

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ADRIANA PERTILLE

**“PAPEL DAS PROTEÍNAS LIGADAS AO CÁLCIO
NO MECANISMO DE PROTEÇÃO À MIONECROSE
NO MODELO EXPERIMENTAL DA DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ADRIANA PERTILLE
Maria Julia Marques
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Co-Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Campinas, 2008

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

P434p	Pertille, Adriana Papel das proteínas ligadas ao cálcio no mecanismo de proteção à mionecrose no modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne / Adriana Pertille. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadores: Maria Júlia Marques, Humberto Santo Neto. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Músculos extra-oculares. 3. Proteínas de ligação do cálcio. 4. Receptores colinérgicos. I. Marques, Maria Júlia. II. Santo Neto, Humberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)
--------------	--

Título em inglês: Role of calcium-binding proteins I the mechanism of sparing from myonecrosis in the experimen tal model of Duchenne muscular dystrophy.

Palavras-chave em inglês: Duchenne muscular dystrophy; Extraocular muscles; Calcium-binding proteins; Cholinergic receptors.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Júlia Marques, Selma Maria Michelin Matheus, Tânia de Fátima Salvini, Leonardo dos Reis Silveira, Rosana Macher Teodori.

Data da defesa: 28/01/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 28 de janeiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini


Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori


Assinatura

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus


Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

Prof. Dr. Marco César Somazz


Assinatura

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira


Assinatura

DEDICATÓRIA

À DEUS...

“Agradecimentos infinitos pela sabedoria que me permitiu adquirir, pela força para conseguí-la e pelo mérito de alcançá-la”

AOS MEUS PAIS, ANTONIO E ALAYDE, MINHA IRMÃ SANDRA...

“Dividi, comigo, os méritos dessa conquista, pois ela vos pertence”

AGRADECIMENTOS

À **toda minha família** pelo incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques** pela confiança e condução dos meus passos nesses oito anos de pós-graduação, que refletiram na minha vida profissional. Expresso meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto pela importante colaboração na co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini que gentilmente permitiu minha entrada em seu laboratório para aprender a técnica de imunoblotting e pelas considerações no exame de pré-banca.

À **Prof. Dra. Selma M. Michelin Matheus** pela orientação na retirada dos músculos extra-oculares e pelas considerações no exame de pré-banca e banca.

À **Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini** pelas considerações no exame de pré-banca e banca.

Aos professores Dr. Leonardo dos Reis Silveira, Dra. Elaine Minatel e Dr. Alexandre L. R. de Oliveira pelas considerações no exame de qualificação.

Aos professores Dr. Marco César Somazz e Dra. Rosana Macher Teodori pela amizade e incentivo no início da minha vida acadêmica.

Ao Sr. Antonio R. Calixto, técnico do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (FCM) pela disposição e paciência em me ensinar a técnica de imunoblotting.

Aos docentes do departamento de Anatomia.

Aos funcionários do departamento de Anatomia, Sr. Norivaldo Celestino, Sr. Marco Aurélio Ribeiro de Paula, Sra. Marlene Lima Francisco e Sra. Ana Floriana Rodrigues.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e à Sra. Liliam Alves Senne Panagio.

Aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular: Renato, Cíntia, Tereza, Cândida, Ana Paula e Rafael que sempre me apoiaram e auxiliaram durante os experimentos.

À **todos os amigos e colegas de trabalho** que nunca me abandonaram.

À **Fapesp** pelo apoio financeiro.

*“A mais bela coragem é a confiança que
devemos ter na capacidade do nosso esforço”
(Autor desconhecido)*

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é caracterizada pela falta de distrofina, proteína estrutural do sarcolema que promove a sua estabilização. Em ausência de distrofina, ocorre aumento da permeabilidade ao cálcio e conseqüente mionecrose. Músculos como tibial anterior, sóleo, diafragma e esternomastóide sofrem ciclos de mionecrose e regeneração muscular. Por outro lado, os músculos extra-oculares (EO) não apresentam degeneração, sendo protegidos da falta da distrofina. A atividade das proteínas ligadas ao Ca^{++} pode ser um dos mecanismos envolvidos para explicar tal proteção. Nossos resultados revelaram aumento significativo do conteúdo da calmodulina (CaM) e quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) no músculos EO *mdx* quando comparado ao controle. A quantidade da calpaína 1 dos músculos EO distróficos foi igual ao controle, confirmando a ausência do processo de degeneração muscular. Também verificamos se alterações no padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (ACh) e dos terminais nervosos, observadas em junções neuromusculares distróficas, são decorrentes da falta da distrofina ou da regeneração da fibra muscular. O padrão de distribuição dos receptores ACh nos músculos retos e oblíquos distróficos, não mostraram alteração quando comparados ao controle. No músculo retrator do bulbo *mdx* (parcialmente afetado pela distrofia) 56% dos receptores apresentaram padrão de distribuição alterado. Nossos resultados sugerem que a distrofina ou o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), não estão diretamente envolvidos na organização dos receptores nos músculos EO.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is characterized by the lack of dystrophin, structural protein that provides stability to the sarcolemma. In the absence of dystrophin, causes increased calcium permeability, leading to myonecrosis. Tibialis anterior, soleus, diaphragm and sternomastoid muscles undergoes myonecrosis and regeneration cycles. However, extraocular muscles (EO) do not show degeneration and are spared of the lack of dystrophin. We investigated whether this protection is related to an activated of calcium-binding proteins. Our results showed significantly increased of calmodulin (CaM) and of the myosin light chain kinase (MLCK) in the *mdx* EO compared to control muscles. Calpain quantity in the dystrophic EO was equal of the control, confirmed the lack of the degeneration muscular processed. We also investigated whether changes in acetylcholine (ACh) receptor distribution at the neuromuscular junction and the nerve terminal, showed in the dystrophic neuromuscular junction, which could be correlated to the lack of dystrophy or the muscle fiber regeneration. Distribution ACh receptor in the dystrophic rectus and oblique exhibited no changes compared to control. In *mdx* retractor bulbi (partial affected by the dystrophy) 56% of the receptor exhibited distribution altered. Taken together, the results suggest the dystrophin or the dystrophin-glycoprotein complex does not influence the distribution of acetylcholine receptors at the neuromuscular junction of spared EO.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh = acetilcolina

Ca⁺⁺ = cálcio

CaM = calmodulina

CDG = complexo distrofina-glicoproteína

CT = controle

DHP = receptor de diidropiridina

DIA = diafragma

DMD = distrofia muscular de Duchenne

EO = extra-ocular

EO- = extra-oculares protegidos (retos e oblíquos)

EO+ = extra-oculares protegidos e afetados

JNM = junção neuromuscular

Mdx = X chromosome-linked muscular dystrophy

MLCK = quinase de cadeia leve da miosina

PMCA = Ca⁺⁺ - ATPase da membrana plasmática

RyR = receptor de rianodina

SERCA = Ca⁺⁺ - ATPase do retículo sarco/endoplasmático

SOL = sóleo

STN = esternomastóide

TA = tibial anterior

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
2. Objetivo	5
3. Revisão da Literatura	7
3.1 Distrofia Muscular de Duchenne	8
3.2 Complexo Distrofina-Glicoproteínas.....	10
3.3 O Cálcio na Distrofia Muscular.....	11
3.4 Músculos Extra-oculares	14
3.5 A Junção Neuromuscular	17
3.6 O Cálcio e Proteínas Ligadas ao Cálcio	19
3.6.1 Calmodulina	21
3.6.2 Calpaína	23
4. Materiais e Métodos	25
4.1 Animais	26
4.2 Técnica de Microscopia de Luz e Fluorescência	26
4.2.1 Grupos Experimentais	26
4.2.2 Microscopia de Luz	27
4.2.3 Microscopia Confocal	27
4.2.4 Imunohistoquímica	28
4.3 Técnica de Immunoblotting	30

4.3.1 Grupos Experimentais	30
4.3.2 Preparação do Extrato Total	30
4.3.3 Eletroforese.....	31
4.4 Anticorpos	32
4.5 Análise dos Dados	33
4.5.1 Microscopia de Luz – análise histológica do processo de degeneração/regeneração..	33
4.5.2 Microscopia Confocal – análise do padrão de distribuição dos receptores de ACh ...	33
4.5.3 Immunoblotting – quantificação das proteínas ligadas ao Ca^{++}	34
5. Artigo Publicado	35
6. Resultados das Proteínas Ligadas ao Ca^{++}	47
6.1 Imunohistoquímica	48
6.2 Immunoblotting.....	48
7. Considerações Finais	54
8. Referências	58
9. Anexo.....	74
9.1 Artigo Submetido	77
9.2 Declaração comitê de ética	104

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que manifesta os primeiros sinais clínicos no início da infância, afetando os músculos cardíaco, esquelético e liso (ENGEL et al., 1994). Caracteriza-se pela falta da distrofina, proteína estrutural do sarcolema que desempenha papel importante na manutenção de sua estabilidade (HOFFMAN et al., 1987; BONILLA et al., 1988; KOENING; KUNKEL, 1990) e em processos de sinalização celular (RANDO, 2001; MARQUES, 2004).

A ausência da distrofina causa instabilidade do sarcolema, aumento da entrada de cálcio e consequente mionecrose (FONG et al., 1990; TURNER et al., 1993; HOPF et al., 1996; ALDERTON; STEINHARDT, 2000). Nos camundongos *mdx*, modelo experimental para a DMD, a mionecrose é observada nos músculos da pata, da mastigação, diafragma e esternomastóide. Por outro lado, os músculos extra-oculares não apresentam degeneração muscular, sendo “protegidos” da falta de distrofina (KHURANA et al., 1995; PORTER; BAKER, 1996; ANDRADE et al., 2000).

O estudo dos músculos extra-oculares (EO) é importante 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 extra-oculares são protegidos ainda não são conhecidos, sendo que uma das possibilidades seria a habilidade intrínseca desses músculos em manter a homeostase do cálcio (KHURANA et al., 1995).

O cálcio (Ca^{++}) é um dos mais importantes mensageiros intracelulares. Alterações na concentração do cálcio citosólico e sua ligação com proteínas e enzimas específicas são essenciais para a contração muscular, secreção, plasticidade neural, metabolismo celular e transcrição gênica (BERCHTOLD et al., 2000; MARTIN et al., 2002; RUEGG et al., 2002).

Dentre as proteínas ligadas ao Ca^{++} destacamos a calmodulina, considerada sensor de Ca^{++} (VOGEL, 1994). Ela modula diretamente a atividade das proteínas quinase e fosfatase (NAIRN; PICCIOTTO, 1994; TOKUWA et al., 1995), dos canais de íons (SAIMI; KUNG, 1994) e da óxido nítrico sintase (REILING et al., 1996). Está envolvida nos processos de proliferação celular, endocitose, adesão celular e contração de músculo liso (ARTALEJO et al., 1996; KUHLMAN et al., 1996).

Experimentos mostram que na ausência da calmodulina ocorre agravamento da mionecrose no músculo sóleo de camundongos distróficos, devido à diminuição da expressão da utrofina (CHAKKALAKAL et al., 2006), proteína que compartilha de seqüência gênica similar à encontrada na distrofina (LOVE et al., 1989).

O Ca^{++} liberado durante a contração muscular pode ativar proteínas quinases dependentes do complexo Ca^{++} /calmodulina, como a quinase da cadeia leve da miosina, que fosforila a miosina (SWEENEY et al., 1993; KAMM; STULL, 2001) aumentando o número de pontes cruzadas, potencializando a contração em fibras musculares de contração rápida (ZHI et al., 2005).

Além disso, o aumento da concentração de Ca^{++} no citosol também ativa proteases dependentes de Ca^{++} , denominadas calpaínas, que se ligam ao citoesqueleto e em proteínas da membrana, sendo importantes no processo de degeneração / regeneração para degradação de proteínas musculares e reorganização do citoesqueleto (RUEGG et al., 2002; OTANI et al., 2004).

No presente trabalho, levantamos a hipótese que nos músculos extra-oculares distróficos, que não apresentam mionecrose, os mecanismos de tamponamento do cálcio seriam mais

eficazes, possivelmente por haver maior quantidade da calmodulina e/ou haver diminuição da calpaína, impedindo a degeneração das fibras musculares.

A distrofina faz parte de um complexo de proteínas e glicoproteínas (complexo distrofina-glicoproteína – CDG), sendo que a ausência de uma proteína modifica a expressão de várias outras, supondo a interdependência entre a distrofina e demais moléculas deste complexo (GILLIS, 1999; DURBEEJ et al., 2000; HACK et al., 2000; GALBIATI et al., 2001). Por estar relacionada à estabilidade do sarcolema, a distrofina também está envolvida na manutenção da organização das dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico da junção neuromuscular, onde os receptores de acetilcolina (ACh) estão agrupados (OHLENDIECK et al., 1991; BEWICK et al., 1992, RUFF, 2003).

Alterações na distribuição dos receptores de ACh são observadas nas junções neuromusculares de camundongos *mdx*, podendo ser consequência do processo de regeneração muscular observado nos músculos distróficos (MINATEL et al., 2001, 2003; MARQUES et al., 2006; MARQUES et al., 2007a) e não pela ausência da distrofina.

Outra hipótese levantada nesse trabalho é que o padrão de distribuição dos receptores de ACh nos músculos extra-oculares distróficos seria normal, visto que esses músculos não apresentam regeneração muscular decorrente da mionecrose.

2. OBJETIVOS

Quantificar as proteínas *calmodulina e quinase da cadeia leve da miosina* e a protease *calpaína* nos músculos extra-oculares distróficos, que não apresentam mionecrose na ausência da distrofina, e em outros músculos afetados pela DMD.

Analisar se as alterações no padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina e dos terminais nervosos dos músculos distróficos estão relacionadas à falta da distrofina ou são decorrentes da regeneração muscular, tal como sugerimos em trabalhos anteriores (MINATEL et al., 2001, 2003).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

A DMD é uma das patologias mais comuns que envolvem lesões musculares (ENGEL et al., 1994; KHURANA et al., 1995). É uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que se manifesta no início da infância, incapacitando o indivíduo de andar próximo da puberdade, levando a morte por volta dos 20 anos de idade, geralmente por broncopneumonia e/ou falência cardíaca (ENGEL et al., 1994; MILLER; HOFFMAN, 1994). Afeta 1 em cada 3.500 meninos nascidos vivos (BRIGUET et al., 2004) e, segundo dados da Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM), estima-se que a cada ano aproximadamente 113 crianças nasçam portadoras de distrofia muscular somente na cidade de São Paulo (http://www.abdim.org.br/dg_numeros.php, acesso em 14/09/2007).

A DMD é causada por uma mutação no gene da distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X, na região Xp21. Em aproximadamente 60% dos pacientes afetados pela DMD ocorre a deleção de DNA (MILLER; HOFFMAN, 1994) e nos 40% dos casos restantes, ocorre um defeito menor, denominado de mutação de ponto (CHATURVEDI et al., 2001).

A mutação no gene resulta na ausência da distrofina, proteína estrutural do sarcolema que desempenha papel importante na manutenção de sua estabilidade (HOFFMAN et al., 1987; BONILLA et al., 1988), conferindo proteção contra danos que podem ocorrer durante a contração muscular (HARRIS et al., 1996) e está envolvida nos processos de sinalização celular (para revisão vide RANDO, 2001; MARQUES, 2004).

A biopsia do músculo esquelético de pacientes com DMD revela a mionecrose ou degeneração da fibra muscular. Observa-se também, em algumas fibras, a presença de núcleo central, característico do processo de regeneração muscular realizado pelas células satélites

(SCHMALBRUCH, 1984; McDOUALL et al., 1990). A regeneração ocorre na fase inicial da doença e é limitada, pois com a progressão do quadro as fibras musculares gradativamente são substituídas por tecido conjuntivo e adiposo (BOCKHOLD et al., 1998).

Os sintomas iniciais são fraqueza dos músculos da cintura pélvica e posteriormente da cintura escapular. À medida que a doença evolui, as contraturas e deformidades limitam os movimentos das articulações do pé, tornozelo, joelho e cotovelo. O indivíduo apresenta dificuldade para subir escadas, caminhar e, para levantar-se do chão, o faz de forma segmentada, numa atitude conhecida como “levantar miopático” (WALTON, 1994). Nos últimos anos de evolução da doença ocorre importante comprometimento da musculatura intercostal, além da escoliose acentuada e comprometimento cardíaco, sendo a utilização de ventilação mecânica freqüente nessa fase, na tentativa de melhorar a qualidade de vida do portador da DMD (WALTON, 1994; JEPPESEN et al., 2003).

Avanços no conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos na DMD ocorrem devido à existência de modelos experimentais para a distrofia muscular. Dentre estes, destaca-se a linhagem de camundongos *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*; BULFIELD et al., 1984). Estes camundongos apresentam miopatia degenerativa hereditária ligada ao cromossomo X, com ausência da distrofina, como observada no humano. É um modelo experimental muito utilizado pelo baixo custo e fácil manutenção. Entretanto, a miopatia do *mdx* difere da doença humana, pois machos e fêmeas são afetados (TORRES; DUCHEN, 1987) e seus músculos regeneram sucessivamente após um período de mionecrose. No animal jovem e adulto o ciclo de degeneração / regeneração é vigoroso, mas no animal idoso o processo de regeneração diminui, persistindo a mionecrose (PASTORET; SEBILLE, 1995).

3.2 COMPLEXO DISTROFINA-GLICOPROTEÍNAS

A distrofina é uma proteína estrutural de 427 kDa, localizada na face citoplasmática do sarcolema (ZUBRZYCKA-GAARN et al., 1988). O domínio carboxila terminal da distrofina liga-se diretamente a proteína transmembrana β -dystroglicana (IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, 1992). O domínio amina terminal da distrofina liga-se a F-actina citoplasmática, formando uma ligação mecânica entre o sarcolema e a miofibrila (RYBAKOVA et al., 2000)

A distrofina é considerada um dos componentes centrais do complexo distrofina-glicoproteínas – CDG (Figura 1), sendo que a ausência dessa proteína modifica a expressão de várias outras, supondo a interdependência entre a distrofina e este complexo (GILLIS, 1999; DURBEEJ et al., 2000; HACK et al., 2000; GALBIATI et al., 2001).

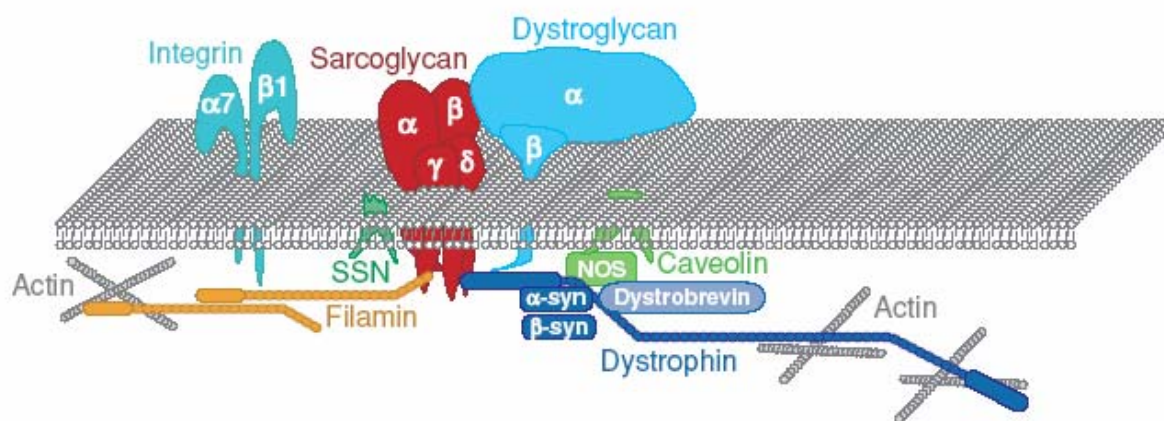


Figura 1 – O complexo distrofina-glicoproteína (CDG). Os principais componentes do CDG são o complexo de sarcoglicanas (Sarcoglycan α , β , γ e δ), o complexo de dystroglicanas (Dystroglycan α e β) e a distrofina (Dystrophin). Através da ligação da laminina no sítio extracelular do sarcolema e da ligação da actina (Actin) no sítio citoplasmático, o complexo promove estabilidade do sarcolema durante as mudanças mecânicas que acompanham a contração muscular. Óxido nítrico sintase neuronal (NOS), distrobrevina (Dystrobrevin), sintrofina (α -syn e β -syn), filamina (Filamin) e sarcospan (SSN) são proteínas adicionais associadas a distrofina (modificado de McNALLY; PYTEL, 2007).

Outra proteína ligada ao CDG, a utrofina, destaca-se por apresentar estrutura e função homólogas a distrofina (LOVE et al., 1989; BLAKE et al., 1996). O domínio da amina terminal da utrofina liga-se a F-actina e o domínio carboxila terminal liga-se ao CDG através da β -dystroglicana. A utrofina está presente no sarcolema do feto, na fibra muscular em regeneração de animais *mdx* e na junção neuromuscular de músculo adulto normal (BLAKE et al., 2002). Estudos realizados em camundongos mutantes para a distrofina e utrofina revelam agravamento no quadro da distrofia muscular, quando comparados aos camundongos *mdx* (GRADY et al., 1997), sugerindo que a utrofina pode compensar, parcialmente, a ausência da distrofina (LOVE et al., 1989; GRADY et al., 1997).

O CDG é considerado um complexo multifuncional envolvido na sinalização celular, com importante papel no mecanismo de defesa e na regulação da sobrevivência da célula (RANDO, 2001). Além disso, o complexo serve para ancorar a fibra muscular na matriz extracelular, onde destaca-se o papel da distrofina no mecanismo de estabilização do sarcolema (HOFFMAN et al., 1987; BONILLA et al., 1988; KOENING; KUNKEL, 1990; MENKE; JOCKUSCH, 1991, 1995; PASTERNAK et al., 1995).

3.3 O CÁLCIO NA DISTROFIA MUSCULAR

Duas hipóteses são levantadas para explicar as mudanças patológicas decorrentes da ausência da distrofina: a hipótese da ruptura da membrana plasmática e a hipótese do aumento do influxo de Ca^{++} através de canais específicos da membrana plasmática (McARDLE et al., 1994; GILLIS, 1999).

De acordo com a hipótese da ruptura da membrana, o sarcolema da fibra distrófica é mais susceptível a lesões. Análises realizadas no plasma sanguíneo mostram aumento na concentração de proteínas citoplasmáticas específicas do músculo estriado, como a mioglobulina, em pacientes portadores de DMD (ZELLWEGER et al., 1972; FLORENCE et al., 1985; ENGEL et al., 1994) e nos camundongos *mdx* (GLESBY et al., 1988; McARDLE et al., 1994), antes mesmo do início da degeneração da fibra muscular. A concentração da creatina quinase, enzima específica da fibra muscular, pode ser até 100 vezes maior nos pacientes de DMD quando comparado ao indivíduo normal (ZELLWEGER et al., 1972).

Em contrapartida, as rupturas do sarcolema permitem a entrada de grandes quantidades de Ca^{++} do meio extracelular para o interior da fibra distrófica, aumentando a atividade de proteases, levando a mionecrose (FONG et al., 1990; TURNER et al., 1993; HOPF et al., 1996; ALDERTON; STEINHARDT, 2000).

Considerando essa hipótese, a contração muscular intensa torna-se um agravante na DMD, pois a força mecânica exercida no músculo aumenta as áreas de ruptura do sarcolema, tornando-o mais frágil e permeável (PETROF et al., 1993). O portador de DMD deve ser orientado a realizar suas atividades com o menor esforço possível, pois movimentos simples como subir escada ou pular corda, se realizadas de forma exagerada, podem acelerar o processo de mionecrose.

A segunda hipótese sobre as mudanças patológicas na distrofia relaciona-se ao aumento do influxo de Ca^{++} através de canais específicos da membrana plasmática da fibra muscular (HOPF et al., 1996; TUTBIDI et al., 1999). O nível elevado de Ca^{++} intracelular livre no citosol foi observado em miotubos e fibras musculares de portadores de DMD (BODENSTEINER; ENGEL, 1978; JACKSON et al., 1985; MONGINI et al., 1988) e de camundongos *mdx*

(TURNER et al., 1988; FONG et al., 1990; TURNER et al., 1991; BAKKER et al., 1993; TURNER et al., 1993; HOPF et al., 1996; TUTDIBI et al., 1999). Entretanto, esse assunto traz controvérsia, pois outros estudos não evidenciam o aumento na concentração de Ca^{++} livre no citosol, nas fibras musculares de portadores de DMD e camundongos *mdx* (HEAD, 1993; RIVET-BASTIDE et al., 1993; GAILLY et al., 1993; PRESSMAR et al., 1994; LEIJENDEKKER et al., 1996).

Os canais específicos de Ca^{++} , como os canais ativados por contração isométrica (stretch-activated channel - SAC) (FRANCO-OBREGON; LANSMAN, 2002; WHITEHEAD et al., 2006), canais que operam segundo o estoque de Ca^{++} (store-operated channel – SOC) (VANDEBROUCK et al., 2001, 2002) e canais que permitem saída de Ca^{++} (Ca^{++} leak channel) (FONG et al., 1990) aumentam suas atividades nas fibras musculares de camundongos *mdx*, permitindo maior influxo de Ca^{++} , o que ativa proteínas e/ou enzimas dependentes de Ca^{++} , levando a degeneração da fibra muscular.

Outros possíveis mediadores da mionecrose seriam as espécies reativas de oxigênio (EROs), pois os músculos distróficos apresentam aumento na sua produção, causando peroxidação lipídica que precede a necrose (DISATNIK et al., 1998). As EROs aumentam a ativação do fator nuclear de transcrição (NF-kappaB), responsável pela regulação da expressão de citocinas pro-inflamatórias, como interleucinas e fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) (KUMAR; BORICK, 2003).

Os parâmetros histológicos mais usados para caracterizar a distrofia no camundongo *mdx* são a determinação da porcentagem de fibras com núcleo central, a variabilidade no tamanho das fibras musculares e acúmulo de tecido conjuntivo (BRIGUET et al., 2004).

Tais alterações são observadas na maioria dos músculos esqueléticos do animal *mdx*, sendo os mais estudados os músculos da pata, da mastigação, diafragma e esternomastóide. Os músculos extra-oculares principais (retos superior, inferior, lateral e medial, e oblíquos superior e inferior) não apresentam sinais de mionecrose, acúmulo de tecido conjuntivo ou núcleo central, sendo protegidos dos efeitos da falta de distrofina (KHURANA et al., 1995; PORTER; BAKER, 1996; ANDRADE et al., 2000). Entretanto, os músculos extra-oculares acessórios (levantador da pálpebra e retrator do bulbo) são parcialmente afetados pela distrofia, fato constatado pela presença do núcleo central (KHURANA et al., 1995; PORTER; BAKER, 1996; ANDRADE et al., 2000; MARQUES et al., 2007a).

Nos músculos da pata de animais *mdx* jovens e adultos a mionecrose é compensada pelo alto índice de regeneração. No animal idoso (65 a 104 semanas de vida) ocorre redução importante do processo regenerativo com consequente aumento da mionecrose (PASTORET; SEBILLE, 1995). Tal fato pode ser atribuído à redução progressiva do número de células satélites e a diminuição da capacidade de proliferação e fusão daquelas células já existentes, como também pela diminuição da função fagocitária das células inflamatórias (ZACKS; SHEFF, 1982).

3.4 MÚSCULOS EXTRA-OCULARES

Os músculos extra-oculares (EO) são responsáveis pelo controle dos movimentos dos olhos e exibem diferenças fundamentais em relação aos demais músculos esqueléticos, no que se refere ao tipo de inervação, morfofisiologia da junção neuromuscular, classificação das fibras musculares e propriedades mecânicas (PORTER et al., 1995; BRON et al., 1997). Essas diferenças os tornam susceptíveis a determinadas doenças, como a miastenia grave e protegidos

de outras, como na DMD (KHURANA et al., 1995; YU WAI MAN et al., 2005, MARQUES et al., 2007a).

Uma das características anatômicas dos músculos EO é a organização laminar em camadas, apresentando uma camada delgada mais externa denominada de orbital (adjacente aos ossos que constituem a órbita) e outra camada mais espessa e interna denominada global (adjacente ao nervo óptico). As camadas apresentam diferenças no diâmetro das fibras musculares, no padrão de inervação, na vascularização e atividade metabólica (MAYR, 1971; PORTER et al., 1991; PORTER et al., 1995; BRUECKNER et al., 1996).

Segundo as características metabólicas e o tipo de inervação (MAYR, 1971; SPENCER; PORTER, 1988), as fibras dos músculos retos e oblíquos são assim classificadas (PORTER, 1995):

⇒ orbital mono-inervada: corresponde a 80% das fibras dessa camada, com características de fibras de contração rápida e inervação presente na porção média de cada fibra.

⇒ orbital poli-inervada: corresponde a 20% das fibras dessa camada, exibe vários terminais nervosos distribuídos ao longo da fibra.

⇒ global vermelha mono-inervada: corresponde a 33% das fibras dessa camada, apresentam contração rápida e alta resistência à fadiga.

⇒ global intermediária mono-inervada: corresponde 24% das fibras dessa camada, apresentam contração rápida e moderada resistência à fadiga.

⇒ global branca mono-inervada: corresponde a 33% das fibras dessa camada, apresentam contração rápida, com junções neuromusculares largas e baixa resistência à fadiga.

⇒ global poli-inervada: corresponde a 10% das fibras, apresenta vários terminais nervosos distribuídos ao longo da fibra. Achados fisiológicos indicam o tipo de contração lenta.

Os músculos levantador da pálpebra e retrator do bulbo (presente em algumas espécies de animais), não exibem essa organização em camadas, como também não apresentam fibras com poli-inervação (PORTER et al., 1995). Diferente dos retos e oblíquos, que não são afetados pela ausência da distrofina, os músculos levantador da pálpebra e retrator do bulbo dos camundongos *mdx* sofrem o processo de degeneração / regeneração, caracterizado pela presença do núcleo central em aproximadamente 50% das fibras de um animal adulto (KARPATI et al., 1988; ANDRADE et al., 2000; MARQUES et al., 2007a).

Inicialmente, acreditava-se que os músculos protegidos poderiam apresentar maior expressão de utrofina, podendo compensar funcionalmente a ausência da distrofina (LOVE et al., 1989). Porter et al. (2003) compararam a expressão gênica de alguns componentes do CDG em músculos da pata e EO e observaram aumento da expressão da utrofina nas fibras do tipo orbital mono-inervada, orbital poli-inervada e global poli-inervada. Entretanto, nos demais tipos de fibra tal aumento não foi significativo, sugerindo que os músculos EO apresentam propriedades constitutivas, e não adaptativas, na proteção a mionecrose.

Uma das possibilidades para explicar a proteção contra a mionecrose dos músculos EO principais (retos e oblíquos) distróficos seria a habilidade intrínseca desses músculos em manter a homeostase do Ca^{++} (KHURANA et al., 1995). Contudo, os mecanismos pelos quais os músculos extra-oculares mantêm a homeostase ainda não são esclarecidos.

3.5 A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

A junção neuromuscular (JNM) é o local de contato entre o terminal nervoso motor e a fibra muscular. Apresenta 3 compartimentos: (1) o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes o terminal nervoso e a célula de Schwann terminal, que envolve a porção não sináptica do terminal; (2) o compartimento extracelular, preenchido pela lâmina basal juncional; (3) o compartimento pós-sináptico, que compreende o sarcolema juncional com os receptores de acetilcolina (ACh) e o sarcoplasma juncional, que proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica (ENGEL et al., 1994).

O sarcolema pós-sináptico é pregueado, contendo dobras juncionais com cerca de 1µm de profundidade (HALL; SANES, 1993). Na dobra juncional existem duas regiões distintas: o ápice, onde os receptores de ACh estão agrupados e o fundo, onde estão os canais de sódio responsáveis de geração do potencial de ação. No ápice das dobras também existem proteínas, que servem de ligação entre o sarcolema e o citoesqueleto da fibra muscular, mantendo a estrutura das dobras juncionais. Entre essas proteínas destacam-se a distrofina, que através da ligação com o CDG une o citoesqueleto abaixo do sarcolema à membrana basal (RUFF, 2003) e a utrofina, co-localizada aos receptores de ACh (OHLENDIECK et al., 1991). A utrofina pode ser uma das moléculas do citoesqueleto responsável por organizar e estabilizar o domínio citoplasmático dos receptores de ACh (TAKEMITSU et al., 1991).

Estudos realizados em camundongos mostram que durante o desenvolvimento da JNM, os receptores ACh aparecem estruturalmente distribuídos em placas compactas e permanecem com esta forma até aproximadamente 2 a 3 dias pós-natal (STEINBACH, 1981; BALICE-GORDON; LICHTMAN, 1993; MARQUES et al., 2000). A seguir, ocorrem falhas no interior dessas placas

até que os receptores atingem seu padrão de distribuição da fase adulta, ou seja, em braços contínuos (BALICE-GORDON; LICHTMAN, 1993; MARQUES; SANTO NETO, 1998; MARQUES et al., 2000), com o terminal nervoso co-localizado.

A maioria das fibras musculares são mono-inervadas e suas junções localizam-se no terço médio do músculo. No entanto, o padrão de distribuição dos receptores observado nos músculos normais de animais adultos é perdido nos músculos distróficos (TORRES; DUCHEN, 1987; LYONS; SALTER, 1991). Anormalidades estruturais ocorrem na JNM de animais *mdx*, principalmente no componente pós-sináptico. Observam-se redução na profundidade da fenda sináptica (TORRES; DUCHEN, 1987), diminuição na marcação da acetilcolinesterase (LYONS; SLATER, 1991), alterações no turnover dos receptores de ACh (XU; SALPETER, 1997) e no padrão de distribuição dos receptores (LYONS; SLATER, 1991; MINATEL et al., 2003).

Na JNM distrófica, os braços contínuos apresentam-se quebrados, formando pequenos aglomerados de receptores, classificados como “ilhas” (BALICE-GORDON; LICHTMAN, 1993; MARQUES; SANTO NETO, 1998; MARQUES et al., 2000, 2005; MINATEL et al., 2001, 2003).

Estudos realizados em camundongos normais que receberam injeções do anestésico local lidocaína, que provoca degeneração da fibra muscular (BENOIT; BELT, 1970), demonstraram o mesmo padrão de distribuição dos receptores ACh encontrado nos animais *mdx*, ou seja, em “ilhas”. Tais resultados sugerem que, aparentemente, a falta da distrofina não está envolvida no padrão de distribuição dos receptores ACh (MINATEL et al., 2001).

3.6 O CÁLCIO E PROTEÍNAS LIGADAS AO CÁLCIO

O cálcio (Ca^{++}) é um dos mais importantes mensageiros intracelulares. Alterações na concentração do cálcio citosólico são essenciais para a contração muscular, secreção, plasticidade neural, metabolismo da célula e transcrição gênica (MARTIN et al., 2002; RUEGG et al., 2002).

No músculo esquelético, a contração muscular se inicia quando a ACh cria um potencial de ação que se propaga através do sarcolema, alcançando os túbulos T. Os receptores sensíveis à voltagem diidropiridina (DHP) abrem os canais de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático adjacente, denominados receptores de rianodina (RyR) (Fig. 2). O Ca^{++} se espalha no citosol, combina-se com a troponina expondo os sítios de ligação da actina, iniciando a contração. Quando a fibra muscular está relaxada, o Ca^{++} em excesso livre no citosol é normalmente transportado para o interior do retículo sarcoplasmático através da Ca^{++} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) ou para fora da célula pela Ca^{++} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) (RUEGG et al., 2002).

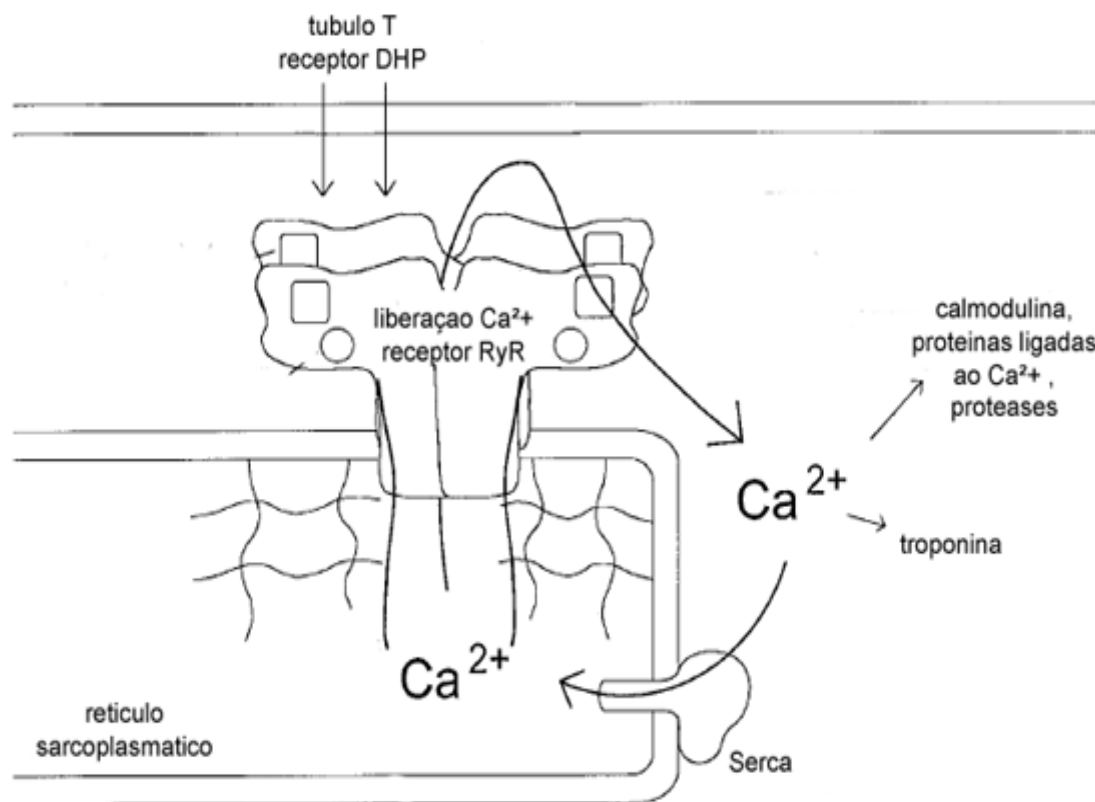


Figura 2. Receptor de rianodina e sua função na liberação de Ca^{++} . A interação entre o receptor de diidropiridina (DHP) e o receptor rianodina (RyR), responsável pela liberação do Ca^{++} do retículo sarcoplasmático, conectam as membranas tubular e do retículo sarcoplasmático. O Ca^{++} liberado do retículo sarcoplasmático via RyR liga-se a troponina para a contração muscular, como também a outras proteínas, desempenhando múltiplas funções (modificado de BERCHTOLD et al., 2000).

O Ca^{++} livre no citosol controla a atividade de enzimas citoplasmáticas e o Ca^{++} do retículo sarcoplasmático está envolvido em processos bioquímicos fundamentais, como a síntese de proteínas de membrana e proteínas secretoras. Distúrbios na concentração de Ca^{++} no retículo endoplasmático têm atraído atenção, pois podem contribuir para processos patológicos que resultam em lesão neuronal (PASCHEN, 2001).

A interação do Ca^{++} com outras moléculas, como a calmodulina (CaM), tem papel fundamental nas funções da fibra muscular, como destacado na tabela abaixo:

Tabela 1. Proteínas ligadas ao Ca^{++} e a CaM e suas funções.

Proteína	Ligação com Ca^{++}	Ligação com CaM	Principal função
Calmodulina	+		Multifuncional
Parvalbumina	+		Transporte da Ca^{++} da miofibrila para o retículo sarcoplasmático
Quinase da cadeia leve de miosina		+	Fosforilação da miosina
Calpaína	+		Protease dependente de Ca^{++}
Calmodulina quinase		+	Quinase multifuncional dependente de Ca^{++}
Receptor de Rianodina	+	+	Canal do retículo sarcoplasmático que libera Ca^{++}
Calsequestrina	+		Proteína do retículo sarcoplasmático que estoca Ca^{++}
Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS)		+	Possível envolvimento no relaxamento muscular
Distrofina		+	Conecta os filamentos de actina ao sarcolema

Fonte: Modificado de BERTOHTOLD et al., 2000

3.6.1 CALMODULINA (CaM)

A CaM, considerada sensor de cálcio (VOGEL, 1994), funciona como receptor e segundo mensageiro para este íon (MEANS, 2000). Ela modula diretamente a atividade das proteínas

quinase e fosfatase (MEANS et al., 1991; NAIRN; PICCIOTTO, 1994; TOKUMA et al., 1995), dos canais de íons (SAIMI; KUNG, 1994) e da óxido nítrico sintase (REILING et al., 1996). Está envolvida em diversos processos como proliferação celular, endocitose, adesão celular e contração de músculo liso (ARTALEJO et al., 1996; KUHLMAN et al., 1996).

Essa proteína apresenta quatro sítios de ligação ao Ca^{++} e é membro de uma grande família de proteínas que se ligam ao Ca^{++} que inclui também a troponina C, a qual desencadeia a contração muscular em resposta ao aumento da concentração de Ca^{++} . Quando ocorre o aumento na concentração de Ca^{++} no citosol, este liga-se a calmodulina formando o complexo Ca^{++} -CaM, que ativa outras proteínas ou enzimas (BERCHTOLD et al., 2000).

Estudos demonstram a associação da CaM com o C-terminal da distrofina, o que sugere uma possível regulação da atividade da distrofina (ANDERSON et al., 1996). Essa associação regula a interação de proteínas, como a distrofina-actina (JARRETT; FOSTER, 1995) e utrofina-actina (WINDER; KENDRICK-JONES, 1995) e também afeta os mecanismos que regulam a sobrevivência da célula (DATTA et al., 1999), pois várias proteínas quinases, incluindo a quinase dependente de CaM, participam no processo celular que regula a apoptose (FRANKLIN; McCUBREY, 2000).

Nos músculos distróficos observa-se redução na atividade de moléculas reguladas pela CaM (NIEBROJ-DOBOSZ et al., 1989) e tanto a CaM, como outras moléculas envolvidas na homeostase do Ca^{++} , têm sido investigadas nesses músculos (CULLIGAN et al., 2002; GAILLY, 2002; MARTIN et al., 2002; RUEGG et al., 2002). A atividade das proteínas ligadas ao Ca^{++} pode ser a chave para explicar a proteção dos músculos EO distróficos contra a mionecrose, considerando a hipótese que o tamponamento do Ca^{++} é eficaz nesses músculos, possivelmente por haver maior quantidade dessas proteínas, como a CaM.

O complexo Ca^{++} -CaM ativa uma série de proteínas quinases, incluindo a quinase da cadeia leve da miosina (Myosin Light Chain Kinase - MLCK), responsável pela fosforilação da miosina e conseqüente contração muscular (STULL, 1996).

A fosforilação da miosina tem papel fundamental na contração do músculo liso (KAMM; STULL, 1985). Entretanto, a MLCK também é expressa no músculo esquelético adulto (HERRING et al., 2000) estando relacionada com o pico de tensão contrátil em fibras de contração rápida (MOORE; STULL, 1984; RYDER et al., 2007).

3.6.2 CALPAÍNA

A calpaína é uma protease dependente de Ca^{++} (SUZUKI et al., 1995; ZHANG et al., 1996). Apresenta duas subunidades com 80 e 30 kDa e está localizada no sarcolema, na mitocôndria e no núcleo (YOSHIZAWA et al., 1995).

Essa protease adere ao citoesqueleto e a proteínas da membrana, sendo importante na degradação de proteínas musculares e posterior reorganização do citoesqueleto, favorecendo o crescimento da fibra muscular ou sua regeneração (KWAK et al., 1993).

Os mecanismos que levam a ativação da calpaína são controversos e complexos (CARAFOLI; MOLINARI, 1998), mas estudos revelam que o aumento na concentração de Ca^{++} livre no citoplasma causa a ativação da calpaína (MELLGREN, 1987), levando à morte da célula (SPENCER et al., 1995; MARIOL; SEGALAT, 2001).

Análises realizadas em biópsias de músculo esquelético de portadores da DMD revelam aumento na concentração de Ca^{++} e de calpaína (BODENSTEINER; ENGEL, 1978), sendo o mesmo resultado encontrado em músculos de animais *mdx* (SPENCER et al., 1995). Por outro

lado, o aumento da expressão da calpastatina, inibidor endógeno da calpaína, preveniu a mionecrose em animais *mdx* (SPENCER; MELLGREN, 2002), levando ao acúmulo de proteínas no músculo, como GLUT4, e a hipertrofia (OTANI et al., 2004).

Estudos revelam a interação entre a calpaína e a utrofina. O aumento de Ca^{++} intracelular resulta no aumento da ativação da calpaína e redução significativa da utrofina em cultura de miotubos, sugerindo que na DMD o aumento da atividade da calpaína pode contribuir para a instabilidade do sarcolema devido à degradação da utrofina (COURDIER-FRUH; BRIGUET, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 36 camundongos adultos (2 a 3 meses de idade) de ambos os sexos, sendo 18 da linhagem *mdx* e 18 C57Bl/10ScSn utilizados como controle, os quais são heterozigotos para o gene que desencadeia a distrofia muscular e deram origem à linhagem *mdx* (BULFIELD et al., 1984). Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, em caixas plásticas padrão, com condições ambientais adequadas (12 horas de ciclo claro/escuro), com ração e água *ad libitum*. O trabalho foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP e aprovado (Protocolo nº 1169-1)

4.2 Técnica de Microscopia de Luz e Fluorescência

4.2.1 Grupos Experimentais

4.2.1.1 - Grupo Músculos Extra-oculares

Constituído por todos os músculos extra-oculares retos superior, inferior, medial e lateral, oblíquos superior e inferior, retrator do bulbo e levantador da pálpebra de camundongos *mdx* e C57BL/10ScSn.

4.2.1.2 – Grupo Músculos da Pata

Constituído pelos músculos tibial anterior (TA) e sóleo (SOL) de camundongos *mdx* e C57BL/10. Esses músculos apresentam grande comprometimento muscular decorrente da falta da distrofina.

4.2.2 Microscopia de Luz

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intra-peritonial (0,2 ml: 20g de peso corporal) e perfundidos com 20 ml de paraformaldeído 2%.

Para o desenvolvimento dessa técnica foram utilizados 4 animais *mdx* e 4 controles, sendo retirados: a órbita direita (com todos os músculos EO), TA e SOL direito de cada animal.

Após a retirada os músculos foram fixados em suportes de madeira com tragacanth gum, imersos em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70°C. Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23°C e seccionados transversalmente utilizando criostato (Microm-HS505E), com espessura variando entre 8 e 10 µm. Os cortes foram seriados, coletados em lâmina, corados com Hematoxilina e Eosina para análise da localização do núcleo e da área das fibras musculares.

4.2.3 Microscopia Confocal

Para análise da distribuição dos receptores de acetilcolina e dos terminais nervosos foi utilizado o microscópio confocal da BioRad (MRC 1024). Os animais foram sacrificados com hidrato de cloral 10% e após perfusão com 20 ml de tampão fosfato (PBS) e 20 ml de paraformaldeído a 2%.

Para o desenvolvimento dessa técnica foram utilizados 3 animais *mdx* e 3 controles, sendo os seguintes músculos fixados *in situ* e retirados separadamente: 4 retos, 2 oblíquos, levantador da pálpebra e retrator do bulbo, TA e SOL direito e esquerdo de cada animal.

Os músculos foram retirados, um a um, e presos pelas extremidades em uma cuba, com auxílio de alfinetes. Foram então lavados com PBS e incubados com glicina 0,1M por 20 minutos em agitador orbital (FANEM 255-B), para inativar o fixador. Depois de lavados com PBS, foram incubados com colagenase 1% (Tipo I-Sigma) por 20 minutos no agitador, para que o tecido conjuntivo que resta preso aos músculos se desprendesse. A seguir foram lavados com PBS e os receptores ACh marcados com α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Tetramethylrhodamine alpha-bungarotoxin; T-1175; Molecular Probes; Rh-BTX, 1:100 em PBS) durante 30 minutos no agitador. Posteriormente, os músculos foram lavados com PBS e incubados com triton 1% durante 1 hora, para permeabilização das fibras musculares. Em seguida, lavados com PBS e com a finalidade de bloquear ou diminuir a marcação inespecífica do anticorpo primário foram incubados com uma solução bloqueadora composta de 125 μ l de triton X-100, 1 ml de soro albumina bovina - BSA, diluídos em 23,8 ml de PBS, durante 24 horas. Após esse período foram incubados com anticorpo primário (anti-neurofilamento, 1:100 em solução bloqueadora), a 4°C por 12 horas. Posteriormente, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário (anti-mouse IgG - FITC, 1:100 em solução bloqueadora) por 3 horas. A seguir, foram lavados e montados em lâmina sob lamínula em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma), para posterior observação ao microscópio confocal.

4.2.4 Imunohistoquímica

Para análise da localização da CaM na fibra muscular foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intra-peritônio (0,2 ml: 20g de peso corporal) e perfundidos com 20 ml de paraformaldeído 2%.

Para o desenvolvimento dessa técnica foram utilizados 4 animais *mdx* e 4 controle, sendo retirados: a órbita esquerda (com todos os músculos EO), TA e SOL esquerdo de cada animal.

Os músculos foram retirados e fixados em suportes de madeira com tragacanth gum, imersos em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C e posteriormente foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70°C. Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23°C e seccionados transversalmente utilizando criostato (Microm-HS505E), com espessura variando entre 8 e 10 µm. Os cortes foram seriados, coletados em lâmina, lavados com tampão fosfato (PBS; 14g de fosfato de sódio monobásico, 4,3g de fosfato de potássio dibásico anidro e 72g de cloreto de sódio em 1 litro de água destilada, pH 7.5) por 10 minutos e posteriormente lavados com Triton 1%, durante 10 min. Após esse período, as lâminas foram secadas e lavadas com PBS. Em seguida, o material permaneceu em solução bloqueadora composta de glicina 1%, BSA 3%, leite desnatado 2%, soro fetal bovino 8%, triton X-100 - 0,6%, durante 1 hora. Após esse período, os músculos foram incubados com o anticorpo primário para calmodulina durante 24 horas. No dia seguinte, foram lavados e incubados com anticorpo secundário durante 2 horas. Após lavagens, as lâminas foram montadas com lamínula em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma) e observadas em microscópio óptico de fluorescência Nikon.

4.3 Técnica de Immunoblotting

4.3.1 Grupos Experimentais

4.3.1.1 - Grupo Músculos Extra-oculares (EO+)

Constituído pelos músculos extra-oculares protegidos: retos superior, inferior, medial e lateral, oblíquos superior e inferior e afetados: retrator do bulbo e levantador da pálpebra de camundongos *mdx* e C57BL/10ScSn. Os músculos afetados apresentam mionecrose parcial decorrente da falta da distrofina.

4.3.1.2 – Grupo Músculos Extra-oculares Protegidos (EO-)

Constituído pelos músculos extra-oculares protegidos: retos superior, inferior, medial e lateral, oblíquos superior e inferior. Os músculos protegidos não apresentam mionecrose decorrente da falta da distrofina.

4.3.1.3 – Grupo Tibial Anterior e outros músculos

Constituído pelos músculos tibial anterior (TA), sóleo (SOL), diafragma (DIA) e esternomastóide (STN) de camundongos *mdx* e C57BL/10ScSn. Esses músculos apresentam grande comprometimento muscular decorrente da falta da distrofina.

4.3.2 Preparação de Extrato Total

Após sinais de anestesia, o animal foi perfundido com PBS. Para o desenvolvimento dessa técnica foram utilizados 11 animais *mdx* e 11 controles, sendo os seguintes músculos retirados: EO, TA, SOL, DIA, STN direito e esquerdo de cada animal. Considerando o grupo EO, a órbita direita foi destinada para constituir o grupo EO+, formado por todos os músculos extra-

oculares e a órbita esquerda destinada para constituir o grupo EO-, onde os quatro retos e dois oblíquos foram isolados.

Em média, a cada 3 animais sacrificados de cada grupo (controle e *mdx*), os músculos retirados eram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente em tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina), com volume variando entre 300 a 1000 ul, a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. O extrato total para a calpaína foi composto apenas de Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

4.3.3 Eletroforese

As amostras dos extratos protéicos foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM e aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 30 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 10 % (MLCK e calpaína) ou 15% (para a CaM) em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Foram obtidos 4 extratos protéicos por grupo (controle e *mdx*) dos animais sacrificados, que resultou em 8 géis para cada proteína analisada. A

eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10µg de anticorpo primário diluído em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce) por 5 minutos, seguido de exposição a um filme Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, N.Y, USA).

4.4 Anticorpos

4.4.1 – Anticorpos Primários:

Calmodulina; CaMI; F1-149; sc-5537; Santa Cruz.

Quinase de cabeça leve da miosina; MLCKsk; R-19; sc-9456; Santa Cruz

Calpaina; Calpain 1; N-19; sc-7531; Santa Cruz

Anti-neurofilamento-monoclonal 200; N-5389; Sigma.

4.4.2 - Anticorpos secundários:

Anti-mouse IgG (whole molecule) FITC Conjugate antibody developed in goat; F-0257; Sigma.

Anti-rabbit IgG (whole molecule) FITC Conjugate antibody developed in goat F-0382; Sigma.

HRP-anti rabbit IgG (H+L); Sinapse

HRP-anti goat IgG (H+L); Sinapse

4.5 Análise dos Dados

4.5.1 Microscopia de Luz – análise histológica do processo de degeneração/ regeneração

A contagem dos núcleos centrais foi realizada através de um retículo de cem pontos acoplado à ocular do microscópio óptico em objetiva de 40x, com auxílio de contador manual.

Para medida da área da fibra muscular foi utilizado o microscópio óptico Axioskop Zeiss, locado no Departamento de Anatomia – IB. Cada corte foi focado em objetiva de 40x e a imagem captada por videocâmera e analisada pelo programa Image-Pro. Foram definidos três campos aleatoriamente e cada fibra muscular foi medida com o auxílio do mouse, o que permitiu obter a área em micrômetros².

4.5.2 Microscopia Confocal – análise do padrão de distribuição dos receptores de ACh

Para medida da área da junção neuromuscular e de cada aglomerado de receptores foi utilizado o sistema confocal da Bio-Rad (MRC 1024UV), equipado com lasers Argônio-Kriptônio (Ar-Kr) e Ultra-Violeta (UV), acoplado a um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 100 Zeiss). Foi utilizada a objetiva de 40x (1.2 NA, imersão em água). As medidas foram feitas usando o Softer Processing da Bio-Rad. Para o índice da área da junção

neuromuscular, foi considerando o maior eixo longitudinal (comprimento) e transversal (largura) do aglomerado de receptores. Para cada segmento de receptor, foi medido o seu eixo longitudinal (comprimento) e transversal (largura) e realizada a razão entre comprimento e largura. Foram classificados como “braços contínuos” aqueles em que a razão era maior que 1.5 e como “ilhas” aqueles segmentos de receptores em que a razão era igual ou menor que 1.5 (MARQUES et al., 2005, 2007).

4.5.3 Immunoblotting – quantificação das proteínas ligadas ao Ca^{++}

As bandas observadas na técnica de immunoblotting foram escaneadas e salvas em discos de computador para posterior quantificação da densitometria óptica, usando um scanner e o programa Image J (The National Institute of Health, EUA).

A avaliação dos dados foi feita através do programa Excel®, considerando média, desvio padrão, Teste *T Student*.

5. RESULTADOS ANÁLISE HISTOLÓGICA E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO RECEPTORES DE ACh

The Anatomical Record 290(7):846-54, 2007.

Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction.

Estudos realizados em nosso laboratório (MINATEL et al., 2003) sugeriram que alterações na distribuição dos receptores de acetilcolina (ACh) de músculos distróficos são consequência do processo de regeneração muscular e não da ausência da distrofina. No presente trabalho levantamos a hipótese que o padrão de distribuição dos receptores de ACh nos músculos EO (retos e oblíquos) distróficos seria normal, visto que esses músculos não apresentam regeneração muscular decorrente da mionecrose.

Através da microscopia confocal analisou-se o padrão de distribuição dos receptores de ACh e do terminal nervoso nos músculos EO protegidos (retos e oblíquos) e afetado (retrator do bulbo) de animais adultos *mdx*. Os músculos tibial anterior e sóleo também foram analisados.

Os resultados mostraram que **os músculos retos e oblíquos distróficos** não apresentam marcação para a distrofina (Figura 1D, p.40), bem como degeneração muscular, acúmulo de tecido conectivo e fibras com núcleo central (Tabela 1, p.39; Figura 1A, p. 40).

Nesses músculos, os receptores de ACh estavam distribuídos em braços contínuos (Figura 2B-D, p.41; Tabela 2, p.42) e “*en grappe*” (Figura 3B, p.43) com o terminal nervoso colocalizado (Figura 3A-B, p.43). O mesmo padrão de distribuição foi observado no controle (Figura 2A, p.41; Tabela 2, p.42).

Diferente dos músculos EO protegidos, **no músculo retrator do bulbo** observou-se 45% das fibras musculares com núcleo central (Tabela 1, p.39; Figura 1B, p.40) e 56% dos receptores de ACh apresentaram padrão de distribuição em ilhas (Tabela 2, p.42; Figura 3D, p.43; Figura 4B-D, p.44). O terminal nervoso era ramificado em delicados prolongamentos com botões nas

extremidades que preenchem o centro dos receptores (Figura 3D, p.43). No músculo retrator do bulbo controle não foram observadas fibras com núcleo central (Tabela 1, p.39) e o padrão de distribuição dos receptores de ACh foi em braços contínuos (Tabela 2, p.42; Figura 3C, p.43; Figura 4A, p.44), com terminal nervoso co-localizado (Figura 3C, p.43). O padrão em ilhas também foi observado nos **músculos tibial anterior e sóleo** de animais distróficos (Figura 5B-C, p.44, Tabela 1, p.39; Tabela 2, p.42).

O padrão de distribuição dos receptores de ACh em músculos retos e oblíquos normais foi observado em microscopia confocal (KHANNA et al., 2003), demonstrando a presença de junções em braços e “*en grappe*”. As junções em braços são tipicamente encontradas em fibras musculares mono-inervadas e de contração rápida (SPENCER; PORTER, 1988; KHANNA et al., 2003) e as junções “*en grappe*” são encontradas em fibras musculares multi-inervadas com contração tônica (KHANNA et al., 2003).

No músculo retrator do bulbo controle foi observado padrão de distribuição em braços contínuos, como descrito por Khanna et al. (2003) e terminal nervoso cobrindo os braços de receptores. No animal mdx, 56% das junções apresentam os braços quebrados, caracterizando o padrão em ilha. Nestas junções, o terminal nervoso possuía finos prolongamentos com botões nas extremidades, ocupando o centro das ilhas, semelhante ao encontrado nos músculos esternomastóide (SANTO NETO et al., 2003) e da pata (LYONS; SLATER, 1991).

Os resultados sugerem que a distrofina ou o complexo distrofina-glicoproteínas, não estão diretamente envolvidos na organização dos receptores nos músculos EO. A alteração no padrão de distribuição dos receptores é consequência do processo de regeneração da fibra muscular distrófica, tal como sugerido anteriormente (MINATEL et al., 2003).

Acetylcholine Receptor Organization at the Dystrophic Extraocular Muscle Neuromuscular Junction

MARIA JULIA MARQUES,* ADRIANA PERTILLE,
CANDIDA LUIZA T. CARVALHO, AND HUMBERTO SANTO NETO

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

ABSTRACT

Spared extraocular muscles of dystrophic mice are not subjected to regeneration process and can be used to verify whether the lack of dystrophin per se could cause changes in acetylcholine receptor (AChR) distribution. In the present study, rectus and oblique (spared) and retractor bulbi (nonspared) muscles were dissected from adult control (C57Bl/10) and *mdx* mice. AChRs and nerve terminals were labeled with rhodamine- α -bungarotoxin and anti-NF200-IgG-FITC, respectively, and visualized by confocal microscopy. Rectus and oblique muscles presented 0.5% central nucleation, while retractor bulbi had central nucleation in 45% of muscle fibers. In *mdx* rectus, AChRs were distributed in branches in 99% of the junctions examined ($n = 200$), similar to that observed for controls. Nerve terminals covered the AChR branches in 100% of the junctions examined. In control retractor bulbi, AChRs were distributed in regular branches. In *mdx* retractor bulbi, multiple fragmented islands of receptors were seen in 56% of the endplates examined ($n = 200$). These results suggest that the lack of dystrophin per se does not influence the distribution of acetylcholine receptors at the neuromuscular junction of spared extraocular muscles. *Anat Rec*, 290:846–854, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: acetylcholine receptors; extraocular muscles; *mdx* mice; muscle regeneration; neuromuscular junction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive degenerative disease that affects cardiac, skeletal, and smooth muscle (Engel et al., 1994). It is caused by a mutation in the dystrophin gene, which encodes a large structural protein, dystrophin (Hoffman et al., 1987). There is a general concept that the lack of dystrophin causes membrane destabilization and increased calcium entry into the muscle fiber, leading to myonecrosis (Bertorini et al., 1982). In the *mdx* mouse model of DMD (Bulfield et al., 1984) which also completely lacks dystrophin, myonecrosis is followed by muscle regeneration (Torres and Duchon, 1987; Lyons and Slater, 1991).

Dystrophin and the dystroglycan complex play a key role in the anchoring of several molecules such as acetylcholine receptors (AChRs; Xu and Salpeter, 1997). Changes in AChR distribution are also observed in the *mdx* muscle (Torres and Duchon, 1987; Lyons and Slater,

1991; Personius and Sawyer, 2005) and parallel those seen in normal regenerated muscle fibers (Minatel et al., 2001), suggesting that these changes are a secondary

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Grant numbers: 95/6110-2, 01/00670-4, 04/15526-9 and 05/55719-3; Grant sponsor: Conselho Nacional de Pesquisas; Grant numbers: 302880/04-6, 306689/06-5.

*Correspondence to: Maria Julia Marques, PhD, Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP-13083-970, Brazil. Fax: 55-19-3289-3124. E-mail: marques@unicamp.br

Received 27 June 2006; Accepted 12 February 2007

DOI 10.1002/ar.20525

Published online 9 May 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

consequence of muscle fiber necrosis and regeneration rather than a direct consequence of dystrophin deficiency (Lyons and Slater, 1991; Minatel et al., 2003).

Dystrophin is also deficient in the spared extraocular muscles (EOMs) of *mdx* mice, rectus and oblique (Porter et al., 1998). However, in contrast to other muscle groups, these muscles do not show muscle fiber degeneration (Krurana et al., 1995; Porter and Baker, 1996; Andrade et al., 2000). Therefore, spared EOMs are not subjected to the regeneration process and can be used to find out if the lack of dystrophin per se could cause a change in acetylcholine receptor distribution.

In the present study, we used fluorescence confocal microscopy to investigate the pattern of AChR and nerve terminal distribution in spared (rectus and oblique) and nonspared (retractor bulbi) extraocular muscles of *mdx* mice, and we found that the lack of dystrophin does not have any influence on the distribution of acetylcholine receptors in spared extraocular muscles of *mdx* mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult *mdx* mice (5–6 months old) and control C57BL/10 ScSn mice were obtained from the mouse breeding colony of the State University of Campinas and were housed on a 12-hr light/dark cycle with free access to water and standard rodent chow until the time of use. All experiments were done in accordance with the guidelines for the use of animals set forth by our Institution.

Muscle Preparation

The mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of chloral hydrate (600 µg/kg) and perfused intracardially with phosphate-buffered saline (PBS), followed by freshly prepared cold fixative (4% paraformaldehyde in PBS). Globes with intact extraocular muscles and associated connective tissue were obtained by orbital dissection. Individual rectus, oblique, and retractor bulbi muscles were carefully dissected from their origin to insertion. Next, the muscles (from 5 *mdx* and 5 C57BL/10 mice) were placed in a Sylgard dish and washed with PBS for confocal microscopy observation of neuromuscular junction organization. Enucleated specimens from five *mdx* and five C57BL/10 mice were dissected out and snap frozen with isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C for hematoxylin and eosin and dystrophin labeling.

Light Microscopy

Frozen globes were cross-sectioned (8-µm-thick cryostat sections) transverse to the globe axis. Sections from globes were collected and mounted on coated microscope slides. Some sections were stained with hematoxylin and eosin and examined with a light microscope. The numbers of normal and regenerated muscle fibers (indicated by the presence of central cell nuclei) were counted with a hand counter.

Immunofluorescence

Other sections were air-dried, hydrated for 30 min with PBS, incubated with 0.3% Triton X-100 for 10 min, and then blocked with blocking solution (1% glycine, 3%

TABLE 1. Total number of fibers, percentage of fibers with central nuclei, and muscle fiber area for each extraocular and limb muscles, in control and *mdx* mice^a

	Control				<i>Mdx</i>			
	Rectus/ Oblique	Retractor bulbi	Tibialis anterioris	Soleus	Rectus/ Oblique	Retractor bulbi	Tibialis anterioris	Soleus
Total no. of fibers	569 ± 98	375 ± 96	1,728 ± 168	600 ± 19	581 ± 87	298 ± 70	1,825 ± 93	558 ± 60
Fibers with central nuclei (%)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	45 ± 1.5*	51.5 ± 1.5*	65 ± 2.5*
Muscle fiber area (µm ²)	527 ± 310	652 ± 261	1,836 ± 597	1,560 ± 431	504 ± 232	730 ± 304	2,135 ± 794	1,574 ± 640

^aValues are reported as means ± SD.

*P < 0.05, significantly different from control (Student's *t*-test).

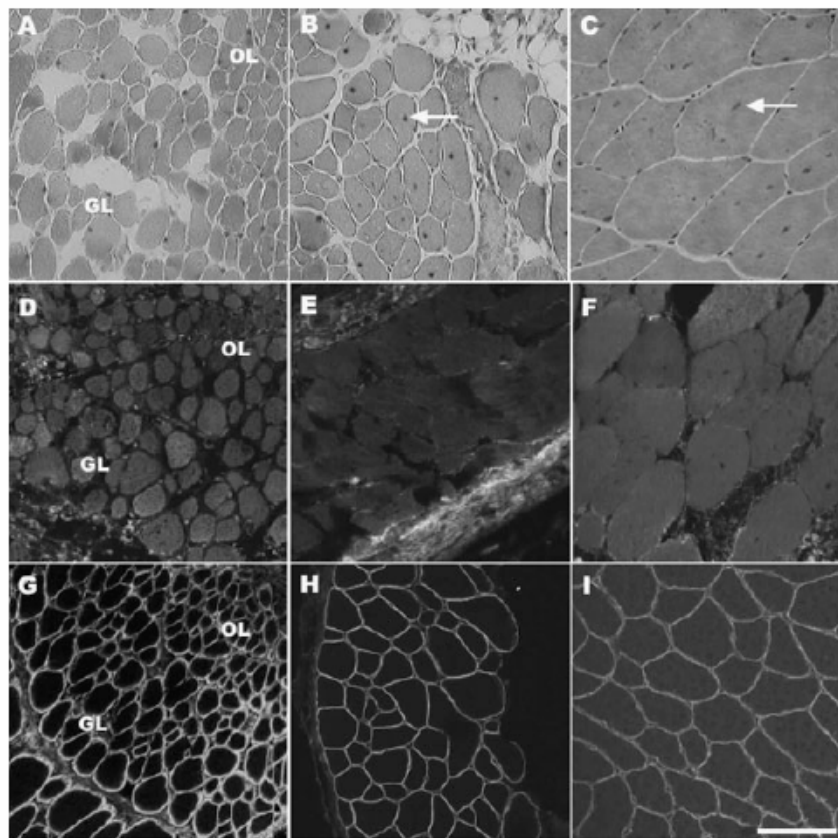


Fig. 1. A–I: Muscle regeneration (A–C) and dystrophin expression (D–I) in spared and nonspared extraocular muscles. **A:** Central nucleated fibers were not seen in dystrophic rectus muscles. **B,C:** Dystrophic retractor bulbi (B) and tibialis anterioris (C) showed central nucleated fibers (arrows). **D–F:** Dystrophin-negative fibers were typically seen in *mdx* rectus (D), retractor (E), and tibialis anterioris (F). **G–I:** Control rectus (G), retractor (H), and tibialis anterioris (I) showed positive labeling for dystrophin. Orbital layer (OL) and global layer (GL) of rectus muscle. A–C, hematoxylin and eosin staining. D–I, immunofluorescence. Scale bar = 20 μ m in A,B,D,E,G,H, 50 μ m in C,F,I.

bovine serum albumin [BSA], and 0.6% Triton X-100 in PBS; Sigma) for 3 hr. The sections were incubated with dystrophin antibody (NCL-DYS1, mouse monoclonal antibody, Novocastra, 1:500) overnight at 4°C. The sections were washed with PBS and incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma; 1:500) for 1 hr at room temperature. Sections were washed with PBS and cover-slipped with DABCO (Sigma) mounting medium for fluorescence microscopy and observed under a confocal microscope.

Control mounts for the primary antibody were incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma; 1:500) in blocking solution instead of the primary antibody. No stained structures were seen in these controls. Approximately 200 neuromuscular junctions were examined for each group (normal and *mdx*).

For the study of the molecular organization of the neuromuscular junction, adult *mdx* mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (0.6 g/kg) and perfused intracardially with PBS followed by freshly prepared cold fixative (2% formaldehyde in PBS). Right and left extraocular muscles were removed, placed in a Sylgard dish and washed with PBS. The muscles were initially incubated with rhodamine- α -bungarotoxin (Rh-BTX; Molecular Probes, 1 μ g/ml) and then with 0.1 M glycine (Sigma) followed by a blocking solution (1% glycine, 3% BSA, and 0.6%

Triton X-100 in PBS; Sigma). The primary antibody used was a mouse monoclonal anti-NF200 (Sigma, 1:500). After washing with PBS, the muscles were incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, 1:500) and again washed with PBS. The muscles were mounted in DABCO (mounting medium for fluorescence microscopy, Sigma) for observation as a whole-mount preparation by confocal microscopy.

The tibialis anterioris and soleus muscles of each mice had their acetylcholine receptors labeled the same way as described above for comparison with EOMs, because limb muscles show differences in terms of fiber typing, are mainly monoinnervated, and are severely affected by the lack of dystrophin.

Confocal Microscopy

A dual-channel Bio-Rad laser confocal system (MRC 1024UV) mounted on a Zeiss Axiovert 100 inverted microscope equipped with an Ar-Kr laser was used to observe labeled muscle fiber endplates. The 488-nm line was used to excite the fluorescein-labeled nerve terminal in muscle whole-mounts or dystrophin-labeled sections and the 568-nm line was used to excite the rhodamine-labeled receptors. Manufacturer-supplied software (Bio-Rad Acquisition and Processing) was used to control image acquisition and processing. The settings for con-

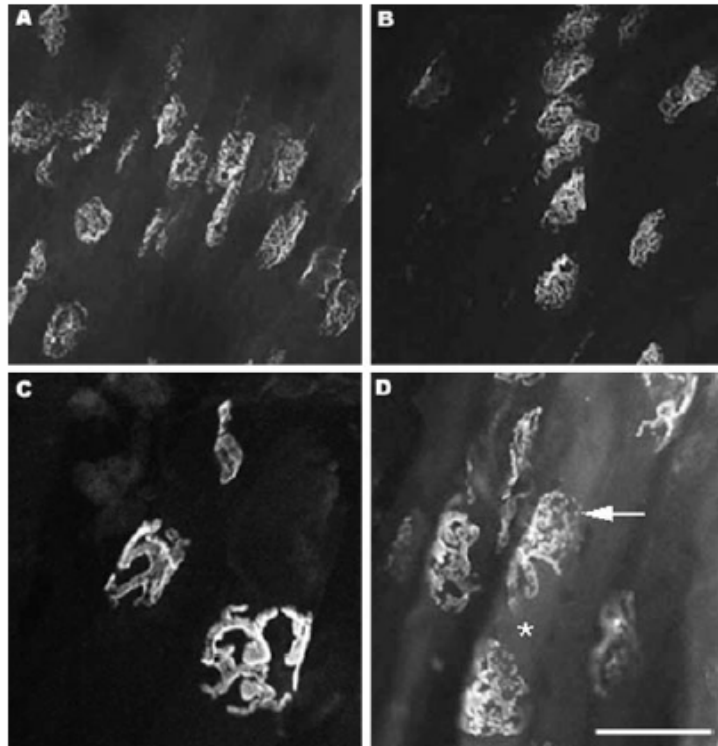


Fig. 2. Acetylcholine receptor (AChR) distribution in spared extraocular muscles. A and B show receptor topography at the endplate band. A–D: Continuous branches of AChRs are typically seen in controls (A) and dystrophic muscles (B–D). In D, muscle fiber (asterisk) with two distinct endplates zones and small discrete AChR regions (arrow). Scale bar = 100 μ m in A,B, 60 μ m in C,D.

trast, brightness, and iris diameter were adjusted and kept unchanged during all observations of control and *mdx* muscles. Two Zeiss microscope objectives were used for confocal imaging: a $\times 40$ 1.4 NA water immersion objective and a $\times 63$ 1.4 NA oil immersion objective. For each endplate studied, 1- to 2- μ m-thick optical sections were obtained from the bottom to the top of the endplate. Each optical section was added to a stack of images using the Bio-Rad data processing software and a single image was then built to allow observation of the whole endplate with all its branches within the same focal plane.

Based on previous observations of AChRs labeled with alpha-bungarotoxin and light microscopy (Lyons and Slater, 1991; Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Marques and Santo Neto, 1998; Marques et al., 2000, 2005; Minatel et al., 2001, 2003), junctions were qualitatively assigned according to the pattern of AChR distribution as “branched” and “islands.” The length and width of each of the AChRs clusters in an endplate were calculated. Briefly, lines following individual AChRs clusters were made with the mouse cursor (see Fig. 4, inset) and the values were automatically obtained using the Bio-Rad processing software for digital measurement. We determined that AChRs clusters with a length/width ratio equal to or less than 1.5 are classified as islands (Marques et al., 2005; Marques et al., 2007). The neuromuscular junction length and width were calculated as the maximum length of the junction in the long axis of the muscle fiber and the maximum width of the junction in the orthogonal axis, using the Bio-Rad processing

software for digital measurement. Comparisons between groups were made using the Student's *t*-test or the χ^2 test.

RESULTS

Histological Characteristics and Dystrophin Labeling

Mdx extraocular rectus and oblique muscles did not show any signs of muscle fiber degeneration, connective tissue accumulation, or central nuclei, characteristic of regenerated muscles (0.5% of regenerated fibers; Table 1; Fig. 1A). The *mdx* retractor bulbi exhibited central nucleated muscle fibers (45% of regenerated fibers; Table 1; Fig. 1B). There were no differences in the total number of fibers and fiber area between *mdx* and control mice for rectus, oblique, or retractor bulbi muscles (Table 1).

Dystrophin distribution was characterized by a bright outline in the sarcolemma of control muscles (Fig. 1G–I). No dystrophin labeling was observed in any dystrophic muscle studied (Fig. 1D–F). The orbital and global layers did not show any differential expression of dystrophin, with the two layers being negative in the *mdx* (Fig. 1D).

Neuromuscular Junction Organization

Mdx and control rectus and oblique muscles displayed a distinct innervation band in the muscle midbelly. The junctions located in this endplate zone were mainly

850

MARQUES ET AL.

TABLE 2. Length (μm) and width (μm) of each of the AChRs branches and islands in an endplate and the percentage of junctions showing the branch and islands patterns in the spared (rectus) and nonspared (retractor bulbi) EOMs and in the limb muscle (tibialis anterior) from control and *mdx* mice^a

	Control			<i>Mdx</i>		
	Rectus	Retractor bulbi	Tibialis anterioris	Rectus	Retractor bulbi	Tibialis anterioris
Length	40.1 $\pm$ 10.6	37.2 $\pm$ 9.0	68.3 $\pm$ 3.6	45.6 $\pm$ 11.0	9.8 $\pm$ 6.8*	9.6 $\pm$ 0.8*
Width	8.5 $\pm$ 1.7	7.4 $\pm$ 2.7	14.4 $\pm$ 4.0	10.7 $\pm$ 2.7	7.6 $\pm$ 2.2	6.8 $\pm$ 1.3*
Length/width***	4.7	5.0	4.7	4.2	1.2	1.4
Pattern of AChR distribution (%)	Branch (100%)	Branch (100%)	Branch (100%)	Branch (99%)	Island* (56%)	Island* (100%)

^aValues represent the mean $\pm$ SD. n = 1,000 branches/muscle.

*Significantly different from respective control ($P < 0.05$, Student *t*-test and χ^2).

***Length/width ratio values equal to or less than 1.5 were used to classify the AChRs clusters as islands (Marques et al., 2007). AChR, acetylcholine receptor.

TABLE 3. Neuromuscular junction length and width obtained for each extraocular and limb muscles, in control and *mdx* mice^a

	Control			<i>Mdx</i>		
	Rectus/Oblique	Retractor bulbi	Tibialis anterioris	Rectus/Oblique	Retractor bulbi	Tibialis anterioris
Junctional length (μm)	44.6 $\pm$ 13.6	46.3 $\pm$ 16.3	76.3 $\pm$ 18.7	42.5 $\pm$ 7.8	31.8 $\pm$ 8.0	61.1 $\pm$ 15.6
Junctional width (μm)	18.3 $\pm$ 7.2	17.0 $\pm$ 4.6	29.0 $\pm$ 6.3	17.8 $\pm$ 5.4	13.6 $\pm$ 4.0	23.5 $\pm$ 5.5

^aValues are reported as means $\pm$ SD. n = 200 endplates/muscle.

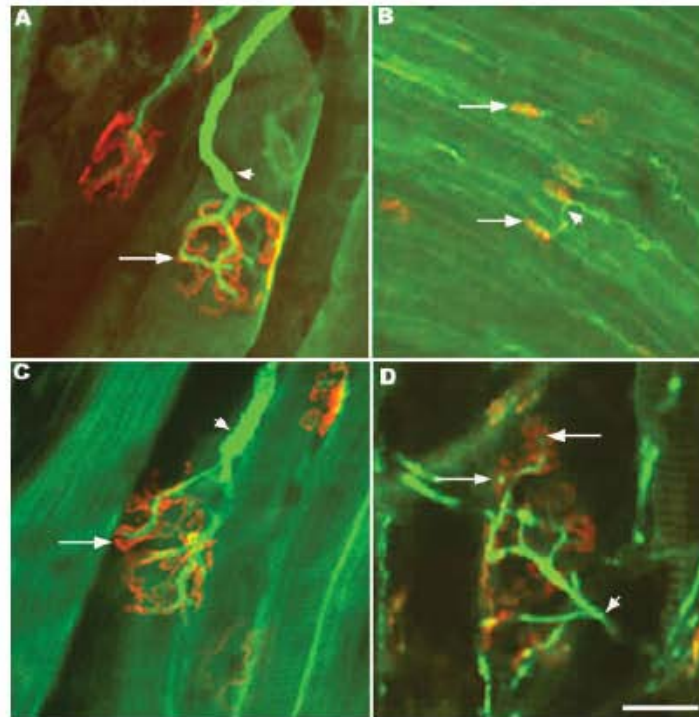


Fig. 3. A–D: Acetylcholine receptor (red) and nerve terminal (green) distribution in branched (A,C,D) and *en grappe* (B) neuromuscular junctions. A: Branches of receptors covered by continuous processes of nerve terminal, seen in *mdx* rectus muscle (arrow). B: *En grappe* junctions, characterized by small plaques of receptors without much resolvable substructure and no-branched nerve terminals, scattered along the muscle fiber from *mdx* rectus muscle (arrows). C: Neuromuscular junction from control retractor bulbi showing continuous processes of nerve terminal covering receptor branches (arrow). D: The *mdx* retractor bulbi. Nerve terminal with bulbous enlargements filling the center of receptors islands (arrows). Preterminal axon (short arrows in A–D). Scale bar = 30 μ m in A,C, 45 μ m in B, 15 μ m in D.

monoinnervated (Fig. 2A,B). A few fibers (2%) showed two distinct AChR-rich areas in the same fiber, suggesting their multiple innervation (Fig. 2D). In *mdx* muscles, AChRs displayed the typical organization pattern described elsewhere as *en plaque* junctions (Khanna et al., 2003) or pretzel-like (Marques et al., 2000). The pretzel or branched pattern is classically described for the adult normal junction (Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Marques et al., 2000) and consists of elongated, smoothly fluorescent branches forming continuous channels that run in several orientations along the muscle fiber. Branches were longer than wider (Table 2). Some junctions (3–4%) showed small discrete AChR regions (Fig. 2D). The same pattern of AChR distribution was seen in control junctions (Fig. 2A; Table 2). Most of the endplates were large and oval, with a variable width of 15 μ m (obliques) to 18 μ m (rectus superior) and length of 30 μ m (obliques) to 44 μ m (rectus superior; Table 3). Nerve terminals covered the branches of the receptors with fine and continuous processes (Fig. 3A).

Controls and *mdx* rectus and oblique muscles also exhibited small endplates scattered along the length of the fibers proximal and distal to the central endplate zone (Fig. 3B). These junctions were classified elsewhere as *en grappe* (Khanna et al., 2003) and were characterized by small plaques of receptors, approximately 5.4 μ m wide and 17 μ m long, without much resolvable substructure and no-branched nerve terminals. No differences were seen between *mdx* and control muscles regarding the pattern of AChR and nerve terminal distribution at these smaller endplates.

AChRs in the *mdx* retractor bulbi muscles were distributed in islands (Table 2). The island pattern was characterized by round fluorescent areas with a brighter outline and a dark center (Fig. 4B–D), resembling the pattern of AChR distribution seen in limb *mdx* muscles (Fig. 5B,C). The islands showed approximately the same dimensions in the two axes (Table 2), and have been described before for the *mdx* junctions (Lyons and Slater, 1991), for regenerated fibers after a crush lesion (Rich and Lichtman, 1989) and after lidocaine injection (Minatel et al., 2001; Marques et al., 2005). No quantitative differences were seen in AChR pattern of distribution between *mdx* retractor bulbi and limb muscles ($P > 0.05$; Student's *t*-test and χ^2 test; Table 2). In controls, receptors were distributed in regular and continuous branches in retractor (Fig. 4A) and tibialis anterioris (Fig. 5A). In *mdx* muscles, nerve terminals showed fine arborizations with bulbous enlargements that filled the center of the AChR spots (Fig. 3D). In control retractor bulbi, nerve terminals presented continuous processes that covered the AChR branches (Fig. 3C).

DISCUSSION

The histopathological analysis of EOMs showed that, despite dystrophin deficiency, *mdx* rectus and oblique muscles did not show central nucleated fibers, indicative of muscle fiber regeneration. Muscle regeneration was readily visible in retractor bulbi muscles of the same animal, in agreement with the literature (Pastoret and Sebillé, 1995; Porter and Baker, 1996). Therefore, the

852

MARQUES ET AL.

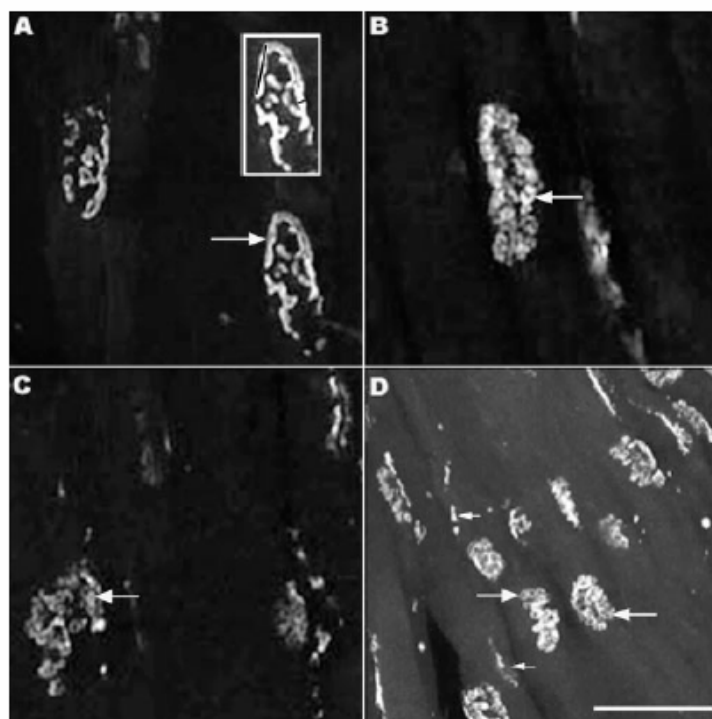


Fig. 4. Acetylcholine receptor (AChR) distribution in nonspared retractor bulbi. **A:** In controls, AChRs are distributed in continuous branches (arrow). **B–D:** Islands of receptors with a bright outline and a dark center are seen in dystrophic retractor bulbi junctions (arrows). **D:** Scattered patches of receptors along the length of the muscle fiber, away from the endplate region could be seen (short arrows) and may represent distinct and less organized junctional zones. The inset shows how the length (longer dark line on the left) and width (shorter dark line on the right) of each branch of AChRs were obtained. Scale bar = 50 μ m in A–C, 100 μ m in D.

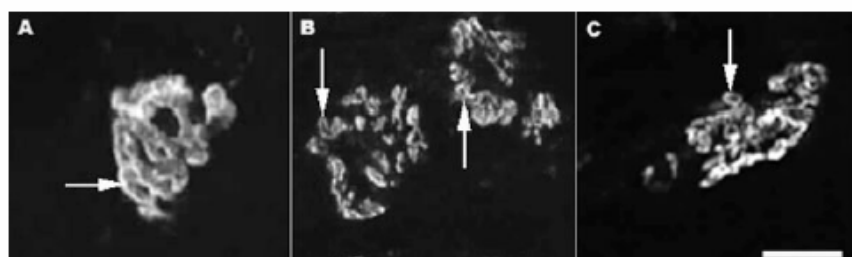


Fig. 5. Acetylcholine receptor (AChR) distribution in limb muscles. **A:** In control tibialis anterioris, AChRs are distributed in branches (arrow). **B,C:** Islands of receptors with a bright outline and a dark center are seen in dystrophic tibialis (B, arrows) and soleus (C, arrow) junctions. Scale bar = 35 μ m.

study of *mdx* rectus and oblique muscles allowed us to verify whether the absence of dystrophin per se would affect acetylcholine receptor distribution at the neuromuscular junction.

The pattern of acetylcholine receptor distribution in control rectus and oblique muscles was closely similar to observations made by confocal (Khanna et al., 2003) and scanning electron microscopy (Desaki, 1990), demonstrating the presence of branched and *en grappe* junctions. The branched junctions are typically seen in singly innervated muscle fibers and show a twitch contraction response (Spencer and Porter, 1988; Khanna et al., 2003), whereas *en grappe* junctions are seen in multiply innervated muscle fibers with a tonic response (Khanna et al., 2003). At the present, no branched junctions were innervated by more than one nerve terminal, but a few fibers showed two distinct endplate regions.

In the dystrophic rectus and oblique muscles, the pattern of AChR organization was indistinguishable from the control muscles. No qualitative differences were seen in the pattern of receptor distribution in the branched and *en grappe* junctions, and no islands of receptors, usually seen in other adult dystrophic muscles, were noted (Lyons and Slater, 1991; Minatel et al., 2003). Hence, these results show that the lack of dystrophin or a normal dystrophin–glycoprotein complex does not interfere with the pattern of AChR distribution at the neuromuscular junction, which is in agreement with a previous report on dystrophic neuromuscular junction development (Minatel et al., 2003).

The pattern of AChR distribution in the control retractor bulbi was similar to that described in the literature (Khanna et al., 2003). In the *mdx* retractor bulbi, receptors were distributed in islands and nerve terminals

showed thin profiles that may represent intraterminal sprouts, which dictate the organization of AChRs into islands (Santo Neto et al., 2003). Thus, the pattern of AChR distribution in the dystrophin-deficient fiber of nonspared extraocular muscles is altered in the presence of muscle fiber regeneration, which is in agreement with previous observations in other muscles (Lyons and Slater, 1991; Minatel et al., 2001). It would be interesting to verify whether limb muscles share biochemical and structural properties with EOMs, such as contraction times and myosin heavy chain components that might explain why some muscles are affected while others are not.

Extraocular muscles present a laminar organization, with an outer orbital layer and an inner global layer, which show differences of gene expression, mainly those genes related to metabolic pathways and structural elements of muscle and nerve (Budak et al., 2004). We observed that both layers were negative for dystrophin, suggesting a common mechanism of protection. Neuronal nitric oxide synthase, which is able to correct defects in neuromuscular junction in dystrophic muscles (Shiao et al., 2004) is decreased in the extraocular muscle of *mdx* mice (Wehling et al., 1998). Utrophin, which can be up-regulated in the dystrophic fiber, seems to not be altered in dystrophic extraocular muscles (Porter et al., 1998, 2003). It would be interesting to see whether molecules of the dystrophin-glycoprotein complex related to calcium, such as calmodulin (Anderson et al., 1996; Rando, 2001) can be up-regulated in dystrophic rectus and oblique muscles and could explain their protection against the lack of dystrophin.

Although the importance of dystrophin and the DGC cannot be excluded (Kong and Anderson, 1999; Banks et al., 2003, 2005), the present results show that the lack of dystrophin or a normal dystrophin glycoprotein complex do not have any influence on the distribution of acetylcholine receptors in spared extraocular muscles of *mdx* mice, which is in agreement with other studies showing a normal pattern of AChR distribution during development of dystrophic junctions (Minatel et al., 2003).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Kerstin Markendof for the English revision. H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Pesquisas.

LITERATURE CITED

- Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. 1996. Ca^{2+} -Calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 271:6605–6610.
- Andrade FH, Porter JD, Kaminski HJ. 2000. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? *Microsc Res Tech* 8:192–203.
- Ballice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1993. In vivo observation of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci* 13:834–855.
- Banks GB, Fuhrer C, Adams ME, Froehner SC. 2003. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and utrophin/dystrophin-associated complex. *J Neurocytol* 32:709–726.
- Banks GB, Chamberlain JS, Froehner SC. 2005. Dystrophin is required to stabilize neuromuscular synapses independent of muscle regeneration. In: Society's Annual Meeting, 35, Washington, DC. Abstract view. Online. Program No. 493.17.
- Bertorini TE, Bhattacharya SK, Palmieri GMMA, Chesney CM, Pifer D, Baker B. 1982. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 32:1088–1092.
- Budak MT, Bogdanovich S, Wiesen MHJ, Lozynska O, Khurana TS, Rubinstein NA. 2004. Layer-specific differences of gene expression in extraocular muscles identified by laser-capture microscopy. *Physiol Genom* 20:55–65.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1189–1192.
- Desaki J. 1990. The morphological variability of neuromuscular junctions in the rat extraocular muscles: a scanning electron microscopical study. *Arch Histol Cytol* 53:275–281.
- Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. 1994. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. New York: McGraw-Hill. p 1133–1187.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919–928.
- Khanna S, Richmonds CR, Kaminski HJ, Porter JD. 2003. Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1918–1926.
- Kong J, Anderson JE. 1999. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Res* 839:298–304.
- Khurana TS, Predergast RA, Alameddine HS, Tome FM, Farden M, Arshata K, Sugita H, Kunkel LM. 1995. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. *J Exp Med* 182:467–474.
- Lyons PR, Slater CR. 1991. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult *mdx* mice. *J Neurocytol* 20:969–981.
- Marques MJ, Santo Neto H. 1998. Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J Anat* 192:425–430.
- Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. 2000. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci* 20:3663–3675.
- Marques MJ, Mendes ZTR, Minatel E, Santo Neto H. 2005. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers. *J Neurocytol* 34:387–396.
- Marques MJ, Taniguti AP, Minatel E, Santo Neto H. 2007. Nerve terminal contributes to acetylcholine receptor organization at the dystrophic neuromuscular junction of *mdx* mice. *Anat Rec* 290:181–187.
- Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. 2001. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. *Muscle Nerve* 24:410–416.
- Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. 2003. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. *Muscle Nerve* 28:561–569.
- Pastoret C, Sebille A. 1995. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 129:97–105.
- Personius KE, Sawyer RP. 2005. Terminal Schwann cell structure is altered in diaphragm of *mdx* mice. *Muscle Nerve* 32:656–663.
- Porter JD, Baker RS. 1996. Muscles of a different color: the unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology* 46:30–37.
- Porter JD, Rafael JA, Ragusa RJ, Brueckner JK, Trickett JJ, Davies KE. 1998. The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J Cell Sci* 111:1801–1811.
- Porter JD, Merlam AP, Khanna S, Andrade FH, Richmonds CR, Leahy P, Cheng G, Karathanasis P, Zhou X, Kusner LL, Adams ME, Willem M, Mayer U, Kaminski HJ. 2003. Constitutive prop-

- erties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic mdx mice. *FASEB J* 17:893–895.
- Rando TA. 2001. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24:1575–1594.
- Rich M, Lichtman JW. 1989. Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers. *Neuron* 3:677–688.
- Santo Neto H, Martins JA, Minatel E, Marques MJ. 2003. Axonal sprouting in mdx mice and its relevance to cell and gene mediated therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Neurosci Lett* 343:67–69.
- Shiao T, Fond A, Deng B, Wehling-Henricks M, Adams ME, Froehner SC, Tidball JG. 2004. Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking α - and β 1-syntrophins. *Hum Mol Genet* 13:1873–1884.
- Spencer RF, Porter JD. 1988. Structural organization of the extraocular muscles. In: Buttner-Ennever JA, editor. *Reviews in oculomotor research*. New York: Elsevier. p 33–79.
- Torres LF, Duchon LW. 1987. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscle and endplates. *Brain* 110:269–299.
- Xu R, Salpeter M. 1997. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *J Neurosci* 17:8194–8200.
- Wehling M, Stull JT, McCabe TJ, Tidball JG. 1998. Sparing of mdx extraocular muscles from dystrophic pathology is not attributable to normalized concentration or distribution of neuronal nitric oxide synthase. *Neuromuscul Disord* 8:22–29.

6. RESULTADOS DAS PROTEÍNAS LIGADAS AO CÁLCIO

6.1 Imunohistoquímica

O padrão de distribuição da calmodulina (Figura 3) foi similar nos músculos normais e distróficos. Os músculos retos, retrator do bulbo e tibial anterior apresentaram distribuição das proteínas em todo o sarcoplasma, não se observando diferença entre os músculos afetados e protegidos da mionecrose.

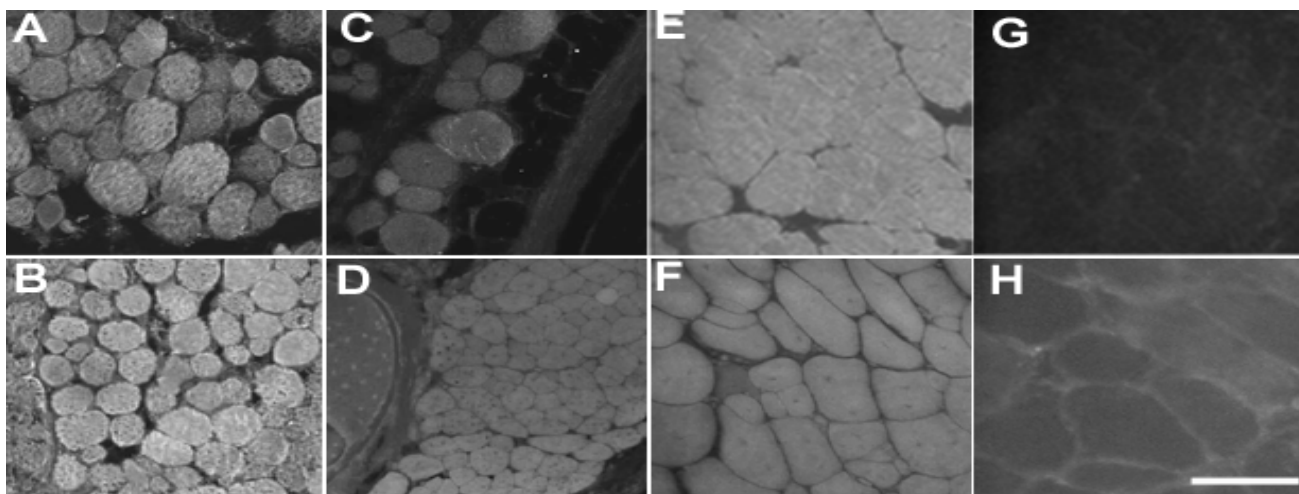


Figura 3 – Localização da calmodulina nos músculos extra-oculares: retos controle (A) e mdx (B), retrator do bulbo controle (C) e mdx (D), e tibial anterior controle (E) e mdx (F). Não foram observadas diferenças na distribuição da calmodulina entre os músculos controle e distróficos. Controle negativo do músculo extra-ocular controle (G) e mdx (H) incubação apenas com o anticorpo secundário. Escala A-C 25 μ m, D 20 μ m, E-H 50 μ m.

6.2 Immunoblotting

A análise do immunoblotting da calmodulina (CaM) mostrou aumento significativo no conteúdo dessa proteína nos músculos EO distróficos, quando comparado ao controle, não sendo observada diferença entre os grupos EO+ e EO-. Houve aparente diminuição do conteúdo da calmodulina nos músculos da pata, esternomastóide e diafragma quando comparados ao controle, mas esta diminuição não foi significativa (Figuras 4).

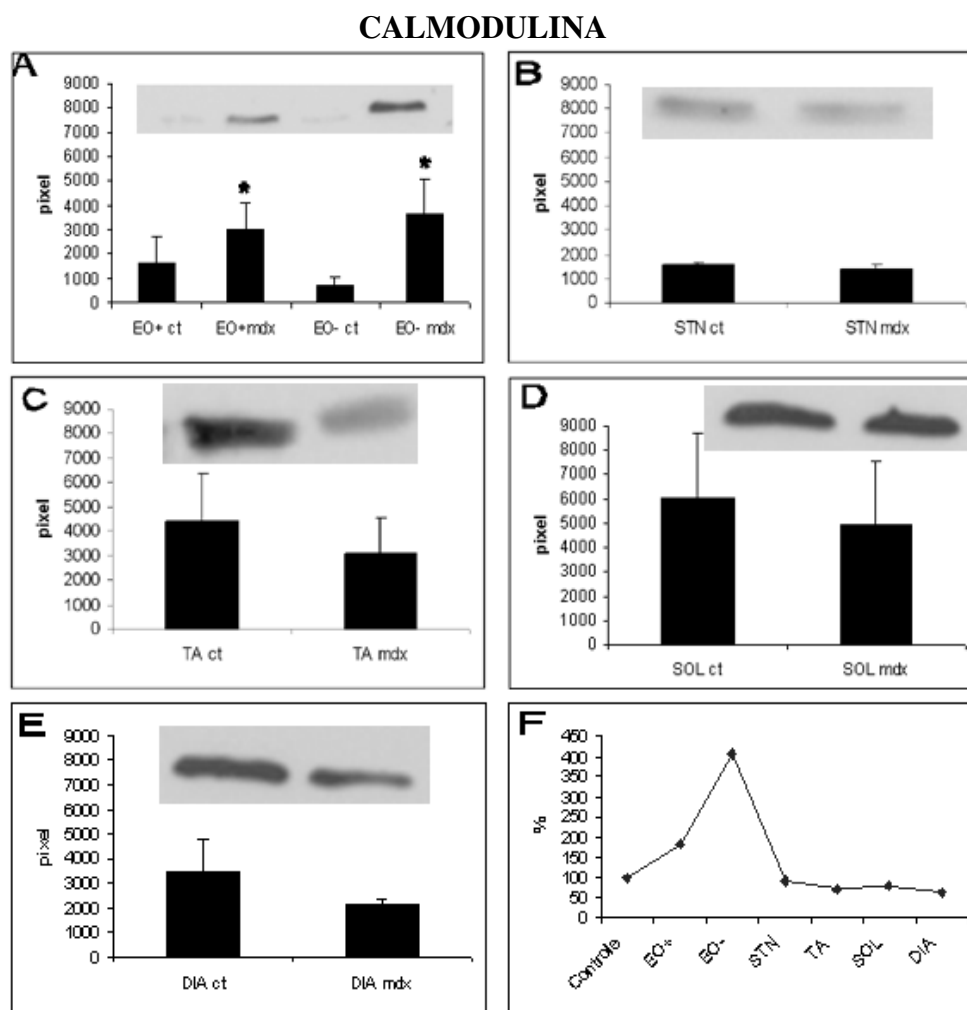


Figura 4. Conteúdo de CaM (18kDa) observado nos músculos controle e mdx. **Em A - E** representação gráfica em pixels do conteúdo da CaM e os respectivos imunoblotting mostrando as bandas imunoreativas dos músculos estudados comparando controle e mdx; * diferença significativa entre controle e mdx nos grupos EO+ ($p=0,03$) e EO- ($p=0,017$). **Em F:** representação gráfica em porcentagem do aumento ou diminuição do conteúdo da CaM, considerando os respectivos músculos normais como controle 100% comparado aos músculos EO+, EO-, STN, TA, SOL e DIA mdx.

Os níveis normais da CaM observados nos músculos distróficos da pata, esternomastóide e diafragma, podem estar relacionados à presença da utrofina no sarcolema extrajuncional (Vide trabalho submetido). Estudos demonstram que a CaM regula a interação

entre a utrofina e F-actina, sugerindo que nos músculos distróficos a ausência da distrofina é compensada pelo aumento da expressão da utrofina (WINDER; KENDRICK-JONES, 1995).

Dentre os músculos controle, o SOL apresentou maior conteúdo de CaM e o EO- o menor. Nos músculos distróficos, o SOL manteve o maior conteúdo, sendo que o menor observado no STN. O grupo EO- distrófico apresentou conteúdo de CaM equivalente ao TA controle.

Quando ocorre aumento na concentração de Ca^{++} no citosol, este liga-se a CaM formando o complexo Ca^{++} -CaM, que ativa outras proteínas ou enzimas (BERCHTOLD et al., 2000). Esse complexo desencadeia a ativação de proteínas quinases, como a quinase de cadeia leve da miosina (Myosin Light Chain Kinase - MLCK), responsável pela fosforilação da miosina e conseqüente contração muscular (STULL, 1996).

Nesse trabalho foi analisada a expressão dessa proteína no músculo esquelético, como um indicativo indireto da atividade da CaM. O resultado foi similar ao encontrado na CaM, ou seja, aumento significativo no conteúdo da MLCK nos músculos EO distróficos, quando comparado ao controle, não sendo observada diferença entre os grupos EO+ e EO- (Figura 5A).

Dentre os músculos controle, o TA apresentou maior conteúdo de MLCK e o EO- o menor. Nos músculos distróficos, o TA manteve o maior conteúdo, sendo que o menor observado no DIA (Figura 5) .

QUINASE DE CADEIA LEVE DA MIOSINA

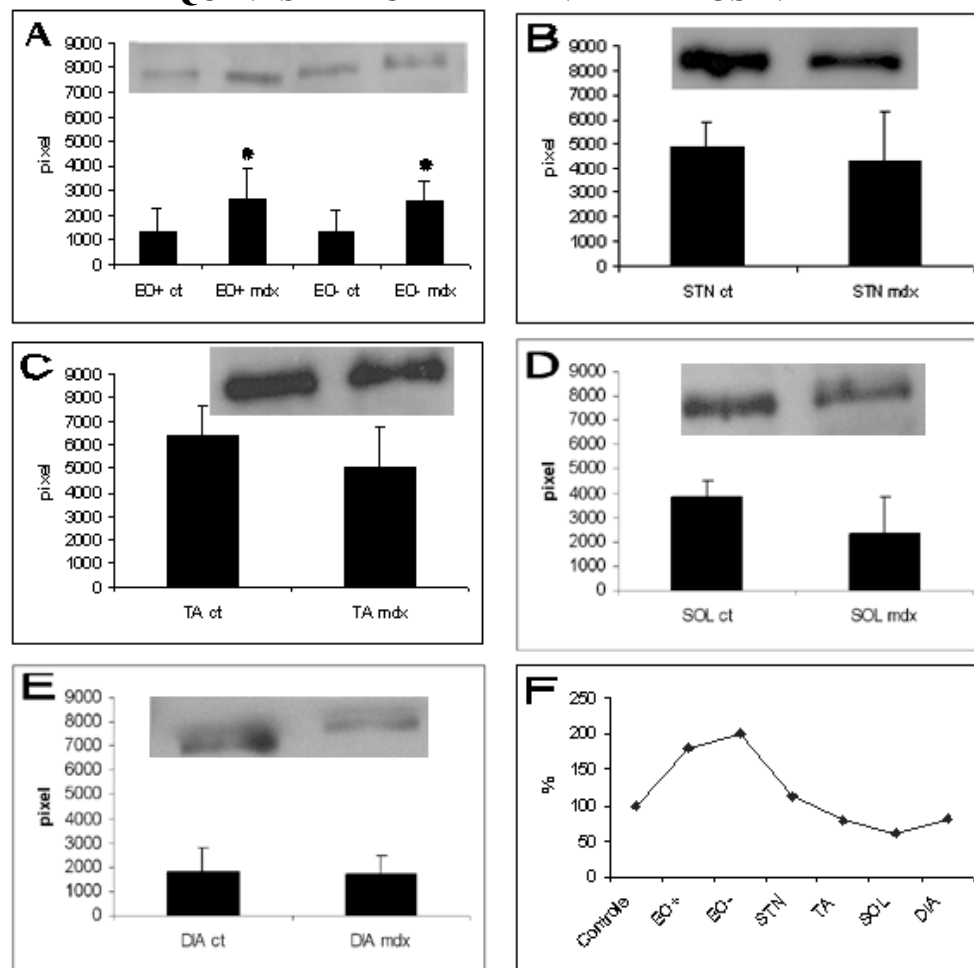


Figura 5. Conteúdo de MLCK (68kDa) observado nos músculos controle e mdx.

Em A - E representação gráfica em pixels do conteúdo da MLCK e os respectivos imunoblotting mostrando as bandas imunoreativas dos músculos estudados comparando controle e mdx; * diferença significativa entre controle e mdx nos grupos EO+ ($p=0,012$) e EO- ($p=0,018$). **Em F:** representação gráfica em porcentagem do aumento ou diminuição do conteúdo da MLCK, considerando os respectivos músculos normais como controle 100% comparado aos músculos EO+, EO-, STN, TA, SOL e DIA mdx.

No músculo esquelético adulto, a MLCK está relacionada ao pico de tensão em fibras de contração rápida (MOORE; STULL, 1984; RYDER et al., 2007). Como observado na Figura 5C, o músculo tibial anterior, que possui a maioria das fibras do tipo II, apresentou maior conteúdo da MLCK no controle e *mdx*, quando comparados aos demais músculos.

Em relação a calpaína 1, os resultados mostraram aumento significativo no músculo STN (Figura 6B) e conteúdo normal nos músculos EO+, EO-, TA, SOL e DIA dos animais *mdx* (Figura 6).

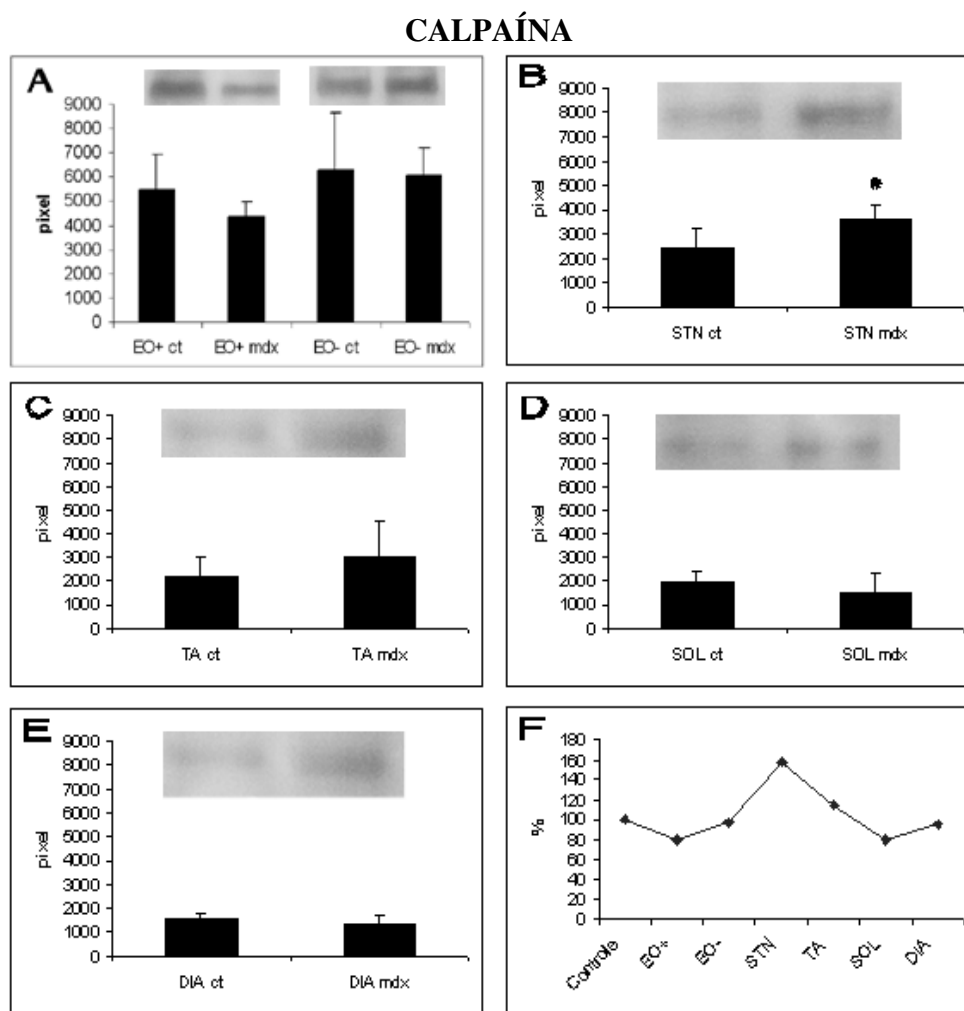


Figura 6. Conteúdo de calpaína 1 (80kDa) observado nos músculos controle e mdx.

Em A - E representação gráfica em pixels do conteúdo da calpaína 1 e os respectivos imunoblotting mostrando as bandas imunoreativas dos músculos estudados comparando controle e mdx; * diferença significativa entre controle e mdx no músculo STN ($p=0,02$). **Em F:** representação gráfica em porcentagem do aumento ou diminuição do conteúdo da calpaína 1, considerando os respectivos músculos normais como controle 100% comparado aos músculos EO+, EO-, STN, TA, SOL e DIA mdx.

A quantidade de calpaína está associada ao processo de degeneração que acomete os músculos distróficos. Assim como nos pacientes portadores de DMD, em camundongos *mdx* os músculos esqueléticos não são igualmente comprometidos (RAGUSA et al., 1996, 1997; PORTER et al., 1998).

Músculos com maior massa muscular como, por exemplo, os músculos quadríceps femoral e gastrocnêmio, são mais intensamente afetados que músculos com menor massa (MULLER et al., 2001). Comparado ao tibial anterior, o sóleo apresenta pico precoce de necrose, compatível à época de desmame e aumento da mobilidade do animal (PASTORET; SEBILLE, 1995).

O músculo diafragma também é significativamente afetado (PETROF et al., 1993), provavelmente como consequência da sua atividade contínua como músculo inspiratório (STEDMAN et al., 1991), levando a um alto nível de lesões da fibra muscular. Por outro lado também é possível que o diafragma tenha diminuição da sua capacidade regenerativa após lesões (MATECKI et al., 2004).

Nossos resultados sugerem que no animal *mdx* com 2 meses de idade, o músculo que apresenta maior pico de necrose é o STN. Nos músculos da pata e DIA, aparentemente, o processo de degeneração está diminuído, como observado em estudo realizado em nosso laboratório (MARQUES et al., 2007b).

Nos músculos EO+ e EO- distróficos, o conteúdo da calpaína 1 foi igual ao controle, confirmando a ausência do processo de degeneração nesses músculos. Dentre os músculos controle, o EO apresentou maior conteúdo de calpaína e o DIA o menor. Nos músculos distróficos, o mesmo padrão foi observado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos músculos extra-oculares (EO) é importante 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 conhecidos, sendo que uma das possibilidades seria a habilidade intrínseca desses músculos em manter a homeostase do cálcio (KHURANA et al., 1995).

Levantamos a hipótese que nos músculos EO distróficos, os mecanismos de tamponamento do cálcio podem ser mais eficazes, possivelmente por haver maior conteúdo da calmodulina (CaM) e diminuição da calpaína, impedindo a degeneração das fibras musculares.

Nossos resultados revelaram aumento significativo do conteúdo da CaM no músculos EO *mdx* quando comparado ao controle, dado não observado nos músculos da pata, diafragma e esternomastóide. O mesmo resultado foi observado na expressão da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), em que os músculos EO apresentaram aumento significativo do conteúdo da MLCK quando comparado ao controle.

A quantidade da calpaína 1 dos músculos EO distróficos foi igual ao controle, sugerindo ausência do processo de degeneração muscular. O músculo distrófico que apresentou aumento significativo da calpaína foi o STN. Nos demais músculos distróficos estudados (pata e DIA), o conteúdo da calpaína foi igual ao controle, sugerindo diminuição do processo de degeneração desses músculos, na idade de 2 meses.

Outro aspecto abordado nesse trabalho foi a análise do padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina e dos terminais nervosos na junção neuromuscular distrófica.

Estudos realizados em nosso laboratório (MINATEL et al., 2003) sugeriram que alterações na distribuição dos receptores de acetilcolina (ACh) de músculos distróficos são consequência do processo de regeneração muscular e não da ausência da distrofina. No presente

trabalho levantamos a hipótese que o padrão de distribuição dos receptores de ACh nos músculos EO (retos e oblíquos) distróficos seria normal, visto que esses músculos não apresentam regeneração muscular decorrente da mionecrose.

Os resultados mostraram que os músculos retos e oblíquos distróficos não apresentam sinais de degeneração muscular, acúmulo de tecido conjuntivo e fibras com núcleo central, como observado na literatura (KHURANA et al., 1995; PORTER; BAKER, 1996; ANDRADE et al., 2000). Nesses músculos, os receptores de ACh estavam distribuídos em braços contínuos e “*en grappe*”, com o terminal nervoso co-localizado. O mesmo padrão de distribuição foi observado no controle.

No músculo retrator do bulbo controle foi observado padrão de distribuição em braços contínuos, como descrito por Kanna et al. (2003) e terminal nervoso cobrindo os braços de receptores. No animal mdx, 45% das fibras musculares apresentaram núcleo central e 56% das junções apresentam os braços quebrados, caracterizando o padrão em ilha. Nestas junções, o terminal nervoso possuía finos prolongamentos com botões nas extremidades, ocupando o centro das ilhas, semelhante ao encontrado nos músculos STN (SANTO NETO et al., 2003) e da pata (LYONS; SLATER, 1991).

Os resultados sugerem que a distrofina ou o complexo distrofina-glicoproteínas, não estão diretamente envolvidos na organização dos receptores nos músculos EO. A alteração no padrão de distribuição dos receptores parece ser devida, pelo menos em parte, ao terminal nervoso (MARQUES et al., 2007c).

Muito embora a falta da distrofina esteja clássica e intimamente relacionada às alterações morfológicas, moleculares e funcionais das fibras musculares distróficas, o presente trabalho sugere que outros fatores também podem explicar, pelo menos em parte, essas alterações.

No caso da junção neuromuscular, estes fatores incluem, por exemplo, componentes pré-sinápticos, tal como o terminal nervoso e o seu comportamento frente à regeneração muscular observada nos músculos afetados, podendo modificar o padrão de distribuição dos receptores de ACh. O melhor conhecimento dos componentes pré- e pós-sinápticos da junção neuromuscular distrófica torna-se relevante, se considerarmos as terapias celulares, em que os mioblastos implantados devem ser inervados para se diferenciarem e se tornarem fibras musculares adultas funcionais.

Em relação aos músculos distróficos protegidos, os inúmeros mecanismos de proteção sugeridos, incluindo o melhor tamponamento do cálcio e o envolvimento de outras moléculas do complexo distrofina-glicoproteínas, abrem novas perspectivas para o melhor entendimento da patogênese da DMD.

8. REFERÊNCIAS *

* De acordo com a NBR 6023/2002

ABDIM, Associação Brasileira de Distrofia Muscular, 2007. Disponível em: http://www.abdim.org.br/dg_numeros.php. Acesso em: 14/09/2007

ALDERTON, J.M.; STEINHARDT, R.A. How calcium through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc. Med.*, v.10, n.6, p.268-272, 2000.

ANDERSON, J.T.; ROGERS, R.P.; JARRETT, H.W. Ca^{2+} -calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.6605-6610, 1996.

ANDRADE, F.H.; PORTER, J.D.; KAMINSKI, H.J. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? *Microsc. Res. Tec.*, v.48, p.192-203, 2000.

ARTALEJO, C.R.; ELHAMDANI, A.; PALFREY, H.C. Calmodulin is the divalent cation receptor for rapid endocytosis, but not exocytosis, in adrenal chromaffin cells. *Neuron*, v.16, p.195-205, 1996.

BALICE-GORDON, R.J.; LICHTMAN, J.W. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *The Journal Neurosci.*, v.13, n.2, p.834-855, 1993.

BAKKER, A.J.; HEAD, S.I.; WILLIAMS, D.A.; STEPHENSON, D.G. Ca^{2+} levels in myotubes grown from the skeletal muscle of dystrophic (mdx) and normal mice. *J Physiol.*, v.460, p.1-13, 1993.

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

BERCHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity and disease. *Physiological Reviews*, v.80, n.3, p.1215-1265, 2000.

BEWICK, G.S.; NICHOLSON, L.V.; YOUNG, C.; O'DONNELL, E.; SLATER, C.R. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport*, v.3, n.10, p.857-860, 1992.

- BLAKE, D.J.; TINSLEY, J.M.; DAVIES, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.*, v.6, n.1, p.37-47, 1996.
- BLAKE, D.J.; WEIR, A.; NEWHEY, S.E.; DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.*, v.82, n.2, p.291-329, 2002.
- BOCKHOLD, K.J.; ROSENBLATT, J.D.; PARTRIDGE, T.A. Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve*, v.21, n.2, p.173-183, 1998.
- BODENSTEINER, J.B.; ENGEL, A.G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology*, v.28, n.5, p.439-446, 1978.
- BONILLA, E.; SAMIT, C.E.; MIRANDA, A.F.; HAYS, A.P.; SALVIATI, G.; DIMAURO, S.; KUNKEL, L.M.; HOFFMAN, E.P.; ROWLAND, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, v.54, p.447-452, 1988.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v.72, p.248-54, 1976.
- BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul Disord*, v.14, n.10, p.675-682, 2004.
- BRON, A.J.; TRIPATHI, R.C.; TRIPATHI, B.J. *Wolff's Anatomy of the Eye and the Orbit*. London: Chapman and Hall Medical, 1997.
- BRUECKNER, J.K.; ITKIS, O.; PORTER, J.D. Spatial and temporal patterns of myosin heavy chain expression in developing rat extraocular muscle. *J Muscle Res Cell Motil.*, v.17, n.3, p.297-312, 1996.
- BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGTH, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-like muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.1189-1192, 1984.

CARAFOLI, E.; MOLINARI, M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun.*, v.247, n.2, p.193-203, 1998.

CHAKKALAKAL, J.V.; MICHEL, S.A.; CHIN, E.R.; MICHEL, R.N.; JASMIN, B.J. Targeted inhibition of Ca²⁺ /calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in mdx mouse muscle. *Hum Mol Genet.*, v.15, n.9, p.1423-1435, 2006.

CHATURVEDI, L.S.; MUKHERJEE, M.; SRIVASTAVA, S.; MITTAL, R.D.; MITTAL, B. POINT mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med.*, v.33, n.4, p.251-256, 2001.

COURDIER-FRUH, I.; BRIGUET, A. Utrophin is a calpain substrate in muscle cells. *Muscle Nerve.*, v.33, n.6, p.753-759, 2006.

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.*, v.92, p.435-445, 2002.

DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*, v.13, p.2905-2927, 1999.

DESAKI, J. The morphological variability of neuromuscular junctions in the rat extraocular muscles: a scanning electron microscopical study. *Arch Histol Cytol.* v.53, n.3, p.275-81, 1990.

DISATNIK, M.H.; DHAWAN, J.; YU, Y., et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: Studies of the pre-necrotic state. *J. Neurol. Sci.*, v.161, p.77-84, 1998.

DURBEEJ, M.; COHN, R.D.; HRSTKA, R.F.; MOORE, S.A.; ALLAMAND, V.; DAVIDSON, B.L.; WILLIAMSON, R.A.; CAMPBELL, K.P. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell*, v.5, p.141-151, 2000.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Myology* (Vol. 2). USA: McGraw-Hill, 1994, p.1130-1187.

FLORENCE, J.M.; FOX, P.T.; PLANER, G.J.; BROOKE, M.H. Activity, creatine kinase, and myoglobin in Duchenne muscular dystrophy: a clue to etiology? *Neurology.*, v.35, n.5, p.758-761, 1985.

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*, v.250, p.673-676, 1990.

FRANCO-OBREGÓN, A.; LANSMAN, J.B. Changes in mechanosensitive channel gating following mechanical stimulation in skeletal muscle myotubes from the mdx mouse. *J Physiol.*, v.539, n.2, p.391-407, 2002.

FRANKLIN, R.A.; McCUBREY, J.A. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia*, v.14, p.2019-2034, 2000.

GAILLY, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.*, v.1600, n.1-2, p.38-44, 2002.

GAILLY, P.; BOLAND, B.; HIMPENS, B.; CASTEELS, R.; GILLIS, J.M. Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. *Cell Calcium.*, v.14, n.6, p.473-483, 1993.

GALBIATI, F.; RAZANI, B.; LISANTI, M.P. Calveolae and calveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol Med*, v.10, p.435-441, 2001.

GILLIS, J.M. Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscle of the mdx mouse. *J. Muscle Res Cell Motil.* v.20, p.605-625, 1999.

GLESBY, M.J.; ROSENMAN, E.; NYLEN, E.G.; WROGEMANN, K. Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in mdx mouse muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* v.11, n.8, p.852-6, 1988.

GRADY, R.M.; TENG, H.; NICHOL, M.C.; CUNNINGHAM, J.C.; WILKINSON, R.S.; SANES, J.R. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, v.90, n.4, p.729-738, 1997.

HACK, A.A.; GROH, M.E.; MCNALLY, E.M. Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc. Res Tech.*, v.48, p.167-180, 2000.

HALL, Z.W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, v.72, p.99-121, 1993.

HARRIS, J.B.; CULLEN, M.J.; VATER, R. Dystrophin: struture, localization and function. In: LANE, R.J.M. *Handbook of muscle disease*, NY: Marcel Dekker, p 223-233, 1996.

HEAD, S.I. Membrane potential, resting calcium and calcium transients in isolated muscle fibres from normal and dystrophic mice. *J Physiol.*, v.469, p.11-19, 1993.

HERRING, B.P.; DIXON, S.; GALLAGHER, PJ. Smooth muscle myosin light chain kinase expression in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. v.279, n.5, p.C1656-64, 2000.

HOFFMAN, E.P.; BROWN JUNIOR, R.H.; KUNKEL, L.M. Distrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, v.51, p. 919-928, 1987.

HOPF, F.W.; TURNER, P.R.; DENETCLAW JUNIOR, W.F.; REDDY, P.; STEINHARDT, R.A. A critical evalution of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am. J. Physiol.*, v.271, p.C1325-39, 1996.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA 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*, v.355, n.6362, p.696-702, 1992.

JACKSON, M.J.; JONES, D.A.; EDWARDS, R.H. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta.*, v.147, n.3, p.215-221, 1985.

JARRETT, H.W.; FOSTER, J.L. Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.5578-5586, 1995

JEPPESEN, J.; GRREN, A.; STEFFENSEN, B.F.; RAHBK, J. The Duchenne muscular dystrophy population in Denmark, 1977-2001: prevalence, incidence and survival in relation to the introduction of ventilator use. *Neuromuscular Disorders*, v.13, p.804-812, 2003.

KAMM, K.E.; STULL, J.T. Myosin phosphorylation, force, and maximal shortening velocity in neurally stimulated tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.*, v.249, n.3, p.C238-247, 1985.

KAMM, K.E.; STULL, J.T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem.*, v.276, n.7, p.4527-30, 2001.

KARPATI, G.; CARPENTER, S.; PRESCOTT, S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve.*, v.11, n.8, p.795-803, 1988.

KHANNA, S.; RICHMONDS, C.R.; KAMINSKI, H.J.; PORTER, J.D. Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, v.44, n.5, p.1918-26, 2003.

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.*, v.182, p.467-474, 1995.

KOENIG, M.; KUNKEL, L.M. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*, v.265, n.8, p.4560-6, 1990.

KUHLMAN, P.A.; HUGHES, C.A.; BENNETT, V.; FOWLER, V.M. A new function for adducing. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.7986-7991, 1996.

KUMAR, A.; BORICK, A.M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: A possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.*, v.17, p.386-396, 2003.

- KWAK, K.B.; CHUNG, S.S.; KIM, O.M.; KANG, M.S.; HÁ, D.B.; CHUNG, C.H. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta.*, v.1175, n.3, p.243-249, 1993.
- LEIJENDEKKER, W.J.; PASSAQUIN, A.C.; METZINGER, L.; RÜEGG, U.T. Regulation of cytosolic calcium in skeletal muscle cells of the mdx mouse under conditions of stress. *Br J Pharmacol.*, v.118, n.3, p.611-616, 1996.
- LOVE, D.R.; HILL, D.F.; DICKSON, G.; SPURR, N.K.; BYTH, B.C.; MARSDEN, R.F.; WALSH, F.S.; EDWARDS, Y.H.; DAVIES, K.E. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*, v.339, p.55-58, 1989.
- LYONS, P.R.; SLATER, C.R. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J. Neurocytol.*, v.20, p.969-981, 1991.
- MACLENNAN, D.H.; REITHMEIR, R.A. Ion tamers. *Nat. Struct. Biol.*, v.5, p.409-411, 1998.
- MARIOL, M.C.; SÉGALAT, L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol.*, v.11, n.21, p.1691-1694, 2001.
- MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.21, p.145-152, 2004.
- MARQUES, M.J.; CONCHELLO, J.A.; LICHTMAN, J.W. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J. Neuroscienc*, v.20, p. 3663-3675, 2000.
- MARQUES, M.J.; MACHADO, R.V.; MINATEL, E.; NETO, H.S. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle Nerve*. 2007b. *in impress*.
- MARQUES, M.J.; MENDES, Z.T.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers. *J Neurocytol.*, v.34, n.6, p.387-396, 2005.

- MARQUES, M.J.; PEREIRA, E.C.; MINATEL, E.; NETO, H.S. Nerve-terminal and Schwann-cell response after nerve injury in the absence of nitric oxide. *Muscle Nerve*, v.34, n.2, p.225-31, 2006.
- MARQUES, M.J.; PERTILLE, A.; CARVALHO, C.L.T.; SANTO NETO, H. Aceylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *The Anatomical Record*, v.290, n.7, p.846-854, 2007a.
- MARQUES, M.J.; SANTO NETO, H. Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in wole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J. Anat.*, v.192, p.425-430, 1998.
- MARQUES, M.J.; TANIGUTI, A.P.T.; MINATEL, M.; SANTO NETO, H. Nerve terminal contributes to acetylcholine receptor organization at the dystrophic neuromuscular junction of *mdx* mice. *The Anatomical Record.*, v.290, n.2, p.181-187, 2007c.
- MAYR, R. Structure and distribution of fiber types in the external eye muscles of the rat. *Tissue Cell*, v.3, p.433-462, 1971.
- MARTIN, V.; BREDOUX, R.; CORVAZIER, E.; VAN GORP, R.; KOVACS, T.; GELEBART, P.; ENOUF, J. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase (SERCA) 3 isoforms. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.2442-24452, 2002.
- MATECKI, S.; GUIBINGA, G.H.; PETROF, B.J..Regenerative capacity of the dystrophic (*mdx*) diaphragm after induced injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.287, n.4, p.R961-668, 2004.
- MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.; JACKSON, M.J. Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient *mdx* mouse. *Muscle Nerve*, v.17, n.12, p.1378-84, 1994.
- MCDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.*, v.99, n.2-3, p.199-217, 1990.

MCNALLY, E.M.; PYTEL, P. Muscle Diseases: The Muscular Dystrophies. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v.2, p.87-109, 2007.

MEANS, A.R.; VANBERKUM, M.F.A.; BAGCHI, I.; LU, K.P.; RASMUSSEN, C.D. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther.*, v.50, p.255-270, 1991.

MEANS, A.R. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endo.*, v.14, p.4-13, 2000.

MELLGREN, R.L. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.*, v.1, n.2, p.110-115, 1987.

MENKE, A.; JOCKUSCH, H. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature*, v.349, n.6304, p.69-71, 1991.

MENKE, A.; JOCKUSCH, H. Extent of shock-induced membrane leakage in human and mouse myotubes depends on dystrophin. *J Cell Sci Cell Sci.* v.108, p.727-33, 1995.

MILLER, R.G.; HOFFMAN, E.P. Molecular diagnosis and modern management of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Clin.*, v.12, n.4, p.699-725, 1994.

MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. *Muscle and Nerve*, v.24, p.410-416, 2001.

MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. *Muscle and Nerve*, v.28, p.561-569, 2003.

MOORE, R.L.; STULL, J.T. Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am J Physiol.*, v.247, n.5, p.C462-471, 1984.

MONGINI, T.; GHIGO, D.; DORIGUZZI, C.; BUSSOLINO, F.; PESCARMONA, G.; POLLO, B.; SCHIFFER, D.; BOSIA, A. Free cytoplasmic Ca⁺⁺ at rest and after cholinergic stimulus is increased in cultured muscle cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Neurology*, v.38, n.3, p.476-480, 1988.

MULLER, J.; VAYSSIERE, N.; ROYUELA, M.; LEGER, M.E.; MULLER, A. BACOU, F.; PONS, F.; HUGON, G.; MORNET, D. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. *J Muscle Res Cell Motil*, v.22, n.2, p.133-9, 2001.

NAIRN, A.C.; PICCIOTTO, M.R. Calcium/calmodulin-dependent protein Kinases. *Sem. Cabcer Biol.*, v.5, p.295-303, 1994.

NIEBROJ-DOBOSZ, I.; KORNGUTH, S.; SCHUTTA, H.S.; SIEGEL, F.L. Elevated calmodulin levels and reduced calmodulin-stimulated calcium-ATPase in Duchenne progressive muscular dystrophy. *Neurology*, v.39, p.1610-1614, 1989.

OHKURA, M.; FURUKAMA, K.; FUJIMORI, H.; KURUMA, A.; KAWANO, S.; HIRAOKA, M.; KUNIYASU, A.; NAKAYAMA, H.; OHIZUMI, Y. Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin. *Biochemistry*, v.37, p.12987-12993, 1998.

OHLENDIECK, K.; ERVASTI, J.M.; MATSUMURA, K.; KAHL, S.D.; LEVEILLE, C.J.; CAMPBELL, K.P. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*, v.7, n.3, p.499-508, 1991.

OTANI, K.; HAN, D.H.; FORD, E.L.; GARCIA-ROVES, P.M.; YE, H.; HORIKAWA, Y.; BELL, G.I.; HOLLOSZY, J.O.; POLONSKY, K.S. Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover. *J Biol Chem.*, v.279, n.20, p.20915-20, 2004.

PASCHEN, W. Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium*, v.29, n.1, p.1-11, 2001.

PASTERNAK, C.; WONG, S.; ELSON, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol.*, v.128, n.3, p.355-61, 1995.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve*, v.18, n.10, p.1147-54, 1995.

PETROF, B.J.; STEDMAN, H.H.; SHRAGER, J.B.; EBY, J.; SWEENEY, H.L.; KELLY, A.M.. Adaptations in myosin heavy chain expression and contractile function in dystrophic mouse diaphragm. *Am J Physiol.*, v.265, n.3, p.C834-41, 1993.

PORTER, J.D.; BAKER, R.S. Muscles of a different color: the unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology*, v.46, p.30-37, 1996.

PORTER, J.D.; BAKER, R.S.; RAGUSA, R.J.; BRUECKNER, J.K. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Survey of Ophthalmology*, v.39, n.6, p. 451-484, 1995.

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-deicient (*mdx*) mice. *Hum. Mol. Gen.*, v. 12, p.1813-1821, 2003.

PORTER, J.D.; RAFAEL, J.A.; RAGUSA, R.J.; BRUECKNER, J.K.; TRICKETT, J.I.; DAVIES K.E. The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J Cell Sci.*, v.111, n.13, p.1801-11, 1998.

PORTER, J.D.; STREBECK, S.; CAPRA, N.F. Botulinum-induced changes in monkey eyelid muscle. Comparison with changes seen in extraocular muscle. *Arch Ophthalmol.*, v.109, n.3, 396-404, 1991.

PRESSMAR, J.; BRINKMEIER, H.; SEEWALD, M.J.; NAUMANN, T.; RÜDEL, R. Intracellular Ca²⁺ concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibres. *Pflugers Arch.*, v.426, n.6, p.499-505, 1994.

RAGUSA, R.J.; CHOW, C.K.; ST CLAIR, D.K.; PORTER, J.D. Extraocular, limb and diaphragm muscle group-specific antioxidant enzyme activity patterns in control and mdx mice. *J Neurol Sci.*, v.139, n.2, p.180-6, 1996.

RAGUSA, R.J.; CHOW, C.K.; PORTER, J.D. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.*, v.7, n.6-7, p.379-86, 1997.

RANDO TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, v. 24, p.1575-1594, 2001.

REILING, N.; KRONCKE, R.; ULMER, A.J.; GERDES, J.; FLAD, H.D.; HAUSCHILDT, S. Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca^{2+} /calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Euro. J. Immunol.*, v.26, p.511-516, 1996.

RIVET-BASTIDE, M.; IMBERT, N.; COGNARD, C.; DUPORT, G.; RIDEAU, Y.; RAYMOND, G. Changes in cytosolic resting ionized calcium level and in calcium transients during in vitro development of normal and Duchenne muscular dystrophy cultured skeletal muscle measured by laser cytofluorimetry using indo-1. *Cell Calcium.*, v.14, n.7, p.563-571, 1993.

RUEGG, U.T.; NICOLAS-MÉTRAL, V.; CHALLET, C.; BERNARD-HÉLARY, K.; DORCHIES, O.L.; WAGNER, S.; BUETLER, T.M. Pharmacological control of cellular calcium handling in dystrophic skeletal muscle. *Neurom. Dis.*, v.12, p.S155-S161, 2002.

RUFF, R.L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci.*, v.998, p.1-10, 2003.

RYBAKOVA, I.N.; PATEL, J.R.; ERVASTI, J.M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol.*, v.150, n.5, p.1209-14, 2000.

RYDER, J.W.; LAU K, S.; KAMM, K.E.; STULL, J.T. Enhanced skeletal muscle contraction with myosin light chain phosphorylation by a calmodulin-sensing kinase. *J Biol Chem.*, v.282, n.28, p.20447-54, 2007.

SAIMI, Y; KUNG, C. Ion channel regulation by calmodulin binding, *FEBS Letts*, v.350, p.155-158, 1994.

SANTO NETO, H.; MARTINS, A.J.; MINATEL, E.; MARQUES, M.J. Axonal sprouting in mdx mice and its relevance to cell and gene mediated therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Neurosci Lett.*, v.343, n.1, p.67-9, 2003.

SCHMALBRUCH, H. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurology*, v.34, n.1, p.60-65, 1984.

SPENCER, M.J.; CROALL, D.E.; TIDBALL, J.G. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem.*, v.270, n.18, p.10909-14, 1995.

SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet.*, v.11, n.21, p.2645-2655, 2002.

SPENCER, R.F.; PORTER, J.D. Structural organization of the extraocular muscles. *Rev Oculomot Res.*, v.2, p.33-79, 1988.

STEDMAN, H.H.; SWEENEY, H.L.; SHRAGER, J.B.; MAGUIRE, H.C.; PANETTIERI, R.A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J.T.; KELLY, A.M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, v. 352, n.6335, p.536-9, 1991.

STEINBACH, J.H. Neuromuscular junctions and alpha-bungarotoxin-binding sites in denervated and contralateral cat skeletal muscles. *J Physiol.*, v.313, p.513-528, 1981.

STULL, J.T. Myosin minireview series. *J Biol Chem.*, v.271, n.27, p.15850-15853, 1996.

SUZUKI, K.; SORIMACHI, H.; YOSHIZAWA, W.A.T.; KINBARA, K.; ISHIURA, S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol Chem Hoppe Seyler.*, v.376, n. 9, p.523-529, 1995.

SWEENEY, H.L.; BOWMAN, B.F.; STULL, J.T. Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am J Physiol.*, v.264, n.5, p.C1085-95, 1993.

TAKEMITSU, M.; ISHIURA, S.; KOGA, R.; KAMAKURA, K.; ARAHATA, K.; NONAKA, I.; SUGITA, H. Dystrophin-related protein in the fetal and denervated skeletal muscles of normal and mdx mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.180, n.3, p.1179-1186, 1991.

TOKUMA, N.; ZHOU, W.; TAKUMA, Y. Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell Signalling*, v.7, p.93-104, 1995.

TORRES, L.F.; DUCHEN, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscle and end-plates. *Brain*, v.110, p.269-299, 1987.

TURNER, P.R.; FONG, P.; DENETCLAW, W.F.; STEINHARDT, R.A. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J. Cell Biol.*, v.115, p.1701-1712, 1991.

TURNER, P.R.; SCHULTZ, R.; GANGULY, B.; STEINHARDT, R.A. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol.*, v.133, n.3, p.243-251, 1993.

TURNER, P.R.; WESTWOOD, T.; REGEN, C.M.; STEINHARDT, R.A. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature*, v.335, n.6192, p.735-738, 1988.

TUTDIBI, O.; BRINKMEIER, H.; RÜDEL, R.; FÖHR, K.J. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol.*, v.515, n.3, p.859-68, 1999.

VANDEBROUCK, C.; DUPORT, G.; COGNARD, C.; RAYMOND, G. Cationic channels in normal and dystrophic human myotubes. *Neuromuscul Disord.*, v.11, n.1, p.72-79, 2001.

VANDEBROUCK, C.; 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.*, v.158, n.6, p.1089-1096, 2002.

VOGEL, H.J. The Merck Frosst Award Lecture. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem. And Cell Biol.*, v.72, p.357-376, 1994.

XU, R.; SALPETER, M.M. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *J Neurosci.*, v.17, n.21, p.8194-8200, 1997.

ZACKS, S.I.; SHEFF, M.F. Periosteal and metaplastic bone formation in mouse minced muscle regeneration. *Lab Invest.*, v.46, n.4, p.405-12, 1982.

ZELLWEGER, H.; IONASESCU, V.; CONWAY, T.W. Muscular dystrophies. *Schweiz Med Wochenschr*, v.102, n.22, p.753-9, 1972.

ZHANG, W.; LANE, R.D.; MELLGREN, R.L. The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J Biol Chem.*, v.271, n.31, p.18825-30, 1996.

ZHI, G.; RYDER, J.W.; HUANG, J.; DING, P.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.; KAMM, K.E.; STULL, J.T. Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.102, n.48, p.17519-24, 2005.

ZUBRZYCKA-GAARN, E.E.; BULMAN, D.E.; KARPATI, G.; BURGHESE, A.H.; BELFALL, B.; KLAMUT, H.J.; TALBOT, J.; HODGES, R.S.; RAY, P.N.; WORTON, R.G. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, v.333, n.6172, p.466-9, 1988.

WHITEHEAD, N.P.; STREAMER, M.; LUSAMBILI, L.I.; SACHS, F.; ALLEN, D.G. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from *mdx* mice. *Neurom. Disord.*, v.16, p.845-854, 2006.

WALTON, J.N. *Disorders of voluntary muscle*. Churchill-Livingstone, London, 1994.

WINDER, S.J.; KENDRICK-JONES, J. Calcium/calmodulin-dependent regulation of the NH₂-terminal F-actin binding domain of utrofin. *FEBS Lett*, v.357, p.125-128, 1995.

YOSHIZAWA, T.; SORIMACHI, H.; TOMIOKA, S.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.208, n.1, p.376-383, 1995.

YU WAI MAN, C.Y.; CHINNERY, P.F.; GRIFFITHS, P.G. Extraocular muscles have fundamentally distinct properties that make them selectively vulnerable to certain disorders. *Neuromus. Disord.*, v.15, p. 17-23, 2005.

9. ANEXOS

9.1 ARTIGO SUBMETIDO

Artigo submetido para a revista Neuromuscular Disorders**“Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient mdx mice: potential role in muscle sparing”.**

Nos camundongos *mdx*, a mionecrose é observada nos músculos da pata, do dorso, da mastigação, diafragma e esternomastóide. Por outro lado, os músculos extraoculares (EO) não apresentam degeneração muscular, sendo “protegidos” da falta de distrofina (KHURANA et al., 1995; PORTER; BAKER, 1996; ANDRADE et al., 2000). Nesse trabalho levantamos a hipótese que nos músculos EO distróficos, os mecanismos de tamponamento do cálcio podem ser mais eficazes, possivelmente por haver maior expressão das proteínas ligadas ao cálcio, impedindo a degeneração das fibras musculares.

A expressão das proteínas SERCA1, calmodulina (CaM) e calsequestrina (CSQ) foi analisada nos músculos EO, da pata, diafragma e esternomastóide de animais controle e *mdx*, utilizando as técnicas de imunofluorescência e imunoblotting. Além disso, foi analisado o padrão de distribuição da utrofina (UTR) e β -dystroglicana (β -DG) nos músculos EO.

Os resultados revelam que os **músculos EO (retos e oblíquos) distróficos** apresentam, como esperado, a ausência da distrofina (Figura 1B, p.96) e aumento significativo na expressão da β -DG, quando comparado ao controle (Figura 1C-D, p.96), sendo este dado confirmado pelo imunoblotting (Figura 4, p.99; Figura 5D, p.101).

Nos EO distróficos a UTR estava restrita ao sarcolema juncional, co-localizada com os receptores de ACh da junção neuromuscular (Figura 2C-D, p.97), o mesmo padrão encontrado no

EO controle (Figura 2A-B, p.97) Nos EO distróficos a UTR também foi observada no sarcolema extrajuncional (Figura 2D, p.97).

Em relação às proteínas ligadas ao cálcio, o padrão de distribuição citoplasmático da SERCA1 (Figura 3A-B, p.98), CSQ (Figura 3E-F, p.98) e calmodulina (Figura 3G-H, p.98) foi similar nos músculos EO entre controle e *mdx*. Os resultados do immunoblotting revelam aumento significativo da expressão dessas proteínas quando comparado EO *mdx* e controle, dado não observado nos músculos da pata, diafragma e esternomastóide (Figura 4, p.99; Figura 5A-C, p.100-101).

Nossos resultados mostram que nos músculos EO distróficos houve aumento na expressão da β -DG concomitante ao aumento na expressão das proteínas ligadas ao cálcio, sugerindo que a β -DG pode estar envolvida na regulação da sinalização do cálcio na fibra muscular. Na ausência da distrofina, a β -DG pode interagir com a utrofina, α -sintrofina ou outras proteínas do subsarcolema envolvidas na sinalização do cálcio, permitindo a célula muscular responder corretamente as mudanças na concentração do cálcio, pela regulação da expressão das proteínas ligadas ao cálcio (Figura 6, p.102).

Além disso, os resultados sugerem o uso de terapias gênicas ou farmacológicas que promovam o aumento da expressão ou conservação da β -DG, associado ao aumento da expressão das proteínas ligadas ao cálcio, com o objetivo de amenizar as consequências da ausência da distrofina nos músculos afetados pela DMD.

Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice: potential role in muscle sparing.

By Adriana Pertille, Humberto Santo Neto, Candida Luiza Tonizza de Carvalho, and Maria Julia Marques.

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil.

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Campinas, SP - 13083-970, Brazil.

fax: 55-19-3521-6101.

email:marques@unicamp.br

phone: 55-19-3521-6395

Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice: potential role in muscle sparing.

Duchenne muscular dystrophy is one of the most common hereditary diseases. Abnormal ion handling renders dystrophic muscle fibers more susceptible to necrosis. In the *mdx* mice, extraocular muscles (EOM) are protected and do not undergo myonecrosis. We investigated whether this protection is related to an increased expression of calcium-binding proteins, which may protect against the elevated calcium levels seen in dystrophic fibers. The expression of SERCA1, calmodulin and calsequestrin was examined in EOM and in non-spared limb, diaphragm and sternomastoid muscles of control and *mdx* mice using immunofluorescence and immunoblotting. Dystrophic EOM presented a significant increase in the proteins studied, and a significant increase in β -dystroglycan expression. These proteins were reduced in the non-spared *mdx* muscles. The increase of Ca^{2+} -handling proteins in dystrophic EOM may permit a better maintenance of calcium homeostasis, with the consequent absence of myonecrosis. The results further support the concept that abnormal Ca^{2+} -handling is involved in dystrophinopathies.

Key words: calmodulin; calsequestrin; Duchenne muscular dystrophy; extraocular muscles; *mdx* mice; SERCA1.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by a mutation in the X chromosome which results in the absence of dystrophin in cardiac, skeletal and smooth muscles [1, 2]. Dystrophin is a large protein that links the cytoskeleton to a complex of proteins in the sarcolemma which, in turn, interact with the extracellular matrix [3]. An established animal model of X-linked muscular dystrophy is the *mdx* mouse [4], which is unable to express dystrophin due to a point mutation [5]. *Mdx* mice exhibit many of the cellular and molecular abnormalities seen in DMD, including elevated serum creatine kinase levels [4], muscle necrosis [6] followed by muscle regeneration [7, 8], abnormal excitation-contraction coupling [9], and a reduction in dystrophin-associated glycoproteins [10].

Several studies have suggested that multiple factors contribute to muscle damage in dystrophic muscle, ranging from the involvement of inflammatory pathways to oxidative stress [11, 12]. A rise in intracellular calcium is widely thought to be an important initiating event in dystrophic muscle pathogenesis, in addition to other destructive mechanisms. There is a general concept that the lack of dystrophin causes membrane destabilization and renders the sarcolemma more susceptible to rupture [13] or affects the normal functioning of calcium channels [14, 15] that ultimately leads to an increased calcium entry into the muscle fiber. These elevated calcium levels activate proteases, such as calpain, resulting in myonecrosis [12, 16]. In addition to disturbed cytosolic calcium levels, the calcium-buffering capacity of dystrophic muscles also seems to be impaired [17, 18]. As a consequence, free cytosolic calcium levels are elevated, thereby accelerating the calcium-dependent proteolysis of muscle proteins [14].

An alternative approach to a better understanding of the mechanisms involved in the pathophysiology of DMD and to the development of new therapeutic strategies is to study naturally protected skeletal muscle fibers. Dystrophic extraocular muscles (EOM) are deficient in dystrophin but only show a mild dystrophic phenotype [19 - 22], and several properties distinguish these muscles from most skeletal muscles [23]. While the sparing of these muscles is due, at least in part, to the small size of their fast-twitch fibers [21, 24], upregulation of utrophin [25] and β -dystroglycan [26] also seems to be involved in muscle protection. *In vitro* experiments have demonstrated that dystrophic EOM are more resistant to necrosis caused by pharmacologically elevated levels of calcium, suggesting that these muscles are spared because of their ability to better maintain calcium homeostasis than other striated muscle groups [19].

In the present study, we investigated whether the key calcium-regulatory muscle proteins sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1), calmodulin and calsequestrin are overexpressed in naturally protected dystrophic EOM compared to control and more severely non-spared limb, diaphragm and sternomastoid muscles. We also evaluated the expression of utrophin and β -dystroglycan, which seem to be involved in the protection of EOM. The levels of SERCA1, calmodulin and calsequestrin were significantly increased in dystrophic EOM. These results suggest that an increase of key Ca^{2+} -handling proteins in spared dystrophic EOM, together with an increase of β -dystroglycan, may permit a better maintenance of calcium homeostasis. These results further support the concept that abnormal Ca^{2+} -handling is involved in X-linked muscular dystrophy.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male *mdx* and C57Bl/10 mice obtained from the mouse breeding colony of the State University of Campinas were housed under controlled conditions of temperature under a 12/12-h light/dark cycle, with free access to food and water. All experiments were performed in accordance with the guidelines for the use of animals set forth by our institution. The calcium-binding proteins calmodulin (CaM), calsequestrin (CSQ) and SERCA1 were studied. In addition, we analyzed the pattern of distribution of utrophin (UTR) and beta-dystroglycan (β -DG), which seem to be upregulated in dystrophic EOM and have been implicated in the protection of these muscles.

Muscle preparation

An established feature of the whole EOM group is that they contain spared (rectus and oblique) and non-spared (retractor bulbi and levator palpebrae) muscles [20, 22]. Immunoblotting was performed with samples containing only the spared muscles, with the retractor bulbi and levator palpebrae muscles being removed. Samples obtained from the tibialis anterior, soleus, sternomastoid and diaphragm muscles were also studied. Immunofluorescence was performed using the intact globe (spared and non-spared muscles together).

Immunofluorescence

Adult (2 months old) *mdx* (n = 5) and C57Bl/10 (control; n = 5) mice were used to study the pattern of distribution of SERCA1, CSQ, CaM, dystrophin (DYS), UTR, and β -DG.

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of chloral hydrate (600 µg/kg). The globes with intact EOM and associated connective tissue, tibialis anterior, soleus, diaphragm, and sternomastoid muscles were dissected out, snap frozen with isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C for hematoxylin-eosin and immunofluorescence staining. The frozen globes were cross-sectioned (8-µm thick cryostat sections) transverse to the globe axis. Sections from the globes and other muscles were collected and mounted on coated microscope slides. Some sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope.

The other sections were air dried, hydrated for 30 min in PBS, incubated with 0.3% Triton X-100 for 10 min, and then blocked with blocking solution (1% glycine, 3% BSA and 0.6% Triton X-100 in PBS; Sigma) for 3 h. The sections were incubated with one of the calcium-binding proteins described below, DYS, UTR and β-DG antibodies overnight at 4°C. The sections were washed with PBS and incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma; 1:500) or anti-rabbit IgG for 1 h at room temperature. Sections were washed with PBS and coverslipped with DABCO (Sigma) mounting medium for fluorescence microscopy and observed under a confocal microscope (BioRad MRC 1024) or a Nikon fluorescence microscope equipped with a Hamamatsu video camera.

Control slides for the primary antibody were incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma; 1:500) in blocking solution instead of the primary antibody. No stained structures were seen in these controls.

Immunoblotting

Adult (2 months old) *mdx* (n = 8) and C57Bl/10 (control; n = 8) mice were used for the quantification of calcium-binding proteins and β -DG.

Muscles were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM PMSF, and 0.25 mM Na_3VO_4). The samples were centrifuged for 20 min at 11,000 rpm and the soluble fraction was resuspended in 50 μ l Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M β -mercaptoethanol) before separation on 8%-15% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane using a submersion electrotransfer apparatus (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skim milk-Tris/HCl Buffer Saline-Tween buffer (TBST; 10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). The membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C, washed in TBST, incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature, and developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce Biotechnology).

Antibodies used for immunofluorescence and/or immunoblotting

The following primary antibodies were used for immunofluorescence and immunoblotting: 1) utrophin (monoclonal NCL-DRP2, Novocastra), 2) β -dystroglycan (monoclonal NCL-b-DG, Novocastra), 3) dystrophin (monoclonal NCL-DYS1, Novocastra), 4) SERCA1 (monoclonal SERCA 1ATPase IIH11, Affinity BioReagents), 5) calsequestrin

(monoclonal VIID12, Affinity BioReagents), and 6) calmodulin (polyclonal CaM I-FL 149; Santa Cruz Biotechnology). Acetylcholine receptors were labeled with rhodamine- α -bungarotoxin (1:100 in blocking solution; Molecular Probes).

Anti-mouse IgG-FITC (Sigma) was used as the corresponding secondary antibody for immunofluorescence. The corresponding secondary antibodies used for immunoblotting were peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgG (H+L) (KPL) and peroxidase-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) (KPL).

Statistical analysis

ANOVA was used for multiple comparisons of mean values. Comparisons of only two groups were made using a *t*-test. For all comparisons, $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Immunofluorescence: dystrophin, utrophin and β -dystroglycan

Immunofluorescence analysis of dystrophin revealed sarcolemma staining in control EOM. As expected, dystrophic EOM clearly exhibited a lack of dystrophin (Figure 1A, B). β -DG was detected in the sarcolemma of control EOM (Figure 1C) and its expression was preserved in dystrophic EOM (Figure 1D). Although fluorescein labeling is only a semiquantitative method, the direct comparison of relative intensity levels indicated that β -DG was apparently increased in dystrophic EOM (Figure 1D) compared to both control EOM (Figure 1C) and limb dystrophic muscle (see Figure 5D for immunoblotting of β -DG). The increase of β -DG in spared dystrophic

EOM was confirmed by immunoblotting, which also showed a significant decrease of β -DG in limb, diaphragm and sternomastoid muscles compared to normal muscles (Figure 5).

Utrophin was found to be restricted to the junctional sarcolemma in control EOM (Figure 2B), with its expression colocalizing with acetylcholine receptors (Figure 2A) at the neuromuscular junction. In dystrophin-deficient EOM, utrophin expression displayed the same distribution pattern as seen in control muscles, i.e., at the junctional sarcolemma colocalizing with acetylcholine receptors (Figure 2C, D). Apparent utrophin staining was also seen in extrajunctional sarcolemma of dystrophic EOM (Figure 2D), but was not observed in control EOM (Figure 2B). In dystrophic tibialis anterior muscle, utrophin expression was detected colocalizing with acetylcholine receptors and in the extrajunctional sarcolemma (Figure 2E, F).

Immunofluorescence: calcium-binding proteins

The pattern of distribution of key calcium-binding proteins is shown in Figure 3. SERCA1 exhibited a similar cytoplasmic pattern of distribution in control and dystrophic EOM (Figure 3A, B). The staining pattern was characterized by bright fine strands, running in parallel to one another and being present in almost all EOM fibers. The same pattern of distribution was seen in soleus muscle. However, SERCA1 staining was only detected in some soleus muscle fibers (Figure 3C, D), possibly corresponding to the fast-twitch fibers of this muscle [27] (Brandl et al., 1978). An apparent decrease in the intensity of SERCA1 fluorescence was seen in dystrophic limb muscle (Figure 3D) when compared to control (Figure 3C). The pattern of distribution of calsequestrin (Figure 3E, F) and calmodulin (Figure 3G, H) was cytoplasmic and similar in normal and dystrophic EOM.

Immunoblotting: calcium-binding proteins

Comparative immunoblotting data of the calcium-binding proteins are shown in Figure 4 (immunoblots) and Figure 5 (graphic representation). A significant increase in the relative expression of SERCA1, calsequestrin and calmodulin was observed in dystrophic EOM compared to control EOM.

Overall, the content of SERCA1, calsequestrin and calmodulin in dystrophin-deficient diaphragm, sternomastoid and limb muscles was decreased but did not differ significantly between *mdx* mice and controls. Calsequestrin was significantly decreased in diaphragm and soleus muscles.

DISCUSSION

Abnormal calcium homeostasis has been related to secondary changes that may lead to muscle fiber degeneration [12]. In the present study, we investigated whether key calcium-regulatory muscle proteins are differentially expressed in naturally protected dystrophic EOM compared to more severely affected leg, diaphragm and sternomastoid muscles from *mdx* mice.

General consensus exists among a number of studies that the free intracellular calcium concentration is higher in muscle fibers from *mdx* mice compared to wild-type fibers [12, 28]. It is postulated that in the absence of dystrophin contraction leads to membrane tears [13] or that a lack of dystrophin may cause abnormal calcium channel function [15, 29], with a consequent rise in intracellular calcium followed by the loss of calcium homeostasis and the activation of degradative pathways that lead to muscle fiber necrosis [30]. In *mdx* mice, abnormal calcium handling has been suggested to play a major role in the secondary steps leading to fiber necrosis [17-19, 31]. The present study showed a trend toward a decrease in the sarcoplasmic reticulum

calcium-handling proteins SERCA1 and calsequestrin compared to wild-type fibers in dystrophic leg, diaphragm and sternomastoid muscles, which are severely affected by the lack of dystrophin. Although this trend was statistically significant only for soleus and diaphragm muscles, the present data generally agree with previous reports showing no changes or a decrease in the levels of calsequestrin and SERCA1 [17, 26, 32]. In addition, our results support the hypothesis that calcium regulation by the sarcoplasmic reticulum is impaired in dystrophic muscles, in agreement with previous findings showing a reduction in sarcalumenin, another calcium-binding element found in the sarcoplasmic reticulum lumen [33].

The cytosolic calcium-binding element calmodulin is one of the major cytosolic calcium buffers in muscle, and calcium-calmodulin interactions serves as regulators of calcineurin and calmodulin kinases [34]. Although there was a tendency towards reduced expression of calmodulin in dystrophic limb, diaphragm and sternomastoid muscles compared to controls, this difference was not statistically significant. A previous study has also shown changes in regucalcin, another cytosolic calcium-handling protein, in *mdx* leg and diaphragm muscle extracts [18]. Since calmodulin is anchored to the dystrophin-glycoprotein complex through dystrophin [35, 36], the normal levels of calmodulin observed in *mdx* limb, diaphragm and sternomastoid fibers might be related to the presence of utrophin in the extrajunctional sarcolemma, as demonstrated here in the tibialis anterior muscle. Utrophin normally is transcribed only in the junctional nuclei and occupies the sarcolemma at the neuromuscular junction [37]. In dystrophic muscle, utrophin is located in non-junctional sarcolemma where it may replace dystrophin [38]. Nevertheless, the normal expression of calmodulin, as well as of SERCA1 and calsequestrin, in dystrophic limb, diaphragm and sternomastoid muscles might not be sufficient to protect against

the increases in calcium concentration that lead to myonecrosis. Taken together, these results further support the view that abnormal calcium handling is involved in *mdx* fiber degeneration.

A striking finding of the present study was the observation that dystrophic EOM show an increase in the levels of SERCA1, calmodulin and calsequestrin compared to control EOM. Since EOM are mildly affected by the lack of dystrophin, the present results strongly support the hypothesis that abnormal calcium-handling is involved in X-linked muscular dystrophy. Previously, EOM have been shown to be more resistant to necrosis caused by pharmacologically elevated calcium levels, suggesting their ability to better maintain calcium homeostasis than other striated muscle groups [19]. The present data suggest that this ability might be related to an increase of sarcoplasmic and cytosolic calcium-handling proteins. In addition, the protection of EOM against dystrophy may be explained, at least in part, by a better capacity of intracellular calcium regulation.

Utrophin was shown to accumulate preferentially at the level of the neuromuscular junction, colocalizing with acetylcholine receptors, in control EOM and tibialis anterior muscles, as previously demonstrated [37]. The restricted expression of utrophin in synaptic regions seems to be under the influence of nerve-derived factors such as agrin [39, 40]. The present immunofluorescence data showed that utrophin expression in dystrophic EOM and tibialis anterior muscle was preserved at the neuromuscular junction and spread throughout the sarcolemma. Previous immunoblotting studies have demonstrated an increase of utrophin expression in EOM [38, 41], being suggested that upregulation of utrophin protects the dystrophic EOM [25].

The expression of β -DG, the central trans-sarcolemmal linker of the dystrophin-glycoprotein complex, was increased in spared dystrophic EOM and dramatically reduced in dystrophic limb, diaphragm and sternomastoid muscles. This finding agrees with the immunofluorescence microscopy data, showing an increase in β -DG staining in rectus muscles compared to limb muscle. This result is in line with previous reports demonstrating a persistent expression of β -DG in EOM [26]. Normal regulation of capacitative calcium entry into skeletal muscle depends on the association between store-operated calcium channels and α 1-syntrophin, a component of the dystrophin-glycoprotein complex which may anchor these channels to the dystrophin complex [15]. The present observation that spared dystrophic EOM overexpress β -DG concomitant with an increase in calcium-handling proteins suggests that β -DG may be involved in the regulation of calcium-signaling pathways in the muscle fiber. In the absence of dystrophin, β -DG may interact with utrophin, α -syntrophin or with other subsarcolemmal proteins involved in calcium signaling, allowing the cells to respond correctly to the changes in calcium concentration by regulating the expression of calcium-binding proteins (Figure 6).

In conclusion, the present study supports the concept that the ability to better remove cytosolic calcium ions explains, at least in part, the sparing of EOM in *mdx* mice. In addition, the results suggest that the use of gene therapy or pharmacological agents to rescue β -DG, associated with an increase in calcium-handling proteins, may be useful to ameliorate the consequences of the lack of dystrophin in other skeletal muscles.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 95/6110-2, 01/00570-4 and 04/15526-9). H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq; 306689/06-5; 302880/04-6; 474708/06-3). We thank Dr. Kleber Gomes Franchini, Dept. Clínica Médica, FCM, UNICAMP, Mr. Antonio R. Calixto for technical assistance and Mrs. Kerstin Markendorf for English revision of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.
- [2] Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, ed. *Myology*. New York: McGraw-Hill, 1994: 1133-1187.
- [3] Ervasti JM. Dystrophin, its interaction with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochem Biophys Acta* 2007; 1772: 108-117.
- [4] Bulfield G, Siller WG, Wigth PAL, Moore KJX. Chromosome-like muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1189-1192.
- [5] Sicinski YG, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science* 1989; 244: 1578-1580.
- [6] Torres LF, Duchon LW. The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscle and end-plates. *Brain* 1987; 110: 269-299.
- [7] Lyons PR, Slater CR. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult *mdx* mice. *J Neurocytol* 1991; 20: 969-981.
- [8] Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. *Muscle Nerve* 2003; 28: 561-569.
- [9] DeLuca A, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Simonetti S, Papadia F, Camerino DC. Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic *mdx* mouse and potential efficacy of taurine. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1047-1054.

- [10] Ohlendieck K, Campbell KP. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from *mdx* mice. *J Cell Biol* 1991; 115: 1685-1694.
- [11] Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF alpha function with Etanercept in *mdx* mice. *Neuromuscul Disor* 2006; 16: 591-602.
- [12] Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 657-662.
- [13] Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3710-3714.
- [14] Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 2000; 275: 9452–9460.
- [15] 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* 2007; 21: 608-617.
- [16] Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1-5.
- [17] 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* 2002; 92: 435-445.

- [18] Doran P, Dowling P, Donoghue P, Buffini M, Ohlendieck K. Reduced expression of regucalcin in young and aged mdx diaphragm indicates abnormal cytosolic calcium handling in dystrophin-deficient muscle. *Biochem Biophys Acta* 2006; 1764: 773-785.
- [19] Khurana TS, Predergast RA, Alameddine HS, Tome FM, Farden M, Arahata K, Sugita H, Kunkel LM. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. *J Exp Med* 1995; 182: 467-474.
- [20] Porter JD, Baker RS. Muscles of a different color: the unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology* 1996; 46: 30-37.
- [21] Andrade FH, Porter JD, Kaminski HJ. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? *Microsc Res Tech* 2000; 48:192-203.
- [22] Marques MJ, Pertille A, Carvalho CLT, Santo Neto H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *Anat Rec* 2007; 290: 846-854.
- [23] McLoon LK, Thorstenson KM, Solomon A, Lewis MP. Myogenic precursor cells in craniofacial muscles. *Oral Dis* 2007; 13: 134-140.
- [24] Karpati G, Carpenter S, Precott S. Small caliber skeletal muscle fibres do not suffer necrosis in *mdx* mouse dystrophy. *Muscle Nerve* 1988; 11: 795-803.
- [25] Porter JD, Rafael JA, Ragusa RJ, Brueckner JK, Trickett JI, Davies KE. The sparing of extraocular muscle is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J Cell Sci* 1998; 111: 1801-1811.

- [26] 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 β -dystroglycan. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 222-230.
- [27] Brandl CJ, de Leon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1978; 262: 3768-3774.
- [28] Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: Implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1600: 38-44.
- [29] Franco Jr A, Lansman JB. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in *mdx* myotubes. *Nature* 1990; 344: 670-673.
- [30] Turner PR, Schultz R, Ganguly B, Steinhardt RA. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in *mdx* muscle. *J Membr Biol* 1993; 133: 243-251.
- [31] Divet A, Lompré A-M, Huchet-Cadiou C. Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, on skeletal muscle from normal and *mdx* mice. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 173-186.
- [32] Doran P, Dowling P, Lohan J, McDonnell K, Poetsch S, Ohlendieck K. Subproteomics analysis of Ca^{2+} -binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3943-3952.
- [33] Dowling P, Doran P, Ohlendieck K. Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa) – deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. *Biochem J* 2004; 379: 479-488.
- [34] Olson EN, Williams RS. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioassays* 2000; 6: 510-519.

- [35] Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca^{2+} -calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 1996; 271: 6605-6610.
- [36] Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1575-1594.
- [37] Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SD, Leveille CJ, Campbell KP. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 1991; 3: 499-508.
- [38] Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 1992; 360: 588-591.
- [39] Gramolini AO, Burton EA, Tinsley JM, Ferns MJ, Cartaud A, Cartaud J, Davies KE, Lunde JA, Jasmin BJ. Muscle and neural isoforms of agrin increased utrophin expression in cultured myotubes via a transcriptional regulatory mechanism. *J Biol Chem* 1998; 273: 736-743.
- [40] Jasmin BJ, Angus LM, Belanger G, Chakkalakal JV, Gramolini AO, Lunde JA, Stocksley MA, Thompson J. Multiple regulatory events controlling the expression and localization of utrophin in skeletal muscle fibers: insights into a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol Paris* 2002; 96: 31-42.
- [41] Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tomé FMS, Fardeau M, Kaplan J-C, Kunkel LM. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 185-194.
- [42] di Vinano AT, Di Zenzo G, Sudol M, Cesareni G, Dente L. Contribution of the different modules in the utrophin carboxy-terminal region to the formation and regulation of the DAP complex. *FEBS Letters* 2000; 471: 229-234.

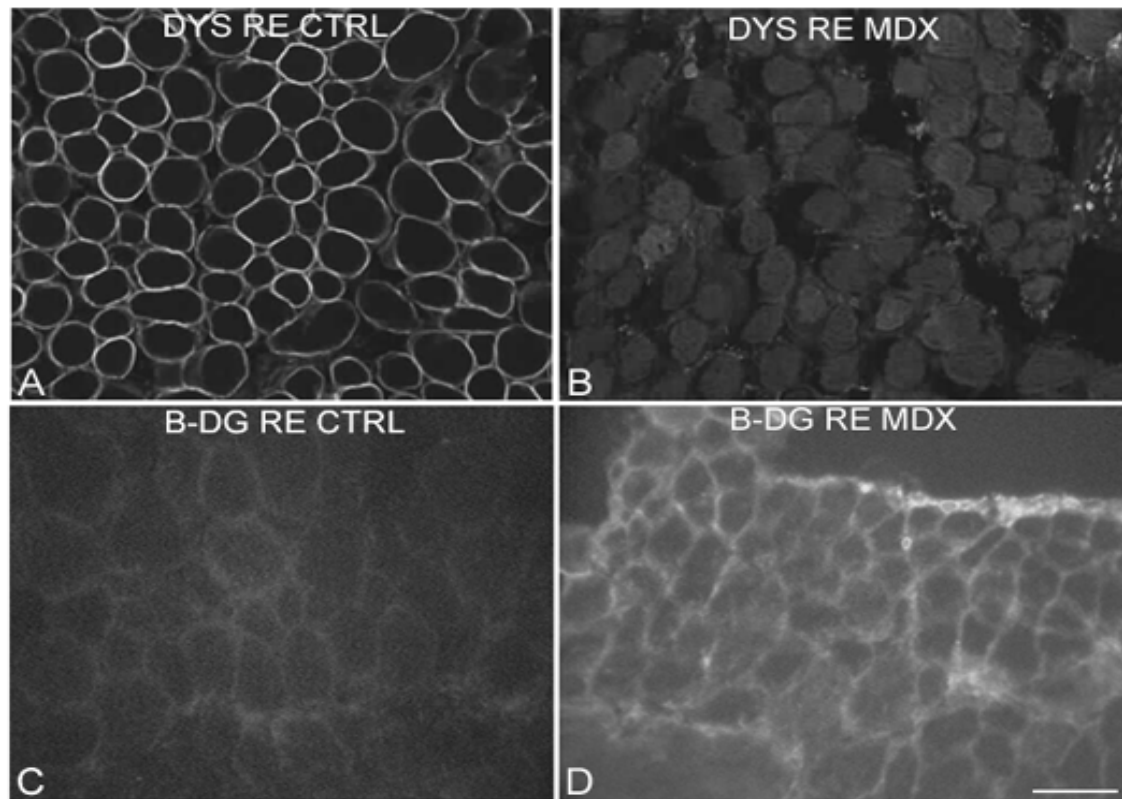
FIGURES

Figure 1. Dystrophin (DYS) and β -dystroglycan (B-DG) immunofluorescence of control (CTRL) and dystrophic (MDX) spared rectus muscle (RE). While normal sarcolemmal labeling using DYS antibody is visible in control RE (A), there is no detectable labeling in mdx RE (B). An apparent increase in B-DYS labeling is seen in mdx RE (D), compared to control RE (C). Scale bar (shown only in D), 14 μ m.

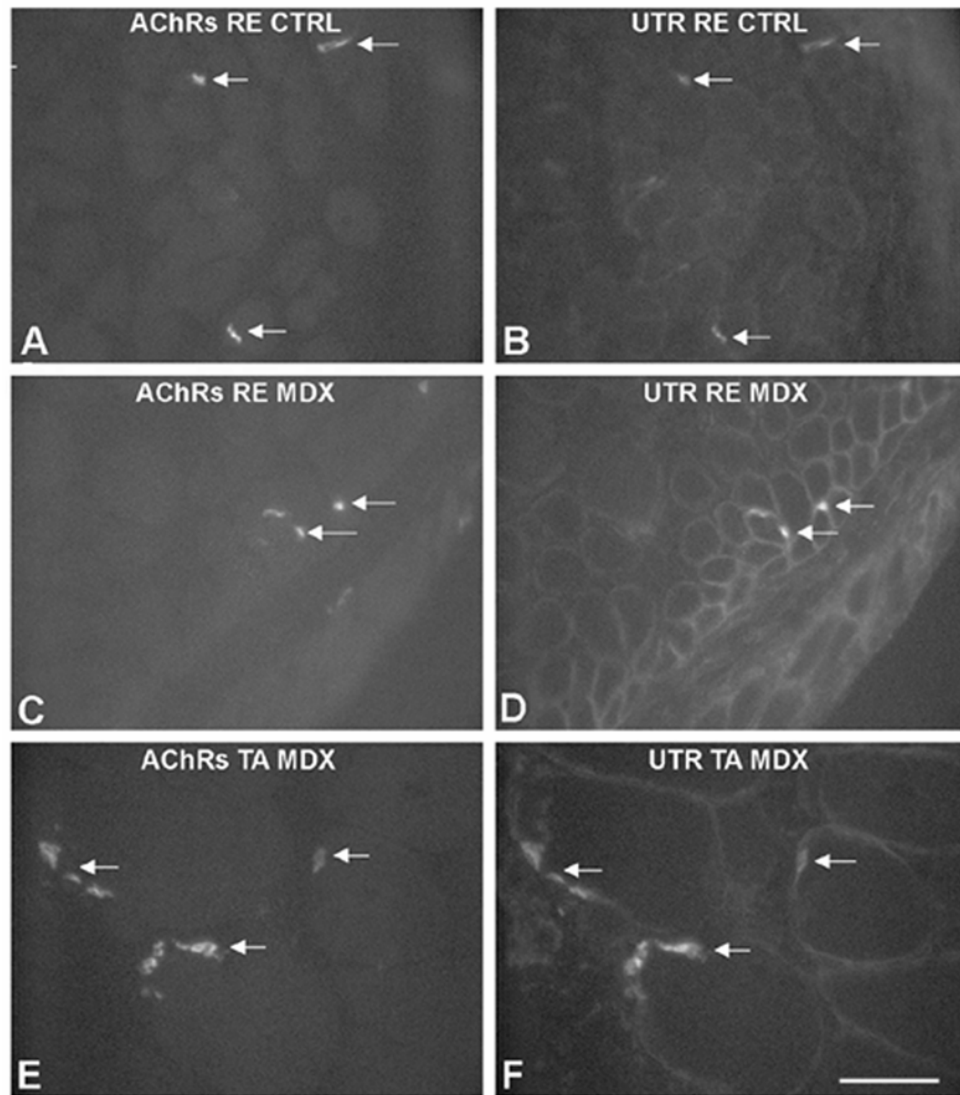


Figure 2. Acetylcholine receptors (AChRs; arrows in A, C, D) and utrophin (UTR; arrows in B, D, F) immunofluorescence of control (CTRL) and dystrophic (MDX) rectus (RE) and tibialis anterior (TA) muscles. UTR labeling is seen in the junctional sarcolemma, co-localizing with AChRs in control RE (B) and *mdx* RE (D) and TA (F). An apparent labeling is present in the extra-junctional sarcolemma in dystrophic RE (D) and TA (F). Scale bar (shown only in F), 34 μm (A, B, C, D) and 42 μm (E, F).

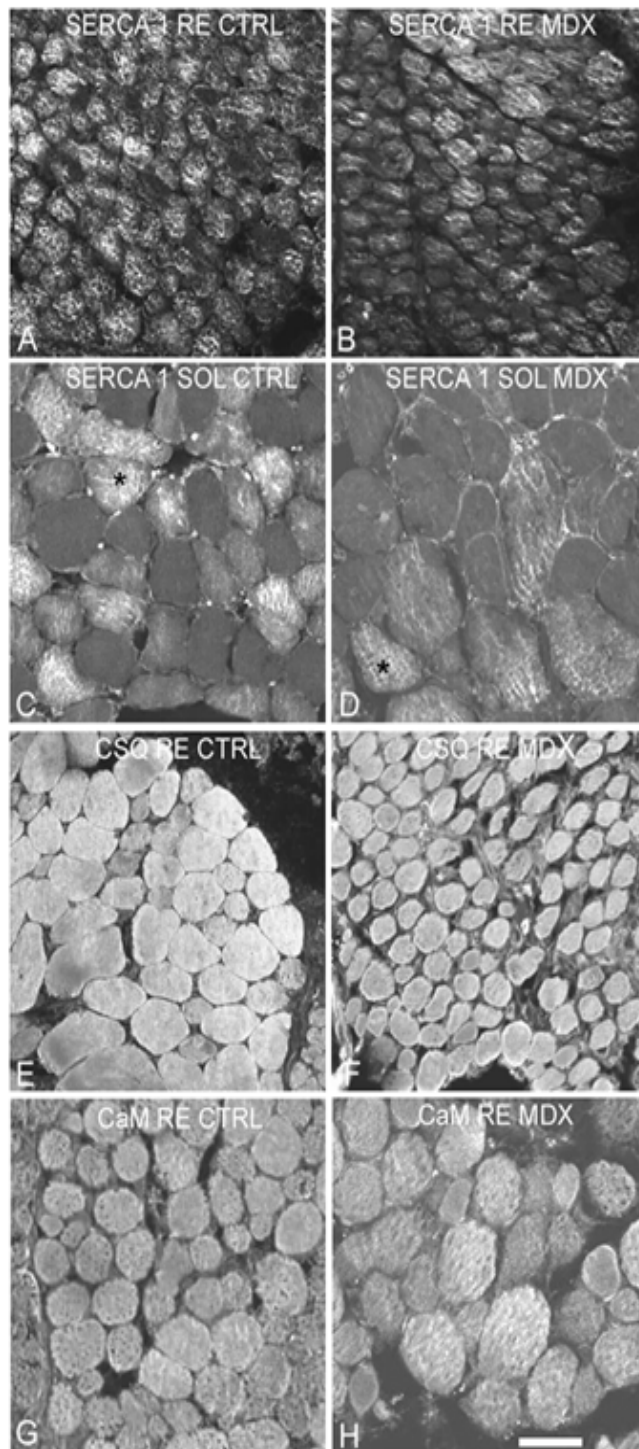


Figure 3. Immunofluorescence localization of calcium-binding proteins in controls (CTRL) and dystrophic (MDX) rectus (RE) and soleus (SOL) muscles. SERCA1 showed a similar pattern of distribution in RE control (A) and mdx (B). In soleus, only some muscle fibers were positive to SERCA1 (asterisk in C and D). Calsequestrin (CSQ) and calmodulin (CaM) showed a cytoplasmatic pattern of distribution in controls (E, G) and dystrophic (F, H) muscles. Scale bar (shown only in H), 10 μ m (E, G, H), 20 μ m (A, B, F) and 30 μ m (C, D).

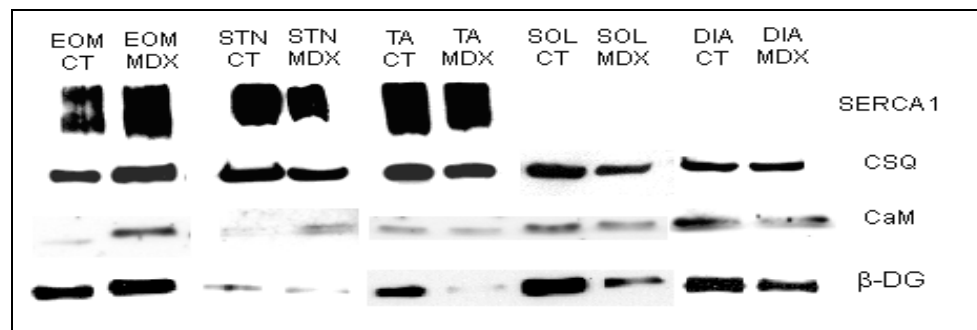
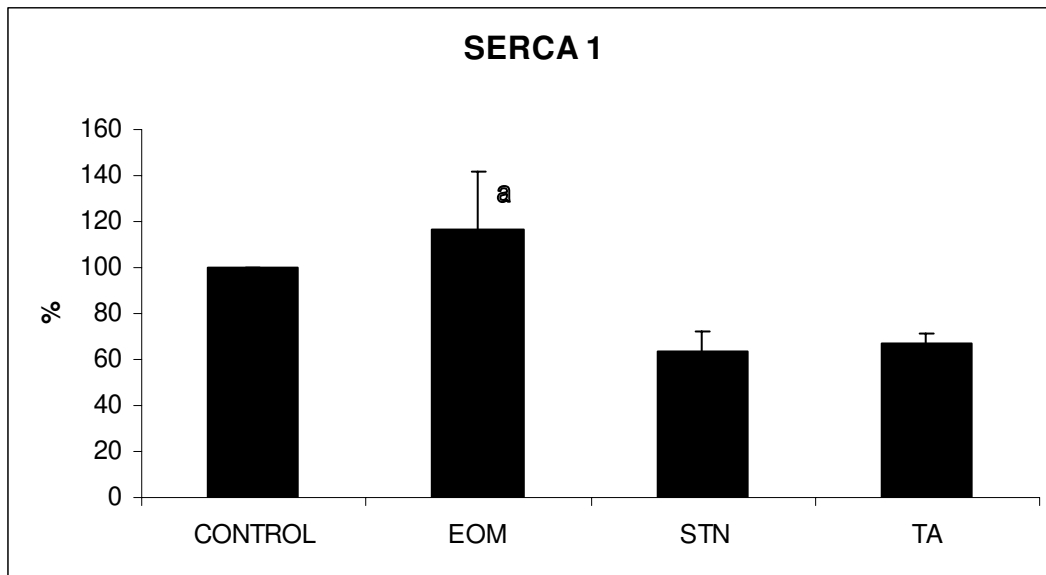
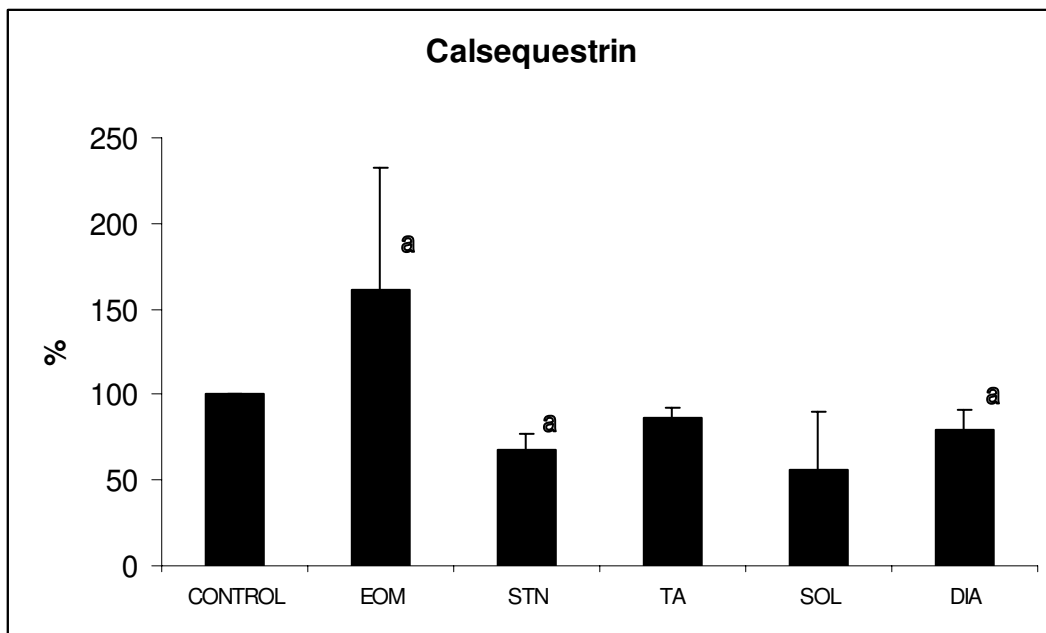


Figure 4. Immunoblotting analysis of calcium-binding proteins expression in crude extracts of extra-ocular (EOM), sternomastoid (STN), tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and diaphragm (DIA) muscles from control (CT) and dystrophic (MDX) mice. Shown are the results obtained for SERCA1, calsequestrin (CSQ), calmodulin (CaM). The dystrophin-glycoprotein component β -dystroglycan (β -DG) is also shown.

Figure 5

A**B**

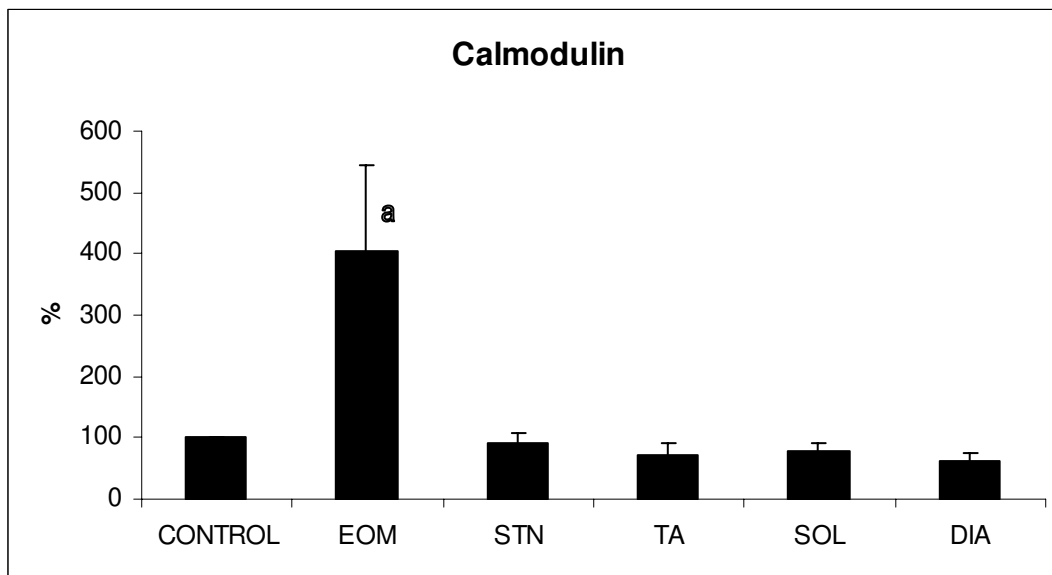
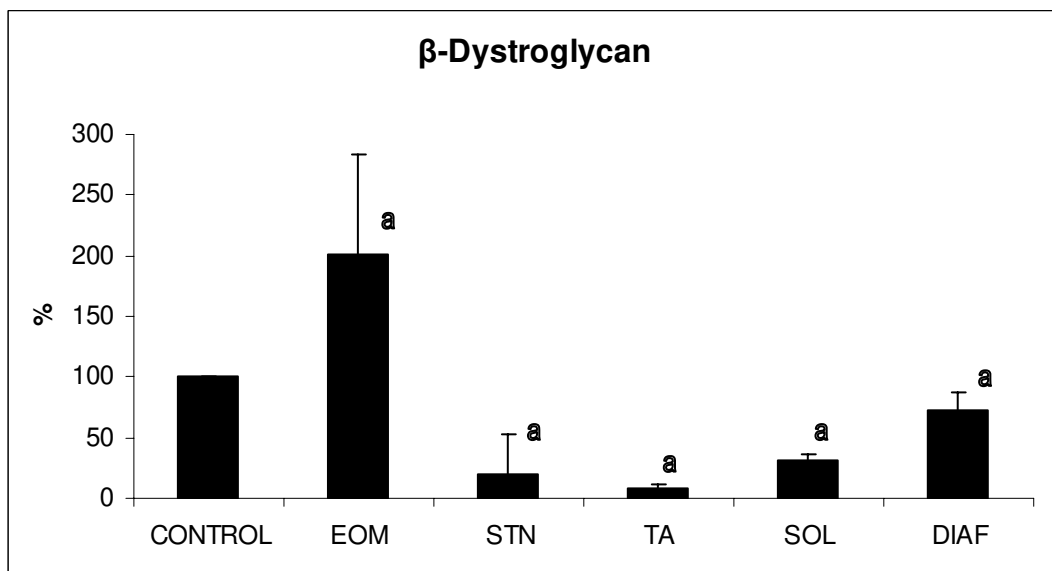
C**D**

Figure 5. Graphical representation of the calcium-binding proteins expression (%) in spared extra-ocular muscle (EOM), sternomastoid (STN) and tibialis anterior (TA) dystrophic muscles in relation to normal control (100%). a, means statistically significant in comparison to control (Anova). Error bars, SD.

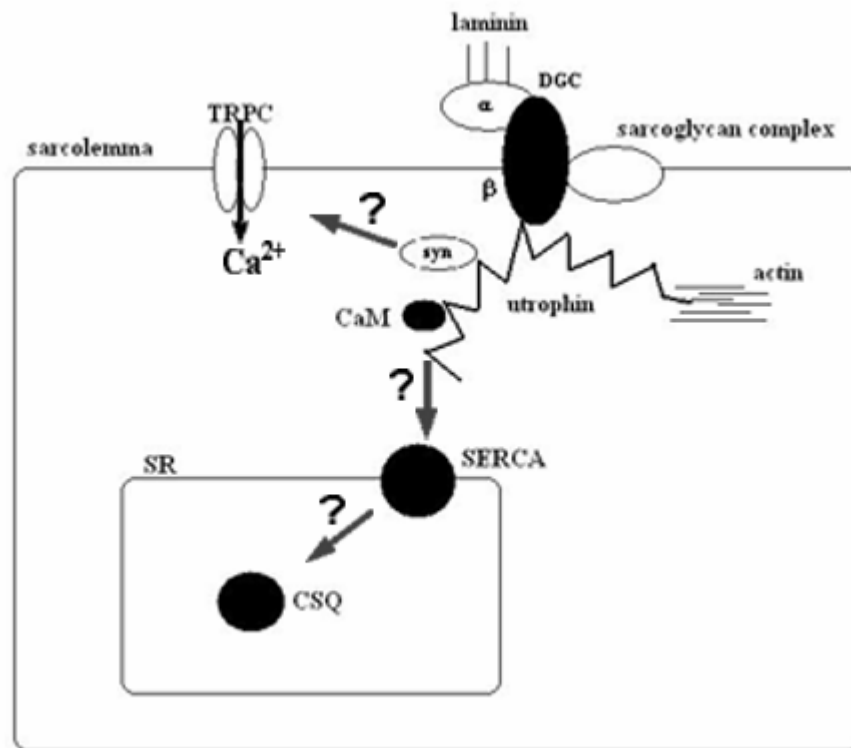


Figure 6. A schematic diagram of the dystrophin-glycoprotein complex in the spared extraocular muscle of a dystrophic muscle fiber. The dystrophin-glycoprotein complex is hypothesized to play a role in cellular signaling [36]. It is postulated that utrophin expression can compensate for the absence of dystrophin: dystrophin and utrophin are likely to bind to actin and β -dystroglycan (β -DGC) with similar affinities, but using distinct modes of contact [3]. The WW-EF-ZZ domains of utrophin mediate binding to β -DGC and the ZZ domain of utrophin, to calmodulin (CaM) [42]. The dystrophin-glycoprotein complex through syntrophin (syn), can influence TRPC (transient receptor potential channel), which participate in calcium entry and homeostasis [15]. Whether these associations participate in a signal transduction pathway to regulate the expression of calcium-binding proteins (SERCA and calsequestrin – CSQ) in the sarcoplasmic reticulum (SR) remains to be established.

Confirmação de Submissão – Neuromuscular Disorders

----- Original Message ----- From: "Neuromuscular Disorders"
<j.miller@imperial.ac.uk>
To: <marques@unicamp.br>
Sent: Wednesday, August 22, 2007 11:40 AM
Subject: Submission Confirmation for

Dear Prof Marques,

Your submission entitled "Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient mdx mice: potential role in muscle sparing" has been received by journal Neuromuscular Disorders

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nmd/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Neuromuscular Disorders

9.2 DECLARAÇÃO COMITE DE ÉTICA

DECLARAÇÃO

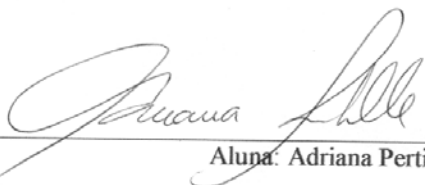
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada "Papel das proteínas ligadas ao cálcio no mecanismo de proteção à mionecrose no modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne".

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

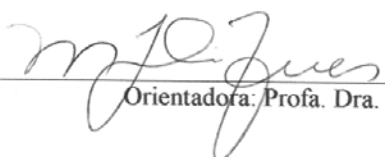
() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1169-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).



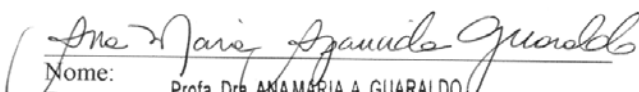
Aluna: Adriana Pertille



Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: Profa. Dra. ANAMÁRIA A. GUINALDO
Função: Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP