UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RENATO FERRETTI

MÚSCULOS LARÍNGEOS DISTRÓFICOS: PROTEÇÃO À MIONECROSE, EXPRESSÃO DE SERCA1 E CALSEQUESTRINA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Renato Ferretti

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ferretti, Renato
F415m Músculos laríngeos distróficos: proteção à mionecrose, expressão de SERCA1 e calsequestrina / Renato Ferretti. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Humberto Santo Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Músculos laríngeos. 2. Músculo esquelético. 3. Distrofia muscular. 4. Calsequestrina. 5. SERCA1. I. Santo Neto, Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Protection from myonecrosis, and expression of SERCA1 and calsequestrin in dystrophic laryngeal muscles.
Palavras-chave em inglês: Laryngeal muscles; Skeletal muscle; Muscular dystrophy; Calsequestrin; SERCA1.
Área de concentração: Anatomia.
Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.
Banca examinadora: Humberto Santo Neto, Maeli Dal Pai Silva, Rosana Macher Teodori.
Data da defesa: 18/12/2007.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RENATO FERRETTI

MÚSCULOS LARÍNGEOS DISTRÓFICOS: PROTEÇÃO À MIONECROSE, EXPRESSÃO DE SERCA1 E CALSEQUESTRINA

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

Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Campinas, 2007

Campinas, 18 de dezembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Ademir De Marco

Assinatura

Dedico...

Aos meus Pais**, Mauro e Sônia: "**Que me ensinaram o sentido da vida, os verdadeiros valores e força maior que é a família".

Agradecimentos

A **Deus**...

À minha irmã (**Fernanda**), ao cunhado (**Maurício**) e minha sobrinha (**Maria Júlia**) pelo constante incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

À **Carolina,** pelo carinho, companheirismo, apoio e compreensão em todas as horas.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural** pelo acolhimento e excelência na formação profissional de seus alunos.

Ao Professor **Humberto Santo Neto,** pelos conhecimentos, respeito, colaboração, incentivo e aprendizado durante a realização deste trabalho. Pela confiança e por ter dirigido meus passos, visando aprimoramento didático e científico.

À Professora **Maria Júlia Marques,** pelas importantes considerações para realização deste trabalho e por ceder seu laboratório para realização deste trabalho.

Ao Professor **Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira** pelas considerações e lapidação deste trabalho, durante a análise pré-defesa e sugestões durante o exame de qualificação.

Aos Professores **Edson Rosa Pimentel** e **Elaine Minatel** pelas pertinentes considerações e sugestões dadas durante o exame de qualificação.

À **Sra. Liliam Alves Senne Panagio** pela atenção e auxílio durante todo o mestrado.

Aos funcionários do Depto. de Anatomia, **Sr. Norivaldo Celestino, Sr. Marco Aurélio Ribeiro de Paula, Sr. Paulo Afonso Bernardes, Sr. Paulo Francisco dos Santos, Sr. Toni Donizeti dos Santos, Sra. Marlene Lima Francisco e Sra. Ana Floriano** pela disposição em ajudar durante minha formação.

Ao **Sr. Antônio R. Calixto** pelo atendimento e colaboração na realização da técnica de imunobloting.

Aos amigos **Carlos Eduardo, Luiz Augusto, João Paulo, Luana, Thais, Maysa, Mariana e Carol** pela amizade, incentivo e apoio em todas as horas.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação pelo apoio, auxílio e ensinamento de como tornar convivência em grupo um ponto agradável.

Aos colegas do Departamento de Histologia pelo coleguismo, auxilio e apoio durante a execução deste trabalho.

A **FUNCAMP** pelo auxílio financeiro concedido durante o Programa Estágio Docente (PED).

A **CAPES** pela concessão de bolsa e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

“A maior realização da vida é a conquista feita com inteligência e coração”

(Autor desconhecido)

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

Estrutura da tese

1. Aspectos gerais....1

2. Introdução....4

2.1 Distrofia Muscular de Duchenne....5

2.2 Camundongo mdx como modelo para DMD....6

2.3 Proteínas reguladoras de cálcio em músculos normais e distróficos....7

2.4 Na DMD e nos camundongos mdx existem músculos que não sofrem necrose....9

2.5 Músculos intrínsecos da laringe....10

3. Objetivo....12

4. Materiais e métodos....14

4.1 Animais....15

4.2 Preparo dos músculos para análise histopatológica....15

4.3 Análise histopatológica (avaliação dos parâmetros distróficos)....16

4.4 Imunohistoquímica....17

4.4.1 Expressão da distrofina....17

4.4.2 Expressão das proteínas reguladoras do cálcio (SERCA1 e calsequestrina)....17

4.5 Imunobloting....18

4.5.1 Preparação de extrato total....18

4.5.2 Quantificação das proteínas totais....19

4.5.3 Anticorpos Primários....20

4.5.4 Anticorpos Secundários....20

4.6 Análise Estatística....20

5. Capítulo 1: Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy....21

6. Capítulo 2: Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles od dystrophin-deficient *mdx* mice....27

7. Considerações finais.....48
8. Referências bibliográficas.....52
9. Anexos.....62

Lista de abreviaturas

AO – Músculo aritenóideo oblíquo;

BSA – Soro albumina bovina;

CaM – Calmodulina;

Ca^{2+} - Íons cálcio;

$[Ca^{2+}]s$ – Concentração sarcoplasmática de íons cálcio;

CDG – Complexo Distrofina-Glicoproteinas;

CSQ – Calsequestrina;

CT – Músculo cricotireóideo;

Ctrl – Controle;

DABCO - 1,4-diazabyclo[2.2.2]octane;

DHPRs – Canais voltagem-dependentes dihidropiridina;

DMD – Distrofia muscular de Duchenne;

EBD – Azul de Evans;

EOM – Músculos extraoculares;

HE – Hematoxilina e Eosina;

ILMs – Músculos intrínsecos da laringe;

LCA – Músculo cricoaritenóideo lateral;

LTA – Músculo tiroaritenóideo lateral;

Mdx - Murine dystrophin X-linked;

MTA – Músculo tiroaritenóideo medial;

MyHC – Cadeia pesada de miosina;

PCA – Músculo cricoaritenóideo posterior;

PBS – Tampão fosfato salina;

PV – Parvalbumina;

RS – Retículo sarcoplasmático;

RyR – Receptores rianodina;

SAC – Canal ativado pelo alongamento;

SERCA1 - Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático;

TBS-T – Tampão tris salina- Tween.

Resumo

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e o camundongo *mdx,* modelo experimental da doença, caracterizam-se pela ausência de distrofina e pela necrose das fibras musculares. Alguns músculos são protegidos da mionecrose e admite-se que nestes a expressão das proteínas reguladoras de cálcio está aumentada. Os músculos intrínsecos da laringe (ILMs) apresentam características anatômicas e fisiológicas semelhantes aos músculos extra-oculares (EOMs), que são protegidos da mionecrose em pacientes portadores de DMD e camundongos *mdx*. Assim levantamos a hipótese de que os ILMs são protegidos da necrose de suas fibras e apresentam expressão diferenciada de proteínas reguladoras do cálcio. Foram avaliados os ILMs e músculos apendiculares de camundongos C57Bl/10 (controles) e *mdx*, adultos e idosos. Foi analisado a porcentagem de núcleos centrais, como um sinal de fibras lesionadas e em reparação e foi utilizado o azul de Evans, como marcador de lesão miofibrilar. Após a caracterização desses músculos, foi estudado por imunohistoquímica e imunobloting, o nível da expressão de proteínas reguladoras do cálcio, calsequestrina e Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1). Observou-se que, exceto o músculo cricotireóideo (CT), nenhum ILMs dos camundongos *mdx* adultos ou idosos apresentaram sinais de miopatia, entretanto núcleos centrais foram visíveis no músculo tibial anterior do mesmo animal. Houve aumento significativo da porcentagem de núcleos centrais no músculo CT comparado com outros ILMs, o qual piorou com envelhecimento. A expressão de SERCA1 e calsequestrina está aumentada nos ILMs distróficos em relação aos controles, distintamente do que ocorre nos músculos apendiculares. Assim, conclui-se que os ILMs dos camundongos *mdx* são protegidos da mionecrose e mostram níveis elevados de SERCA1 e calsequestrina, sugerindo que a manutenção da homeostase do cálcio pode estar envolvida na proteção desses músculos.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) and *mdx* mice, a model for DMD, is characterized by the lack of dystrophin expression and muscle fiber necrosis. Some muscle are enigmatically protected and admitted that an elevated expression of calcium-binding proteins. The intrinsic laryngeal muscles (ILMs) share many anatomical and physiological properties with extra-ocular muscles, which are unaffected in both Duchenne muscular dystrophy and *mdx* mice. We hypothesized that ILMs are spared from myonecrosis in the *mdx* and investigated whether this possible protection is related to an increased expression of calcium-binding proteins, SERCA1 and calsequestrin, which may be protective against the elevated calcium levels seen in dystrophic fibers. ILMs and limb muscles of adult and aged control C57Bl/10 and *mdx* mice were used. The percentage of central nucleated fibers, as a sign of muscle fibers that had experienced injury and regeneration, and myofibers labeling with Evans blue dye, as a marker of myofiber damage, were studied. After this characterization, the expression of Sarco-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA1) and calsequestrin was examined using immunofluorescence and immunoblotting. Except for the cricothyroid muscle (CT), none of the ILMs from adult and old *mdx* mice showed signs of myofiber damage. Central nucleation was readily visible in tibialis anterior of the same *mdx* mice. A significant increase in the percentage of central nucleated fibers was observed in adult CT compared to the other ILMs, which was worsened by age. Dystrophic ILMs presented a significant increase in the proteins studied, in comparison to controls. These proteins were reduced in the non-spared *mdx* muscles. Thus we show that the ILMs are spared from the lack of dystrophin and the increase of SERCA1 and calsequestrin may permit a better maintenance of calcium homeostasis with the consequent absence of myonecrosis.

Estrutura da tese

Em pacientes com DMD e em camundongos mdx alguns músculos crânios-faciais, como os músculos extraoculares (EOMs) não são comprometidos pela ausência de distrofina. Considerando-se que a necrose de suas fibras musculares é o fator determinante na evolução da doença, entender o mecanismo pelo qual esses músculos são protegidos é de interesse para a melhor compreensão da patogênese da mionecrose. Os músculos intrínsecos da laringe (ILMs) apresentam propriedades anatômicas e fisiológicas que os torna semelhante aos EOMs. Considerando-se que o aumento intracelular de cálcio tem papel na gênese da mionecrose e que a expressão de algumas proteínas reguladoras do cálcio, como por exemplo calsequestrina e SERCA1 está aumentado nos músculos protegidos, admite-se que essas proteínas estejam envolvidas com o mecanismo de proteção.

Examinamos através de técnicas histopatológicas a ocorrência de aspectos distróficos (necrose de fibras musculares e índice de fibras com núcleo central) nos ILMs em mdx. Os resultados foram apresentados no **capítulo 1 (p. 21)** pelo artigo publicado na revista *Muscle and Nerve* 35(3): 349-353, 2007. Concluindo que os ILMs são protegidos da mionecrose, não obstante a ausência da distrofina, fornecendo um modelo interessante para estudo dos mecanismos de proteção na DMD.

Investigamos também os níveis das proteínas calsequestrina e Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1), reguladoras do cálcio intracelular, associando-os a possíveis mecanismos de proteção dos ILMs em camundongos mdx. Os resultados foram apresentados no **capítulo 2 (p. 27)** pelo artigo submetido à publicação na revista *Muscle and Nerve* (MUS- 07-0520), onde demonstramos que os níveis de calsequestrina e SERCA1 estão aumentados nos músculos ILMs de camundongos *mdx,* sugerindo que a manutenção dos níveis de cálcio intracelular contribui para a proteção da fibra muscular.

1. ASPECTOS GERAIS

1. Aspectos Gerais

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária caracterizada por mutação no cromossomo X, que resulta na ausência da transcrição da proteína distrofina nos músculos esqueléticos e cardíacos (Engel et al., 1994). Histologicamente os músculos estriados caracterizam-se pela extensa necrose das fibras musculares. Camundongos *mdx* são utilizados como modelo animal da DMD pela ausência na expressão da distrofina e necrose das fibras musculares (Hoffman et al.; Torres e Duken, 1987).

Os músculos extraoculares (EOMs), tanto de portadores da DMD como dos camundongos *mdx*, apresentam-se enigmaticamente protegidos da mionecrose durante o curso da doença (Porter et al., 1998; 2000; 2006). Os músculos intrínsecos da laringe (ILMs) apresentam características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas semelhantes àquelas dos músculos extraoculares (Hoh et al., 2005; McLoon et al., 2002; 2004; 2007). Assim, por exemplo, os ILMs são inervados por nervo craniano, expressam cadeia pesada de miosina (MyHC) do tipo extraocular, apresentam tempo de contração-relaxamento curto e remodelação contínua de suas fibras (Goding et al., 2005).

O exato mecanismo da necrose das fibras musculares não está totalmente esclarecido, mas o aumento do cálcio intracelular pode ser um fator importante (Spencer et al., 1995; Han et al.; Whitehead et al., 2006). Postula-se que a ausência da distrofina torna a membrana plasmática susceptível à ruptura (Petrof et al., 1993), altera o funcionamento dos canais de cálcio (Alderton e Steinhardt, 2000; Vandebrouck et al., 2007), o que aumenta o influxo do cálcio para a fibra muscular (Tidball e Spencer, 2000; Whitehead et al., 2006).

Associada aos níveis aumentados de cálcio citosólico, os músculos distróficos apresentam reduzida capacidade de manter a homeostase do cálcio (Khurana et al., 1995). Como conseqüência aos níveis elevados de cálcio, ocorre ativação de proteínas cálcio dependentes que levam a fibra muscular à proteólise (Tidball e Spencer, 2000).

O retículo sarcoplasmático (RS) tem papel importante no controle da liberação e captura do cálcio para contração e relaxamento muscular, sendo a principal organela de estoque do cálcio nas fibras musculares estriadas (MacLennan et al., 1986; Ross e Dirksen, 2006). A mais importante proteína para a captura e armazenamento do cálcio no RS é a calsequestrina (MacLennan et al., 1998). Nos músculos distróficos, as proteínas do RS que regulam o cálcio parecem estar alteradas, levando à eventos intracelulares que culminam na mionecrose (Berchtold et al., 2000).

Considerando as semelhanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas dos ILMs com os músculos extraoculares, estabelecemos a hipótese que os ILMs são protegidos da mionecrose nos camundongos *mdx* e que a expressão de proteínas reguladoras do cálcio poderiam estar envolvidas nesse processo.

2. INTRODUÇÃO

2. Introdução

2.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum entre as distrofinopatias, afetando uma em cada 3500 crianças do sexo masculino. Trata-se de doença recessiva ligada ao cromossomo X, caracterizada pela falta da distrofina, proteína estrutural que se localiza no lado citosólico do sarcolema, a membrana da fibra muscular (Engel et al., 1994).

Os primeiros sinais surgem entre três e cinco anos de vida e caracterizam-se por fraqueza muscular nos membros inferiores, dificuldade em subir escadas e correr. Quedas freqüentes são também observadas. Ao exame histopatológico, as fibras musculares apresentam extensa necrose. A perda da função muscular progride e os pacientes tornam-se dependentes de cadeira de rodas e ventilação pulmonar mecânica e, por volta da 2° ou 3° década de vida, o indivíduo vai a óbito, normalmente por falência do músculo diafragma (Engel et al., 1994; Biggar et al., 2006).

A DMD ocorre em função da mutação no gene responsável pela expressão da distrofina (Hoffman et al., 1987; Bonilla et al.,1988). A distrofina é um membro das proteínas spectrinas, com peso molecular de 427kDa. Em músculos esqueléticos normais, a distrofina localiza-se na superfície citoplasmática do sarcolema e se associa com glicoproteínas formando um complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) (Hoffman et al., 1987; Bonilla et al.,1988).

No CDG, a distrofina conecta a F-actina à laminina-2, componente da matriz extracelular (Ervasti e Campbell, 1993). Admite-se que o CDG atue como estabilizador mecânico do sarcolema durante a contração muscular (Petrof et al., 1993). Particularmente, a distrofina parece ter relação com a atividade de canais de cálcio independentes de voltagem sensíveis ao estiramento e, na ausência da distrofina, aumentaria o influxo de cálcio (Backer et al., 2002).

Admite-se que a falta da distrofina levaria à desorganização e instabilidade mecânica do sarcolema durante a contração excêntrica (Petrof et al., 1993) e aumentaria a atividade de canais de Ca^{2+} ativados pelo estiramento da fibra muscular (Stretch-Activated Channels – SACs). Os SACs são canais mecanosensíveis permeáveis ao Ca^{2+} que aumentam a concentração sarcoplasmática deste íon ($[Ca^{2+}]_s$) (Yeung et al., 2005), o que levaria a ativação exagerada de proteases endógenas, como a calpaina, resultando finalmente na necrose da fibra muscular. Assim sendo, é possível que o cálcio desempenhe papel central na gênese da mionecrose (Mariol e Ségalat, 2001; Gailly, 2002).

2.2 Camundongo mdx como modelo para DMD

Diversas espécies animais, como cães e gatos, podem apresentar ausência da expressão da distrofina, tornando-as modelos para estudos da patogênese e tratamento da DMD (Gaschen et al., 2001). Contudo, por diversas razões como, por exemplo, facilidade de manutenção e baixo custo financeiro, o camundongo *mdx* representa o modelo animal mais utilizado (Engel et al., 1994).

O camundongo C57Bl/10*mdx* (murine dystrophin X-linked - *mdx*) foi descrito inicialmente por Bulfield e colaboradores (1984). Estudos mostram mutação do gene da distrofina semelhante àquela ocorrida na distrofia muscular de Duchenne (Hoffman et al., 1987; Engel et al., 1994; Collins e Morgan, 2003). Histologicamente apresentam acometimento dos músculos esqueléticos semelhante aos dos pacientes portadores de DMD: fibras musculares em degeneração, fibras regeneradas com núcleo em posição central e fibrose intersticial (Bulfield et al., 1984; Collins e Morgan, 2003).

Entretanto, a evolução da doença nos camundongos *mdx* não é a mesma dos portadores de DMD. A necrose é, em boa parte da vida, seguida de intensa regeneração, fazendo com que a deposição de tecido fibroso intersticial e tecido gorduroso seja menos extensa que na DMD (Torres e Duchen, 1987; Coulton et. al.; Cullen e Jaros, 1988).

Nos camundongos mdx, os primeiros indícios de mionecrose ocorrem a partir do 21° dia pós-natal e atingem o ápice ao redor do primeiro mês de vida, diminuindo progressivamente até o 18º mês. Subseqüente a isto, o processo de degeneração volta a ocorrer e permanece pelo resto da vida do animal. Interessante é que nessa fase da vida (18 meses em diante) a capacidade de regeneração diminui acentuadamente, com comprometimento do músculo cardíaco (Engel et al., 1994; Pastoret e Sebille, 1995).

O camundongo *mdx* é utilizado na maioria dos estudos para compreensão dos aspectos da biologia dos músculos esqueléticos distróficos e dos mecanismos das distrofinopatias (Straub et al., 1997; Yoshida et al., 2006).

2.3 Proteínas reguladoras de cálcio em músculos normais e distróficos

Alterações da concentração de cálcio sarcoplasmático ($[Ca^{2+}]_s$) são essenciais para o mecanismo de contração-relaxamento da fibra muscular esquelética (Berridge et al., 1998). A entrada do cálcio se faz através dos canais voltagem-dependentes dihidropiridina (DHPRs) e tipo-L (L-type Ca^{2+} channel), localizados nos túbulos transversos. O cálcio será primeiramente armazenado no retículo sarcoplasmático e sua liberação para o sarcoplasma se dá pelo receptor rianodina (RyRs) em resposta à despolarização do sarcolema (para revisão vide Berchtold et al., 2000).

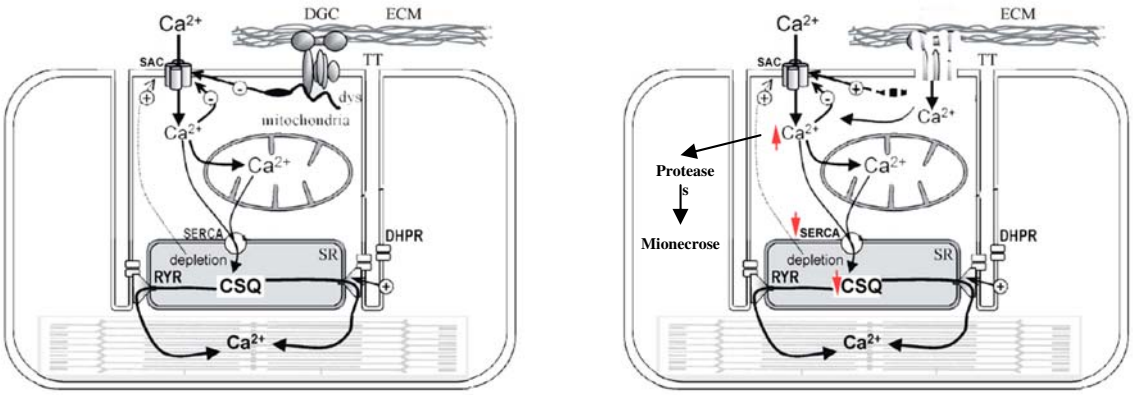
A concentração intracelular de cálcio é regulada por diversas proteínas, como a calmodulina (CaM) e a parvalbumina (PV). A calmodulina (CaM) liga-se ao cálcio sarcoplasmático ativando proteinas kinases responsáveis pela fosforilação da miosina, no processo de contração-relaxamento muscular (Berchtold et al., 2000). Além disto, a calmodulina regula a interação de componentes do CDG, incluindo a distrofina-actina (Jarrett e Foster, 1995) e parece estar envolvida no processo de fosforilação da distrofina (Luise et al.,1993).

O cálcio usado na contração muscular poderá ser levado para fora da fibra muscular pelas bombas Ca^{2+}-ATPase da membrana plasmática (PMCAs) e Na^{+}/Ca^{2+} -ATPase (Berchtold et al., 2000; Ruegg et al., 2002) ou retornar para dentro do retículo sarcoplasmático pela bomba Ca^{2+}-ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA). Isto impede o aumento da $[Ca^{2+}]_s$ resultando no relaxamento da fibra muscular (MacLennan et al., 1998).

O Ca^{2+} bombeado pela SERCA para o lúmen do retículo sarcoplasmático será seqüestrado pela calsequestrina (CSQ). A calsequestrina é a maior proteína transportadora de Ca^{2+} do lúmen do retículo sarcoplasmático. Apresenta alta capacidade de armazenamento do Ca^{2+}, sendo componente chave para regulação do Ca^{2+} na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático das fibras musculares esqueléticas (MacLennan, 2000a). Além disto, a calsequestrina parece regular a liberação do cálcio para fora do retículo sarcoplasmático através dos receptores rianodina (RyRs), permitindo níveis normais de cálcio no citosol (Ohkura et al., 1998; Beard et al., 2002).

Anormalidades nas proteínas relacionadas ao Ca^{2+} são pontos importantes na fisiopatologia de determinadas doenças (MacLennan et al., 2000b; Gommas et al., 2002). Eventos que levam ao aumento da $[Ca^{2+}]_s$ promovem efeitos deletérios sobre a célula por ativação de proteínas Ca^{2+} dependente, como a calpaina (Spencer et al., 1995; Tidbaal e Spencer, 2000; Spencer e Mellgren, 2002), levando à necrose da fibra muscular.

Normal **Distrófico**



Modificado de Vanderbrouck et al., 2005

Há indícios de que a expressão de algumas das proteínas reguladoras do cálcio está alterada nos músculos esqueléticos de paciente portadores de DMD (Niebroj-dobosz et al.,1989), o que sugere que estas proteínas estejam envolvidas na gênese da necrose das fibras musculares (Berchtold et al., 2000; Culligan e Ohlendieck, 2002).

2.4 Na DMD e nos camundongos mdx existem músculos que não sofrem necrose

Na DMD e nos camundongos *mdx,* tanto a musculatura do tronco quanto a apendicular apresentam-se comprometidas pela necrose das fibras musculares. Entretanto, alguns músculos da região crânio-facial, em especial os músculos extra-oculares (EOMs), apresentam-se protegidos da mionecrose (Porter et al., 1998; 1999; 2000; 2001). O conhecimento dos mecanismos moleculares que fazem com que esses músculos sejam protegidos é de grande valia para melhor compreensão do mecanismo de necrose.

Os EOMs apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas em relação aos demais músculos esqueléticos, como tempo de contração-relaxamento rápido, cadeia pesada de miosina do tipo extra-ocular (Porter et al., 1998; 2000), adição contínua de mionúcleos (McLoon et al., 2004) e expressão diferenciada de proteínas do CDG (Pertille et al., 2007 *Submetido*).

Aspectos moleculares, bioquímicos e morfológicos dos músculos extra-oculares, tanto na DMD quanto em camundongos *mdx*, vêm sendo extensivamente estudados. Um mecanismo provável para explicar a proteção relaciona-se às proteínas reguladoras do cálcio (Khurana et al., 1995). Postula-se que os níveis destas proteínas estariam aumentados em relação aos músculos não protegidos (Culligan e Ohlendieck, 2002; Doran et al., 2004). Esta hipótese baseia-se no fato de que a manutenção da homeostase do cálcio impediria a ativação de proteases Ca^{2+}-dependentes (Berchtold et al., 2000; Spencer e Mellgren, 2002).

Entretanto, resultados referentes às alterações na expressão das proteínas reguladoras de cálcio em músculos esqueléticos são contraditórios. Alguns trabalhos demonstram redução da expressão de calsequestrina e manutenção dos níveis de SERCA1 (Doran et al., 2004; Dowling et al., 2004), enquanto outros trabalhos não retrataram diferenças destas proteínas (Culligan et al., 2002a). Estudos recentes realizados em nosso laboratório verificaram que os EOMs têm níveis aumentados das proteínas calmodulina, SERCA1 e calsequestrina (Pertille et al., 2007 *submetido*).

O melhor entendimento dos mecanismos que levam à proteção dos músculos distróficos permitirá o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas, celulares e genéticas para as distrofinopatias.

2.5 Músculos intrínsecos da laringe

Músculos intrínsecos da laringe são aqueles cuja origem e inserção é feita em estruturas da própria laringe, em particular nas cartilagens laríngeas e apresentam função de proteção das vias aéreas, respiração e fonação (Pretterklieber, 2003). Eles incluem: cricoaritenóideo posterior (PCA), cricoaritenóideo lateral (LCA), cricotireóideo (CT), tiroaritenóideo porção lateral (LTA) e

medial (vocal - MTA), aritenóideos transverso (Ta) e oblíquo (OA). Baseado em sua função os músculos são divididos em abdutores (PCA e CT), adutores (LCA, Ta e OA) e tensor da corda vocal (CT) (Hinrichsen e Dulhunty 1982; Pretterklieber et al., 2003).

O músculo cricotireóideo (CT) tem funções mais complexas e diferenças estruturais e anatômicas em relação aos demais músculos intrínsecos da laringe, como inervação pelo nervo laríngeo inferior, tempo de contração-relaxamento e conteúdo do retículo sarcoplasmático reduzido, em relação ao PCA (Hinrichsen e Dulhunty 1982; Hoh et al., 2005).

Os ILMs, similarmente aos músculos extraoculares, compreendem um grupo especial de músculos, pois apresentam características importantes em relação aos demais músculos esqueléticos. São inervados por nervo craniano, têm múltipla inervação, expressam cadeia pesada de miosina do tipo extraocular (MyHC EO - Myosin Heavy Chain Extraocular), possuem tempo rápido de contração e relaxamento (ver revisão Hoh et al., 2005), remodelação contínua das fibras musculares (Goding et al., 2005; McLoon et al., 2007) e pequeno diâmetro de suas fibras.

No presente trabalho, levantamos a hipótese que os ILMs são protegidos da mionecrose e que, caso assim o sejam, as proteínas reguladoras do cálcio poderiam estar envolvidas no mecanismo de proteção através da regulação da homeostase do cálcio na fibra muscular.

3. OBJETIVO

3. Objetivo

Verificar, através de parâmetros histopatológicos, se os músculos intrínsecos da laringe de camundongos distróficos da linhagem *mdx* são protegidos da mionecrose.

Investigar, através das técnicas de imunohistoquímica e imunobloting, se a expressão das proteínas reguladoras do cálcio, calsequestrina e Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1), está alterada nos músculos intrínsecos da laringe de camundongos distróficos da linhagem mdx.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram usados camundongos machos das linhagens *C57Bl/10* (controle) e *C57Bl/10/mdx* (mdx) adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro 12 horas) e ração e água *ad libitum.*

Para análise histopatológica foram utilizados camundongos adultos (4 meses de idade) *mdx* (n=5) e *C57Bl/10* (n=5) e idosos (18 meses de idade) *mdx* (n=5) e *C57Bl/10* (n=5). Para quantificação da expressão de proteínas reguladoras do Ca^{2+} foram utilizados animais *C57Bl/10* (n=20) e *mdx* (n=20) com 2 meses de idade.

Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) n°: 1096-2 (Anexo 1).

4.2 Preparo dos músculos para análise histopatológica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral (600µg/kg). Após sinais de anestesia injetou-se por via intraperitoneal uma solução de azul de Evans a 1% (tetrasodium diazo salt Evans blue dye; Sigma) na dose de 100 µl a cada 10g de peso corporal. O azul de Evans é um marcador *in vivo* de fibras musculares em necrose (Matsuda et al., 1995).

Após 24 horas da injeção do azul de Evans, os animais foram sacrificados com excesso da solução anestésica. A pele da face ântero-lateral do membro posterior direito foi aberta para exposição e retirada do músculo tibial anterior. A seguir, através de uma incisão na linha mediana

da região ventral do pescoço, as glândulas submandibulares foram rebatidas lateralmente para exposição, dissecção e retirada da laringe.

O músculo tibial anterior e a laringe foram posicionados em suporte de madeira através de *tragacam gum* (SIGMA), imersos em isopentano e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi armazenado em biofreezer a –80^{o}C. Cortes transversais de 7 μm do músculo e da laringe foram obtidos em criostato (Microm-HS505E). Parte das lâminas foi corada com Hematoxilina e Eosina (HE) e parte foi usada para identificação do azul de Evans.

4.3 Análise histopatológica (avaliação dos parâmetros distróficos)

As lâminas coradas em HE foram examinadas em microscópio de luz transmitida (Nikon® Eclipse E 400). A caracterização das fibras musculares distróficas foi feita pelo critério da porcentagem de fibras musculares em regeneração e pelo índice de núcleos centrais (Torres e Duchen, 1987; Coulton et al., 1988).

A contagem de fibras musculares com núcleo central e com núcleo periférico foi feita com auxílio de contador manual, utilizando-se um retículo de cem pontos acoplado à ocular do microscópio, na objetiva de 40X. Esta quantificação foi realizada de forma cega. O índice de núcleo central foi obtido pela divisão do número total de fibras contidas em uma secção transversa do músculo pelo número de fibras com núcleos centrais (fibras musculares regeneradas; Marques et al., 2005).

As fibras musculares marcadas com azul de Evans foram observadas sob microscópio de fluorescência (Nikon® EFD 3) em objetiva de 40X, sendo avaliadas seis cortes por lâminas para cada músculo e idade dos animais estudados.

4.4 Imunohistoquímica

4.4.1 Expressão da distrofina

Alguns cortes transversais obtidos dos músculos da laringe e do músculo tibial anterior de ambas as linhagens de camundongos (*mdx* e *C57Bl/10*) foram hidratados com PBS (0.1 M) por 30 minutos e imersos em Triton X-100 (0.3% - Sigma) por 10 minutos. Após lavadas durante 30 minutos em PBS, os cortes foram imersos por 3 horas em solução bloqueadora (15% glicina, 3% soro albumina bovina e 0.6% Triton X-100 em PBS 0.1M) e incubados por 12 horas com anticorpo primário para detecção da distrofina (Dys; 1:500) à 4°C em câmara úmida.

A seguir, os cortes foram lavados por 30 minutos com PBS e incubados com anticorpo secundário anti-mouse IgG-FITC (1:500), durante 1 hora à temperatura de 20°C. Após lavagens com PBS durante 30 minutos, os cortes foram montados em meio de montagem para fluorescência DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; Sigma) e recobertos com lamínulas de vidro.

As lâminas foram analisadas em sistema confocal BioRad (MRC 1024UV; BioRad Laboratories, Hercules, California), montado em microscópio invertido (Zeiss Axiovert 100) e equipado com laser Ar-Kr.

4.4.2 Expressão das proteínas reguladoras do cálcio (SERCA1 e calsequestrina)

Alguns cortes transversais dos músculos acima citados de ambas as linhagens (*mdx* e *C57Bl/10*) foram hidratados com PBS por 30 minutos e imersos em Triton X-100 (0.3% - Sigma) por 10 minutos. Após lavadas durante 30 minutos com PBS, os cortes foram imersos por 3 horas

em solução para bloquear marcação inespecífica (1% Glicina, 3% BSA e 0.6% Triton X-100 em PBS; Sigma) e incubados por 12 horas com anticorpo primário à 4°C em câmara úmida.

A seguir, os cortes foram lavados por 30 minutos com PBS e incubados com anticorpo secundário IgG-FITC (Sigma) durante 1 hora, à temperatura de 20°C. Após lavagens com PBS durante 30 minutos, os cortes foram montados em meio de montagem para fluorescência DABCO (1,4-diazabyclo[2.2.2]octane; Sigma) e recobertos com lamínulas de vidro. As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon acoplado a vídeo-câmera Hamamatsu.

4.5 Imunobloting

4.5.1 Preparação de extrato total

Outro grupo de camundongos *mdx* e *C57Bl/10* foi anestesiado da mesma forma descrita. Após sinais de anestesia, foram perfundidos com PBS e a laringe e o músculo tibial anterior foram dissecados e removidos.

O músculo tibial anterior e a laringe foram seccionados em pequenos fragmentos e homogeneizados em tampão com inibidores de proteases (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 10 µg/ml de aprotinina) a 4ºC em homogeneizador Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA), operado em velocidade máxima por 30 segundos.

Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4ºC por 30 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação da proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

4.5.2 Quantificação das proteínas totais

As amostras de extrato protéico foram tratadas com tampão Laemmli (Tris 10mM, β-MercaptoEthanol 20mM, glicerol 20%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,1%), aquecidas em banho seco por 5 minutos. Em seguida, 30μg de proteína foi pipetado em gel SDS-poliacrilamida em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences) foi realizada em 90 minutos a 120 V em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com TBS-T (Tris base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário (1:1000) diluído em 10ml de TBS-T contendo 3% de leite desnatado a 4ºC, durante 12 horas em agitador mecânico (ROCKER II, Boekel Scientific). As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e incubadas em 10ml de solução basal contendo 3% de leite em pó desnatado e os anticorpos secundários (1: 2.500) por 2 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce) por 5 minutos, seguida pela exposição a um filme Kodak XAR (Eastman KodaK, Rochester, USA). As densidades das bandas das amostras sobre o filme foram escaneadas e posteriormente realizada a quantificação da densitometria em pixels usando o programa Image J 1.37v (National Institute of Health, EUA).

4.5.3 Anticorpos Primários

Anticorpos primários utilizados para imunofluorescência e/ou imunobloting: (i) distrofina, monoclonal NCL-DYS1, Novocastra; (ii) calsequestrina monoclonal, mAb VIIID12, Affinity BioReagents; (iii) Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1), monoclonal, Affinity BioReagents.

4.5.4 Anticorpos Secundários

Foi utilizado anticorpo secundário anti-mouse (IgG FITC; F-0257; Sigma) para imunohistoquímica e anticorpo secundário affinity purified antibody peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (H+L); Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL) para a técnica de imunobloting.

4.6 Análise Estatística

Os dados do índice de nucleação central foram analisados utilizando-se o modelo linear geral (ProcGLM) através do programa estatístico SAS (Instituto SAS, Cary, North Carolina). Para a análise dos resultados obtidos com o imunobloting foi utilizado o programa estatístico Biostat 3.0 (MCT - CNPq). O nível de significância utilizado foi de 5%.

5. CAPÍTULO 1

TRABALHO PUBLICADO (*Muscle and Nerve.* Mar; 35(3): 349-353, 2007)

ABSTRACT: Intrinsic laryngeal muscles share many anatomical and physiological properties with extraocular muscles, which are unaffected in both Duchenne muscular dystrophy and *mdx* mice. We hypothesized that intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in *mdx* mice and may serve as an additional tool to understand the mechanisms of muscle sparing in dystrophinopathy. Intrinsic laryngeal muscles and tibialis anterior (TA) muscle of adult and aged *mdx* and control C57Bl/10 mice were investigated. The percentage of central nucleated fibers, as a sign of muscle fibers that had undergone injury and regeneration, and myofiber labeling with Evans blue dye, as a marker of myofiber damage, were studied. Except for the cricothyroid muscle, none of the intrinsic laryngeal muscles from adult and old *mdx* mice showed signs of myofiber damage or Evans blue dye labeling, and all appeared to be normal. Central nucleation was readily visible in the TA of the same *mdx* mice. A significant increase in the percentage of central nucleated fibers was observed in adult cricothyroid muscle compared to the other intrinsic laryngeal muscles, which worsened with age. Thus, we have shown that the intrinsic laryngeal muscles are spared from the lack of dystrophin and may serve as a useful model to study the mechanisms of muscle sparing in dystrophinopathy.

Muscle Nerve **35:** 349–353, 2007

INTRINSIC LARYNGEAL MUSCLES ARE SPARED FROM MYONECROSIS IN THE *mdx* MOUSE MODEL OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

MARIA JULIA MARQUES, PhD, RENATO FERRETTI, MSc, VIVIANE URBINI VOMERO, MSc, ELAINE MINATEL, PhD, and HUMBERTO SANTO NETO, PhD

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

Accepted 4 October 2006

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe X-linked recessive disorder characterized by progressive loss of muscular strength that affects 1 in 3500 live male births.[9,10] DMD is caused by a lack of dystrophin, a cytoskeletal protein localized on the inner surface of the muscle cell membrane. Lack of dystrophin predisposes the cell membrane to breakdown, leading to muscle-fiber necrosis.[13] In the *mdx* mouse, an experimental model for DMD, skeletal muscle fibers exhibit a drastic reduction in the expression of dystrophin, which results in myonecrosis.[6,26]

The extraocular muscles (EOMs) of both DMD patients and *mdx* mice remain unaffected during the course of the disease. Because necrosis of muscle fibers is central in the pathophysiology of DMD, understanding the mechanisms that allow EOMs to escape from myonecrosis is of interest and has been examined extensively in *mdx* mice.[1,3,5,16,20,22–24,27]

The intrinsic laryngeal muscles (ILMs) share many anatomical and physiological properties with the EOMs.[2,7,11,14] The ILMs are innervated by cranial nerves, express extraocular myosin heavy chain, and present short contraction times and continuous muscle-fiber remodeling.[11,14,25] Hence, we hypothesized that the ILMs are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of DMD and may serve as an additional tool to study the mechanisms of muscle sparing in dystrophinopathy. The present study was undertaken to investigate this hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Male *mdx* and C57Bl/10 mice obtained from the mouse breeding colony at our institution were housed under controlled conditions of 12/12-h light/dark cycle and temperature, with free access to food and water. All experiments were performed in

Abbreviations: CT, cricothyroid; DMD, Duchenne muscular dystrophy; EBD, Evans blue dye; EOMs, extraocular muscles; ILMs, intrinsic laryngeal muscles; PBS, phosphate-buffered saline; TA, tibialis anterior

Key words: aging; dystrophin; intrinsic laryngeal muscles; *mdx* mouse; muscle regeneration

Correspondence to: H. Santo Neto; e-mail: marques@unicamp.br

Published online 1 December 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/mus.20697

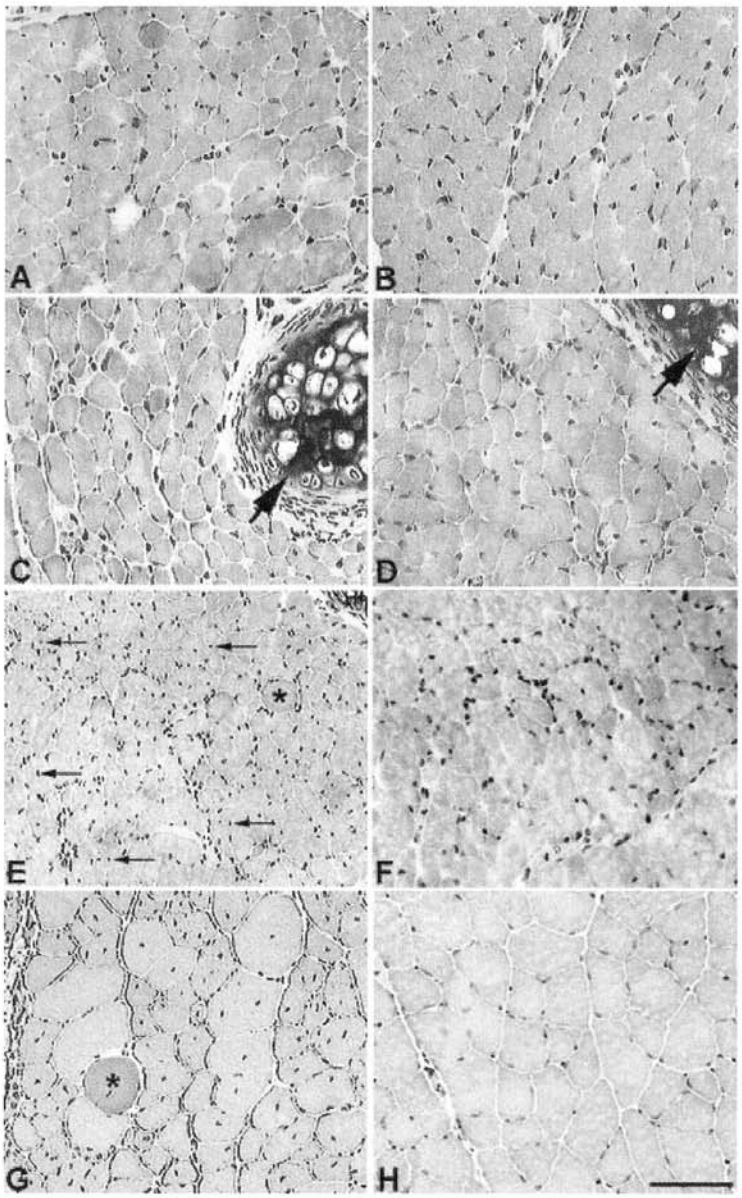


FIGURE 1. Transverse sections of intrinsic laryngeal muscles stained with hematoxylin–eosin. Left column: *mdx* muscles. Right column: counterpart controls; note the presence of peripheral cell nuclei. No differences were observed between old *mdx* lateral thyroarytenoid **(A)**, adult control lateral thyroarytenoid **(B)**, adult *mdx* lateral cricoarytenoid **(C)**, and adult control lateral cricoarytenoid **(D)** muscles. Central nucleated fibers were present in old *mdx* cricothyroid **(E)** (arrows) muscle. **(F)** Old control cricothyroid muscle. Tibialis anterior muscle from *mdx* **(G)** and control **(H)** mice. Asterisk in **E** and **G**: hypercontracted fibers. Arrow in **C** and **D**: cartilage. Scale bar, 140 μm.

accordance with the guidelines for the use of animals set forth by our institution.

For visualization of muscle-fiber damage, adult (4 months of age) *mdx* ($n = 5$) and C57Bl/10 (control; $n = 5$) and old (18 months of age) *mdx* ($n = 5$) and C57Bl/10 ($n = 5$) mice were injected with Evans blue dye (EBD; Sigma, St. Louis, Missouri), a marker of sarcolemmal lesions.[12] The animals received an intraperitoneal injection of 1% EBD in phosphate-buffered saline (PBS) at a dose of 100 μl per 10 g body weight. Twenty-four hours later, the mice were killed with an overdose of chloral hydrate and the larynx and right tibialis anterior (TA) muscle were dissected out and snap frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen.

Cryostat cross-sections of the larynx (transverse and longitudinal 7-μm-thick sections) and TA (trans-

Table 1. Percentage of central nucleated fibers in lateral cricoarytenoid (LCA), posterior cricoarytenoid (PCA), lateral thyroarytenoid (LTA), medial thyroarytenoid (MTA), cricothyroid (CT) and tibialis anterior muscles from adult (4-month-old) and aged (18-month-old) C57B1/10 (control) and *mdx* mice.

	LCA		PCA		LTA		MTA		CT		Tibialis anterior	
	Adult	Aged	Adult	Aged	Adult	Aged	Adult	Aged	Adult	Aged	Adult	Aged
Control	2.0 ± 1.3 (n = 7)	2.2 ± 0.4 (n = 3)	0.8 ± 0.6 (n = 6)	1.1 ± 0.2 (n = 3)	1.1 ± 0.7 (n = 7)	1.2 ± 0.8 (n = 3)	1.2 ± 0.7 (n = 6)	1.4 ± 0.9 (n = 3)	4.8 ± 1.1* (n = 7)	5.3 ± 1.1* (n = 3)	1.0 ± 0.1 (n = 5)	0.9 ± 0.1 (n = 5)
mdx	2.4 ± 1.1 (n = 10)	2.5 ± 0.3 (n = 6)	1.0 ± 0.5 (n = 10)	1.1 ± 0.3 (n = 5)	1.3 ± 0.6 (n = 10)	1.4 ± 0.6 (n = 5)	1.2 ± 0.6 (n = 5)	1.3 ± 0.5 (n = 6)	9.3 ± 4.0* (n = 8)	18.0 ± 1.5*† (n = 5)	50.0 ± 1.0* (n = 5)	96 ± 2.0 (n = 5)

Values represent the mean ± standard deviation; n = number of muscles examined.
** $P < 0.05$: significantly different from all groups (Duncan's multiple comparisons of means).*
† $P < 0.05$: significantly different from adult animals of the same strain (Duncan's multiple comparisons of means).

verse 7-μm-thick sections) were stained with hematoxylin–eosin (H&E) for quantification of the total number of fibers and the number of fibers with central nucleation, indicative of muscle regeneration. The number of fibers and of central nucleated fibers was counted by a blinded observer. The ILMs studied were the lateral thyroarytenoid, medial thyroarytenoid (vocalis muscle), lateral cricoarytenoid, posterior cricoarytenoid, and cricothyroid (CT).

Some sections were labeled for dystrophin. 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 (15% glycine, 3% bovine serum albumin, and 0.6% Triton X-100 in PBS; Sigma) for 3 h. The sections were incubated with dystrophin antibody (NCL-DYS1 mouse monoclonal, Novacastra, Newcastle upon Tyne, UK) at 1:500 overnight at 4°C, washed with PBS, and incubated with secondary anti-mouse immunoglobulin G–flourescein isothiocyanate (IgG-FITC; Sigma, St. Louis, Missouri) at 1:500 for 1 h at room temperature. Sections were washed again in PBS, coverslipped with 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO; Sigma) mounting medium, and observed under a confocal microscope (MRC 1024; BioRad Laboratories, Hercules, California).

EBD staining appears as a bright red emission under a fluorescence microscope. Fiber counts of EBD-positive muscle fibers and H&E observation were done for all sections and photographed under a Nikon fluorescence microscope connected to a Hamamatsu video camera. Statistical analysis was performed using the ProcGLM (general linear models) of the SAS statistical program; mean comparisons were done using the average multiple comparison test (SAS Institute, Cary, North Carolina).

RESULTS

In adult and old *mdx* mice, no signs of myofiber damage were observed in any of the ILMs (Fig. 1A, C), except for the CT muscle (Fig. 1E). The lateral thyroarytenoid, medial thyroarytenoid (vocalis muscle), lateral CT, and posterior CT appeared to be normal, with muscle fibers round or roughly polygonal with rounded angles. In cross-sections, their nuclei were randomly placed, always found in a peripheral location directly under the sarcolemma,

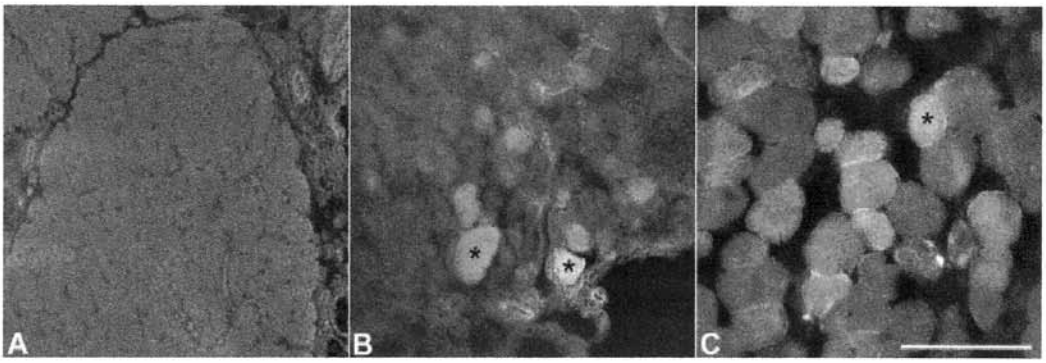


FIGURE 2. Transverse sections of Evans blue dye (EBD)–labeled muscles. Adult *mdx* lateral thyroarytenoid muscle **(A)** showing no EBD-positive fibers. EBD-positive fibers were observed in adult *mdx* cricothyroid **(B)** (asterisk) and tibialis anterior **(C)** (asterisk) muscles. Scale bar, **(A)** 166 μm; **(B)** 144 μm; **(C)** 183 μm.

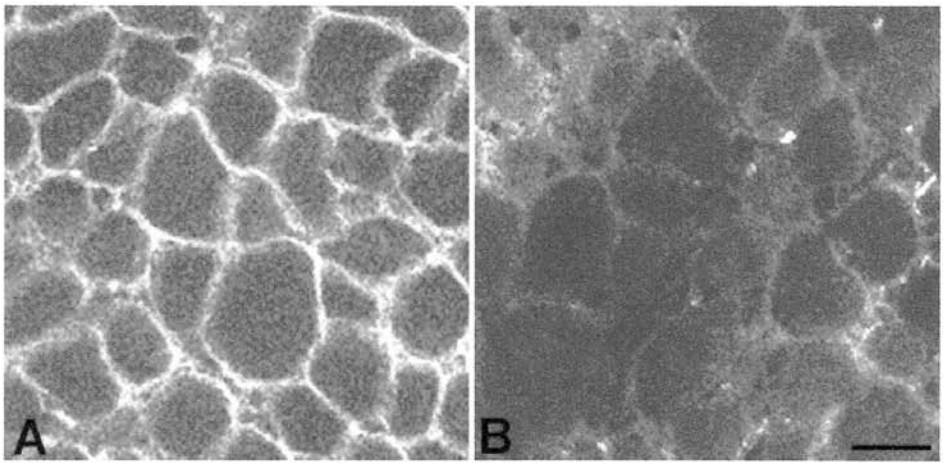


FIGURE 3. Transverse sections of dystrophin-labeled posterior cricoarytenoid muscles. In controls **(A)**, dystrophin was seen in the sarcolemma as a bright outline of each fiber. In *mdx* mice **(B)**, the lack of dystrophin was evident. Scale bar, 75 μm.

similar to control muscles (Fig. 1B, D). Muscle fibers had a relatively uniform diameter, and no degenerating myofibers or extensive areas of inflammatory reaction were observed (Fig. 1A, C). In these muscles, the percentage of central nucleated fibers, the morphological indicator of fibers having undergone damage, did not differ from control (Table 1). No myofibers containing EBD, an earlier marker of sarcolemmal disruption, were seen (Fig. 2A).

The adult *mdx* CT muscle displayed evidence of myopathy, represented by an increased percentage of central nucleated fibers when compared to the other ILMs (Fig. 1E). Compared to the TA muscle, this increase was not significant. The dystrophic phenotype of the CT was more evident in aged mice, which showed a twofold increase in the percentage of central nucleated fibers (Table 1). Both inflammatory reaction and fiber injury, as demonstrated by EBD-positive fibers, were observed more frequently (Fig. 2B). In the TA of adult and old *mdx* mice, EBD-positive fibers were present (Fig. 2C) and central nucleated fibers were readily visible (Fig. 1G and Table 1).

Control posterior CT muscles exhibited a normal pattern of dystrophin distribution, with dystrophin labeling associated with the sarcolemma (Fig. 3A). In *mdx* mice, posterior CT muscles were negative for dystrophin (Fig. 3B). This shows that, despite the lack of dystrophin, there was no muscle-fiber degeneration in ILMs.

DISCUSSION

In the present study, we evaluated whether ILMs from *mdx* mice show signs of muscle-fiber degeneration. Usually, myonecrosis in *mdx* mice starts at about 3–4 weeks of age, with degeneration of limb muscles having occurred by 10 weeks of age.[8,26] Except for the CT muscles, we did not observe any signs of muscle-fiber damage in the ILMs of adult or aged *mdx* mice. Central nucleation was significantly lower in ILMs than in the TA muscles, as is described also for the EOMs, where myonecrosis is not observed.[1,3,16,22–24,27] Therefore, the ILMs do not exhibit the pattern of muscle necrosis and regeneration seen in most *mdx* skeletal muscles, demonstrating that these muscles are protected from the lack of dystrophin.

Loss of calcium homeostasis has been suggested to play a role in the mechanism of muscle necrosis in DMD and *mdx* mice.[16] In the EOMs, proteins involved in calcium reuptake, such as parvalbumin and sarcoplasmic reticulum calcium ATPase, are increased, and this may explain their escape from myonecrosis.[7] Preliminary observations have shown that calcium reuptake and release systems are both amplified in laryngeal muscles,[4] suggesting that, similar to the EOMs, dystrophic laryngeal muscles may be spared from myonecrosis by a better capacity to maintain calcium homeostasis.

Continuous myofiber remodeling has been reported in non-dystrophic EOMs as a result of fusion of satellite cells into existing myofibers, and this may account for the sparing of dystrophic EOMs in Duchenne dystrophy.[20] Continuous remodeling of muscle fibers has also been reported for non-dystrophic ILMs,[11] and this may explain the lack of muscle degeneration in these muscles.

We found that the CT muscle in *mdx* mice is affected significantly compared to the other laryngeal muscles. The EOMs also show non-spared mus-

cles, such as the retractor bulbi,[24] for unclear reasons. Possibly, the lack of dystrophin itself associated with lower levels of calcium-handling proteins may explain this finding, but further studies are needed on this topic. The CT muscles also showed muscle regeneration over time, similar to that in human thyroarytenoid muscles.[15,19] Alternatively, the CT muscles may be more susceptible to damage over time than the other ILMs, possibly in response to eccentric contractions or oxidative stress.[14]

The CT myosin heavy chain shows components typical of limb muscles,[25] and CT contraction times are closer to values of fast limb muscles.[14] Conversely, the other ILMs share myosin heavy chain components with the EOMs[11,18] and their contraction times are in the range of those observed for EOMs,[11] which are protected from dystrophy. Although the CT muscles were less affected than *mdx* TA, the biochemical and structural properties of CT muscles might explain why they were affected while the other ILMs were spared. In agreement with this suggestion is the fact that aging worsens the CT myopathy, the same being observed in limb muscles.[17,21]

In conclusion, we have shown that ILMs are protected from the lack of dystrophin in adult and old *mdx* mice, whereas no sparing occurs of the CT muscle. Further studies of dystrophic laryngeal muscles will be needed to better understand the mechanisms of sparing and its relation to aging, and also to develop new therapeutic strategies for the treatment of dystrophinopathies.

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 the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq; 302880/2004-6 and 301286/2003-5).

REFERENCES

1. Andrade FH, Porter JD, Kaminski HJ. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? Microsc Res Technol 2000;8:192–203.
2. Bain NL, Knight MA, O'Donnell L, Murdoch BE, Trezise AEO. Adult mouse intrinsic laryngeal muscles express high levels of the myogenic regulatory factor, Myf-5. J Med Speech-Lang Pathol 2001;9:157–167.
3. Baker PE, Kearney JA, Gong B, Merriam AP, Kuhn DE, Porter JD, et al. Analysis of gene expression differences between utrophin/dystrophin-deficient vs *mdx* skeletal muscles reveals a specific upregulation of slow muscles genes in limb muscles. Neurogenetics 2006;7:81–91.
4. Blank JM, Schachat F. Extraocular and laryngeal muscles exhibit differential amplification of protein involved in calcium homeostasis. Mol Biol Cell 1999;10:246A.
5. Budak MT, Bogdanovich S, Wiesen MHJ, Lozynska O, Khurana TS, Rubinstein NA. Layer-specific differences of gene expression in extraocular muscles identified by laser-capture microscopy. Physiol Genomics 2004;20:55–65.
6. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:1189–1192.
7. Celio MR, Heizmann CW. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. Nature 1981;293:300–302.
8. Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy. I. A histological, morphometric and biochemical investigation. Neuropathol Appl Neurobiol 1988;14:53–70.
9. Dubowitz V. What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. J R Coll Phys Lond 2000;34:464–468.
10. Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. Myology. Vol. 2. New York: McGraw-Hill; 1994. p 1133–1187.
11. Goding GS, Al-Sharif KI, McLoon LK. Myonuclear addition to uninjured laryngeal myofibers in adult rabbits. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005;114:552–557.
12. Hamer PW, McGeachie JM, Davies MJ, Grounds MD. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. J Anat 2002;200:69–79.
13. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987;51:919–928.
14. Hoh JFY. Laryngeal muscle fibre types. Acta Physiol Scand 2005;183:133–149.
15. Kersing W, Jennekens FGI. Age-related changes in human thyroarytenoid muscles: a histological and histochemical study. Eur Arch Otorhinolaryngol 2004;261:386–392.
16. Khurana TS, Prendergast RA, Alameddine HS, et al. 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.
17. Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. Anat Rec 1995;242:70–76.
18. Lucas CA, Rughani A, Hoh JFY. Expression of extraocular myosin heavy chain in rabbit laryngeal muscle. J Muscle Res Cell Motil 1995;16:368–378.
19. Malmgren LT, Lovice DB, Kaufman MR. Age-related changes in muscle fiber regeneration in the human thyroarytenoid muscle. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2000;126:851–856.
20. McLoon LK, Rowe J, Wirtschafter J, McCormick KM. Continuous myofiber remodeling in uninjured extraocular myofibers; myonuclear turnover and evidence for apoptosis. Muscle Nerve 2004;29:707–715.
21. Pastoret C, Sebille A. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. J Neurol Sci 1995;129:97–105.
22. Porter JD, Israel S, Gong BD, Merriam AP, Feuerman J, Khanna S, et al. Distinctive morphological and gene/protein expression signatures during myogenesis in novel cell lines from extraocular and hindlimb muscle. Physiol Genomics 2006;24:264–275.
23. 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.
24. Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. Surv Ophthalmol 1995;39:451–484.
25. Rhee HS, Lucas CA, Hoh JF. Fiber types in rat laryngeal muscles and their transformations after denervation and reinnervation. J Histochem Cytochem 2004;52:581–590.
26. Torres LBF, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Brain 1987;110:269–299.
27. Yu Wai Man CY, Chinnery PF, Griffiths PG. Extraocular muscles have fundamentally distinct properties that make them selectively vulnerable to certain disorders. Neuromuscul Disord 2005;15:17–23.

6. CAPÍTULO 2

TRABALHO SUBMETIDO (*Muscle and Nerve*; MUS-07-0525)

Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice

By Renato Ferretti, Maria Julia Marques, Adriana Pertille and Humberto Santo Neto.

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

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). R.F. is recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Prof. Kleber Gomes Franchini, Departmento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas and Mr. Antonio R. Calixto for technical assistance and Mrs. Kerstin Markendorf for revision of the English text

All correspondence should be addressed to:

Dr. Humberto Santo Neto

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

Running title: calcium proteins and intrinsic laryngeal muscles

Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice.

Abstract

In the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy, the lack of dystrophin is associated with increased calcium levels and skeletal muscle myonecrosis. The intrinsic laryngeal muscles (ILMs) 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 sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase and calsequestrin was examined in ILMs and in non-spared limb muscles of control and *mdx* mice using immunofluorescence and immunoblotting. Dystrophic ILMs presented a significant increase in the proteins studied when compared to controls. These proteins were reduced in non-spared *mdx* muscles. The increase of Ca^{2+}-handling proteins in dystrophic ILMs 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: calsequestrin; Duchenne muscular dystrophy; intrinsic laryngeal muscles; *mdx* mice; SERCA1.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a hereditary disease characterized by a mutation in the X chromosome that leads to a lack of dystrophin in skeletal and cardiac muscles.[16,21] In the *mdx* mouse model of DMD, the animals are unable to express dystrophin due to a point mutation in the X chromosome[8,33] and exhibit skeletal muscle necrosis followed by muscle regeneration.[25,35]

Among other mechanisms,[20,39] a rise in intracellular calcium is believed to be an important event in dystrophic muscle pathogenesis. The lack of dystrophin renders the sarcolemma more susceptible to rupture[29] or affects the normal functioning of calcium channels[1,37] that ultimately leads to an increased calcium entry into the muscle fiber with consequent myonecrosis.[34,39] In addition to altered cytosolic calcium levels, the calcium-buffering capacity of dystrophic muscles also seems to be impaired.[10,12] As a consequence, free cytosolic calcium levels are elevated, thereby accelerating the calcium-dependent proteolysis of muscle proteins.[1]

We have demonstrated that intrinsic laryngeal muscles (ILMs) are protected against myonecrosis in *mdx* mice.[26] Dystrophic extraocular muscles (EOM) also show a mild dystrophic phenotype,[2,24,27,30] possibly because of their better ability to maintain calcium homeostasis compared to other striated muscles,[24] although other factors seem to be involved in EOM protection.[15,31] In the present study, we showed that the levels of the calcium-binding proteins sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA1) and calsequestrin were significantly increased in dystrophic ILMs, suggesting that their mildly dystrophic phenotype is possibly associated with a better maintenance of calcium homeostasis.

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 calsequestrin and SERCA1 were studied.

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 and calsequestrin. The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of chloral hydrate (600 µg/kg). The larynx with intact ILMs, tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles were dissected out, snap frozen with isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80^{o}C. The frozen larynx were cross-sectioned (8µm thick cryostat sections) transverse to the longitudinal axis. Sections from the larynx and other muscles were collected and mounted on coated microscope slides.

The other sections were air dried, hydrated for 30 min in PBS (0.15 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4), 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 protein antibodies described below and dystrophin antibodies overnight at 4^{o}C. The sections were washed with PBS and incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma; 1:500) 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 Nikon fluorescence microscope equipped with a Hamamatsu video camera.

Control slides for the primary antibody were incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Sigma; 1:100) in blocking solution instead of the primary antibody. No stained structures were seen in these controls.

Immunoblotting

Adult (2 months old) *mdx* (n = 20) and C57Bl/10 (control; n = 20) mice were used for the quantification of calcium-binding proteins.

Muscles were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 mM sodium ortho-vanadium, 10 mM EDTA, 2 mM PMSF, and 10 µg/ml aprotinin). The samples were centrifuged for 20 min at 11,000 rpm and the soluble fraction was resuspended in 50 µl Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromphenol blue, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 20 mM β-mercaptoethanol) before separation on 8%-10% 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 (TBS-T; 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 TBS-T, 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). Band intensities were quantified using ImageJ 1.37v (National Institute of Health, USA) software.

Antibodies used for immunofluorescence and/or immunoblotting

The following primary antibodies were used for immunofluorescence and immunoblotting: 1) dystrophin (monoclonal NCL-DYS1, Novocastra), 2) SERCA1 (monoclonal SERCA 1ATPase IIH11, Affinity BioReagents), 3) calsequestrin (monoclonal VIIID12, Affinity BioReagents).

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

Statistical analysis

ANOVA was used for multiple comparisons of mean values. For all comparisons, $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Immunofluorescence

Immunofluorescence analysis of dystrophin revealed sarcolemma staining in control ILMs. As expected, dystrophic ILMs clearly exhibited a lack of dystrophin (Figure 1A, B).

The pattern of distribution of key calcium-binding proteins is shown in Figure 1C-H. SERCA1 exhibited a similar cytoplasmic pattern of distribution in control and dystrophic ILMs (Figure 1C, D). The staining pattern was characterized by bright spots and strands, which were detected in almost all of the ILMs fibers. The same pattern of distribution was seen in SOL. However, SERCA1 staining was only detected in some SOL fibers (Figure 1E, F), possibly corresponding to the fast-twitch fibers of this muscle.[7] The pattern of distribution of calsequestrin (Figure 1G, H) was cytoplasmic and similar in normal and dystrophic ILMs.

Immunoblotting: calcium-binding proteins

Comparative immunoblotting data of the calcium-binding proteins are shown in Figures 2 and 3. A significant increase in the relative expression of SERCA1 (Figure 2) and calsequestrin (Figure 3) was observed in dystrophic ILMs compared to control ILMs.

In limb muscles, SERCA1 was significantly decreased in dystrophic SOL and EDL muscles and similar to control levels in dystrophic TA (Figure 2). The content of calsequestrin in dystrophic TA and EDL was comparable to controls and was significantly decreased in dystrophic SOL (Figure 3).

DISCUSSION

It is generally accepted that the skeletal muscles of DMD patients[6] and *mdx* mice[36] show abnormally high levels of intracellular calcium and changes in calcium homeostasis have been related to muscle fiber degeneration.[17,39] We have previously reported that the ILMs of *mdx* mice are spared from the lack of dystrophin.[26] In the present study, we observed that the expression of the key calcium-regulatory proteins SERCA1 and calsequestrin is increased in dystrophic ILMs, supporting previous suggestion that these muscles may have a better ability to maintain calcium homeostasis which is correlated with muscle sparing.[5]

The sarcoplasmic reticulum (SR) plays a central role in the control of calcium release and reuptake during muscle contraction and is the primary calcium-storage organelle in striated muscles.[32] The most important protein for calcium buffering and storage in the SR is calsequestrin,[4] whose synthesis is controlled by myogenin.[3] Myogenin is a myogenic growth factor which is overexpressed during muscle regeneration.[9] Unlike limb muscles, craniofacial muscles, including EOM and ILMs, maintain increased expression of a number of myogenic

factors and their receptors,[28] retain a population of activated satellite cells and undergo continuous remodeling,[18] a fact that renders these muscles more suitable than limb muscles to survive insults such as aging, injury and disease.[28] The present results suggest that the lack of dystrophin seems not to interfere with this innate capacity of ILMs to survive insults. An attractive speculation is that this capacity of continuous remodeling is more pronounced in dystrophic ILMs and may be correlated with increased myogenin expression or an increase in other mechanisms related to fiber protection, including the upregulation of calcium-binding proteins.

SERCA is involved in calcium reuptake into the SR following calcium release during extitation-contraction coupling. SERCA1 is the isoform found in fast-twitch skeletal muscle and its function seems to be regulated by the luminal calcium-binding protein, sarcalumenin, which interacts with SERCA1 reducing its degradation.[38] Sarcalumenin vesicles isolated from skeletal muscles of sarcalumenin-deficient mice exhibited decreased calcium reuptake due to a reduction in SERCA expression.[38] Sarcalumenin is decreased in dystrophic limb muscles,[14] a fact that might explain the present observation that SERCA 1 is decreased in TA and SOL muscles. Conversely, increased expression of SERCA1 might be related to increased expression of sarcalumenin in ILMs, and future studies may provide important information concerning the levels of sarcalumenin and its relationship with the sparing of dystrophic muscles.

The present observation that spared ILMs present an increased expression of SR calcium-buffering proteins, suggesting a better ability to maintain calcium homeostasis than other striated muscle groups, is consistent with the findings reported for the spared EOM of *mdx* mice, which are also mildly affected by the lack of dystrophin.[2,24,26,30] EOM have been shown to be more resistant to necrosis caused by pharmacologically elevated calcium levels.[24] ILMs share many anatomical and biochemical characteristics with EOM[22] and other factors are suggested to be

involved in dystrophic EOM protection, such as the small size of their fibers[23] and upregulation of utrophin[31] and β-dystroglycan.[15] Experiments are under way to determine whether ILMs also show changes in the pattern of distribution and expression of these components of the dystrophin-glycoprotein complex.

The present study also showed a decrease of SERCA1 and calsequestrin in affected dystrophic leg muscles compared to wild-type fibers, which is in agreement with other reports.[10,13,15] This finding is in line with the hypothesis that abnormal calcium handling by the SR is involved in *mdx* fiber degeneration.[11] In vitro studies have shown that adult *mdx* myofibers are able to normally maintain subsarcolemmal Ca^{2+} homeostasis.[19] On the other hand, cytosolic calcium handling is compromised in *mdx* myotubes[19] and one possibility raised was a decrease in SR function.

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 ILMs in *mdx* mice. The results suggest that the lack of dystrophin per se does not affect the intrinsic mechanisms of dystrophic ILMs to react against diseases, and the use of their precursor cells, as well as cells from other craniofacial muscles, may provide additional advantages in myoblast therapy for DMD and related dystrophies.

Abbreviations

CSQ, calsequestrin

DMD, Duchenne muscular dystrophy

Dys, dystrophin

EDL, extensor digitorum longus

EOM, extraocular muscles

ILMs, intrinsic laryngeal muscles

Mdx, murine *x*-linked dystrophy

SERCA1, fast-type sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+}-ATPase

SOL, soleus muscle

SR, sarcoplasmic reticulum

TA, tibialis anterior muscle

REFERENCES

1. 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.

2. Andrade FH, Porter JD, Kaminski HJ. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? Micros Res Tec 2000; 48:192-203.

3. Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Periasamy M. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. Am J Physiol Cell Physiol 1992; 262:C614–C620.

4. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. Prog Biophys Mol Biol 2004; 85:33–69.

5. Blank JM, Schachat F. Extraocular and laryngeal muscles exhibit differential amplification of protein involved in calcium homeostasis. Mol Biol Cell 1999; 10:246A.

6. Bodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibres in 114 biopsies. Neurol 1978; 28:439-446.

7. 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.

8. 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.

9. Carlsen H, Gundersen K. Helix-loop-helix transcription factors in electrically active and inactive skeletal muscles. Muscle Nerve 2000; 23: 1374–1380.

10. 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.

11. Divet A, Huchet-Cadiou C. Sarcoplasmic reticulum function in slow- and fast-twitch skeletal muscles from mdx mice. European J Physiol 2002; 444:634-643.

12. 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 msucle. Biochem Biophys Acta 2006; 1764:773-785.

13. 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

14. 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.

15. Dowling P, Lohan J, Ohlendieck K. Comparative analysis of Dp427-deficient mdx tissues shows that the milder dystrophic phenotype of extraocular and toe muscle fibres is associated with a persistent expression of beta-dystroglycan. Eur J Cell Biol 2003; 82:222-230.

16. Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. Myology. New York: McGraw-Hill; 1994. p1133-1187.

17. Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: Implications in Duchenne muscular dystrophy. Biochem Biophys Acta 2002; 1600:38-44.

18. Goding GS Jr., Al-Sharif KI, McLoon LK. Myonuclear addition to uninjured laryngeal myofibers in adult rabbits. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2005; 114:552-557.

19. Han R, Grounds MD, Bakker AJ. Measurements of sub-membrane [Ca^{2+}] in adult myofiber and cytosolic [Ca^{2+}] in myotubes from normal and mdx mice using the Ca^{2+} indicator FFP-18. Cell Calcium 2006; 40:299-307.

20. 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.

21. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987; 51:919-928.

22. Hoh JFY. Laryngeal muscle fibre types. Acta Physiol Scand 2005; 183:133-149.

23. 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.

24. Khurana TS, Prendergast RA, Alameddine HS, Tomé FM, Fardeau 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.

25. Lyons PR, Slater CR. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. J Neurocytol 1991; 20:969-981.

26. Marques MJ, Ferretti R, Vomero VU, Minatel E, Santo Neto H. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve 2007a; 35:349-353.

27. Marques MJ, Pertille A, Carvalho CLT, Santo Neto H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. Anat Rec 2007b; 290:846-854.

28. McLoon LK, Thorstenson KM, Solomon A, Lewis MP. Myogenic precursor cells in craniofacial muscles. Oral Dis 2007; 13:134-140.

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. Ross AE, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. Muscle Nerve 2006; 33:715-731.

33. 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.

34. Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. Int J Biochem Cell Biol 2000; 32:1-5.

35. Torres LF, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscle and end-plates. Brain 1987; 110:269-299.

36. Turner PR, Fong PY, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased calcium influx in dystrophic muscle. J Cell Biol 1991; 115:1701-1712.

37. 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 alpha1-syntrophin:association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. FASEB J 2007; 21:608-617.

38. Yoshida M, Minamisawa S, Shimura M, Komazaki S, Kume H, Zhang M, Matsumura K, Nishi M, Saito M, Saeki Y, Ishikawa Y, Yanagisawa T, Takeshima H. Impaired Ca2+ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice. J Biol Chem 2005; 280:3500–3506.

39. 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.

Legends

Figure 1. Dystrophin (Dys), SERCA1 and calsequestrin (CSQ) immunofluorescence in control (CTRL) and dystrophic (mdx) intrinsic laryngeal muscles (ILMs) and soleus muscle (SOL). While normal sarcolemmal staining using DYS antibody is visible in control ILMs (A), there is no detectable staining in mdx ILMs (B). SERCA1 showed a similar pattern of distribution in control (C) and mdx (D) ILMs. In soleus muscle, only some muscle fibers were positive for SERCA1 (asterisk in E and F). CSQ showed a cytoplasmic pattern of distribution in control (G) and dystrophic (H) ILMs. Scale bar (shown only in H), 210 μm (A-D; G-H), 100 μm (E, F).

Figure 2. Immunoblot analysis of SERCA1 expression in crude extracts of intrinsic laryngeal muscles (ILMs), tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles from control (Ctrl) and dystrophic (*mdx*) mice. Immunoblots (upper panel; molecular mass standards, in kDa, are indicated on the left) and graphic representations (in relation to normal control - 100%) are shown. *, means significantly different compared to control (ANOVA). Error bars, SD.

Figure 3. Immunoblot analysis of calsequestrin (CSQ) expression in crude extracts of intrinsic laryngeal muscles (ILMs), tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles from control (Ctrl) and dystrophic (*mdx*) mice. Immunoblots (upper panel; molecular mass standards, in kDa, are indicated on the left) and graphic representations (in relation to normal control - 100%) are shown. *, means significantly different compared to control (ANOVA). Error bars, SD.

Figures

Figure 1

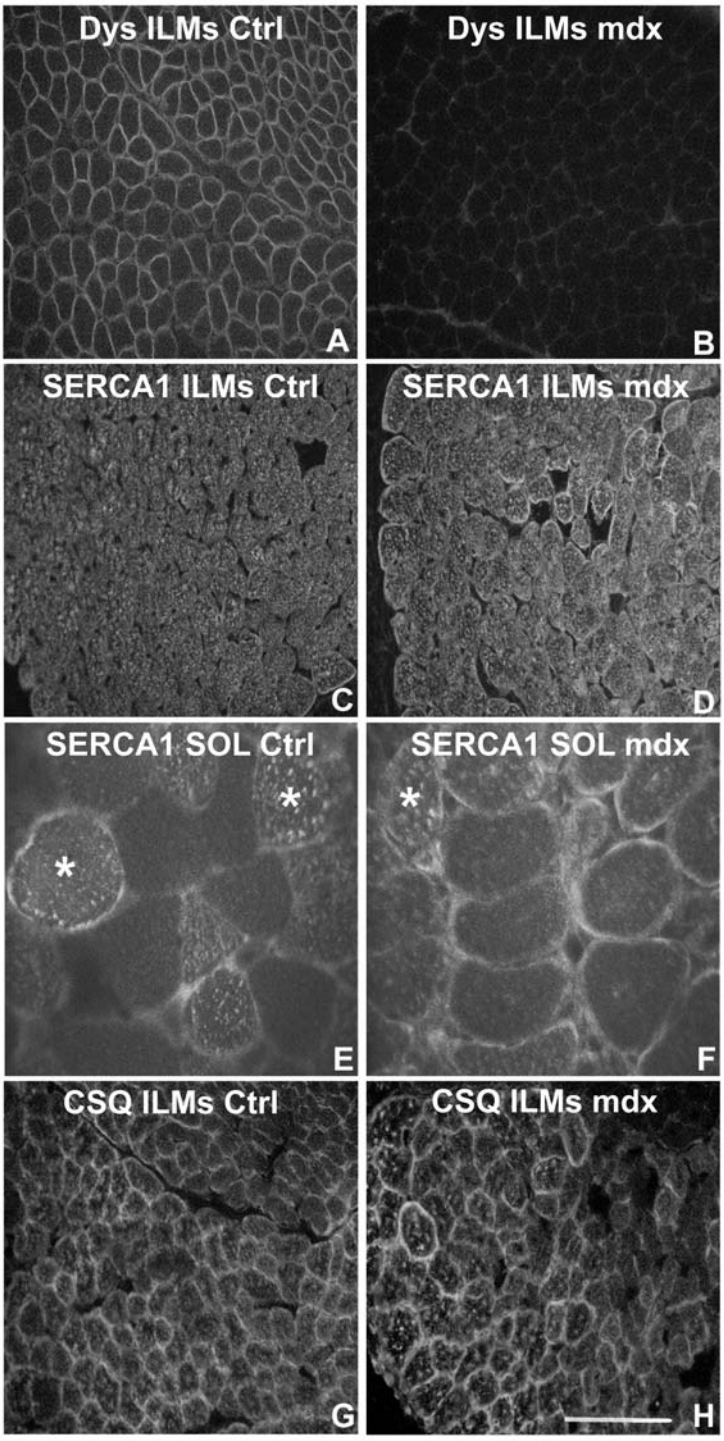


Figure 2

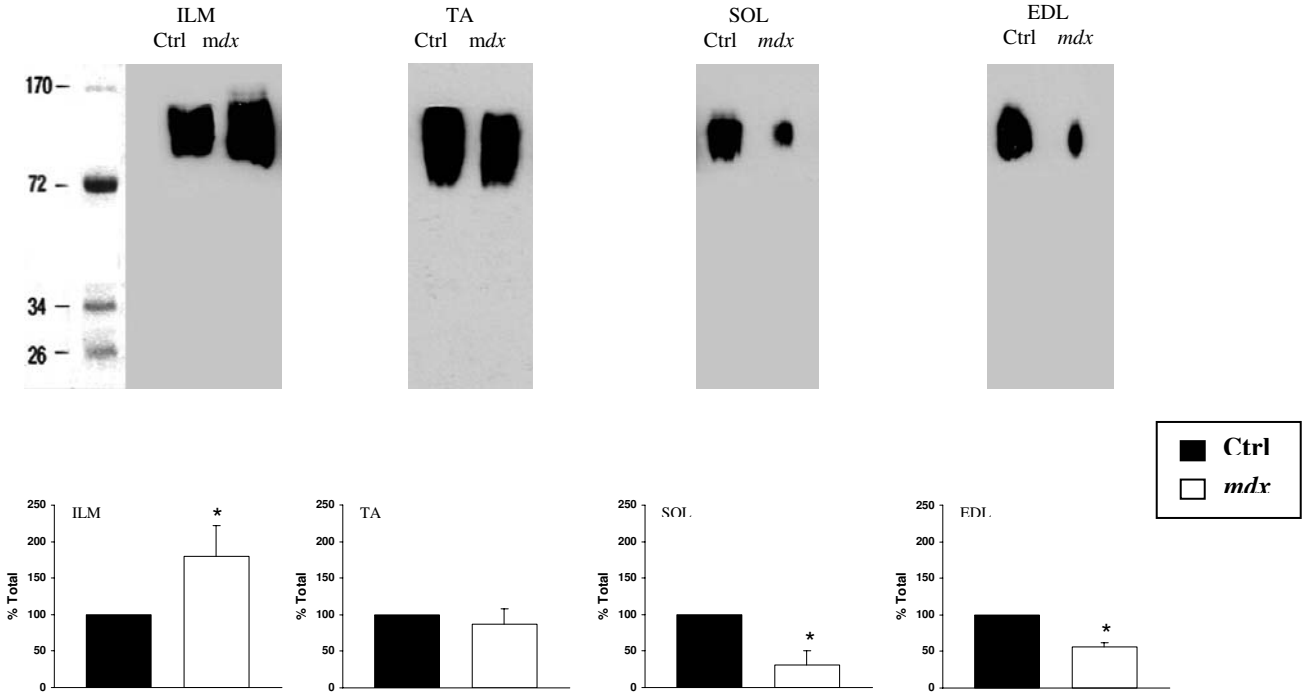
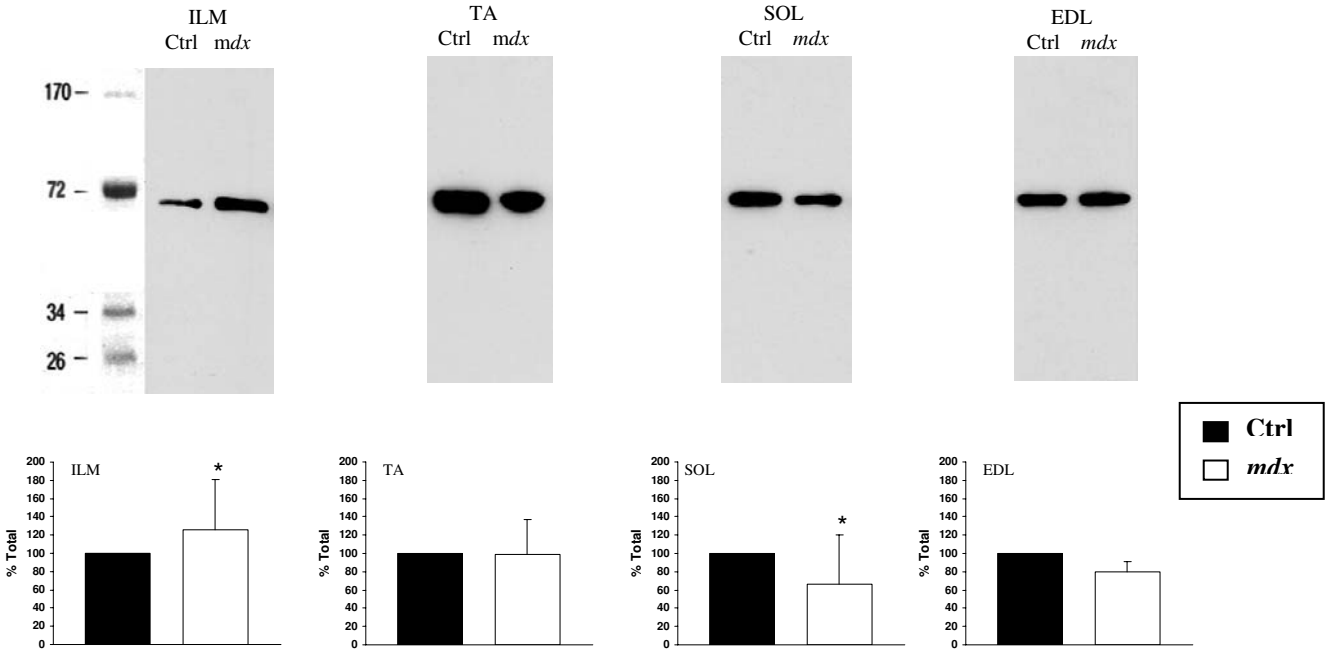


Figure 3



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. Considerações Finais

Neste trabalho demonstramos que com exceção do músculo cricotireóideo (CT) os músculos intrínsecos da laringe (ILMs) de camundongos *mdx* não apresentam sinais típicos da miopatia, quais sejam: necrose de fibras musculares, processo inflamatório e aumento da fibrose intersticial. Mesmo o CT quando comparado aos músculos dos membros apresenta-se apenas levemente comprometido. Disto conclui-se que mesmo com ausência da distrofina, os ILMs são protegidos da mionecrose.

As observações dos animais adultos (4 meses) demonstraram de forma inequívoca que os ILMs eram protegidos. Entretanto, só esses achados não permitiriam que concluíssemos que de fato os ILMs permaneciam protegidos pelo resto da vida. Isto porque, nesse período da vida nos camundongos os ciclos de necrose-regeneração praticamente estabilizam-se e só retornam com maior intensidade a partir dos 18 meses. Por isto a conclusão só foi possível após termos examinados os ILMs de animais com 18 meses.

Um fato interessante foi que o fenótipo distrófico do músculo CT acentuou-se com o avanço da idade, embora menos acometido que o músculo tibial anterior. Não sabemos por qual razão o CT comporta-se dessa maneira. É possível que contrações excêntricas e/ou estresse oxidativo imposto por sua função (Hoh et al., 2005), bem como particularidades bioquímicas e estruturais podem contribuir para acometimento do CT.

Uma hipótese provável para explicar a razão pela qual os ILMs são protegidos refere-se a uma melhor capacidade de regular a concentração sarcoplasmática de cálcio, em relação aos músculos dos membros. Essa hipótese baseia-se no fato de que os níveis de proteínas reguladoras de cálcio estão aumentados nos músculos extra-oculares de camundongos *mdx* os quais são também protegidos da necrose.

Para testar essa hipótese passamos a estudar a expressão de algumas dessas proteínas nos ILMs e compará-las com aquelas dos animais normais. Observamos que os ILMs dos camundongos *mdx* mostram níveis aumentados de proteínas reguladoras do cálcio intracelular, como a bomba Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1) e calsequestrina. Esses resultados sustentam o conceito que a manutenção da homeostase do cálcio intracelular tem papel no mecanismo de proteção das fibras musculares (Blank e Schachat, 1999; Marques et al., 2007a).

O retículo sarcoplasmático (RS) como sendo o primeiro local de estocagem e armazenamento do cálcio, tem grande importância no processo de regulação do cálcio sarcoplasmático (Ross e Dirksen, 2006). A calsequestrina é a mais importante proteína reguladora do cálcio no lúmen do RS e sua síntese está sob controle da miogenina (Arai et al., 1992). A miogenina é um importante fator regulador miogênico, expresso pela fibra muscular durante o processo de regeneração (Kablar et al., 1997). Devido ao fato dos ILMs apresentarem intensa e contínua remodelação de suas fibras musculares (Goding et al., 2005) e expressão aumentada de fatores reguladores de miogênese (McLoon et al., 2007), sugerimos que a proteção dos ILMs de camundongos *mdx* seja dada pelo aumento da expressão de miogenina e aumento na expressão de proteínas reguladoras do cálcio.

SERCA1 que está envolvido na captura do cálcio para dentro do RS após o relaxamento da fibra muscular, apresenta interação com uma proteína reguladora do cálcio do lúmen do RS, chamada sarcalumenina. Animais deficientes em sarcalumenina apresentam redução na expressão de SERCA1 (Yoshida et al., 2005). Devido ao fato das fibras musculares distróficas apresentarem redução drástica de sarcalumenina (Dowling et al., 2004; Doran et al., 2006), pode-se explicar a redução na expressão de SERCA1 no músculo tibial anterior e sóleus (Fig. 3). Inversamente, os ILMs apresentam aumento significante na expressão de SERCA1, o qual pode ser explicado pelo

aumento da expressão de sarcalumenina. Estudos futuros são interessantes para identificar a expressão da sarcalumenina e sua relação com a proteção dos ILMs distróficos.

Portanto este trabalho demonstrou que os músculos intrínsecos da laringe de camundongos *mdx* não obstante a ausência da distrofina, são protegidos da necrose e que nos mesmos a expressão das proteínas calsequestrina e SERCA1 está aumentada. Estes últimos achados sugerem que a manutenção dos níveis de cálcio intracelular contribui para a proteção dos ILMs.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023:2002

ALDERTON, J.M., STEINHARDT, R.A. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. **J Biol Chem.** v.275, p. 9452–9460, 2000.

ARAI, M., OTSU, K., MaCLENNAN, D.H., PERIASAMY, M. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. **Am J Physiol Cell Physiol. v.** 262, p.C614–C620, 1992.

BACKER, F.D., VANDEBROUCK, C., GAILLY, P., GILLIS, J.M. Long-term study of Ca2+ homeostasis and of survival in collagenase-isolated muscle fibres from normal and mdx mice. **Journal of Physiology**. v.542, n.3, p.855–865, 2002.

BEARD, N.A., SAKOWSKA, M.M., DULHUNTY, A.F., LAVER, D.R. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. **Biophysical Journal**. v.82, p.310–320, 2002.

BERCHTOLD, M.W., BRINKMEIER, H., MÜNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol Rev.** v.80, p.1215–1265, 2000.

BERRIDGE, M.J., MARTIN, D., BOOTMAN, M.D., LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature.** v.395, n.15, p.645-648, 1998.

BIGGAR, D.W. Duchenne muscular dystrophy. **Pediatr Rev.** v.27, p.83-88, 2006.

BLANK, J.M., SCHACHAT, F. Extraocular and laryngeal muscles exhibit differential amplification of protein involved in calcium homeostasis. **Mol Biol Cell**. v.10, p.246A, 1999.

BONILLA, E., SCHMIDT, B., SAMITT, C.E., MIRANDA, A.F., HAYS, A.P., DE OLIVEIRA, A.B., CHANG, H.W., SERVIDEI, S., RICCI, E., YOUNGER, D.S., et al. Normal and dystrophin-deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. **Am J Pathol.** v.133, n.3, p.440-445, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** v.72, p.248-254, 1976.

BULFIELD, G., SILLER, W.G., WIGHT, P.A.L., MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse (animal model). **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**.v.81, p.1189-1192, 1984.

COLLINS, C.A., MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **Int J Exp Pathol.** v.84, n.4, p.165-72, 2003.

COULTON, G.R., MORGAN, J.E., PARTRIDGE, T.A., SLOPER, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. **Neuropathol Appl Neurobiol**.v.14, n.1, p.53-70, 1988.

CULLEN, M.J., JAROS, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathol (Berl).** v.77, n.1, p.69-81, 1988.

CULLIGAN, K., BANVILLE, N., DOWLING, P., OHLENDIECK, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. **J Appl Physiol**.v.92, p.435-445, 2002.

CULLIGAN, K.G., OHLENDIECK, K. Abnormal calcium handling in muscular dystrophy. **Basic Appl Myol.** v.12, n.4, p.147-157, 2002.

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.** v.1764, p.773-785, 2006.

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**. v.271, p.3943-3952, 2004.

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.** v.379, p.479-488, 2004.

ENGEL, A.G., YAMAMOTO, M., FISCHBECK, K.H. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. Myology. New York: McGraw-Hill; v.2, p. 1133-1187, 1994.

ERVASTI, J.M., CAMPBELL, K.P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **The Journal of Cell Biology.** v.122, n.4, p. 809-823, 1993.

GAILLY, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1600, p.38– 44, 2002.

GASCHEN, F., BURGUNDER, J.M. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. **Acta Neuropathol**. v.101, p.591–600, 2001.

GODING, G.S. Jr., AL-SHARIF, K.I., MCLOON, L.K. Myonuclear addition to uninjured laryngeal myofibers in adult rabbits. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. v.114, n.7, p.552-557, 2005.

GOMMANS, I.M.P., VLAK, M.H.M., HAAN, A. De, VAN ENGELEN, B.G.M. Calcium regulation and muscle disease. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**. v.23, p.59–63, 2002.

HAN R., GROUNDS, M.D., BAKKER, A.J. Measurement of sub-membrane [Ca2+] in adult myofibers and cytosolic [Ca2+] in myotubes from normal and mdx mice using the Ca2+ indicator FFP18. **Cell Calcium**. v.40, p. 299-307, 2006.

HINRICHSEN, C., DULHUNTY, A. The contractile properties, histochemistry, ultrastructure and electrophysiology of the cricothyroid and posterior cricoarytenoid muscles in the rat. **Journal of Muscle Research and Cell Motility.** v.3, p.169-190, 1982.

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

HOH, J.F.Y. Laryngeal muscle fibre types. **Acta Physiol Scand.** v.183, p.133–149, 2005.

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.

KABLAR, B., KRASTEL, K., YING, C., ASAKURA, A., TAPSCOTT, S.J., RUDNICKI, M.A. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. **Development.** v.124, n.23, p. 4729-38, 1997.

KHURANA, T.S., PREDERGAST, R.A., ALAMEDDINE, H.S., TOME, F.M., FARDEN, 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.

LUISE, M., PRESOTTO, C., SENTER, L., BETTO, R., CEOLDO, S., FURLAN, S., SALVATORI, S., SABBADINI, R.A., SALVIATI, G. Dystrophin is phosphorylated by endogenous protein kinases. **Biochem. J.** v.293, p.243-247, 1993.

MaCLENNAN, D.H., CAMPBELL, K.P., REITHMEIER, R.A.F. Calsequestrin. In: MacLennan DH, editors. **Calcium and cell function**. v.4, p. 152–173, 1986.

MacLENNAM, D.H. Ca^{2+} signalling and muscle disease. **Eur. J. Biochem.** v.267, p.5291-5297, 2000a.

MaCLENNAN, D.H., DUFF, C., ZORZATO, F., FUJII, J., PHILLIPS, M., KORNELUK, R.G., FRODIS, W., BRITT, B.A., WORTON, R.G. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. **Nature.** v.343, p.559-561, 2000b.

MacLENNAN, D.H., REITHMEIER, R.A.F. Ion tamers. **Nature Struct Biol**. V.5, n.6, p.409-411, 1998.

MARIOL, M.C., SÉGALAT, L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. **Current Biology.** v.11, p.691-694, 2001.

MARQUES, M.J., FERRETTI, R., VOMERO, V.U., MINATEL, E., NETO, H.S. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve.** v.35, n.3, p.349-53, 2007a.

MARQUES, M.J., MENDES, Z.T.R., 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, p.387–396, 2005.

MATSUDA, R., NISHIKAWA, A., TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **J. Biochem**. v.118, p.959-964, 1995.

McLOON, L.K., ROWE, J., WIRTSCHAFTER, J., MCCORMICK, K.M. Continuous myofiber remodeling in uninjured extraocular myofibers; myonuclear turnover and evidence for apoptosis. **Muscle Nerve.** v.29, p.707-715, 2004.

McLOON, L.K., WIRTSCHAFTER, J. Activated satellite cells are present in uninjured extraocular muscles of mature mice. **Trans Am Ophthalmol Soc**. V.100, p.119-23, 2002.

McLOON, L.K., THORSTENSON, K.M., SOLOMON, A., LEWIS, M.P. Myogenic precursor cells in craniofacial muscles. **Oral Dis.** v.13, p.134-140, 2007.

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, n.12, p.1610-1614, 1989.

OHKURA, M., FURUKAWA, 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, n.37, p.12987-12993, 1998.

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

PERTILLE, A., SANTO NETO, H., CARVALHO, C.L.T., MARQUES, M.J. Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice: potential role in muscle sparing. **Neuromuscular Disorders**. *Submitted*.

PETROF, B.J., SHRAGER, J.B., STEDMAN, H.H., KELLY, A.M., SWEENEY, H.L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.90, p.3710-3714, 1993.

PORTER, J.D. Introduction to muscular dystrophy. **Microsc Res Tech.** v.48, n.3-4, p.127-30, 2000.

PORTER, J.D., ISRAEL, S., GONG, B.D., MERRIAM, A.P., FEUERMAN, J., KHANNA, S., KAMINSKI, H.J. Distinctive morphological and gene/protein expression signatures during myogenesis in novel cell lines from extraocular and hindlimb muscle**. Physiol Genomics**. v.24, p.264-275, 2006.

PORTER, J.D., KARATHANASIS, P. The development of extraocular muscle calcium homeostasis parallels visuomotor system maturation. **Biochem Biophys Res Commun.** v.257, n.3, p.678-83, 1999.

PORTER, J.D., KHANNA, S., KAMINSKI, H.J., RAO, J.S., MERRIAM, A.P., RICHMONDS, C.R., LEAHY, P., LI, J., ANDRADE, F.H. Extraocular muscle is defined by a fundamentally distinct gene expression profile. **Proc Natl Acad Sci.** v.98, n.21, p.12062-12067, 2001.

PORTER, J.D., RAFAEL, J.A., RAGUSA, R.J., BRUECKNER, J.K., TRICKETT, J.I., DAVIES, K.E. The sparing of extraocular muscle is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. **J Cell Sci**. v.111, p.1801-1811, 1998.

PRETTERKLIEBER, M.L. Functional anatomy of the human intrinsic laryngeal muscles. **Eur. Surg.** v.35, n.5, p.250-258, 2003.

ROSS, A.E., DIRKSEN, R.T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. **Muscle and Nerve.** v.33, p.715-731, 2006.

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

SPENCER, M.J., CROALL, D.E., TIDBALL, J.G. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. **The J Biol Chem.** v.270, n.18, p.10909-10914, 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.

STRAUB, V., RAFAEL, J.A., CHAMBERLAIN, J.S., CAMPBELL, K.P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. **The Journal of Cell Biology**, v.139, n.2, p.375–385, 1997.

TIDBALL, J.G., SPENCER, M.J. Calpains and muscular dystrophies. **Int J Biochem Cell Biol.** v.32, p.1-5, 2000.

TORRES, L.B.F., DUCHEN, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. **Brain.** v.110, p.269-299, 1987.

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 alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. **FASEB J**. v.21, p.608-617, 2007.

WHITEHEAD, N.P., YEUNG, E.W., ALLEN, D.G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.33, p.657-662, 2006.

YEUNG, E.W., WHITEHEAD, N.P., SUCHYNA, T.M., GOTTLIEB, P.A., SACHS, F., ALLEN, D.G. Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca2+]_i$ and muscle damage in the *mdx* mouse. **J Physiol.** v.562, n.2, p.367-380, 2005.

YOSHIDA, M., MINAMISAWA, S., SHIMURA, M., KOMAZAKI, S., KUME, H., ZHANG, M., et al. Impaired Ca^{2+} store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice. **J Biol Chem**. v.280, p.3500–3506, 2005.

YOSHIDA, M., YONETANI, A., SHIRASAKI, T., WADA, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.290, p.R449–R455, 2006.

9. ANEXOS

9. Anexos

ANEXO 1: Certificado da Comissão de ética em experimentação animal, Instituto de Biologia-UNICAMP.

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1096-2**, sobre "**PARÂMETROS DISTRÓFICOS E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DE CÁLCIO EM MÚSCULOS INTRÍNSECOS DA LARINGE DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *MDX***", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Humberto Santo Neto / Renato Ferretti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 06 de outubro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1096-2**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 6, 2006.

Campinas, 06 de outubro de 2006.

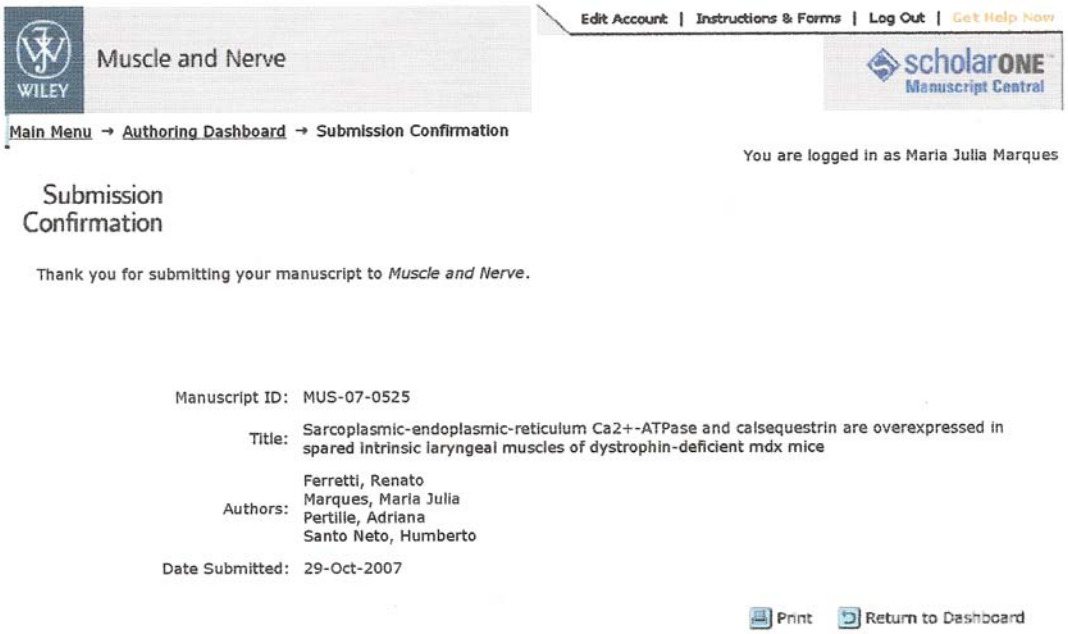
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm

ANEXO 2: Confirmação da submissão para revista *Muscle and Nerve* do trabalho intitulado "Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca2+-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscle of dystrophin-deficient mdx mice".



Muscle and Nerve

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | Get Help Now

scholarONE Manuscript Central

Main Menu → Authoring Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as Maria Julia Marques

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Muscle and Nerve*.

Manuscript ID:	MUS-07-0525
Title:	Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca2+-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice
Authors:	Ferretti, Renato Marques, Maria Julia Pertille, Adriana Santo Neto, Humberto
Date Submitted:	29-Oct-2007

Print Return to Dashboard

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **TESE DE MESTRADO** intitulada **"MÚSCULOS LARÍNGEOS DISTRÓFICOS: PROTEÇÃO À MIONECROSE, EXPRESSÃO DE SERCA1 E CALSEQUESTRINA"**:

( ) 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 1096-2**).

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

Renato Ferretti

Renato Ferretti
- Aluno -

Prof. Dr. Humberto Santo Neto
- Orientador -

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Ana Maria Aranda Guaraldo

Nome:
Função: Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP