

PAULA SPANOPOULOS PEREZ

**“EFEITOS DO TRATAMENTO COM GENTAMICINA NA
RECUPERAÇÃO DA DISTROFINA E NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR EM CAMUNDONGOS *MDX*”**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULA SPANOPOULOS PEREZ

“EFEITOS DO TRATAMENTO COM GENTAMICINA NA
RECUPERAÇÃO DA DISTROFINA E NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR EM CAMUNDONGOS *mdx*”

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

Paula Spanopoulos Perez

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção
do Título de Mestra em Biologia
Celular e Estrutural, na área de
Anatomia.



Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P415e Perez, Paula Spanopoulos, 1987-
Efeitos do tratamento com gentamicina na recuperação da distrofina e na regeneração muscular em camundongos mdx / Paula Spanopoulos Perez. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Camundongo mdx. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3. Distrofina. 4. Músculos - Regeneração. 5. Gentamicina. I. Santo Neto, Humberto, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effects of gentamicin treatment on dystrophin recovery and muscle regeneration in mdx mice

Palavras-chave em Inglês:

Mice, mdx
Duchenne muscular dystrophy
Dystrophin
Muscles – Regeneration
Gentamicin

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Humberto Santo Neto [Orientador]
Rosana Macher Teodori
Mara Patrícia Traina Chacon Mikahil

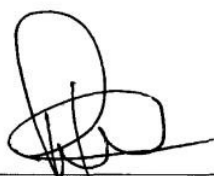
Data da defesa: 22-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

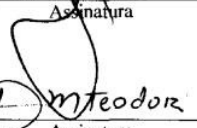
Campinas, 22 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

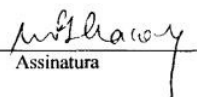
Prof. Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori


Assinatura

Profa. Dra. Mara Patrícia Traina Chacon Mikahil


Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

Profa. Dra. Sheila Cristina da Silva Victorio

Assinatura

Dedico...

Aos meus pais e irmão, por me acompanharem e me darem força e carinho em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido, Leandro, por sempre estar ao meu lado e pelo amor e incentivo durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pelas oportunidades que me foram concedidas na vida.

Aos meus pais, **Ártemys e Paulo**, por sempre terem dado o melhor de si para que eu tivesse uma vida repleta de oportunidades.

Ao meu irmão querido, **Lucas**, companheiro desde sempre.

Ao meu marido perfeito, **Leandro**, sempre me acompanhando e fazendo parte das etapas mais importantes da minha vida. Sem você, eu não conseguiria.

Aos meus sogros, **Armando e Edileusa** e cunhados, **Leonardo, Letícia e Fernando** pelo imenso carinho e apoio.

Às minhas sobrinhas lindas, **Alícia e Amanda**, por tornarem minha vida muito mais doce e feliz, fazendo com que sempre houvesse força para continuar.

Ao meu **avô José Perez Serrano, tios e primos**, pelo carinho e incentivo.

Aos meus **amigos**, pela enorme torcida.

Ao **Professor Dr. Humberto Santo Neto**, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de fazer parte do Programa. Pela orientação, acolhimento e paciência durante esses anos.

Ao **Professor Dr. Marco Cesar Somazz**, por todos esses anos de dedicação, confiança, amizade e conhecimento compartilhado.

À **Professora Dra. Maria Júlia Marques**, pela colaboração e sugestões na execução deste trabalho.

Aos Professores Doutores **Edson Pimentel, Adriana Pertille e Valéria Quitete**, pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Às Professoras Doutoras **Mara Patricia Chacon-Mikahil, Rosana Macher Teodori e Valéria Quitete**, pelas sugestões feitas na pré-banca.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela contribuição no desenvolvimento pessoal e profissional.

À **CAPES/DC** pela bolsa concedida e **CAPES/PROAP**, pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos de laboratório, **Adriana Maurício, Aline Macedo, Ana Paula Taniguti, Cíntia Matsumura, Drielen de Oliveira, Isabel Chagas, Letícia Montanholi, Luiz Henrique Rapucci, Matheus Rovere, Natália Pinheiro, Rafael Machado, Renato Ferretti, Samara Carvalho e Juliano Alves Pereira** pela paciência e importantes contribuições para a realização deste trabalho.

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

A todos os **docentes e funcionários** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos do **Laboratório de Biologia de Reprodução, Regeneração Nervosa, Plasticidade e Regeneração Óssea** pela amizade e bons momentos compartilhados durante o mestrado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. Introdução.....	08
1.1. Distrofia Muscular de Duchenne.....	08
1.2. Camundongos <i>mdx</i>	11
1.3. Degeneração e regeneração muscular no camundongo <i>mdx</i>	12
1.4. Gentamicina.....	13
2. Objetivo.....	16
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1 Animais.....	17
3.2. Grupos experimentais.....	17
3.3. Terapia farmacológica.....	18
3.3.1. Tratamento com gentamicina.....	18
3.4. Indução da lesão.....	18
3.5. Procedimento cirúrgico para retirada dos músculos e preparo das amostras.....	19
3.6. Análise histopatológica.....	19
3.7. Imunohistoquímica.....	20
3.8. Western blot.....	21
3.8.1. Preparo do extrato total.....	21
3.8.2. Análise da proteína distrofina por western blot.....	21
3.9. Determinação da creatinoquinase no plasma sanguíneo.....	22
4. Análise funcional.....	23

4.1. Análise estatística.....	23
4. Resultados.....	25
4.1. Achados clínicos e análise da massa corporal dos animais.....	25
4.2. Força de tração do membro torácico.....	25
4.3. Avaliação da expressão de distrofina.....	26
4.3.1. Imunohistoquímica.....	26
4.3.2. Western blot.....	28
4.4. Regeneração muscular.....	28
4.4.1. Análise qualitativa.....	28
4.4.2. Análise quantitativa.....	30
5. Níveis de creatinoquinase no plasma sanguíneo.....	31
5. Discussão.....	33
6. Resultados.....	42
7. Referências bibliográficas.....	43

Lista de abreviaturas

BL/10 – C57BL/10

CDG – complexo distrofina-glicoproteínas

CK – enzima creatino-quinase

CT – camundongo *mdx* controle

DMD – distrofia muscular de Duchenne

GT - gentamicina

HE – hematoxilina-eosina

IFN- γ – interferon-gamma

mdx - X chromosome-linked muscular dystrophy

MMPs - metaloproteinases

NC – núcleo central

nNOS – oxido nítrico sintase neural

NP – núcleo periférico

TNF-alfa – fator de necrose tumoral alfa

XL - xilocaína

RESUMO

Na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e no seu modelo experimental, o camundongo *mdx*, a ausência ou disfunção da proteína distrofina leva à degeneração muscular. Terapias farmacológicas que produzam menos efeitos adversos que os glicocorticoides – atualmente utilizados no tratamento da DMD - vêm sendo testadas para promover melhor qualidade de vida aos pacientes. Estudos iniciais em camundongos *mdx* revelaram que o tratamento com gentamicina (GT), um antibiótico aminoglicosídeo, resultou na recuperação da síntese de distrofina. Esse fato, porém não foi confirmado por outros estudos em camundongos *mdx* e em pacientes portadores de DMD. Assim, a utilização da GT como indutor da expressão da distrofina permanece uma questão a ser examinada. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com GT no músculo sóleo de camundongos *mdx* e, para isso, camundongos *mdx* de 15 dias e 3 meses de idade foram tratados durante 15 dias através de injeção subcutânea de GT (34mg/Kg/dia). Inicialmente examinamos seu efeito na reexpressão da proteína distrofina e em seguida, os aspectos histopatológicos do músculo sóleo. Nossos resultados demonstraram que não houve recuperação da expressão da proteína distrofina nos músculos de camundongos tratados com GT, nem mesmo quando os ciclos de degeneração e regeneração foram induzidos através de 3 injeções com xilocaína. Além disto, os resultados mostraram que a regeneração muscular foi intensificada nos músculos dos camundongos *mdx* tratados com GT, uma vez que os mesmos apresentaram maior quantidade de fibras com núcleo central e densidade de fibras regeneradas, sugerindo contribuição da droga no processo de regeneração muscular.

ABSTRACT

In Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and in the *mdx* mice model of DMD, the lack of dystrophin leads to muscle degeneration. Drug therapies that produce fewer adverse effects than glucocorticoids, currently used to treat DMD, are being tested to promote better quality of life for patients. Some studies in *mdx* mice revealed that the treatment with gentamicin, an aminoglycoside antibiotic, resulted in increase of almost 20% of dystrophin levels. However, dystrophin expression has not been observed in other studies with *mdx* mice and DMD patients as well. Therefore, whether dystrophin, in fact, is restored by gentamicin remains an open question. This study aimed to evaluate the effects of treatment with gentamicin in the soleus muscle of *mdx* mice and, therefore, we used C57BL/10 and *mdx* with 15 days and 3 months old mice. We first verified its effects on dystrophin expression, and then in the histopathological aspects of the soleus muscle. Our results showed no recovery of dystrophin expression in muscles of treated mice of any age. The histopatological aspects shows higher amount of fibers with central nuclei, suggesting contribution of gentamicin in the process of muscle regeneration.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD; OMIM 310200) é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X e causada pela mutação no gene que codifica a proteína distrofina, uma proteína estrutural com peso molecular de 427kDa, localizada principalmente na face citoplasmática do sarcolema (Engel et al., 1994). A distrofina promove importante ligação entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular, via complexo distrofina-glicoproteínas (Campbell and Kahl, 1989; Ervasti et al, 1990).

As primeiras observações da DMD foram feitas em 1861 por Dr. Duchenne de Boulogne, na França, e descrita como uma condição de paralisia muscular pseudo-hipertrófica (Engel et al., 1988). A doença afeta cerca de 1 a cada 3.500 recém-nascidos do sexo masculino e aproximadamente 30% dos casos origina-se de mutação espontânea, sendo que o restante é herdado do genótipo materno. A frequência de mutação, deleções ou duplicações é elevada devido ao tamanho e complexidade do gene (Tinsley et al., 1997; Barton-Davis et al., 1999), o que resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (Seixas et al, 1997).

Clinicamente, a DMD manifesta-se entre dois e cinco anos de idade, quando se observa atraso no desenvolvimento motor, dificuldade em correr ou subir e descer degraus e quedas frequentes. A fraqueza muscular é progressiva e evidente nos membros inferiores e na musculatura proximal, resultando na perda da deambulação aproximadamente aos doze anos de idade, comumente com cifoescoliose. A utilização de órteses e de ventilação mecânica melhoram a qualidade de vida do paciente, porém, o óbito é inevitável e frequentemente ocorre devido à falência respiratória e cardíaca por volta da segunda ou terceira década de vida. (Engel et al, 1994; Petrof, 1998;

Bogdanovich et al., 2004). Além do comprometimento muscular, cerca de 30% dos pacientes com DMD apresentam comprometimento do sistema nervoso central com grau variável. (Anderson et al., 2002).

Em pacientes com DMD, o aspecto histopatológico do músculo é praticamente normal antes do início dos sintomas clínicos. Logo após, alterações são evidentes, confirmando a ausência da proteína distrofina, presença de fibras musculares necróticas ou em degeneração e altos níveis de CK (Collin e Morgan, 2003). Células inflamatórias são observadas no músculo distrófico e as fibras musculares são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo e adiposo, evidenciados clinicamente pela pseudo-hipertrofia dos membros, o que pode ser observado a partir de um a cinco anos de idade (Engel et al., 1994; Blake et al., 2002; Biggar, 2006). O gene da distrofina estende-se ao longo de 2.4 megabases do cromossomo x e contém 79 exons que codificam um mRNA de 14kb. Sua tradução gera uma proteína de 3.685 aminoácidos, com um peso molecular de 427kDa – distrofina – que localiza-se abaixo do sarcolema das fibras musculares. O estudo genético da DMD indica mutações na sequência de nucleotídeos no *locus* p21.2 do cromossomo X (Pichavant et al., 2011).

A molécula da distrofina apresenta 4 regiões principais: o domínio N-terminal interage com os filamentos de actina. O domínio central também se liga aos filamentos de actina e também à nNOS (óxido nítrico sintase neuronal). Essa enzima está relacionada a várias funções fisiológicas do músculo, como sua contração e regeneração. O domínio central também possui 4 regiões (em dobradiça) que promovem flexibilidade. A terceira região é o domínio rico em cisteína, que interage com a β -dystroglicana sarcolemal, que por sua vez interage com a α -dystroglicana da membrana. A região C terminal é associada com as α , β e γ -sintrofina. Como as dystroglicanas e sintrofina também estão ligadas a outras proteínas, a distrofina, assim,

interage com muitas proteínas em um complexo chamado complexo distrofina-glicoproteínas (CDG). Este complexo é expresso em grande quantidade no sarcolema do músculo esquelético, atravessando-o e estabelecendo a conexão do citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular da fibra muscular (Brown et al., 1997; Petrof, 2002; Pichavant et al., 2011).

Sugere-se que o CDG confira estabilidade ao sarcolema durante a contração e relaxamento da fibra muscular (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Engel et al., 1994), além de servir como sinalizador de processos intracelulares que levam a mecanismos de defesa, regulação de processos vitais ou à morte da fibra muscular (Gailly, 2002; Marques, 2004; Rando, 2001). Mutações nos genes que codificam os componentes do complexo levam à perda da sua expressão e/ou função no músculo. Devido à ausência da distrofina, a conexão fica prejudicada e acaba por promover uma desorganização dos componentes do CDG, juntamente a uma instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração/relaxamento, tendo como consequência lesão do sarcolema e degeneração da fibra muscular (Gumerson e Michele, 2011; Grounds et al., 2005). Entretanto o exato mecanismo através do qual os defeitos do CDG causam degeneração muscular permanece desconhecido.

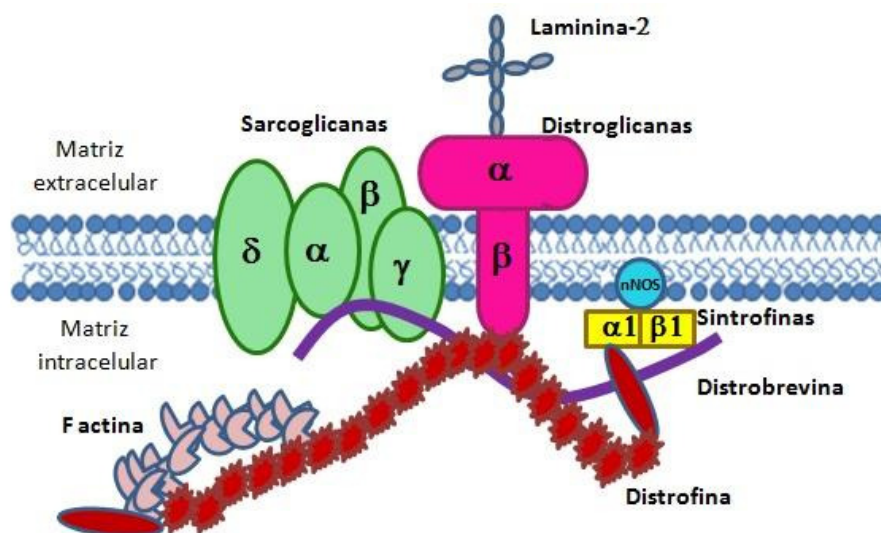


Figura1: Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema, incluindo os componentes integrais do complexo (distrofina, complexo distroglicano, complexo sarcoglicano, α -distrobrevina e sintrofina), a ligação com a matriz extracelular (laminina), parte da ligação intracelular (F-actina) e moléculas de sinalização ligadas ao complexo (sintase de óxido nítrico neuronal – nNOS e calmodulina – CaM). Figura elaborada pelos alunos do Laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular, Instituto de Biologia – UNICAMP.

1.2 Camundongos *mdx*

Ao final da década de 80, período em que o estudo da DMD estava restrito às análises de biópsias ou ao cultivo de células, surgiu uma linhagem de camundongos mutantes originados da linhagem C57BL/10 ScSn, denominada C57BL/10 *mdx* (x chromosome-linked muscular dystrophy). Através desta linhagem, possibilitou-se a observação experimental controlada de degeneração muscular (Bulfield et al., 1984).

Sendo assim, o camundongo *mdx* tornou-se o modelo animal favorito para estudos da DMD (Hoffman et al., 1987; Anderson et al., 1988; Collins e Morgan, 2003), pois estudos genéticos mostram que nesses camundongos o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD (Lefaucher et al., 1995), apresentando também ausência da distrofina.

Apesar de o gene afetado ser homólogo ao do humano, o camundongo *mdx* possui fenótipo mais brando, com alterações morfológicas moderadas e função mecânica menos comprometida. Isto faz com que a sobrevivência dos camundongos *mdx* não seja diferente dos camundongos C57BL/10 (Collins e Morgan, 2003). Diferentemente da miopatia humana, os músculos do *mdx* regeneram sucessivamente após um período de necrose (Torres e Duchon, 1987).

Embora apresente certas limitações, o camundongo *mdx* é o modelo mais utilizado para o estudo da DMD devido a sua larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção quando comparado a outros modelos mamíferos, como cães e gatos (Tanabe et al., 1986; Hamer et al., 2002; Sasaoka et al., 2003).

1.3 Degeneração e Regeneração Muscular no Camundongo *mdx*

A ausência da distrofina, juntamente com a desorganização do CDG é o evento inicial que provoca degeneração muscular, pois favorece a fragilidade do sarcolema. A partir disso, observa-se um aumento das micro-rupturas transitórias da membrana plasmática (Petrof et al., 1993), que são comuns em células sob estresse mecânico e podem ser observadas pela perda do conteúdo intracelular da fibra muscular distrófica para o meio extracelular (McNeil & Steinhardt, 1997; Amthor et al., 2004).

A diferença entre o desenvolvimento da doença em humanos e em camundongos *mdx* é que nos camundongos, as fibras têm a capacidade de se regenerar sucessivamente após a degeneração sem que ocorra a manifestação de sinais clínicos que evidenciem o comprometimento muscular (Cullen e Jaros, 1988).

Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras dos músculos do camundongo *mdx* iniciam-se por volta dos 20 dias de vida pós-natal. Acredita-se que o início repentino da mionecrose nessa idade seja devido ao aumento da atividade muscular, o que aumentaria a susceptibilidade das fibras musculares à lesão (Tanabe et al, 1986; Cullen e Jarros, 1988; Disatnik et al, 1998). O ápice da intensidade da mionecrose ocorre aos três meses de idade e, com cerca de 120 dias, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (Tanabe et al., 1986; Disatnik et al, 1998; Chargé, and Rudnicki, 2004). Até os nove meses de idade observa-se uma heterogeneidade no diâmetro das fibras musculares, bem como um aumento significativo do número de fibras com núcleo central (Briguet et al., 2004).

Os músculos do camundongo *mdx* apresentam sinais histopatológicos semelhantes aos músculos esqueléticos de portadores da DMD por volta dos dois anos de idade, com predominância da degeneração muscular (Lefaucheur et al., 1995). Análises detalhadas

da histopatologia do músculo do *mdx* têm mostrado que apesar de alguns músculos serem poupados, como os laríngeos e extraoculares (Porter et al., 2006, Marques et al., 2007), outros são afetados, como os músculos do membro posterior e severamente afetados no camundongo idoso – como o diafragma (Muller et al., 2001). Dentre os músculos do membro posterior, o sóleo é o que apresenta o pico de necrose mais precoce, com 7,5% de fibras degeneradas na terceira semana de vida.

1.4 Gentamicina

Atualmente, o tratamento para DMD é realizado principalmente com glicocorticoides, como deflazacorte e prednisona. Os glicocorticoides pertencem a uma classe de hormônios esteróides utilizados como imunossupressores e anti-inflamatórios. No músculo esquelético, retardam a perda de força e aumentam a massa muscular, prolongando a deambulação e manutenção da função pulmonar (Engel et al., 1994; Kapsa et al., 2003; Manzue et al., 2008; Escolar et al., 2011). Porém, o uso prolongado produz efeitos colaterais como ganho de peso, atrofia muscular, alteração da densidade da matriz óssea e fraturas, alterações no comportamento, deficiência adrenal e Síndrome de Cushing (Manzue et al., 2008; DeBosscher, 2010). Terapias farmacológicas que produzam menos efeitos adversos vêm sendo testadas para promover melhor qualidade de vida aos pacientes com DMD.

Cerca de 2/3 dos pacientes com DMD possui deleções ou duplicações no gene da distrofina, o qual produz uma proteína truncada. Para estes pacientes, a reposição da proteína defeituosa parece ser a única solução. Em contrapartida, cerca de 15% dos pacientes possuem uma mutação pontual ou rearranjo no DNA que altera um códon por um aminoácido em um *stop códon*. Para esses indivíduos, terapias com antibióticos

aminoglicosídeos parecem ser benéficas (Hoffman and Dressman, 2001; Wagner et al., 2001; Malik et al., 2010).

A gentamicina (GT) é um antibiótico aminoglicosídeo descoberto em 1963, considerado um importante antibacteriano. Estudos genéticos e bioquímicos demonstraram que esses antibióticos se ligam ao sítio de decodificação do RNA ribossômico, provocando uma mudança estrutural que permite o emparelhamento códon-anticódon durante a tradução da proteína (Malik et al., 2010). Ocorre, então, a inserção de um aminoácido no local do stop códon, tendo como resultado, a continuação da tradução pelo mesmo. As injeções da droga promovem um fornecimento sistêmico do agente terapêutico, tendo seu pico 20 minutos após a injeção e decaindo cerca de 24 horas após. Esse pico da GT no sangue logo após a injeção permitiria quantidades significativas de erro de tradução e, assim, a possibilidade de suprimir um códon de parada prematura (Lund et al., 1997; Barton-Davis et al., 1999).

Camundongos *mdx* têm falha na produção da proteína distrofina, pois seus genes para essa proteína contêm uma mutação que conduz a uma terminação prematura durante a sua síntese (Lefaucher et al., 1995).

Estudos em camundongos *mdx* revelaram que o tratamento com GT resulta na elevação de aproximadamente 10-20% da síntese de distrofina, com consequente proteção das fibras musculares em relação à mionecrose (Barton-Davis et al., 1999; Kimura et al., 2005; Delucca et al., 2008). Porém, outros estudos com a GT em camundongos *mdx* não obtiveram os mesmos resultados positivos (Dunant et al., 2003). Também em contraste aos resultados reportados em camundongos *mdx*, testes clínicos com pacientes com DMD utilizando doses baixas e subtóxicas de GT não resultaram em benefícios clínicos (Serrano et al., 2001; Wagner et al., 2001). Estes estudos em conflito devem ser cautelosamente interpretados, pois o conhecimento dos mecanismos moleculares

associados ao tratamento com GT ainda é incompleto. Além disso, há diferença entre os estudos no que se diz respeito aos músculos utilizados e idade dos animais.

Portanto, mais estudos são necessários para o melhor entendimento dos efeitos da GT no tratamento da DMD, tanto em camundongos *mdx*, quanto em humanos.

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do tratamento com gentamicina no músculo sóleo de camundongos *mdx* quanto à restauração da distrofina e sua influência na regeneração muscular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes para experimentação de animal da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (protocolo nº 2614-1). Foram utilizados camundongos de ambos os sexos da linhagem *mdx*, com idades de 15 dias e 12 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia em caixas plásticas, sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro), com ração e água *ad libitum*.

3.2 Grupos Experimentais

Foram utilizados 52 camundongos de ambos os sexos, divididos nos seguintes grupos:

Grupo C57BL/10 (n= 8): animais da linhagem C57BL/10ScCr/PasUnib. Este grupo teve por objetivo servir de comparação aos demais grupos.

Grupo *mdx* controle 15 dias (n=8): animais da linhagem *mdx* de 15 dias de vida, com o objetivo de observar a regeneração da fibra muscular distrófica em camundongos não tratados.

Grupo *mdx* gentamicina 15 dias (n=8): animais *mdx* de 15 dias de vida, submetidos ao tratamento de 15 dias com gentamicina, conforme descrito por Barton-Davis (1999).

Grupo *mdx* controle 3 meses (n=8): animais da linhagem *mdx* de 3 meses de vida, com o objetivo de observar a regeneração da fibra muscular distrófica em camundongos não tratados.

Grupo *mdx* 3 meses tratado com gentamicina (n=8): animais da linhagem *mdx* de 3 meses de vida, submetidos ao tratamento com gentamicina durante 15 dias.

Grupo *mdx* 3 meses com lesão química (n=6): animais da linhagem *mdx* de 3 meses de vida, submetidos a lesão química com xilocaína (3 vezes) no músculo sóleo para induzir repetitivos ciclos de degeneração e regeneração (Luz, 2000).

Grupo *mdx* 3 meses lesão química + tratamento com gentamicina (n=6): animais da linhagem *mdx* nos quais foi feita associação de lesão intramuscular com xilocaína e tratamento de 15 dias com gentamicina.

3.3 Terapia Farmacológica

3.3.1 Tratamento com Gentamicina

Os camundongos dos grupos *mdx* com idades de 15 dias e 3 meses tratados com gentamicina receberam o antibiótico (Garamicina 40mg injetável, Schering-Plough®)

via injeção subcutânea, 34mg/Kg/dia de acordo com Barton-Davis (1999), durante 15 dias, do 15º ao 30º dia de vida pós-natal e da 12ª a 14ª semana de vida pós-natal, respectivamente.

3.4 Indução da Lesão

Para induzir mionecrose e consequente regeneração muscular, foi empregada injeção intramuscular de xilocaína, conforme previamente descrito (Luz et al.,2000). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de cloridrato de cetamina (65mg/Kg) e cloridrato de xilazina (3,4mg/Kg) diluída em solução salina.

Após profunda anestesia, foi realizada incisão na face ântero-lateral da pele do membro posterior direito para exposição do músculo sóleo. Posteriormente, foi feita injeção intramuscular de xilocaína (solução de cloridrato de lidocaína 0,2 ml a 2% sem vaso constritor, Astra®) em seu terço médio. Este modelo de lesão baseia-se no fato de que alguns anestésicos locais, ao interagirem com a membrana da fibra muscular, produzem na mesma pequenas lesões focais que resultam inicialmente na entrada abrupta de íons cálcio. Com isso, ocorre hipercontração das fibras musculares seguida por mionecrose e regeneração. Apesar da extensa lesão das fibras, as estruturas nervosas intramusculares, bem como o tubo endomisial são preservados. Cada animal recebeu 3 injeções de xilocaína, com intervalo de 1 semana entre elas.

3.5 Procedimento cirúrgico para retirada dos músculos e preparo das amostras

Os animais com 15 dias foram sacrificados imediatamente após o término do tratamento, enquanto que os animais de 3 meses foram sacrificados 15 dias após o término do tratamento. Para isso, os animais foram anestesiados com 0,1 ml/10g de peso da mistura 1:1 de cloridrato de cetamina (130mg/kg, Francotar, Virbac, São Paulo,

Brasil) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg, 2% m/v, Virbaxyl, Virbac, São Paulo, Brasil).

O músculo sóleo foi retirado e fixado em suporte de madeira com *tragacanth gum*, imerso em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -159°C. Para obtenção dos cortes, o músculo foi descongelado por aproximadamente 30 minutos até atingir a temperatura de -23°C e seccionado transversalmente na espessura de 7 µm utilizando criostato (Microm-HS505E, Departamento de Anatomia, IB). Além disso, alguns desses músculos foram transferidos para tubos criogênicos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o processamento para a quantificação da distrofina pela técnica de western blot.

3.6 Análise histopatológica

A utilização de parâmetros histopatológicos para o estudo das alterações musculares decorrentes da distrofia, tais como a relação do número de fibras musculares com núcleo periférico e central nos fornecem dados que, em conjunto, permitem analisar o processo de degeneração e regeneração ocorrido ao longo do tempo nos músculos distróficos (Gaschen e Burgunder, 2001). Inicialmente, os cortes congelados foram fixados em solução Bouin por 30 minutos e, em seguida, lavados com etanol por toda a noite. Os cortes, então, foram lavados em água corrente por dez minutos e com hematoxilina de Harris por 1 minuto e, em seguida, com eosina por 2 minutos. Após esta etapa, os cortes foram desidratados em séries de etanóis e diafanizados em xilol para posterior montagem em Entelan e observação em microscopia de luz.

Foi realizada a quantificação do número total de fibras musculares, considerando como fibras normais aquelas identificadas pela presença de núcleo periférico (NP); e o número de fibras com núcleo central (NC – indicativo de regeneração muscular). A

quantificação do número de fibras com NC e NP foi realizada utilizando-se um contador manual, observadas com objetiva de 20X e retículo quadrilátero de 100 pontos acoplado ao microscópio de luz binocular. A média da quantificação foi expressa como percentual do total de fibras contadas em cada secção transversa.

3.7 Marcação imunohistoquímica da distrofina

Cortes do músculo sóleo foram hidratados com TBS (0.05M) por 15 minutos e imersos em Triton X-100 (0.3% - Sigma) por 5 minutos. Após lavar durante 15 minutos com TBS, os cortes foram imersos por 2 horas em solução para bloquear marcação inespecífica (TBS 0.05M em 10% de albumina bovina - TBS/ BSA 10%) e incubados por 12 horas com anticorpo primário à 4°C, em câmara úmida. A seguir, os cortes foram lavados e incubados com anticorpo secundário IgG-FITC (SIGMA) diluído em TBS/BSA 3%, durante 2 horas em temperatura ambiente. Finalmente, após lavar por 15 minutos com TBS (0,05M), os cortes foram montados em meio de montagem DABCO (Sigma) e recobertos por lamínulas. Os cortes foram divididos de forma aleatória e imunomarcados para distrofina, para caracterização do fenótipo distrófico. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon® EFD 3) acoplado a videocâmera Hamamatsu.

3.8 Western blot

3.8.1 Preparo do extrato total

Foi realizada a técnica de western blot para quantificação da concentração da proteína distrofina no músculo sóleo de camundongos C57BL/10 e *mdx*. O músculo sóleo dos animais de todos os grupos foram seccionados em pequenos fragmentos e homogeneizados em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 1%,

pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10 mM, ortovanato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina a 4°C com homogeneizador do tipo Polytron PTA 20S (PT 10/35; Brinkmann Instruments) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 12581 g, a temperatura de 4°C por 20 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação da proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.8.2 Análise da proteína distrofina por western blot

As amostras de extrato protéico foram tratadas com tampão Laemmli (Tris 10mM, β -MercaptoEthanol, glicerol 10%, SDS 2% e azul de bromfenol 0,1%) e aquecidas em banho seco por 5 minutos. Em seguida, 30 microgramas de proteína foram aplicados em gel de 6,5% SDS-poliacrilamida em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences) realizou-se em 90 minutos a 30 V e 240 minutos a 120 V em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução de TBS-T (Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário (Dys, NCL-DYS1, mouse monoclonal, Novacastra ; 1:250) diluído em 10ml de TBS-T contendo 3% de leite desnatado à 4°C, durante 12 horas em agitador mecânico (ROCKER II, Boekel Scientific). As membranas foram lavadas 3 vezes com solução basal, 10 minutos cada lavagem e incubadas com anticorpos secundários (Anti-

mouse IgG-FITC, SIGMA; 1: 2000 - 4000) por 90 minutos em temperatura ambiente. As membranas, então, foram lavadas novamente por 30 minutos com solução basal.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce) por 5 minutos e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Cambridgr, UK).

As membranas foram coradas em Ponceau para certificação de que a quantidade de proteína era a mesma em todas as amostras.

3.9 Determinação da creatinoquinase no plasma sanguíneo

Para observar a ação do tratamento sobre a degeneração muscular, realizamos a quantificação da CK em todos os grupos. Uma amostra de sangue dos animais foi obtida sob anestesia de acordo com o item 3.4. Após toracotomia e exposição do coração, uma seringa heparinizada foi introduzida no ventrículo esquerdo e 0,5 ml de sangue punccionado. Em seguida, o sangue foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml, centrifugado a 12000 rpm, na temperatura de 4°C por 15 minutos no aparelho Sigma 3-18k (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany), sendo o sobrenadante utilizado para análise. Para quantificação utilizou-se o kit bioquímico CK da Bioclin. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro U.V Thermo Electron Corporation Spectrophotometer Genesys 20 (Thermo Electron Scientific Instruments Corp., Madison, Wisconsin, USA) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

4. Análise Funcional

Ao início e final do tratamento foi realizada a medida de força de tração dos membros torácicos dos camundongos. Os animais foram posicionados sobre o medidor horizontal de força (New Primer, São Paulo, BR), de forma que as patas dianteiras segurassem um anel metálico ligado a um transdutor de força (Figura 2).



Figura 2: Balança digital adaptada para medir a força de tração do membro torácico dos camundongos.

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

4.1 Análise Estatística

Para análise estatística, inicialmente utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade das amostras. Mediante a distribuição normal dos dados, foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (significância $p < 0,01$) para as devidas comparações entre os grupos. Para análise comparativa entre 2 grupos, foi utilizado o teste-t de *student* (significância $p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS

4.1 Achados clínicos e análise da massa corporal dos animais

Não se observou diferença na aparência física e no comportamento dos animais na gaiola ou durante seu manuseio. Também não se observou diferença significativa entre o peso dos camundongos *mdx* tratados com GT quando comparado aos camundongos *mdx* não tratados ($p>0,05$). Não houve mortalidade.

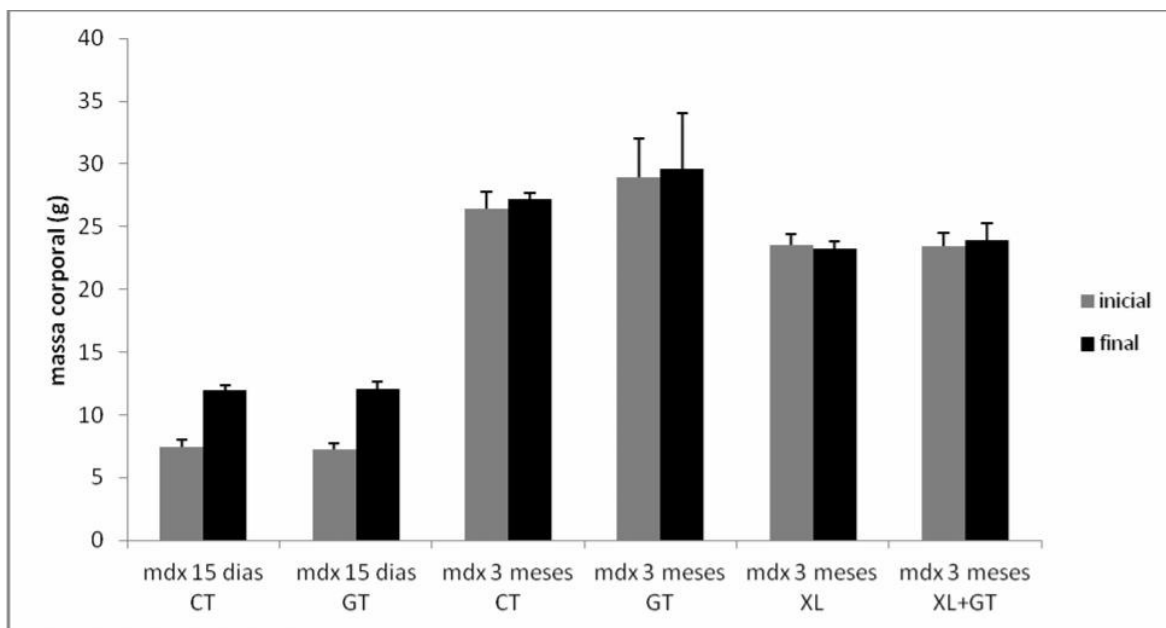


Gráfico 1: Medida da massa corporal no primeiro (inicial) e último dia de tratamento (final). Controle (CT), gentamicina (GT), xilocaína (XL) e xilocaína+gentamicina (XL+GT). Os valores estão expressos em grama (g).

4.2 Força de tração do membro torácico

Nos camundongos *mdx* tratados com GT (tanto de 15 dias, quanto de 3 meses) observou-se aumento da força, entretanto, não houve diferença significativa ($p>0,05$).

entre elas e aquelas observadas em camundongos dos grupos tratados com GT. A tabela 1 mostra os valores médios e desvio padrão para cada grupo.

Tabela 1: Medidas de força muscular expressa em g/g.

	Inicial	Final
mdx 15 dias CT	1,82±0,17	2,08±0,15
mdx 15 dias GT	1,94±0,23	2,14±0,06
mdx 3 meses CT	1,23±0,03	1,23±0,04
mdx 3 meses GT	1,18±0,1	1,19±0,1
mdx 3 meses XL	1,28±0,14	1,37±0,12
mdx 3 meses XL+GT	1,38±0,05	1,44±0,08

Tabela 1: Força muscular avaliada no primeiro (inicial) e no ultimo dia de tratamento (final). Controle (CT), gentamicina (GT), xilocaina (XL) e xilocaína + gentamicina(XL+ GT). Os valores estão expressos em grama/grama (g/g). Considerou-se como valor de significância $p < 0,05$ (teste t de *student*).

4.3 Avaliação da expressão de distrofina

4.3.1 Imunohistoquímica

A figura 3 representa um corte transversal do músculo sóleo de camundongo C57BL10 com expressão de distrofina no sarcolema da fibra muscular. Isto mostra que a técnica por nós utilizada é adequada para a identificação da distrofina. Fibras musculares positivas à distrofina não foram observadas no músculo sóleo dos camundongos *mdx* não tratados (fig. 4A e 4C)

Nos camundongos *mdx* de 3 meses dos grupos GT e XL+GT, observou-se pequenos grupos de fibras musculares (normalmente formados por 1-3 fibras) positivas à distrofina. Os grupos de fibras musculares dispunham-se aleatoriamente distribuídos ao longo da secção transversal do músculo sóleo (Fig 4B e 4D).

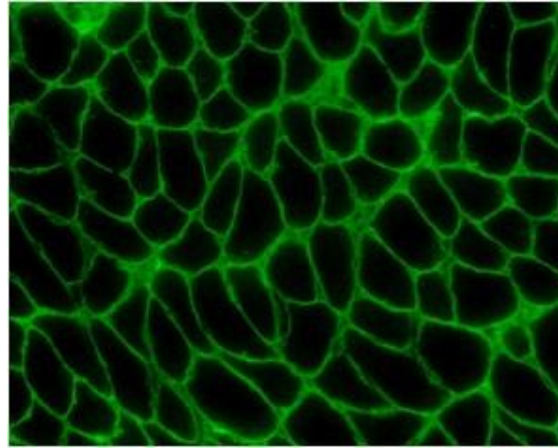


Figura 3: Fibras musculares marcadas com distrofina. Secção transversal de músculo sóleo de camundongos C57BL/10. Aumento de 2000X.

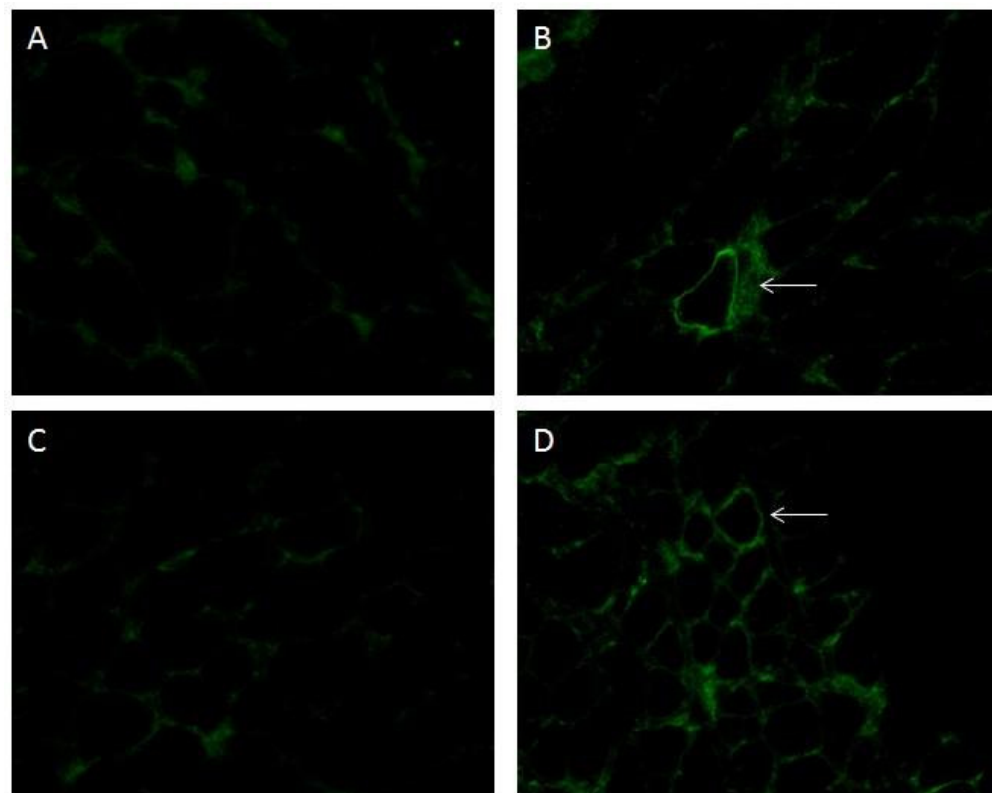


Figura 4: Fibras musculares marcadas com distrofina. Em A: representativo dos camundongos *mdx* 3 meses sem tratamento; B: *mdx* 3 meses tratado com GT; C: *mdx* 3 meses injetados com xilocaína; D: *mdx* 3 meses com associação de xilocaína + gentamicina. As setas indicam fibras musculares positivas à distrofina. Notar presença de 1-3 fibras positivas à distrofina (B, D). Aumento de 2000X.

4.3.2 Western-blot

Não houve expressão da proteína distrofina em nenhum dos grupos *mdx*, contrastando com a expressão da mesma no grupo controle C57BL/10 (fig.5).

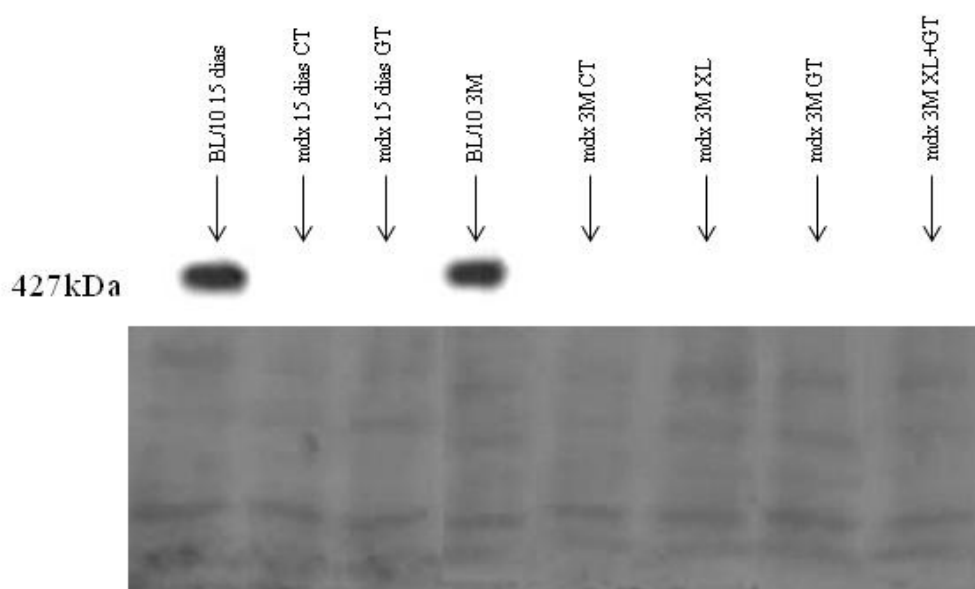


Figura 5: Western-blot da concentração da distrofina no músculo sóleo de camundongos C57BL/10 (BL/10), *mdx* (CT), *mdx* gentamicina (GT), *mdx* xilocaína (XL) e *mdx* xilocaína+gentamicina (XL + GT). Notar que as bandas de distrofina somente estão presentes nos grupos BL/10. XXX

4.4 Regeneração muscular

4.4.1 Análise qualitativa

Na análise histopatológica em camundongos *mdx* sem tratamento – tanto de 15 dias, quanto de 3 meses - observou-se fibras musculares em regeneração, caracterizadas por núcleo central, cromatina condensada, citoplasma eosinófilo e diâmetro aparentemente compatível com os de fibras normais (fig.6) Esses aspectos histopatológicos não foram diferentes em fibras musculares dos demais grupos de

camundongos *mdx*, exceto pelo aparente aumento no número de fibras com núcleo central nos músculos dos camundongos tratados com GT.

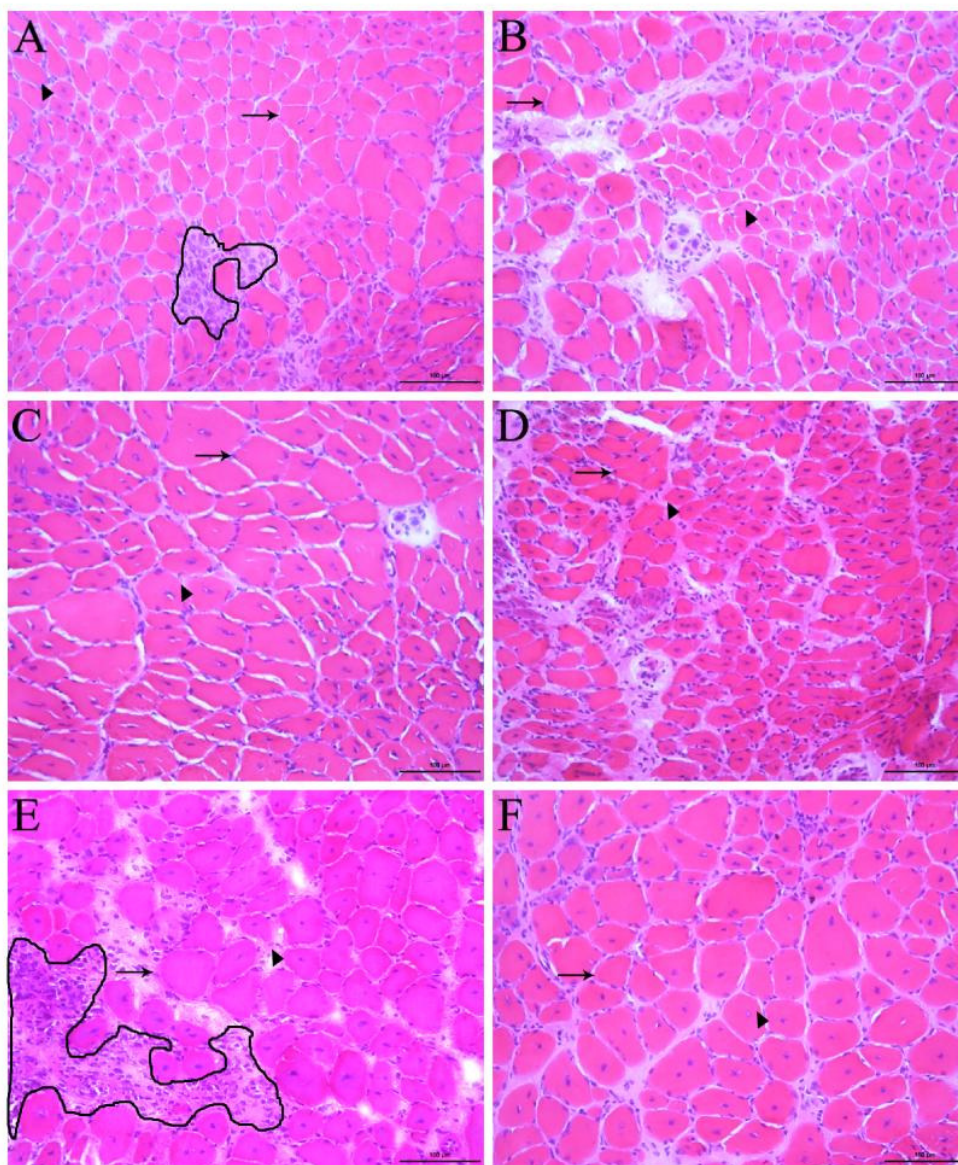


Figura 6: Secções transversais do músculo sóleo de camundongos *mdx* 15 dias CT (A), 15 dias GT (B), 3 meses CT (C), 3 meses GT (D), 3 meses XL (E) e 3 meses XL + GT (F). Áreas de regeneração (circundadas), fibras musculares com núcleos periféricos (seta) e fibras musculares com núcleos centrais (cabeça de seta). Coloração HE. Bar 100μm.

musculares do músculo sóleo de camundongos *mdx* com 15 dias de idade tratados com GT foram significativamente superiores ($p < 0,01$) que aquelas do grupo controle de mesma idade (Gráfico 2 e Tabela 2). Portanto, nesses grupos houve maior quantidade de

fibras musculares regeneradas. De fato, a percentagem e a densidade foram respectivamente 21,8% e 29% superiores àquelas do grupo controle (52,85% vs. 46,39%; e 83,16 fibras/mm² vs 64 fibras/mm²).

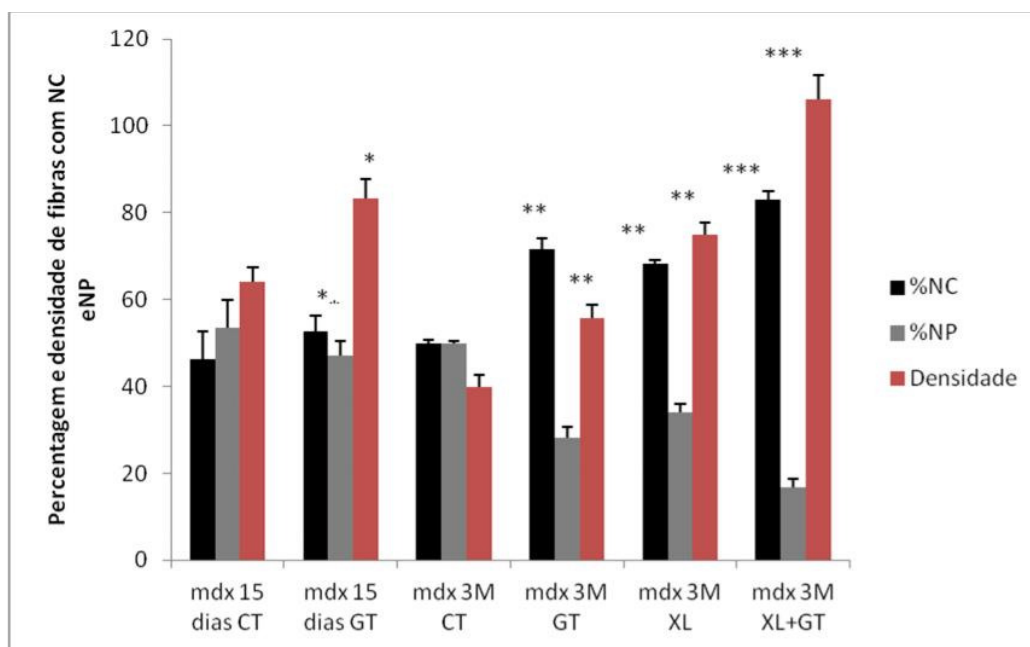


Gráfico 2: Percentagem e densidade de fibras musculares regeneradas. Controle (CT), gentamicina (GT), xilocaína (XL) e xilocaína e gentamicina (XL+ GT). Percentagem de fibras com núcleo central (%NC), porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP) e da densidade de fibras com núcleo central.

(*) diferença significativa quando comparado ao *mdx* 15 dias CT

(**) diferença significativa quando comparado ao *mdx* 3 meses CT

(***) diferença significativa quando comparado ao *mdx* 3 meses GT.

Tabela 2: Percentagem e densidade de fibras musculares regeneradas.

	%NC	%NP	Densidade NC (fibras/mm ²)
mdx 15 dias CT	46,39±6,29	53,60±6,29	64
mdx 15 dias GT	52,85±3,43*	47,14±3,43	83,16*
mdx 3M CT	50,01±0,59	49,98±0,54	40
mdx 3M GT	68,28±0,86**	34,29±1,97	55,66**

mdx 3M XL	71,76±2,46**	28,23±2,46	74,83**
mdx 3M XL+GT	83,14±1,81***	16,85±1,81	106***

Tabela 2: Percentagem e densidade de fibras musculares regeneradas. Controle (CT), gentamicina (GT), xilocaína (XL) e xilocaína e gentamicina (XL+ GT). Percentagem de fibras com núcleo central (%NC), porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP) e da densidade de fibras com núcleo central.

(*) diferença significativa quando comparado ao mdx 15 dias CT

(**) diferença significativa quando comparado ao mdx 3 meses CT

(***) diferença significativa quando comparado ao mdx 3 meses GT

Também no grupo de camundongos *mdx* com 3 meses GT se observou que a percentagem e a densidade de fibras musculares com núcleo central foram significativamente superiores ($p<0,01$) quando comparados ao grupo controle da mesma idade (Gráfico 2 e Tabela 2). A percentagem e a densidade de fibras com núcleo central foram respectivamente 30,53% e 28,4% superiores àquelas do grupo controle 68,28% vs. 50,01% e 55,66 vs. 40 fibras/mm²).

5. Níveis de creatinoquinase no plasma sanguíneo

Para investigar se o tratamento com GT produziu danos às fibras musculares, quantificou-se os níveis séricos da enzima creatina-cinase (CK), um indicador universal de degeneração muscular. Os resultados estão expressos na tabela 3.

Tabela 3: Quantificação da enzima CK expressa em U/L

Grupo	média±dp
<i>mdx</i> 15 dias CT	1404,95±83,82
<i>mdx</i> 15 dias GT ^a	1034±142,96
<i>mdx</i> 3 meses CT	1625,75±104,65

<i>mdx</i> 3 meses GT	1448,25±165,61
<i>mdx</i> 3 meses XL	1642,75±88,73
<i>mdx</i> 3 meses XL+GT ^{b,c}	943,25±117,76

Tabela 3: Quantificação de CK (U/L) em camundongos *mdx*. Controle (CT), gentamicina (GT), xilocaína (XL) e xilocaína e gentamicina (XL+GT). Média±desvio padrão. Diferença significativa ($p<0,05$; teste t de *student*) entre os grupos *mdx* 15 dias CT e *mdx* 15 dias GT (a), *mdx* 3 meses GT e *mdx* 3 meses XL+GT (b), *mdx* 3 meses XL e *mdx* 3 meses XL+GT (c).

Observou-se redução significativa dos níveis de CK nos camundongos tratados com GT de ambas as idades (15 dias e 3 meses). No primeiro caso a redução foi de 27% ($p<0,05$) em relação ao grupo controle ($1404\pm83,82$ vs. $1034\pm142,96$), enquanto que nos animais de 3 meses GT a redução foi de 11% ($p<0,05$) em relação aos animais não tratados da mesma idade ($1625\pm104,65$ vs. $1448\pm165,61$).

Também se observou redução significativa de 43% ($p<0,05$) no grupo *mdx* XL+GT quando comparado com o grupo *mdx* XL o qual, como esperado, apresentou aumento dos níveis séricos de CK quando comparado aos demais grupos ($943\pm117,76$ vs. $1642\pm88,73$).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo o tratamento com gentamicina não foi suficiente para recuperar a expressão da proteína distrofina, nem mesmo quando a regeneração muscular foi induzida através de injeção de xilocaína. Observamos também que a gentamicina parece favorecer a regeneração muscular.

Com o intuito de facilitar a leitura, os resultados serão discutidos em duas etapas:

1. Sobre a recuperação da expressão de distrofina:

A idéia de se empregar a GT para a recuperação da distrofina vem do fato de que este antibiótico possui a propriedade de se ligar ao sítio de decodificação do RNA ribossômico, provocando uma mudança estrutural que permite o emparelhamento códon-anticódon durante a tradução da proteína. Ocorre, então, a inserção de um aminoácido no local do *stop códon*, tendo como resultado a continuação da tradução pelo mesmo, resultando na síntese de pelo menos parte da distrofina (Bedwell et al., 1997; Aurino & Nigro., 2006; Finkel., 2010; Malik et al., 2010).

Baseado nisto e, com o intuito de induzir a recuperação da distrofina, Barton-Davis et al. (1999) trataram camundongos *mdx* com GT e observaram aumento de 20% na expressão de distrofina em fibras musculares de diversos músculos, como por exemplo, o tibial anterior e o extensor longo dos dedos. Observaram também que a distrofina apresentava distribuição topográfica semelhante às fibras não distróficas, ou seja, ao longo do sarcolema, pressupondo proteção contra a mionecrose.

Na primeira etapa deste trabalho não observamos recuperação da distrofina em camundongos *mdx* com 3 meses de idade quando tratados com gentamicina, conforme demonstrado tanto pela técnica imunohistoquímica, quanto pela técnica bioquímica (western-blot). Portanto, nossos achados nessa fase não estiveram de acordo com aqueles de Barton-Davis et al., (1999).

Neste estudo, empregamos o mesmo tempo de tratamento e a mesma dose de GT usadas por Barton-Davis et al. (1999), mas duas diferenças podem ser notadas entre o nosso trabalho e aquele estudo. A primeira refere-se aos músculos examinados; enquanto Barton-Davis estudaram os músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos, nosso estudo restringiu-se ao músculo sóleo. É importante ressaltar que em

camundongos *mdx*, assim como em portadores de DMD, os músculos esqueléticos não são igualmente acometidos (Engel et al., 1994; Pastoret & Sebillé, 1995a). Dessa forma, músculos envolvidos na manutenção postural, como o sóleo, são mais intensamente acometidos que outros não envolvidos nesta função (Pastoret & Sebillé, 1995a). Sabe-se também que a intensidade da mionecrose em um determinado músculo varia de acordo com a idade do animal. Assim um mesmo músculo pode apresentar ciclos de degeneração e regeneração mais intensos um momento da vida que em outros (Pastoret & Sebillé, 1995a; Marques et al., 2008). Portanto, a análise de um mesmo músculo pode gerar resultados distintos entre vários estudos, dependendo da idade dos animais estudados.

Ainda que no estudo de Barton-Davis et al. (1999) não exista referência à faixa etária dos animais, sabe-se que no músculo sóleo de camundongos *mdx* com 3 meses de idade há acentuada diminuição na incidência de necrose das fibras musculares e, conseqüentemente, dos ciclos de degeneração e regeneração (Carnwath & Shotton, 1987; Pastoret & Sebillé, 1995b). O que também é sabido é que há possibilidade de reexpressão da distrofina a cada ciclo (Yokota et al., 2006; Fall et al., 2006). Assim, teoricamente, a possibilidade de reexpressão da distrofina estaria reduzida em nosso grupo pelo fato de a incidência dos ciclos estarem diminuídas devido à idade do animal.

Outra diferença entre o nosso estudo e aquele de Barton-Davis et al. (1999) foi o anticorpo usado para a detecção da distrofina; enquanto neste estudo utilizamos anticorpo primário para detecção da proteína de 427kDa, Barton-Davis et al. (1999) empregaram anticorpo com epítipo diferente, este para detectar uma isoforma da distrofina - chamada mini-distrofina - que apresenta peso molecular mais baixo (60kDa). Neste caso, ao realizar o western-blot aqueles autores examinaram, na verdade, a proteína em isoforma diferente da que nós tentamos quantificar. Assim, a

possível explicação para as diferenças entre nossos achados, desta fase de nosso trabalho, e aqueles de Barton Davis poderiam estar mais relacionadas ao fato de que distintos músculos foram examinados bem como ao tipo de anticorpo utilizado e menos ao tempo de tratamento e a dosagem de GT por nós empregada.

Nossos resultados não estão discordantes apenas daqueles de Barton-Davis, pois DeLucca et al; (2008) também observaram aumento na expressão da distrofina após tratamento com gentamicina em músculos de camundongos *mdx*. Uma diferença entre o estudo de Barton-Davis e o de DeLucca et al., (2008) é que neste último os animais foram submetidos a exercício. Isto é de importância, pois sabe-se que exercícios físicos aumentam a incidência de necrose e, conseqüentemente nos ciclos de degeneração e regeneração nas fibras musculares distróficas (Vilquin et al., 1998; DeLucca et al., 2003; Moens et al., 2003; Radley & Grounds, 2006; Grounds et al., 2008). Considerando-se que a cada ciclo de degeneração e regeneração aumenta a possibilidade do aparecimento de fibras revertentes, ou seja, que expressam distrofina (Fall et al., 2006), no estudo de DeLucca, a possibilidade de reexpressão da distrofina estaria aumentada, diferentemente do grupo *mdx* com 3 meses do nosso estudo.

Dessa forma, com o intuito de excluir a possibilidade de que a não reexpressão de distrofina após tratamento com GT estivesse relacionada ao fato de não haver grande número de fibras em processo de degeneração e regeneração, passamos a uma segunda etapa do trabalho. Para tal, criamos um grupo experimental no qual o músculo sóleo foi injetado com xilocaína e tratado com GT. Injeções intramusculares de xilocaína têm sido sistematicamente empregadas por gerar na fibra muscular pequenas lesões focais, que resultam na entrada abrupta de íons cálcio e conseqüente mionecrose (Luz et al., 2000). Os animais deste grupo, então, foram tratados com GT de forma que tivessem simultaneamente fibras musculares com intenso processo de degeneração, favorecido

por 3 injeções de xilocaína, a fim de induzir repetitivos ciclos de degeneração. Assim sendo, caso de fato tal evento favorecesse o surgimento de fibras revertentes, seria esperado que a distrofina voltasse a ser expressa de forma significativa.

Nossos resultados novamente não revelaram aumento da expressão da proteína distrofina, embora tenhamos utilizado o protocolo de tratamento de 14 dias, enquanto que De Lucca et al., (2008) tratou seus animais com GT por mais tempo, revelando o mesmo aumento de 20% que Barton-Davis havia relatado e demonstrando, portanto, menor eficácia da droga em seu grupo de animais exercitados.

É possível que as fibras musculares regeneradas após indução de mionecrose apresentem susceptibilidade à GT diferente daquelas que passam por regeneração após necrose que ocorre no o curso natural da doença (DeLucca et al.,) Diante disso, passamos para a terceira etapa do trabalho, na qual camundongos *mdx* com 15 dias de vida foram tratados durante 15 dias com GT, idade em que o músculo sóleo apresenta máxima atividade degenerativa (Carnwath & Shotton, 1987). Também nesse grupo de animais o tratamento com a GT foi incapaz de recuperar a expressão da distrofina.

Portanto em nenhum dos grupos experimentais observamos recuperação da distrofina, o que de certa forma não foi surpresa, pois há estudos tanto em camundongos *mdx*, quanto em humanos nos quais a reexpressão também não foi observada (Serrano et al., 2001; Wagner et al., 2001; Dunant et al., 2003).

A diferença entre nossos resultados e aqueles de outros estudos pode ser atribuída a alguns fatores, como por exemplo, a composição da GT a qual se sabe que é formada por 3 isômeros. As diferentes amostras de GT comercialmente disponíveis podem variar na quantidade de cada isômero, o que apesar de não influenciar em sua ação antibacteriana pode afetar sua capacidade em restaurar a distrofina, uma vez que influenciaria mais ou menos intensamente na leitura do códon de parada e,

consequentemente, na tradução da proteína (Howard et al., 2004; Pichavant et al., 2011).

Outro fator poderia ser a sequência de nucleotídeos decorrentes da mutação gênica que leva à tradução incorreta da proteína distrofina, pois a eficácia dos aminoglicosídeos em induzir a leitura através do códon de parada está associada ao tipo e local de mutação no gene. Na DMD o tratamento com gentamicina é muito mais eficaz em pacientes com mutações TGA do que naqueles com mutações TAA e TAG (Kimura et al., 2004), o que explica resultados controversos no mesmo estudo (Politano et al., 2003; Malik et al., 2010). Também nos camundongos mdx existe diferença quanto ao local de mutação e quanto à sensibilidade à gentamicina. Nos camundongos com mutação UAA a ação da GT é menos eficiente, enquanto que naqueles com mutação UGA há maior eficácia da droga (Bidou et al., 2004; Wilton, 2007). Não sabemos o local da mutação dos animais utilizados em nosso estudo, porém, devido aos resultados, há possibilidade de que a mutação seja aquela cuja sensibilidade à gentamicina é menor.

2. Sobre a regeneração muscular:

Um achado interessante em nosso estudo foi o aumento significativo da percentagem de fibras musculares com núcleo central no músculo sóleo de camundongos *mdx* tratados com gentamicina (15 dias = $52,85 \pm 3,43$; 3 meses = $68,28 \pm 0,86$; 3 meses com lesão + tratamento = $83,14 \pm 1,81$) quando comparados aos grupos não tratados de idades equivalentes (15 dias = $46,39 \pm 6,29$; 3 meses = $50,01 \pm 0,59$; 3 meses com lesão = $71,76 \pm 2,46$).

Após lesão da fibra muscular, independente da causa, ocorre rápido influxo de cálcio com ativação das proteases cálcio-dependentes e desenvolvimento de necrose

(Berchtold et al., 2000; Whitehead et al., 2006). A isto se segue o processo regenerativo, ao final do qual a fibra muscular perde suas características originais. Nas fibras regeneradas os núcleos, que originalmente se localizavam na periferia da fibra, passam a se localizar no centro da mesma, uma característica histológica da fibra muscular regenerada (Pastoret & Sebillé, 1995).

Em nosso estudo, o aumento da percentagem de fibras musculares com núcleo central pode ser decorrente de 2 situações: primeiro devido a um processo de intensa degeneração e consequente regeneração - em resposta a eventual mionecrose provocada pela GT- ou segundo, devido a um estímulo à regeneração causado pela GT. Com a finalidade de melhor entender qual dos processos teria levado ao aumento da quantidade de fibras com núcleo central, realizamos 2 procedimentos.

Inicialmente avaliamos a densidade de fibras com núcleo central e observamos que estava significativamente maior nos músculos de todos os grupos de camundongos que foram tratados com GT. De fato, verificamos que a densidade de fibras regeneradas era respectivamente 29%, 28,4% e 29,5% maior nos músculos dos animais tratados com GT de 15 dias, 3 meses e 3 meses com associação de lesão quando comparada aos músculos dos animais dos grupos não tratados.

Em seguida quantificamos o nível plasmático da enzima CK, o qual vem sendo utilizado, inclusive nos experimentos com *mdx*, como um marcador da degeneração muscular; quanto maior o nível dessa enzima, maior o dano muscular (Bulfield et al., 1984; Engel et al., 1994; Nadarajah et al., 2011). Nossos resultados mostraram diminuição significativa nos níveis de CK dos animais dos grupos *mdx* tratados com GT (15 dias = 27%; 3 meses = 11%; 3 meses com associação de lesão = 35%) quando comparados aos dos camundongos *mdx* não tratados.

Assim, o resultado conjunto desses dois procedimentos sugere que o aumento das fibras musculares com núcleo central deve ser consequente a um estímulo à regeneração muscular gerado pela GT e não em decorrência de degeneração muscular.

Nossos resultados ainda estão de acordo com aqueles relacionados à força muscular dos animais, pois sabe-se que trabalhos anteriores revelaram estabilização ou aumento da força muscular nos camundongos *mdx* tratados com GT (Barton-Davis et al., 1999; DeLucca et al., 2008).

Recentemente foi descrito que o tratamento com streptomicina, um antibiótico aminoglicosídeo da família da GT, melhora os aspectos histopatologia dos músculos da pata de camundongos *mdx* idosos, reduzindo fibrose e promovendo regeneração muscular (Jorgensen et al., 2011). Dessa forma, nossos resultados à respeito de que a GT pode estimular a regeneração muscular não são inéditos.

O exato mecanismo através do qual a GT atuaria no estímulo à regeneração muscular não é objetivo deste estudo, entretanto podemos imaginar que isto possa ocorrer através do bloqueio dos canais de cálcio, uma ação dos antibióticos aminoglicosídeos sobre as musculaturas esquelética e cardíaca (Jorgensen et al., Matsumura et al., 2011). A entrada de cálcio através desses canais está aumentada nos músculos dos animais distróficos e contribui para a ativação de diferentes vias degenerativas e, consequentemente, para danos musculares e mionecrose (Robert et al., 2001; Heydemann & McNally, 2004; Whitehead et al., 2006). Sabe-se que junto ao aumento do influxo de cálcio no músculo distrófico, ocorre elevação nos níveis de TNF- α , citocina pró-inflamatória que também contribui para a mionecrose (Whitehead et al., 2006). É possível que a GT, ao bloquear o influxo exacerbado de cálcio, tenha regulado os níveis de TNF- α (Grounds et al., 2008; Dutta et al., 2012) e consequentemente do interferon-gamma (IFN- γ), citocina que também encontra-se aumentada no *mdx* (Collins

& Grounds., 2001; Whitehead et al., 2006). Foi demonstrado que a diminuição ou remoção do IFN- γ estimula a ativação de macrófagos do tipo M2, responsáveis pelo reparo do músculo distrófico e de extrema importância para a regeneração muscular (Villalta et al., 2011). Dessa forma, pode-se sugerir que a GT, ao bloquear os canais de cálcio, tenha influenciado nos níveis dessas citocinas, contribuindo para uma melhor regeneração muscular.

Outra possibilidade para explicar o aumento da regeneração muscular é através da elevação dos níveis das metaloproteinases (MMPs) por parte da GT. Sabe-se que as MMP-9 (gelatinase A) e MMP-2 (gelatinase B) constituem as principais metaloproteinases envolvidas no reparo do tecido muscular (Van Gieson e Skalak, 2001; Carmeli, E. et al., 2006). A MMP-9 está associada com a migração de células inflamatórias e possivelmente com a ativação de células satélite, enquanto que a MMP-2 é constitutiva do tecido muscular e está aumentada durante o processo de regeneração muscular (Kherif, et al., 1999). Setz e colaboradores (2011) demonstraram aumento dos níveis de MMP-2 e MMP-9 no órgão de Corti após exposição à GT. No presente estudo, sugerimos que a melhor regeneração muscular dos animais dos grupos tratados com GT também possa ter sido devido à estimulação das MMPs pela droga no tecido muscular.

6. CONCLUSÕES

- 1) A expressão da distrofina não foi restaurada pelo tratamento da GT.
- 2) A GT atuou positivamente na regeneração de músculos distróficos tanto no curso normal da doença, quanto após indução de lesão muscular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMTHOR, H., EGELHOF, T., MCKINNELL, I., LADD, M.E., JANSSEN, I., WEBER, J., SINN, H., SCHRENK, H-H., FORSTING, M., VOIT, T., STRAUB, V. Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by by MRI. **Neuromuscul Dosrod.** v.14, p.791-796, 2004.

ANDERSON, J.L., HEAD, S.I., RAE, C., MORLEY, J.W. **Brain function in Duchenne Muscular Dystrophy.** Brain, vol.125, p 4-13, 2002.

ANDERSON, J.E., BRESSLER, B.H., OYALLE, W.K. Functional regeneration in the hindlimb skeletal muscle of the *mdx* mouse. **J Muscle Res Cell Motil.** v.9, (6), p.499-515, 1988.

BARTON-DAVIS E.R., CORDIER L., SHOTURMA D.I., LELAND S.E., SWEENEY H.L. 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. **J. Clin. Invest.** 104:375–381 doi: 10.1172/JCI7866

BEDWELL, D.M., KAENJAK, A., BENOS, D.J., BEBOK, Z., BUBIEN, J.K., HONG, J. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. **Nat Med** 3: 1280-1284, 1997.

BIDOU, L., HATIN, I., PEREZ, N., ALLAMAND, V., PANTHIER, J.J. AND ROUSSET, J.P. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. **Gene Ther** 11: 619_627, 2004.

BIGGAR, D.W. Duchenne Muscular Dystrophy. **Pedriatr Rev** 401:83-88, 2006.

BOGDANOVICH, S., PERKINS, K.J., KRAG, T.O.B., KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy: current approaches and future direction. **J Mol Med.** v.82 (2), p.102-115, 2004.

BULFIELD, G.; SILLER W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, KJ. X chromossome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:1189 – 1192, 1984.

BLAKE, D.J., WEIR, A., NEWAY, S.E., DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Phisiol Rev.** v.82 (1), p.291-329, 2002.

BRIGUET A, COURDIER-FRUH I, FOSTER M, MEIER T, MAGYAR JP. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular Disorders.** 14:675-682, 2004.

BROWN, R.H., DPHIL JR, M.D. Dystrophyn-associates proteins and the muscular dystrophies. **Annu Rev Med.** v.48, p.457-466, 1997.

BUSHBY, K., FINKEL, R., BIRNKRANT, D.J., CASE, L.E., CLEMENS, P.R., CRIPE, L. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **Lancet Neurol** 9: 77-93, 2010.

CAMPBELL, K.P. AND KAHL, S.D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. **Nature.** V.338, p. 259-262, 1989.

CARMELI, E., MOAS M., REZNICK, A.Z., COLEMAN R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, 29(2): p. 191-7, 2006.

CARNWATH, J. W., SHOTTON, D. M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. **Journal of the Neurological Sciences**, 80: 39-54, 1987.

CHARGÉ, S. B. P., RUDNICKI, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Rev** 84: 209–238, 2004.

COLLINS, C.A., MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **Int J Exper Pathol**. v.84, p.165-172, 2003.

COLLINS, R. A., GROUNDS, M. D. The role of tumor necrosis factor (TNF- α) in skeletal muscle regeneration: Studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-)/LT- α (-/-) mice. **J Histochem Cytochem**, 49: 975-989, 2001.

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

DEBOSSCHER, K. Selective Glucocorticoid Receptor modulators. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 120:96-104, 2010

DELUCA, A., NICO, B., ROLLAND, J., COZZOLI, A., BURDI, R., MANGIERI, D., GIANUZZI, V., LIANTONIO, A., CIPPONE, V., BELLIS, M., NICCHIA, G. P., CAMERINO, G. M., FRIGERI, A., SVELTO, M., CAMERINO, D. C. Gentamicin treatment in exercised mice: Identification of dystrophin-sensitive pathways and evaluation of efficacy in work-loaded dystrophic muscle. **Neurobiol of Disease**. v.32, p.243-253, 2008

DISATNIK, M.H., DHAWAN, J., YU, Y., BEAL, M.F., WHIRL, M.M., FRANCO, A.A., RANDO, T.A. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of pre-necrotic state. **J Neurol Sci**. 161:77-84, 1998.

DUNANT, P., WALTER, M. C., KARPATI, G., LOCHMULLER, H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. **Muscle Nerve**. 27:624-627, 2003.

DUTTA, S., BANDYOPADYAY, D., DUTTA, K., BASU, A., BISHAYI, B. Gentamicin in combination with ascorbic regulates the severity of Staphylococcus aureus infection-induced septic arthritis in mice. **Basic Immunology**, 2012.

ENGEL, A.G., YAMAMOTO, M., FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. v.2 , p. 1130-1187, 1994.

ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D., GAVER, M.G. AND CAMPBELL, K.P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**. p. 315-319, 1990

ESCOLAR, D.M., HACHE, L.P., CLEMENS, P.R., CNAAN, A., MCDONALD, C.M., VISWANATHAN, V., KORNBURG, A.J., BERTORINI, T.E., NEVO, Y., LOTZE, T., PESTRONK, A., RYAN, M.M., MOASTERIO, E., DAY, J.W., ZIMMERMAN, A., ARRIETA, A., HENRICSON, E., MAYHEW, J., FLORENCE, J., HU, F., CONNOLY, A.M. Randomizes, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, 77:444-52, 2011.

FALL, A.M., JOHNSEN, R., HONEYMAN, K., IVERSEN, P., FLETCHER, S., WILTON, S. Induction os revertant fibres in the mdx mouse using antisense oligonucleotides. **Genetic Vaccines and Therapy**. Vol 12, pg 1-12, 2006.

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

GROUND, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**. v. 15, p. 381-391, 2005.

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

GUMERSON, J. D., MICHELE, D. E. The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. **J Biomed Biotechnol.** vol. 2011, Article ID 210797, 2011.

HAMER, P.W., MCGEACHIE, J.M., DAVIES, M.J., GROUNDS, M.D. Evans blue dye an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **J Anat.** V.200, p.69-79, 2002.

HEYDEMANN, A., MCNALLY, E. M. Regenerating more than muscle in muscular dystrophy. **Journal of the American Heart Association**, 110: 3290-3292, 2004.

HOFFMAN, E.P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends Pharmacol.** Vol.22, p.465-470, 2001.

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

HOWARD ,M. T., ANDERSON, C. B., FASS, U., KHATRIS, S., GESTELAND, R. F., ATKINS, J. F., FLANIGAN, K. M. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. **Ann Neurol**, 55: 422–426, 2004.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., ERVASTI, J.M., LEVEILLE, C.J., SLAUGHTER, C.C., SERNETT, S.W., CAMPBELL, K.P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**, 355:696-702, 1992.

JORGENSEN, L.H., BLAIN, A., GREALLY, E., LAVAL, S.H., BLAMIRE, A.M., DAVISON, B.J., BRINKMEIER, H., MACGOWAN, G.A., SCHRODER, H.D., BUSHBY, K., STRAUB, V., LOCHMULLER., H. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle. **The American Journal of Pathology**, vol. 178, 2011.

KAPSA, R.; KORNBERG, A.J.; BYRNE, E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Lancet Neurol.** v2, p. 229-310, 2003.

KHERIF S, LAFUMA C, DEHAUPAS M, LACHKAR S, FOURNIER JG, VERDIERE-SAHUQUE M, FARDEAU M, ALAMEDDINE HS. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Dev. Biol.** 205(1): p. 158-70, 1999.

KIMURA, S.; ITO,K.; MIYAGI, T.; HIRANUMA, T.; YOSHIOKA, K.; OZASA, S.; MATSUKURA, M.; IKEZAWA, M.; MATSUO, M.; TAKESHIMA, Y.; MIIKE, T. A novel approach to identify Duchenne muscular dystrophy patients for aminoglycoside antibiotics therapy. **Brain & Development.** v.27, p.400-405, 2005.

LEFAUCHER J.P.; PASTORET C.; SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat. Rec.** 242: 70 –76, 1995.

LUND, E.S.; ELIASSEN, P.; WANDALL, E.P.; HANSEN, E.E; LOMHOLDT, J.D.; FRIIS, H.M. Aminoglycoside treatment I. Administration of gentamicin once versus three times daily. **Ugeskr Laeger.**, v. 160, n.1, p.45-9, 1997.

LUZ, M. A. M. **Estudo *in vivo* da capacidade regenerativa de fibras musculares de Camundongos mdx.** 2000. 63f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MALIK, V., LOUISE, R., KLAPAC, R., VIOLLET, L., MENDELL, J. R. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders.** 3(6) 379-389, 2010.

MANZUE, A.Y., KUNTZER, T., PIKE, M., SWAN, A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Syst Rev.** (1), 2008.

MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Braz J Morphol Sci.** v. 21 (3), p.145-152, 2004.

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, 2007.

MATSUMURA, C.Y.; TANIGUTI, A.P.T.; PERTILLE, A.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, C1344-C1350, 2011.

MCNEIL, P.L.; STEINHARDT, R.A. Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity. **J Cell Biol**. v.137(1), p. 1-4, 1997.

MOENS, P., BAATSEN, P.H.W., MARECHAL, G. Increased susceptibility on EDL muscles from mdx miceto damage induced by contractions with strech. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, V.14, p. 446-451, 1993.

MULLER, J.; VAYSSIERE, N.; ROYUELA, M.; LEGER, M.E.; MULLER, A.; BACOU, F.; PONS, F.; HUGON, G.; MORNET, D. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**. v. 22, p. 133-139, 2001.

NADARAJAH, V. D., PUTTEN, V., CHAOUCH, A., GARROOD, P., STRAUB, V., LOCHMULLER, H., GINJAAR, H. B., AARTSMA-RUS, A. M., VAN OMMEN, G. J. B., DEN DUNNEN, J. T., HOEN, P. A. C. Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-a) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). **Neuromuscular Disorders**, 21: 569-578, 2011.

PAYNE, E. T., YASUDA, N., BOURGEOIS, J. M., DEVRIES, M. C., RODRIGUEZ, M. C., YOUSUF, J., TARNOPOLSKY, M. A. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in mdx mice. **Muscle Nerve**, 33(1): 66-77, 2006.

PASTORET, C., SEBILLE, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the Neurological Sciences**. V.129, p.97-105, 1995a.

PASTORET, C., SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. **Mucle Nerve**. 18:1147-1154, 1995b.

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.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Mol Cell Biochem**. v.179, n.1-2, p.111-123, 1998.

PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. **Am J PhysMed Rehabil**. v.81, p.S162-S174, 2002.

PICHAVANT, C., AARTSMA-RUS, A., CLEMENS, P. R., DAVIES, K. E., DICKSON, G., TAKEFA, S., WILTON, S. D., WOLFF, J. A., WOODDELL, C. I., XIAO, X., TREMBLAY, J. P. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. **Mol Ther** 19(5):830–840, 2011.

POLITANO L, NIGRO G, NIGRO V, PILUSO G, PAPPARELLA S, PACIELLO O, COMI LI. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. **Acta Myol** 22(1):15–21, 2003.

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.

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

RADLEY, H., GROUNDS, M.D. Cromolyn administration(to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in *mdx* mice. **Neurobiol Dis**. v.23, p.387-397, 2006.

ROBERT, V., MASSIMINO, M L., TOSSELO, V., MARSAULT, R., CANTINI, M., SORRENTINO, V. Alterations in calcium handling at the subsarcolemal level in *mdx* myotubes. **J Biol Chem.** v.276, p.4647-4651, 2001.

SASAKA, T., IMAMURA, M., ARAISHI, K., NOGUCHI, S., MIZUNO, Y., TAKAGOSHI, N., HAMA, H., WAKABAYASHI-TAKAI, E., YPSHIMOTO-MATSUDA, Y., NONAKA, I., KANEKO, K., YOSHIDA, M., OZAWA, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice. **Neuromuscul Disord.** v.13, p.193-206, 2003.

SEIXAS, S.L., CÂNDIDO, J.L., SARINO, W., QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo *mdx* na fisiologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arquivos de Neuro-psiquiatria.** 55(3-B): 610-617, 1997.

SERRANO C, WALL C, MOORE SA, KING W, BARRESI R, CAMPBELL KP, NOTICEWALA P, BROWN RH, NAGARJA HN, MENDELL JR. Gentamicin treatment for muscular dystrophy patients with stop codon mutations. *Neurology* 2001;56(Suppl):A79.

SETZ, C., BRAND, Y., RADOJEVIC, V., HANUSEK, C., MULLEN, P. J., LEVANO, S., LISTYO, A., BODMER, D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in the cochlea: expression and activity after aminoglycoside exposition. **Neuroscience.** 181: 28-39, 2011.

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

TANIGUTI, A. P., PERTILLE, A., MATSUMURA, C. Y., SANTO NETO, H., MARQUES, M. J. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in *mdx* mice by suramin, a TGF- β 1 blocker. **Muscle Nerve,** 43(1): 82-87, 2011.

TINSLEY, J.M., BLAKE, D.J., RICHARD, A.Z., DAVIS, K.E. Increase complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.97, p.8307-8313, 1997.

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

VAN GIESON E.J. & SKALAK T.C. Chronic vasodilatation induces matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression during vascular remodeling in rat skeletal muscle. *Microcirculation* 8:25-31, 2001.

VILLALTA, S. A., DENG, B., RINALDI, C., WEHLING-HENRICKS, M., TDBALL, J. G. IFN- γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. **Journal of Immunology**, 187: 5419-5428, 2011.

VILQUIN, J.T., BRUSSEE, V., ASSELIN, I., KINOSHITA, I., CINGRAS, M., TREMBLAY, J.P. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. **Muscle & Nerve**, v. 21, p. 567-576, 1998.

WAGNER, K.R., HAMED, S., HADLEY, D.W., GROPMAN, A.L., BURSTEIN, A.H., ESCOLAR, D.M., HOFFMAN, E.P. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Due to Nonsense Mutations. **Ann Neurol**. v.49, p.706-711, 2001.

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.

WILTON, S.D., FLETCHER, S. Novel compounds for the treatment of Duchenne muscular dystrophy: emerging therapeutic agents. **The Application of Clinical Genetics**. Vol. 4, p. 29-44, 2011.

YOKOTA, T., LU, Q., MORGAN J. E. Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. **J Cell Sci**, 119:2679-87, 2006.

Anexo 1: Declaração de autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal,
Instituto de Biologia – UNICAMP.



CEUA/Unicamp

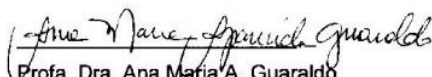
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

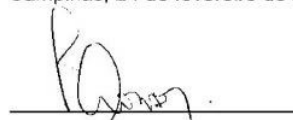
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Recuperação da distrofia em fibras musculares de camundongos mdx: emprego simultâneo de lesão muscular e tratamento com gentamicina" (protocolo nº 2614-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Humberto Santo Neto / Paula Spanopoulos Perez, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de fevereiro de 2012.

Campinas, 24 de fevereiro de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/oeaa/>