

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



CANDIDA LUIZA TONIZZA DE CARVALHO MELO

MECANISMOS DE PROTEÇÃO A MIONECROSE NOS
MÚSCULOS EXTRA-OCULARES DE CAMUNDONGOS
DISTRÓFICOS *MDX*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Candida Luiza T. Carvalho
Melo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M491m

Melo, Candida Luiza Tonizza de Carvalho
Mecanismos e proteção a mionecrose nos músculos
extra-oculares de camundongos distróficos *mdx* / Candida
Luiza Tonizza de Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Camundongo *mdx*. 2. Músculos extra-oculares. 3.
Necrose. 4. Distrofia muscular de Duchenne. I.
Marques, Maria Júlia, 1961-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Mechanisms of protection against myonecrosis in extraocular muscles of the *mdx* mice.

Palavras-chave em inglês: *Mdx* mice; Extraocular muscles; Necrosis; Duchenne muscular dystrophy.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Júlia Marques, Rosana Macher Teodori, Selma Maria Michelin Matheus, Jose Ângelo Camilli, José Meciano Filho.

Data da defesa: 17/11/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 17 de novembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

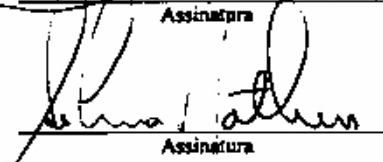
Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori


Assinatura

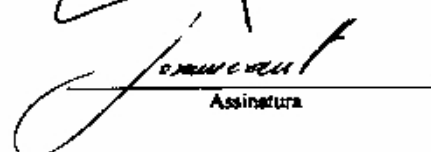
Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus


Assinatura

Prof. Dr. José Angelo Camilli


Assinatura

Prof. Dr. José Meciano Filho


Assinatura

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

Assinatura

Profa. Dra. Ivanira José Bechara

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

DEDICATÓRIA

À Deus, por minha vida, por minha família e pela energia positiva que me motiva a cumprir as obrigações com responsabilidade, vontade e dedicação.

Aos meus pais, Antônio e Luíza, meu porto seguro, pela força, educação, carinho, amizade, e confiança.

Ao meu irmão, Nélcio, exemplo de pesquisador, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao meu marido, Ricardo, pela paciência, ajuda, companheirismo e amor.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos, exemplos de persistência e dedicação, conselhos, pelo convívio e pela oportunidade de tê-la como orientadora.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto**, pela visão que têm das atividades de pesquisa científica, por todas as sugestões para com este experimento.

Ao **Prof. Dr. José Meciano Filho**, pela amizade, pelo exemplo de profissionalismo, amor à profissão, ajuda constante, incentivo e generosidade com que transmite seus conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Kleber Gomes Franchine**, pela disponibilidade de seu laboratório para a aprendizagem e realização dos experimentos de immunoblotting.

Ao **Sr. Antonio R. Calixto**, técnico do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (FCM) pela prestatividade, paciência e pela ajuda na aprendizagem experimental (técnica de immunoblotting) do presente trabalho.

Ao **Prof. Dr. Paulo Pinto Joaseiro**, pelas considerações no exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira**, pelas considerações no exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Ivanira José Bechara**, pelas considerações e constante ajuda desde o exame de qualificação de mestrado, pré-banca de mestrado, exame de qualificação do doutorado e pré-banca deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Ângelo Camilli**, pelo convívio, importantes considerações e orientações no exame de pré-banca.

Ao **Prof. Dra. Rosana Macher Teodori**, pela prestatividade, atenção e importantes considerações no exame de pré-banca deste trabalho.

À **Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus**, pela ajuda e cordialidade concedida ao aceitar fazer parte da banca de doutorado.

Aos **Docentes do departamento de anatomia**, por toda ajuda durante esses oito anos de pós-graduação.

Aos funcionários e amigos **Marcos Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino**, pessoas de extrema confiança e responsabilidade, que foram de fundamental importância para a realização do processo experimental deste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima**, pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Aos funcionários **Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos e Toni Donizete dos Santos**, pela cordialidade e ajuda no laboratório de anatomia.

À **Sras. Ana Floriano Rodrigues**, pela cordialidade e pelos vários favores prestados.

À **Sra. Lílian Alves Senne Panagio**, secretária da pós-graduação, pelos vários favores prestados.

Aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular: **Adriana**, pela ajuda constante na técnica de immunoblotting, **Cíntia, Tereza, Renato, Rafael e Ana Paula**, pelo apoio e auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural**, por tudo que me proporcionou.

A todos os **pós-graduandos** do Departamento de Anatomia pelo convívio e amizade.

À **CAPES e FAPESP**, pelo indispensável e oportuno auxílio concedido através de bolsas e financiamento do projeto.

A todos aqueles que, de alguma maneira, apoiaram-me e auxiliaram-me, tornando possível a concretização desta Dissertação.

A todos, muitíssimo obrigada

*"É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas a graça das graças é não desistir nunca",
(Autor desconhecido)*

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne é caracterizada pela falta de distrofina, proteína estrutural do sarcolema que promove a sua estabilização. Em ausência de distrofina, ocorre aumento da permeabilidade ao cálcio e conseqüente mionecrose. No camundongo distrófico *mdx*, os músculos extra-oculares (EOM) não apresentam mionecrose, sendo protegidos da falta de distrofina. Este fato os torna importantes para a maior compreensão dos mecanismos da patogênese da distrofia muscular. No presente trabalho verificamos se alterações nos níveis das proteínas calsequestrina e SERCA1, reguladoras do cálcio, e β -dystroglicana (β -DG), pertencente ao complexo distrofina-glicoproteínas, podem se relacionar a proteção contra a mionecrose dos EOM de animais distróficos. Utilizamos as técnicas de immunoblotting e imunofluorescência e observamos que os EOM de animais distróficos apresentaram aumento significativo no conteúdo das proteínas calsequestrina e SERCA1, bem como aumento significativo da β -dystroglicana. Músculos distróficos não protegidos (tibial, gastrocnêmio, sóleo, esternomastóide e diafragma) apresentaram diminuição no conteúdo destas proteínas em relação aos controles. Não foram observadas alterações na localização da utrofina, decorrente da falta da distrofina. Sugerimos que o aumento da β -DG nos EOM de animais distróficos possa auxiliar na integridade do sarcolema e, conseqüentemente, na proteção das fibras musculares. Já o aumento das proteínas ligadas ao Ca^{2+} nos EOM *mdx* poderia ajudar na rápida remoção do excesso de cálcio, resultando na manutenção da sua homeostase e proteção à mionecrose. Os resultados obtidos nos demais músculos distróficos confirmam que distúrbios no tamponamento do cálcio podem estar envolvidos na distrofia muscular.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy is one of the most common hereditary diseases. Abnormal calcium ion handling renders dystrophic muscle fibers more susceptible to necrosis. In the *mdx* mice, extraocular muscles (EOM) are protected and do not undergo myonecrosis. We investigated whether this protection is related to an increased expression of calcium-binding proteins, which may protect against the elevated calcium levels seen in dystrophic fibers. The expression of SERCA1 and calsequestrin was examined in EOM and in non-spared limb, diaphragm and sternomastoid muscles of control and *mdx* mice using immunofluorescence and immunoblotting. Dystrophic EOM presented a significant increase in the proteins studied, and a significant increase in β -dystroglycan expression. These proteins were reduced in the non-spared *mdx* muscles. There were no changes in utrophin distribution. The increase of Ca^{2+} -handling proteins in dystrophic EOM may permit a better maintenance of calcium homeostasis, with the consequent absence of myonecrosis. The results further support the concept that abnormal Ca^{2+} -handling is involved in dystrophinopathies.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AchRs = receptor de acetilcolina

α -DG = α -dystroglicana

Ca^{++} = íon cálcio

$[\text{Ca}^{++}]_{\text{rs}}$ = concentração citosólica de íons cálcio

$[\text{Ca}^{++}]_{\text{i}}$ = concentração intracelular de íons cálcio

CDG = complexo distrofina-glicoproteína

CSQ = calsequestrina

CTRL = controle

C-terminal = carbono terminal

DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

DHP = receptor diidropiridina

DIA = diafragma

DMD = distrofia muscular de Duchenne

EOM = músculos extra-oculares

EOM^- = músculos extra-oculares protegidos (retos e oblíquos)

EOM^+ = músculos extra – oculares protegidos e afetados

GAS = gastrocnêmio

JNM = junção neuromuscular

Mdx = *X chromosome-linked muscular dystrophy*

PBS = tampão fosfato salina

PMCA = Ca^{++} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático

RE = reto

RyR = receptores rianodina

SERCA1 = Ca^{++} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático

SOL = sóleo

STN = esternomastóideo

TA = tibial anterior

TBS = tampão tris salina

UTR = utrofina

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Símbolos	xi
Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
2. Objetivos	7
3. Revisão da Literatura	9
3.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	10
3.2 O Camundongo <i>mdx</i>	11
3.3 Complexo Distrofina-Glicoproteínas	13
3.4 Músculos Extraoculares	17
3.5 Cálcio	19
3.6 Serca1 e Calsequestrina	20
4. Materiais e Métodos	23
4.1 Animais	24
4.2 Técnica de Imunofluorescência e Microscopia de Luz	24
4.2.1 Grupos Experimentais	24
4.2.1.1 Grupo Músculos Extra-oculares	24

4.2.1.2 Grupo tibial anterior e demais músculos	24
4.2.2 Imunofluorescência das proteínas calsequestrina, SERCA1, distrofina, utrofina e β distroglicana	25
4.2.3 Análise Histológica	26
4.2.3.1. Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina	26
4.2.3.2 Contagem de fibras normais e regeneradas e análise das áreas das fibras musculares	26
4.4 Técnica de Immunobloting	27
4.4.1 Grupos Experimentais	27
4.4.1.1 - Grupo Músculos Extra-oculares Total (EOM+)	27
4.4.1.2 – Grupo Músculos Extra-oculares Protegidos (EOM-)	27
4.4.1.3 – Grupo tibial anterior e demais músculos	28
4.4.2 Preparação de Extrato Total	28
4.4.3 Eletroforese	29
4.4.4 Análise dos Dados	30
4.4.5 Anticorpos	30
4.4.5.1 – Anticorpos Primários	30
4.4.5.2 – Anticorpos Secundários	30
5. Resultados	31
5.1 Características Histológicas	32

5.2 Imunofluorescência das proteínas ligadas ao cálcio: calsequestrina e SERCA1	35
5.3 Imunofluorescência das proteínas do sarcolema: distrofina, utrofina e β -dystroglicana	39
5.4 Immunoblotting	42
6. Considerações Finais	48
6.1 Intensidade da miopatia nos diferentes músculos esqueléticos	49
6.2 Proteínas reguladoras do Ca^{++}	50
6.2.1 SERCA 1 e Calsequestrina nos EOM e demais músculos	50
6.3 Complexo Distrofina-Glicoproteínas: quantificação da utrofina e β -dystroglicana	53
7. Conclusão	56
8. Referências Bibliográficas	58
9. Anexo	72
Artigo Publicado	73
Artigo Submetido	82

1. INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são miopatias primárias progressivas geneticamente determinadas. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é considerada a mais comum e devastadora das distrofias musculares. É uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que acomete um a cada 3500 homens nascidos vivos (ENGEL *et al.*, 1994). Entre 2 e 5 anos de idade começa a fraqueza muscular progressiva, levando a morte prematura em torno de 20 anos por falência cardíaca ou respiratória (ALDERTON & STEINHARDT, 2000).

Os camundongos distróficos da linhagem *mdx* (X-linked muscular dystrophy; BULFIELD *et al.*, 1984; GROUNDS *et al.*, 2008) possuem, tal como humanos portadores de distrofia muscular progressiva, altos níveis séricos de piruvato kinase e creatina kinase, bem como ausência de distrofina, proteína estrutural do sarcolema, que desempenha papel importante na manutenção de sua estabilidade (HOFFMAN *et al.*, 1987; BONILLA *et al.*, 1988).

A distrofina faz parte de um complexo de proteínas e glicoproteínas que estabiliza e previne a formação de falhas no sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, mantendo assim a integridade da fibra muscular (ENGEL *et al.*, 1994; GRANOLINI & JASMIN, 1998; HACK *et al.*, 2000). Porém sua ausência modifica a expressão de várias outras proteínas deste complexo (DURBEEJ *et al.*, 2000; HACK *et al.*, 2000; GALBIATI *et al.*, 2001; RANDO *et al.*, 2001). A deficiência da distrofina resulta na alteração da permeabilidade da membrana, facilitando a entrada de grandes quantidades de Ca^{++} nas fibras musculares, levando-as à degeneração (TURNER *et al.*, 1993; ALDERTON & STEINHARDT, 2000).

O influxo excessivo de cálcio na fibra muscular, bem como distúrbios na sinalização do cálcio intracelular estão provavelmente envolvidos na distrofia muscular (BERCHTOLD *et al.*, 2000; TIDBALL e SPENCER 2000; WHITEHEAD *et al.*, 2006). As principais vias de entrada de Ca^{++} para o sarcoplasma é o receptor dihidropiridina (DHPR) tipo L, localizado na membrana dos túbulos transversos (Figura 1). O potencial de ação gerado pelos DHPRs ativa os receptores rianodina (RyR) que liberam Ca^{++} do retículo sarcoplasmático (RS) para o citosol. O aumento do $[\text{Ca}^{++}]_i$ leva a ativação de proteínas e conseqüentemente contração da fibra. O relaxamento ocorre em decorrência da diminuição do $[\text{Ca}^{++}]_i$ que poderá ser levado para fora da fibra muscular pela bombas Ca^{++} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) ou retornar para dentro do RS pela bomba Ca^{++} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (ROSSI e DIRKSEN, 2006). O Ca^{++} bombeado pela SERCA para o lúmen do retículo sarcoplasmático será seqüestrado pela calsequestrina (CSQ), principal proteína de tamponamento e estocagem de Ca^{++} desta organela. Além disso, a CSQ parece regular a liberação do Ca^{++} para fora do RS através dos receptores rianodina, permitindo níveis normais de cálcio no citosol (Figura 1) (MacLENNAN *et al.*, 2000b; BEARD *et al.*, 2002).

A $[\text{Ca}^{++}]_i$ elevada ativa proteases como a calpaína, que ativa os canais de Ca^{++} do tipo *leak* (ALDERTON e STEINHARDT, 2000). A ativação de canais *leak* leva a um influxo contínuo de Ca^{++} (FONG *et al.*, 1990; TURNER *et al.*, 1991; TURNER *et al.*, 1993), com conseqüente aumento na $[\text{Ca}^{++}]_i$ e ativação de diferentes vias degenerativas, que levam a mionecrose (TIDBALL e SPENCER, 2000).

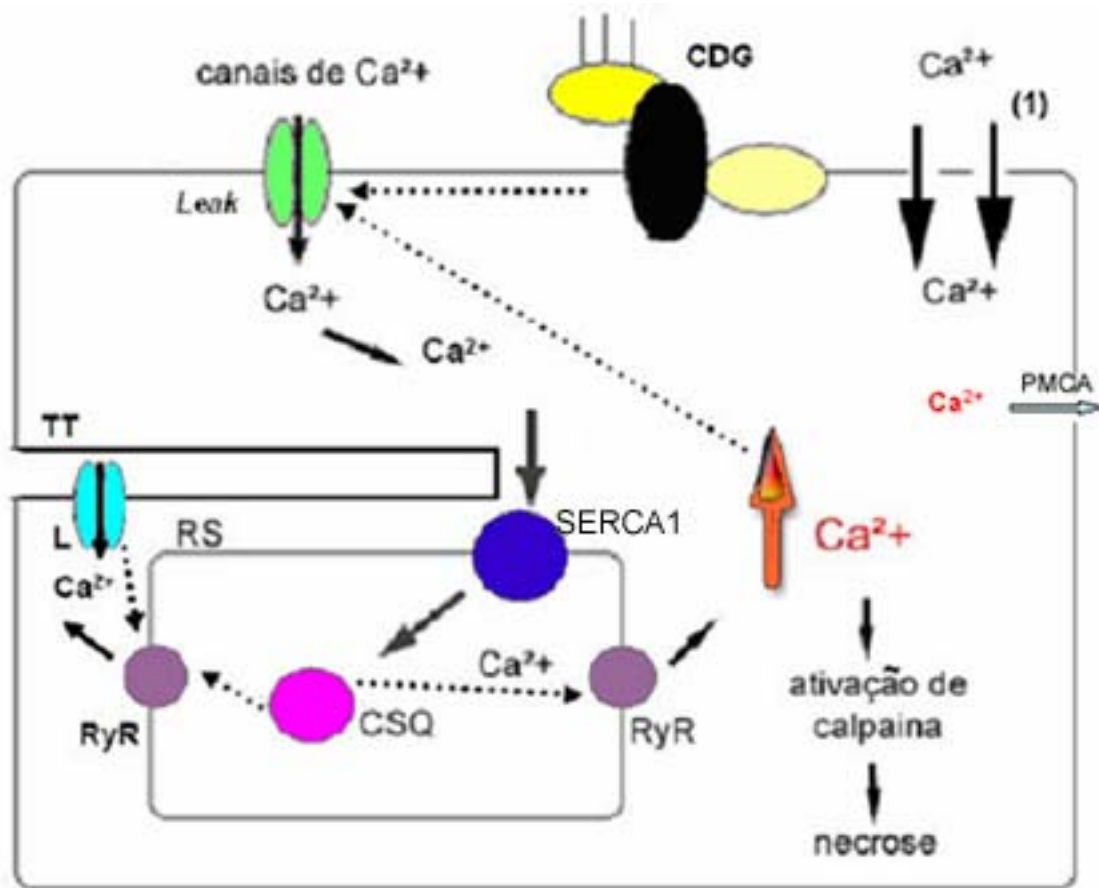


Figura 1. Diagrama esquemático da regulação de íons intracelular (Ca^{++}) em uma fibra muscular esquelética distrofica. As **setas contínuas** indicam a movimentação de cálcio intracelular; as **setas pontilhadas** indicam vias de regulação do Ca^{++} . Em resposta à despolarização do sarcolema, os canais de cálcio tipo-L (L), localizados nos túbulos (TT) permitem a entrada de cálcio na fibra muscular e ativam os receptores rianodina (RyR) do retículo sarcoplasmático (RS), levando a um aumento $[\text{Ca}^{++}]_i$ e conseqüentemente contração muscular. O relaxamento ocorre em decorrência da diminuição da $[\text{Ca}^{++}]_i$ pelo bombeamento de Ca^{++} para fora da fibra muscular e para o RS vias bombas Ca^{++} ATPase da membrana plasmática (PMCA) e Ca^{++} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 1). O cálcio bombeado para o retículo sarcoplasmático liga-se a calsequestrina (CSQ), que parece regular a liberação do Ca^{++} para fora do RS através dos RyR. A deficiência primária da distrofina desencadeia uma redução sarcolemal das proteínas associadas a distrofina (DGC), resultando na alteração da permeabilidade da membrana, facilitando a entrada de grande quantidade de Ca^{++} nas fibras musculares, levando-as à degeneração. Os ciclos de contração e relaxamento aumentam as micro-rupturas transitórias da membrana plasmática (1), permitindo o influxo de cálcio para o meio intracelular. O aumento $[\text{Ca}^{++}]_i$ ativa proteases como a **calpaína**, que ativa os canais de Ca^{++} do tipo *leak* e leva a um influxo contínuo de Ca^{++} , com conseqüente aumento da $[\text{Ca}^{++}]_i$ e ativação de diferentes vias degenerativas, que levam a mionecrose. A ausência de distrofina no Complexo Distrofia-Glicoproteínas (CDG) pode levar a função anormal de canais do sarcolema.

Estudos realizados em músculos estriados esqueléticos de camundongos *mdx* revelaram baixos níveis de calsequestrina (NIEBROJ-DOBOSZ *et al.*, 1989; DORAN *et al.*, 2004, 2006). Porém, alguns estudos não observaram diferença entre animais controle e *mdx* (CULLIGAN *et al.*, 2002), sendo observada redução de uma isoforma da calsequestrina de alto peso molecular - “calsequestrin-like” - cuja função permanece obscura (DOWLING *et al.*, 2003; DOWLING *et al.*, 2004). Por outro lado, a expressão do receptor dihidropiridina (DHPR), receptor rianodina (RyR) e SERCA1 no *mdx* foi considerada semelhante a de animais normais (CULLIGAN *et al.*, 2002; DORAN *et al.*, 2004; DIVET *et al.*, 2005). Em contradição, estudos mais recentes indicam altos níveis de SERCA1 nos músculos dos dedos da pata do camundongo distrófico (DOWLING *et al.*, 2003).

Segundo Berchtold *et al.*, 2000, nos músculos distróficos, as proteínas do retículo sarcoplasmático que regulam o cálcio parecem estar alteradas, levando a eventos intracelulares que culminam na mionecrose. Embora nas últimas décadas havia maior interesse nos distúrbios do $[Ca^{++}]_c$, o cálcio do retículo sarcoplasmático ($[Ca^{++}]_{rs}$) também parece participar do processo de degeneração muscular (CULLIGAN *et al.*, 2002).

Os músculos extra-oculares (EOM) dos camundongos *mdx* são protegidos da mionecrose (PORTER *et al.*, 1998, 2000, 2006). Enquanto a maioria dos grupos musculares esqueléticos são afetados pela ausência da distrofina, os extra-oculares permanecem não afetados durante o curso da doença. Uma das possibilidades para explicar a proteção contra a mionecrose dos EOMs distróficos pode estar diretamente relacionada a propriedades específicas desses músculos (ANDRADE *et al.*, 2000), como o pequeno diâmetro da fibra, (KARPATI *et al.*, 1988; PORTER *et al.*, 1998), a origem embriológica (PORTER *et al.*,

1996, 1998), tipo da fibra muscular, padrão de inervação e organização da junção neuromuscular (KHANNA *et al.*, 2002), preservação da beta-distroglicana (β -DG) (DOWLING *et al.*, 2003) e aumento da utrofina (UTR) (KHURANA *et al.*, 1995) que apresenta estrutura e função homóloga a distrofina. Como a utrofina e a distrofina apresentam as mesmas proteínas associadas (distroglicanas, sarcoglicanas e sintrofina), sugeriu-se que a utrofina poderia compensar a deficiência da distrofina (LOVE *et al.*, 1989; GRADY *et al.*, 1997). Estudos realizados em camundongos mutantes para distrofina e utrofina revelaram agravamento do quadro da distrofia muscular, quando comparados aos camundongos distróficos *mdx* (GRADY *et al.*, 1997), sugerindo que a utrofina pode compensar parcialmente a ausência da distrofina (LOVE *et al.*, 1989; GRADY *et al.*, 1997).

Outra possibilidade para se explicar a proteção é devido a habilidade intrínseca desses músculos em manter a homeostase do Ca^{2+} (KHURANA *et al.*, 1995). Contudo, ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais os músculos extra-oculares mantêm a homeostase do cálcio.

Estabelecemos a hipótese de que o aumento na captura do Ca^{++} no retículo sarcoplasmático, pela proteína calsequestrina, e no transporte do Ca^{++} livre no citosol para o interior do retículo sarcoplasmático, através da Ca^{++} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1), poderia ajudar na rápida remoção do excesso de cálcio, levando a redução da mionecrose observada nos músculos extra-oculares do camundongo distrófico *mdx*.

2. OBJETIVOS

Verificar se as proteínas reguladoras do cálcio, calsequestrina e SERCA1, estão aumentadas nos músculos extra-oculares dos camundongos *mdx* e, conseqüentemente, protegendo-os da mionecrose. Para tal foi realizado uma análise quantitativa dessas moléculas.

Analisar qualitativamente a expressão da utrofina e se há aumento da β -dystroglicana nos músculos extra-oculares, favorecendo a integridade do sarcolema e, conseqüentemente, a proteção a mionecrose.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) foi primeiramente descrita por Edward Meryon em 1852 e posteriormente pelo neurologista francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne, em 1868 (DORLAND`S, 1974). É considerada a mais comum e devastadora das distrofias musculares. Ocorrendo em cerca de 1 a cada 3500 homens nascidos vivos. Sendo aproximadamente dois terços dos quais são filhos de mães portadoras, e o restante tendo sofrido nova mutação no óvulo da mãe ou da avó da criança (ENGEL *et al.*, 1994 ; ROBBINS, 1989).

O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito somente no quarto ou quinto ano de vida, quando os pais percebem que a criança apresenta um atraso no desenvolvimento motor, dificuldade em correr e subir escadas, freqüentes quedas e aumento do volume muscular ou pseudo-hipertrofia das panturrilhas. Entre 5 e 6 anos há aumento de volume também nos músculos glúteos, vasto laterais, deltóides e infra-espinhais, sendo a fraqueza muscular mais proximal que distal. Entre 6 e 11 anos a fraqueza muscular progride resultando em intensa fraqueza de outros grupos musculares juntamente com significativa contratura. Aos 12 anos, freqüentemente a criança não consegue mais andar. Nas fases terminais restam apenas movimentos dos dedos, da língua e dos músculos da respiração. Em torno da 2º ou 3º década de vida, o paciente vai a óbito por broncopneumonia e/ou falência cardíaca (ENGEL *et al.*, 1994).

A anormalidade genética na DMD está presente na banda 1 da região 2 do braço curto do cromossomo X (banda Xp21). Este gene é atualmente o maior já descoberto, medindo aproximadamente 2.4 megabases (Mb) de DNA, ou seja, cerca de 1% do total do

cromossomo X. O gene apresenta 2,5 milhões de pares de bases e 79 exons, codificando a proteína denominada distrofina. Devido ao grande tamanho e complexidade do gene, é bastante elevada a taxa de mutação, deleções ou duplicações, as quais resultam na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e/ou codificação anormal da proteína (TINSLEY *et al.*, 1994).

A patogênese da DMD está relacionada com anormalidade da membrana da fibra muscular (CARPENTER e KARPATI, 1979; SCHOTLAND *et al.*, 1977), a qual permite a saída de enzimas intracelulares e o ingresso de cálcio (OBERC e ENGEL, 1977; BODENSTEINER e ENGEL, 1978). O acúmulo de cálcio é fator importante na evolução da degeneração muscular (ROBBINS, 1989), desempenhando papel central na gênese da mionecrose (GAILLY, 2002; MARIOL e SÉGALAT, 2001). O aumento elevado na concentração de cálcio em biópsias de músculos de pacientes com DMD tem sido extensamente reportado (BODENSTEINER e ENGEL, 1978; MAUNDER *et al.*, 1980; JACKSON *et al.*, 1985). Ao exame patológico observa-se padrão difuso caracterizado pela degeneração. As fibras necróticas são fagocitadas por macrófagos e, à medida que são destruídas, são substituídas por tecido fibroadiposo e conjuntivo (ROBBINS, 1989; BOCKHOLD *et al.*, 1998).

3.2 O camundongo *mdx*

A caracterização do gene defeituoso da DMD permitiu a identificação desta alteração em várias espécies animais: cão, gato, camundongo (GASGHENER *et al.*, 1992; MATSUMURA e CAMPBELL, 1994; VALENTINE *et al.*, 1986). Nos cães, a doença

parece ser mais severa, com início e evolução mais rápida que em humanos (PASTERNAK *et al.*, 1995). Em camundongos e gatos a fibrose do tecido muscular é mais moderada e o processo de regeneração maior. Contudo, o gato, apesar de apresentar processo de fibrose mais brando, desenvolve hipertrofia muscular exagerada com evolução geralmente fatal (GASGHENER *et al.*, 1992; ENGEL *et al.*, 1994).

O camundongo *mdx* é um dos modelos mais utilizados para o estudo da DMD (ENGEL *et al.*, 1994). O mutante *mdx* foi inicialmente identificado na colônia do camundongo C57BL10/ScSn, apresentando níveis elevados das enzimas musculares piruvato kinase e creatina kinase (BULFIELD *et al.*, 1984). Estudos genéticos demonstram que o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995; SICINSKI *et al.*, 1989) e os camundongos desta linhagem apresentam deficiência na produção da distrofina, reproduzindo, assim, as características das fibras musculares dos pacientes portadores de DMD (BULFIELD *et al.*, 1984; SICINSKI *et al.*, 1989). As principais alterações histológicas evidentes no tecido muscular, observadas a partir do 18º dia pós-natal, são necrose e intenso infiltrado inflamatório (QUIRICO-SANTOS *et al.*, 1995; SEIXAS *et al.*, 1994). Em torno da terceira semana observa-se abrupto aumento da mionecrose, seguido de rápida regeneração após a quinta semana pós-natal. Entre 35 e 90 dias, mais de 50% das fibras do músculo estão em regeneração, com diâmetro variável e núcleos centrais. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE *et al.*, 1986).

Entretanto, há algumas diferenças entre a patologia dos camundongos *mdx* e da DMD, pois machos e fêmeas são afetados (TORRES e DUCHEN, 1987) e, embora o camundongo *mdx* apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere

da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo, na maioria dos tecidos musculares esqueléticos. No entanto, o diafragma do camundongo *mdx* apresenta degeneração e fibrose semelhantes aos músculos extensores de pacientes com DMD (BOLAND *et al.*, 1995). Além disso, camundongos *mdx* idosos, com 65 - 104 semanas de vida também apresentam deposição de tecido adiposo e diminuição da sobrevida (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995). Quanto ao envolvimento do músculo cardíaco no camundongo *mdx*, alguns autores encontraram necrose no miocárdio do *mdx* (QUINLAN *et al.*, 2004; SPURNEY *et al.*, 2008)

Apesar de apresentarem algumas características diferentes em relação à distrofia muscular humana, em termos de severidade e persistência da miopatia, o *mdx* é de fácil manutenção, disponibilidade e baixo custo financeiro, sendo o modelo experimental da DMD mais empregado para se estudar a biologia dos músculos esqueléticos distróficos e dos mecanismos das distrofinopatias (STRAUB *et al.*, 1997; YOSHIDA *et al.*, 2006).

3.3 Complexo Distrofina-Glicoproteínas

A distrofina é uma proteína de massa molecular relativa de 427 kilodaltons (kDa), presente na superfície citoplasmática do sarcolema, fazendo parte do citoesqueleto subsarcolema, que conecta os miofilamentos a um complexo de glicoproteínas da membrana celular. Estudos bioquímicos relatam sua ausência em músculos distróficos (ENGEL *et al.*, 1994; BONILLA *et al.*, 1988), embora em alguns casos pode ser detectada pequena concentração em pacientes com DMD (PATEL *et al.*, 1988, OHLENDIECK *et al.*, 1991). A expressão da distrofina muscular é regulada de acordo com as etapas do

desenvolvimento. Nos músculos fetais, a distrofina é detectada depois da nona semana de gestação, aumentando progressivamente sua expressão na junção neuromuscular e miotendinosa, na superfície das membranas plasmáticas, túbulos transversos da fibra muscular cardíaca e junto a diversas junções celulares (ENGEL *et al.*, 1994).

A molécula da distrofina consiste de uma longa cadeia de 120nm de comprimento, formada por uma tripla hélice de 1700 aminoácidos (McCOMAS, 1996), codificados por 79 exons, que são comandados pela atuação de diversos promotores presentes em alguns tipos celulares, como as células musculares, as células gliais, as células de Purkinje e as células de Schwann. O promotor muscular para distrofina é bastante ativo nos músculos esqueléticos, cardíacos e lisos (ENGEL *et al.*, 1994).

A proteína utrofina, de massa molecular relativa de 395 kDa, destaca-se por apresentar estrutura e função homóloga a distrofina. A utrofina contém quatro domínios semelhantes ao da distrofina (BLAKE *et al.*, 1996; PEARCE *et al.*, 1993; TINSLEY *et al.*, 1992): o amino terminal, domínio central, domínio rico em cisteína e um domínio C-terminal (KOENIG *et al.*, 1988), e as mesmas proteínas associadas (dystroglicanas, sarcoglicanas e sintrofina). Diferente da distrofina, a utrofina é encontrada em muitos tecidos (LOVE *et al.*, 1991). Em músculos normais é encontrada na junção neuromuscular (NGUYEN *et al.*, 1991; TAKEMITSU *et al.*, 1993) e miotendinosa (KHURANA *et al.*, 1992), na parede de capilares e outros vasos sanguíneos, no perineuro e células de Schwann de nervos intramusculares (KARPATI *et al.*, 1993). Durante a ontogênese (LIN e BURGUNDER, 2000) e regeneração (LIN *et al.*, 1998), é encontrada no sarcolema. Estudos realizados em camundongos mutantes para distrofina e utrofina revelaram agravamento do quadro da distrofia muscular, quando comparados aos camundongos distróficos *mdx*

(GRADY *et al.*, 1997), sugerindo que a utrofina pode compensar parcialmente a ausência da distrofina (LOVE *et al.*, 1989; GRADY *et al.*, 1997).

O complexo distrofina-glicoproteínas – CDG (Fig. 2), expresso em alta concentração no músculo estriado esquelético, conecta o citoesqueleto da fibra muscular (actina) à matriz extracelular e é constituído por proteínas sarcolemas (CAMPBELL & KAHL, 1989; ERVASTI & CAMPBELL, 1991). A distrofina é considerada um dos componentes centrais do CDG, sendo que sua ausência modifica a expressão de várias outras, supondo a interdependência da distrofina com este complexo (GILLIS, 1999; DURBEEJ *et al.*, 2000; HACK *et al.*, 2000; GALBIATI *et al.*, 2001). Algumas proteínas são consideradas componentes integrais porque estão fortemente associadas com este complexo; a maioria está associada com a distrofina ou com as distroglicanas. As proteínas incluídas no complexo são: distrofina, α -distroglicana, β -distroglicana, α -sarcoglicana, β -sarcoglicana, γ -sarcoglicana, δ -sarcoglicana, α -distrobrevina, $\alpha 1$ e $\beta 1$ sintrofina, sarcospan; um componente de ligação extracelular: laminina 2; um componente de ligação intracelular: actina F, sincoilin e filamento 2; e moléculas sinalizadoras associadas com o complexo: calmodulina, Grb2 e nNOS (RANDO, 2001). A distrofina liga-se a actina F (HOFFMAN *et al.*, 1987; RYBAKOVA *et al.*, 1996; RYBAKOVA & ERVASTI, 1997), formando uma ligação mecânica entre o sarcolema e a miofibrila (RYBAKOVA *et al.*, 2000), α -distroglicana encontra-se ligada ao domínio G da laminina 2 (JUNG *et al.*, 1995; RANDO, 2001), enquanto a β -distroglicana está ligada ao complexo de sarcoglicanas e ao domínio C-terminal da distrofina (JUNG *et al.*, 1995; SUNADA & CAMPBELL, 1995; NIGRO *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1996); as sintrofinas, proteínas intracelulares que ligam-

se ao terminal C da distrofina (YANG *et al.*, 1995). Sugere-se que a distrofina, unida às proteínas integrantes, estabiliza e previne a formação de falhas no sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, mantendo assim a integridade da fibra muscular (ENGEL *et al.*, 1994; GRANOLINI & JASMIN, 1998).

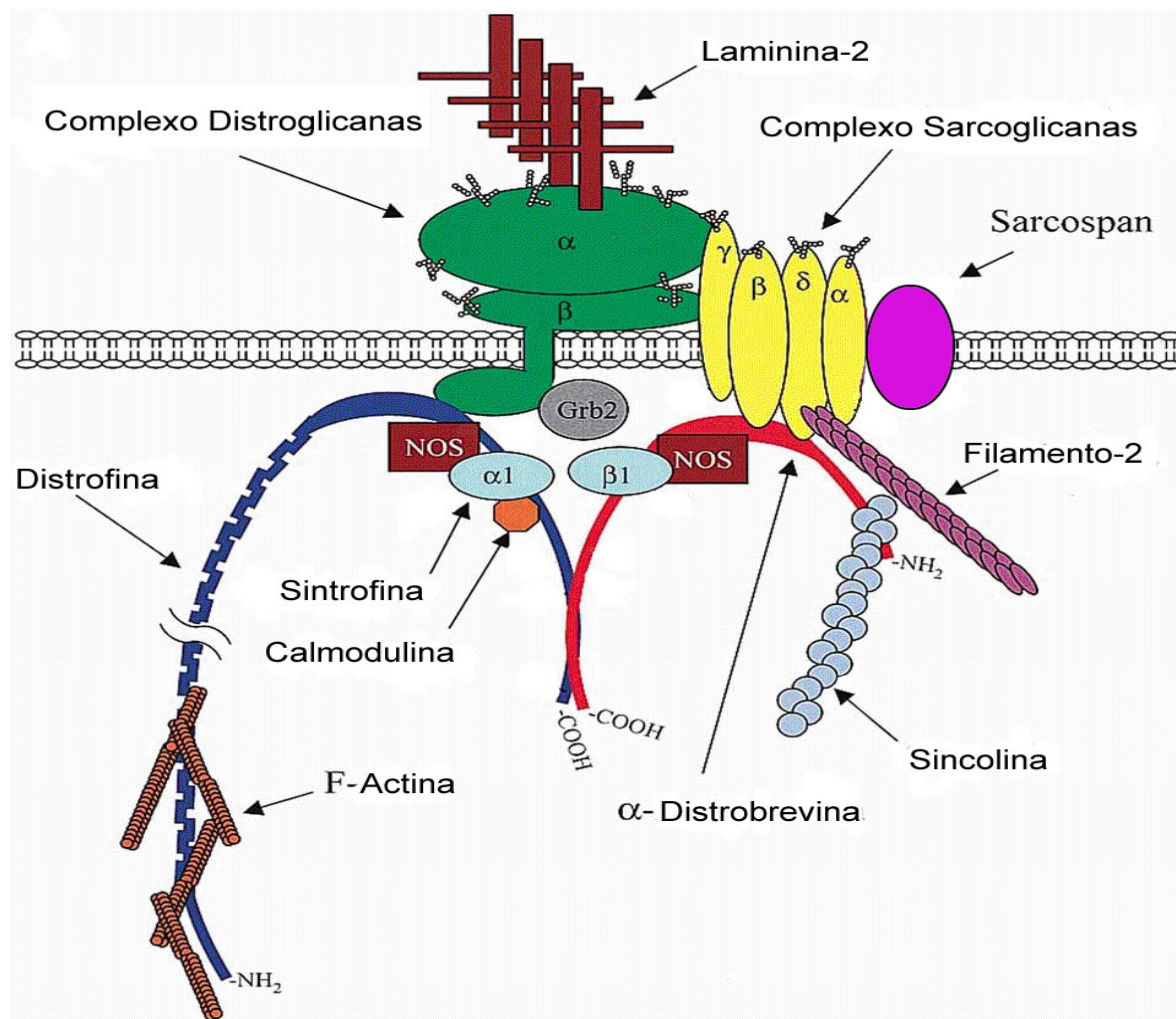


Figura 2. Complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema extrajuncional representando os componentes integrais do complexo (distrofina, complexo distroglicanas, complexo sarcoglicanas, α -distrobrevina, as sintrofina e sarcospan), um ligante extracelular (laminina-2), componentes de ligação intracelular (F-actina, sincolina, filamento 2) e moléculas sinalizadoras associadas com o complexo (calmodulina, Grb2, nNOS). As distroglicanas e sarcoglicanas são mostradas sendo glicolizadas. Adaptado de Rando TA, *Muscle & Nerve*, 24, p.1575-1594, 2001.

3.4 Músculos extraoculares do camundongo *mdx*

Os músculos extra-oculares (EOM) são responsáveis pelo controle dos movimentos dos olhos. Compreendem os músculos retos (superior, inferior, medial e lateral), os músculos oblíquos (superior e inferior), o músculo levantador da pálpebra e o músculo retrator do bulbo.

Os músculos extra-oculares dos camundongos *mdx* não apresentam sinais de mionecrose, acúmulo de tecido conectivo ou núcleo central (característico em fibras regeneradas), sendo protegidos dos efeitos da falta de distrofina. Entretanto, os músculos extra-oculares acessórios (levantador da pálpebra e retrator do bulbo) são parcialmente afetados pela distrofia, sofrendo o processo de degeneração-regeneração muscular, fato constatado pela presença do núcleo central (KHURANA *et al.*, 1995; PORTER e BAKER, 1996; ANDRADE *et al.*, 2000; MARQUES *et al.*, 2007).

Os EOM exibem diferenças fundamentais em relação aos demais músculos esqueléticos no que se refere à inervação, estrutura da junção neuromuscular, propriedades mecânicas, classificação das fibras musculares (PORTER *et al.*, 1995; BRON *et al.*, 1997), tempo de contração-relaxamento rápido (PORTER *et al.*, 1998; 2000), maior resistência à fadiga (KJELLGREN *et al.*, 2003), adição contínua de mionúcleos (WIRTSCHAFTER *et al.*, 2004) e origem embriológica (PORTER *et al.*, 1996, 1998).

Os EOM apresentam organização laminar em duas camadas, sendo uma fina e externa denominada orbital (adjacente aos ossos que constituem a órbita) e outra espessa e interna denominada global (adjacente ao nervo óptico). As camadas apresentam diferenças no tamanho de fibras musculares, nas características eletromiográficas, na vascularização e

atividade metabólica (PORTER *et al.*, 1995; BRUECKNER *et al.*, 1996). Segundo Porter (1995), a classificação dos tipos de fibras do EOM se baseia na localização (orbital ou global), cor (vermelho, intermediário ou branco) e padrão de inervação (mono-inervada e poli-inervada). Os músculos acessórios diferem dos músculos retos e oblíquos, por não apresentarem organização em camadas (orbital e global) e também pela ausência de fibras musculares com múltipla inervação (MATHEUS e SOARES, 1999).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir os mecanismos que fazem os EOM protegidos da ausência da distrofia. Acreditava-se que o aumento da utrofina seria uma provável explicação para sua proteção (LOVE *et al.*, 1989). Porém, foi verificado aumento da utrofina somente em três dos seis tipos de fibras encontradas no EOM, sendo improvável que tal aumento fosse o responsável pelo mecanismo de proteção (PORTER *et al.*, 2003). Resultados têm sugerido que a atividade da peroxidase dismutase é consideravelmente maior nos EOM que em outros músculos esqueléticos, tornando-os mais eficientes na remoção dos radicais livres (PORTER *et al.*, 1995), porém a remoção de radicais livres não cura a doença (KAMINSKI *et al.*, 2002). O aumento da proteína β -dystroglicana (DOWLING *et al.*, 2003) parece também estar envolvido na proteção dos músculos extra-oculares. Experimentos “*in vitro*” mostraram que os EOM são mais resistentes a necrose causada pelo aumento do cálcio através da utilização de drogas, sugerindo que esses músculos são protegidos da DMD devido à habilidade intrínseca destes em manter a homeostase do Ca^{++} (KHURANA *et al.*, 1995). Contudo, os mecanismos pelos quais os EOM mantêm a homeostase ainda não são esclarecidos.

A importância em se determinar os mecanismos que fazem os EOM protegidos da distrofia permitirá o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as distrofinopatias.

3.5 Cálcio

No músculo estriado esquelético, a contração muscular inicia-se quando um potencial de ação gerado no neurônio motor é propagado até os terminais axônicos, resultando na liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. A ACh difunde-se em direção à membrana sarcoplasmática e liga-se ao receptor. O receptor é um canal iônico não seletivo que, quando ativado pela ACh, permite o influxo de Na^+ e efluxo de K^+ levando a despolarização do sarcolema. O potencial de ação propaga-se pelo interior da fibra por um sistema especializado de membranas tubulares chamado de túbulos transversos ou túbulos T, que são contínuos ao sarcolema e invaginam-se transversalmente para o interior da célula. As membranas dos túbulos T e o sarcolema são organizados para conduzir rapidamente o potencial de ação por toda a fibra muscular. Juntamente com as membranas do retículo sarcoplasmático (RS), o túbulo T forma uma junção especializada denominada tríade, que estabelece a comunicação entre o sarcolema (túbulo T) e a cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (RS) (SPERELAKIS, 1998).

Na tríade, os receptores diidropiridina (DHPRs) detectam a despolarização da membrana e, através de uma mudança conformacional de seus domínios intramembrana, eles ativam (abrem) os canais de Ca^{++} do RS (HUANG & PEACHEY, 1989; HAMILTON *et al.*, 2000; FILL & COPELLO, 2002) denominados receptores de rianodina (RyR). O

retículo sarcoplasmático é uma organela altamente especializada no controle de Ca^{++} citosólico. Além de liberação de Ca^{++} para o citoplasma, o RS possui funções adicionais: recaptção de Ca^{++} para iniciar o relaxamento muscular e seu armazenamento.

Após a liberação de Ca^{++} no citosol, estes íons difundem-se e ligam-se a troponina ativando o aparato contrátil actina-miosina, iniciando a contração (BERCHTOLD *et al.*, 2000). Quando a fibra muscular está relaxada, o Ca^{++} em excesso no citosol é normalmente transportado para o interior do RS através da SERCA, sendo seqüestrado pela calsequestrina (CSQ), proteína do RS importante para a regulação do Ca^{++} (MacLENNAN, 2000a), ou o Ca^{++} será transportado para fora da célula pela Ca^{++} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) (RUEGG *et al.*, 2002).

3.6 Serca 1 e Calsequestrina

As mudanças nos níveis de Ca^{++} nos músculos distróficos levam ao distúrbio na homeostase do Ca^{++} intracelular, influenciando suas ligações e diminuindo a captura deste íon pelo RS. Alguns autores têm sugerido que o aumento nos níveis de cálcio nas fibras musculares afeta diretamente a habilidade do transporte e retenção do mesmo pelo retículo sarcoplasmático (LAMB e CELLINI, 1999).

Experimentos “*in vitro*” demonstraram que as células musculares do camundongo *mdx* apresentaram alteração no mecanismo de captura do cálcio, diminuição na sua taxa de acúmulo no RS e aumento de sua saída do retículo sarcoplasmático (DIVET *et al.*, 2002). Adicionalmente, sugerem que há correlação entre alteração da concentração do Ca^{++} livre no citoplasma e a diminuição da habilidade das células *mdx* removerem o Ca^{++} , pela bomba

Ca^{++} -ATPase , levando a uma alteração no relaxamento do músculo (NICOLAS-METRAL *et al.*, 2001).

O citosol de uma fibra muscular normal em repouso contém $[\text{Ca}^{++}]$ em torno de 0,1 μM , pela função da bomba Ca^{++} -ATPase (SERCA) presente na membrana longitudinal do RS (VIRES,1998). No músculo distrófico, a SERCA 1 encontra-se funcionalmente alterada apresentando uma velocidade de transporte de cálcio diminuída (KARGACIN *et al.*, 1996). Entretanto, há controvérsias, pois alguns autores não observaram diminuição na concentração da SERCA1 no músculo *mdx* (DORAN *et al.*, 2004, CULLIGAN *et al.*, 2002) e outros encontraram um aumento na concentração e na atividade da SERCA 1 apenas nos músculos dos dedos da pata do *mdx* (DOWLING, *et al.*, 2003). Possivelmente, esse aumento está envolvido na rápida remoção do excesso do Ca^{++} citosólico, reduzindo a mionecrose também observados nas fibras musculares dos dedos da pata do camundongo *mdx*.

A calsequestrina é a principal proteína que liga ao Ca^{++} no interior do RS, neutralizando o efeito potencialmente negativo do Ca^{++} sobre a função do retículo sarcoplasmático (MITCHELL *et al.*, 1988). Está localizada dentro da cisterna terminal do RS, seqüestrando o Ca^{++} bombeado pela SERCA 1 para o lúmen do RS. Sugere-se que a CSQ tem papel central na homeostase do Ca^{++} (MacLENNAN, 2000a), regulando a liberação do Ca^{++} para fora do retículo sarcoplasmático através do receptor rianodina (RyR), permitindo assim níveis normais de cálcio no citosol (OHKURA *et al.*, 1998; MacLENNAN, 2000b; BEARD *et al.*, 2002).

Uma vez que a calsequestrina parece desempenhar papel importante na regulação do ciclo do Ca^{++} através do retículo sarcoplasmático, sendo um mediador essencial durante a contração e relaxamento muscular, acredita-se que a diminuição na função de elementos da cisterna terminal resulta em um maior dano ao tecido (DOWLING *et al.*, 2003).

Desta forma, é provável que a alteração das proteínas reguladoras do Ca^{++} , SERCA 1 e calsequestrina, estejam envolvidas na distrofia muscular (DORAN *et al.*, 2004), contribuindo na gênese da necrose das fibras musculares (CULLIGAN *et al.*, 2002; BERCHTOLD *et al.*, 2000).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos (60 dias), da linhagem *mdx* (n=14) de ambos os sexos. Os camundongos da linhagem C57BL/10 (n=14) foram utilizados como controle, os quais são heterozigotos para o gene que desencadeia a distrofia muscular e deram origem à linhagem *mdx* (BULFIELD *et al.*, 1984). Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, em caixas plásticas padrão, com condições ambientais adequadas (12 horas de ciclo claro/escuro), com ração e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal da Universidade Estadual de Campinas, sob o protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa-IB-UNICAMP) nº: 1175-1.

4.2 Técnica de Imunofluorescência e Microscopia de Luz

4.2.1 Grupos Experimentais

4.2.1.1 - Grupo Músculos Extra-oculares

Este grupo é constituído por camundongos *mdx* (n = 5) e C57BL/10 (n = 5) que tiveram os músculos reto superior, reto inferior, reto medial, reto lateral, oblíquo superior, oblíquo inferior, retrator do bulbo e levantador da pálpebra estudados.

4.2.1.2 – Grupo tibial anterior e demais músculos

Constituído por camundongos *mdx* (n = 5) e C57BL/10 (n = 5) em que o músculo tibial anterior (TA), gastrocnêmio (GAS), sóleo (SOL), esternomastóideo (STN) e

diafragma (DIA) foram analisados. Estes músculos apresentam grande comprometimento muscular decorrente da falta da distrofina.

4.2.2 Imunofluorescência das proteínas calsequestrina, SERCA1, distrofina, utrofina e β -dystroglicana.

Após os animais serem anestesiados com hidrato de cloral 10% intra-peritoneal (1mL/10g de peso do animal) e perfundidos com 20ml de PBS e 20ml de paraformaldeído 2%, os músculos EOM (em conjunto com a órbita), TA, SOL, STN, DIA e GAS foram retirados e colocados em suportes de madeira com uma mistura de “Gum Tragacanth” (Sigma-G1128) e “TBS Tissue Freezing Medium” (Triangle Biomedical Sciences), congelados em isopentano resfriado à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C . Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em *Biofreezer* à -80°C . Para obtenção dos cortes, os músculos foram levados para o criostato (Microm-HS505E) a -24°C onde permaneceram por 1 hora antes de serem processados. Cortes transversais de $8\mu\text{m}$ foram coletados em lâminas. A seguir, foram incubados com Triton X-100 (0,3%) por 10 minutos. Após esse período, o material ficou em solução bloqueadora composta de glicina 1%, BSA 3%, leite desnatado 2%, soro fetal bovino 8%, triton X-100-0,6%, durante 3 horas. Após esse período, os músculos foram incubados com anticorpo primário anti-calsequestrina, anti-SERCA1, anti-distrofina, anti-utrofina e anti- β -dystroglicana (Affinity BioReagents; 1:100, Novocastra Laboratories; 1:100, Novocastra Laboratories; 1:100, Affinity BioReagents; 1:100 e Novocastra Laboratories; 1:100, respectivamente), durante 12 horas. No dia seguinte, foram lavados e

incubados com anticorpo secundário (anti-mouse-IgG-FITC; Sigma; 1:100, em solução bloqueadora) durante 1 hora. Após lavagens, as lâminas foram montadas com lamínula em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma) e posteriormente observadas com a utilização do microscópio confocal e óptico de fluorescência Nikon.

4.2.3 Análise Histológica

A obtenção de cortes para análise da presença de núcleos centrais e área das fibras musculares procedeu da mesma forma que na imunofluorescência, através de cortes congelados de 8µm em criostato (Microm-HS505E) a -24°C.

4.2.3.1. Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina:

Os cortes foram hidratados e corados em solução de hematoxilina por 15 min. Em seguida foram lavados em água corrente para retirar o excesso do corante. Sequencialmente, corou-se com eosina por 10 min. Novamente os cortes foram lavados em água corrente, seguindo-se a desidratação e montagem.

4.2.3.2 Contagem de fibras normais e regeneradas e análise das áreas das fibras musculares

A contagem do número de fibras normais e de fibras regeneradas (indicada pela presença de núcleos centrais) foi realizada selecionando aleatoriamente três cortes em cada lâmina dos músculos empregados no experimento, corados pelo método da H.E. Utilizou-se um retículo com linhas paralelas horizontais e verticais que dividiam o campo microscópico em 4 regiões distintas, acoplado à ocular de microscópio de luz Nikon, em objetiva de 40x,

com auxílio de um contador manual. Foram contadas todas as fibras do corte para a estimativa da população total de fibras dos músculos, juntamente com a população de fibras regeneradas.

Para análise da área da fibra muscular foi utilizado o microscópio óptico Axioskop Zeiss, locado no Departamento de Anatomia – IB. Cada corte foi focado em objetiva de 40x e a imagem captada por videocâmara e analisada pelo programa Image-Pro (versão 4.0). Foram definidos três campos aleatórios e cada fibra muscular foi contornada com o mouse, o que permitiu obter a área em micrômetros quadrados.

4.4 Técnica de Immunobloting

Foram utilizados camundongos adultos (60 dias) *mdx* (n = 9) and C57Bl/10 (controle; n = 9).

4.4.1 Grupos Experimentais

4.4.1.1 - Grupo Músculos Extra-oculares Total (EOM+)

Este grupo é constituído por camundongos *mdx* e C57BL/10 que tiveram os músculos reto superior, reto inferior, reto medial, reto lateral, oblíquo superior, oblíquo inferior, retrator do bulbo e levantador da pálpebra estudados.

4.4.1.2 – Grupo Músculos Extra-oculares Protegidos (EOM-)

Constituído pelos músculos reto superior, reto inferior, reto medial, reto lateral, oblíquo superior e inferior de camundongos *mdx* e C57BL/10. Os músculos protegidos não apresentam mionecrose decorrente da falta da distrofina.

4.4.1.3 – Grupo tibial anterior e demais músculos

Constituído por camundongos *mdx* e C57BL/10 em que o músculo tibial anterior, gastrocnêmio, sóleo, esternomastóideo e diafragma foram analisados. Estes músculos apresentam grande comprometimento muscular decorrente da falta da distrofina.

4.4.2 Preparação de Extrato Total

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de 0,3 ml de hidrato de cloral a 10%. O plastão esternal foi aberto aproximadamente na linha mediana, o coração exposto e foi realizada uma abertura no átrio direito. A seguir, utilizando-se uma agulha 25x7 montada em seringa de 20 ml perfundiu-se o animal com aproximadamente 40 ml de PBS e os músculos tibial anterior, gastrocnêmio, sóleo, esternomastóideo, diafragma e os extra-oculares (total e protegidos) foram removidos. Em cada animal, uma órbita foi destinada para constituir o grupo EOM⁺, formado por todos os músculos extra-oculares e a outra para constituir o grupo EOM⁻, onde os quatro retos e dois oblíquos foram isolados. Todos os músculos foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente em 2 ml de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BRADFORD *et al.* (1976).

4.4.3 Eletroforese

As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM e aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 30 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 10%, 12% e 8% (para calsequestrina 63 kDa, β -distroglicana 43 kDa e SERCA1 110 kDa, respectivamente) em um aparelho para eletroforese miniaturado da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Para cada proteína analisada foram obtidos 8 géis. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência miniaturado da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10µg de anticorpos primários diluídos em 10mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal.

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

4.4.4 Análise dos Dados

As bandas observadas na técnica de immunoblotting foram escaneadas e “salvas” no computador para posterior quantificação da densitometria ótica, usando um scanner e o programa Image J (The National Institute of Health, EUA).

A avaliação dos dados foi feita através do programa Excel[®], considerando média, desvio padrão e Teste *t- Student*.

4.4.5 Anticorpos

4.4.5.1 – *Anticorpos Primários*

Anticorpo monoclonal para calsequestrina (VIID12 – Affinity BioReagents).

Anticorpo monoclonal SERCA1 ATPase (IIH11 - Affinity BioReagents).

Anticorpo monoclonal para β -dystroglycan (NCL-b-DG, Novocastra).

4.4.5.2 – *Anticorpos Secundários*

Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat Anti-mouse-IgG; Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL).

5. RESULTADOS

5.1 Características Histológicas

Os músculos retos (superior, inferior, medial e lateral) e oblíquos (superior e inferior) distróficos não apresentaram degeneração muscular, acúmulo de tecido conjuntivo ou núcleos centrais característicos da regeneração muscular (0,5% de fibras regeneradas; Tabela 1; Figura 3D) (artigo publicado: Tabela 1; Fig. 1A, p.40). Diferente dos músculos extra-oculares protegidos, o músculo retrator do bulbo apresentou 45% das fibras musculares com núcleo central (Tabela 1, Figura 3C), (artigo publicado: Tabela 1; Fig. 1B, p.40). Os outros músculos distróficos analisados apresentaram quantidade significativamente maior de fibras musculares com núcleos centrais em relação as fibras musculares com núcleo periférico (Tabela 1, Figura 3B, E, F, G, H). Não houve diferença no número total de fibras entre controle e *mdx* e na área da fibra muscular, visto que após o período de degeneração e regeneração muscular as áreas das fibras retornam aos valores originais (LIEBER, 2002), (Tabela 1 e 2), (artigo publicado: Tabela 1).

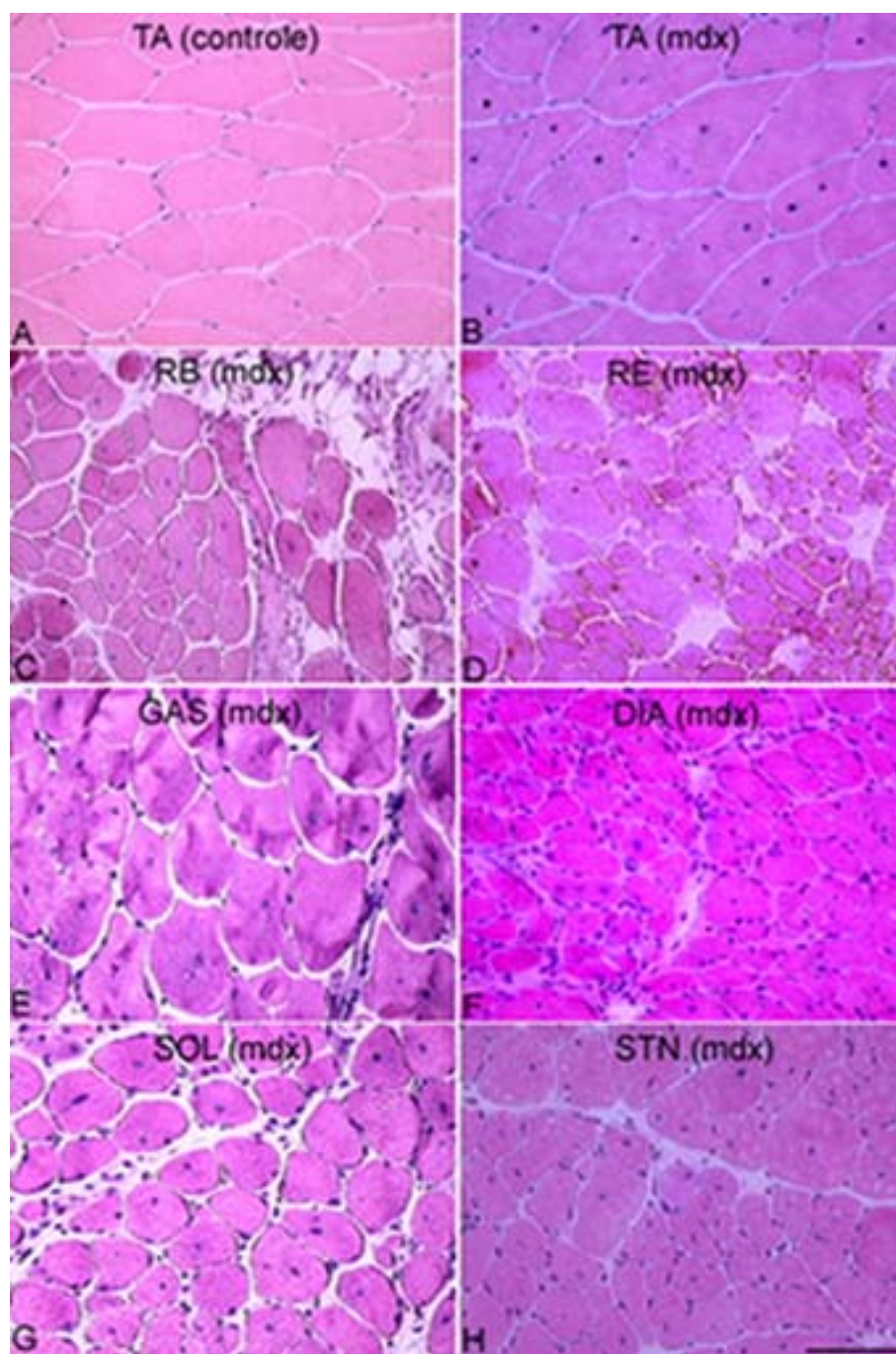


Figura 3. Cortes histológicos de músculos controle e *mdx*. Observar as posições dos núcleos periféricos em (A) músculo tibial anterior controle (TA). Em (B, C, D, E, F, G e H) somente músculos *mdx* com presença de núcleos centrais, exceção do reto (RE) *mdx* (D) predomínio de núcleos periféricos. Escala A, B, E, G: 50 μ m; C, D, F, H: 20 μ m.

Tabela 1. Total de fibras e porcentagens de núcleos centrais e periféricos nos animais controle e *mdx*. * $P \leq 0.05$, diferença significativa do respectivo controle (Teste *t-Student*).

MÚSCULO	ANIMAL	TOTAL DE FIBRAS	% NÚCLEO CENTRAL	% NÚCLEO PERIFÉRICO
Retos/Oblíquos	Controle	569 $\pm$ 98	0,4 $\pm$ 0,1	99,6 $\pm$ 0,1
	<i>Mdx</i>	581 $\pm$ 87	0,5 $\pm$ 0,2	99,5 $\pm$ 0,3
Retrator do bulbo	Controle	375 $\pm$ 96	0,3 $\pm$ 0,1	99,7 $\pm$ 0,1
	<i>Mdx</i>	298 $\pm$ 70	45 $\pm$ 1,5*	55,1 $\pm$ 1,0
Tibial anterior	Controle	1728 $\pm$ 168	1,0 $\pm$ 0,3	99,0 $\pm$ 0,2
	<i>Mdx</i>	1825 $\pm$ 93	51,5 $\pm$ 1,5*	48,5 $\pm$ 1,2
STN	Controle	1094 $\pm$ 46	0,2 $\pm$ 0,1	99,8 $\pm$ 0,2
	<i>Mdx</i>	1211 $\pm$ 97	62 $\pm$ 1,5*	38 $\pm$ 1,0
Diafragma	Controle	2353 $\pm$ 408	0,1 $\pm$ 0,1	99,9 $\pm$ 0,1
	<i>Mdx</i>	1678 $\pm$ 223	60 $\pm$ 1,0*	40 $\pm$ 1,5
Gastrocnêmio	Controle	1562 $\pm$ 65	0,7 $\pm$ 0,3	99,3 $\pm$ 0,2
	<i>Mdx</i>	2158 $\pm$ 491	51,5 $\pm$ 1,0*	48,5 $\pm$ 2,0
Sóleo	Controle	600 $\pm$ 19	0,8 $\pm$ 0,2	99,2 $\pm$ 0,1
	<i>Mdx</i>	558 $\pm$ 60	65 $\pm$ 2,5*	35 $\pm$ 1,5

Tabela 2. Análise da área das fibras musculares em animais controle e *mdx*. Não houve diferença significativa ($P \geq 0.05$).

MÚSCULO	CONTROLE ÁREA (μm^2)	MDX ÁREA (μm^2)
Retos/Oblíquos	527 $\pm$ 310	504 $\pm$ 232
Retrator do bulbo	652 $\pm$ 261	730 $\pm$ 304
Tibial anterior	1.836 $\pm$ 597	2.135 $\pm$ 794
Diafragma	1.106 $\pm$ 601	1.156 $\pm$ 679
Esternomastóide	1.698 $\pm$ 422	1.704 $\pm$ 530
Gastrocnêmio	1.870 $\pm$ 491	1.885 $\pm$ 524
Sóleo	1.560 $\pm$ 431	1.574 $\pm$ 640

5.2 Imunofluorescência das proteínas ligadas ao cálcio: calsequestrina e SERCA1.

A imunomarcacão para a calsequestrina e SERCA1 caracterizou-se por fluorescência em todo sarcoplasma da fibra. Em relação a SERCA1, expressa em músculos de contração rápida, houve diferença na intensidade do sinal de fluorescência entre as fibras de contração rápida e lenta, observado no músculo sóleo (contração lenta) (Figuras 7 G, H). Porém, não foi observada diferença no padrão de localização entre controle e *mdx*, tanto para calsequestrina quanto para SERCA1 (Figuras 4, 5, 6 e 7).

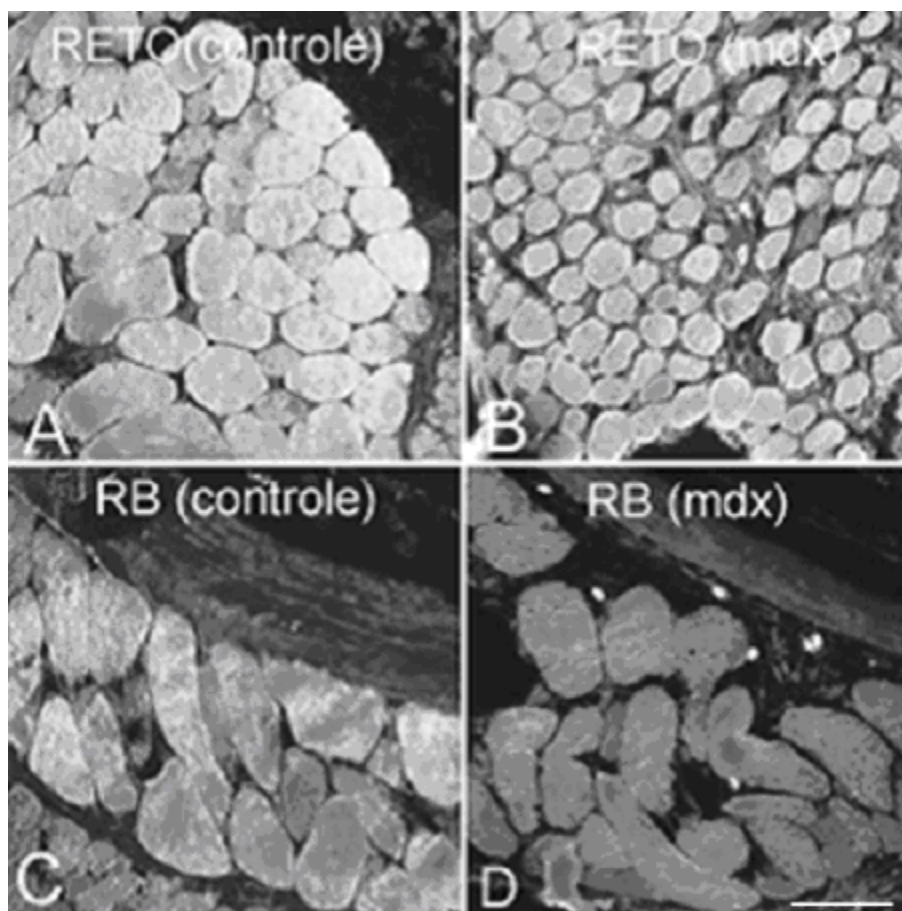


Figura 4. Localização da calsequestrina nos músculos extra-oculares controle (A e C) e *mdx* (B e D). As marcações imunohistoquímicas dos músculos *mdx* reto (B) e retrator do bulbo (RB) não apresentaram diferença em relação aos músculos controle (A e C). Escala: 25µm.

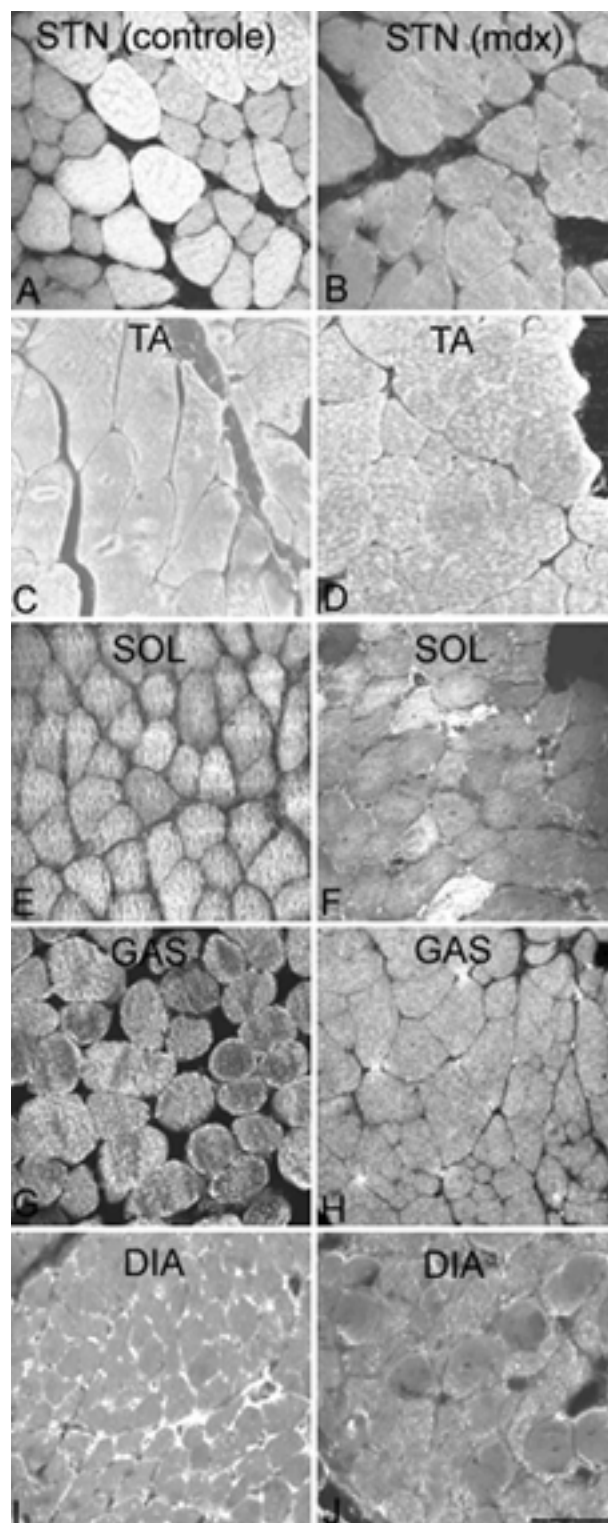


Figura 5. Localização da calcestrina nos músculos esternomastóide (STN), tibial (TA), sóleo (SOL), gastrocnêmio (GAS) e diafragma (DIA) controle e *mdx*. Não foram observadas diferenças na distribuição da calcestrina entre os músculos *mdx* (B, D, F, H e J) e controle (A, C, E, G e I). Escala: A, B: 20μm; C, D, E, F, G, H, I, J: 25μm.

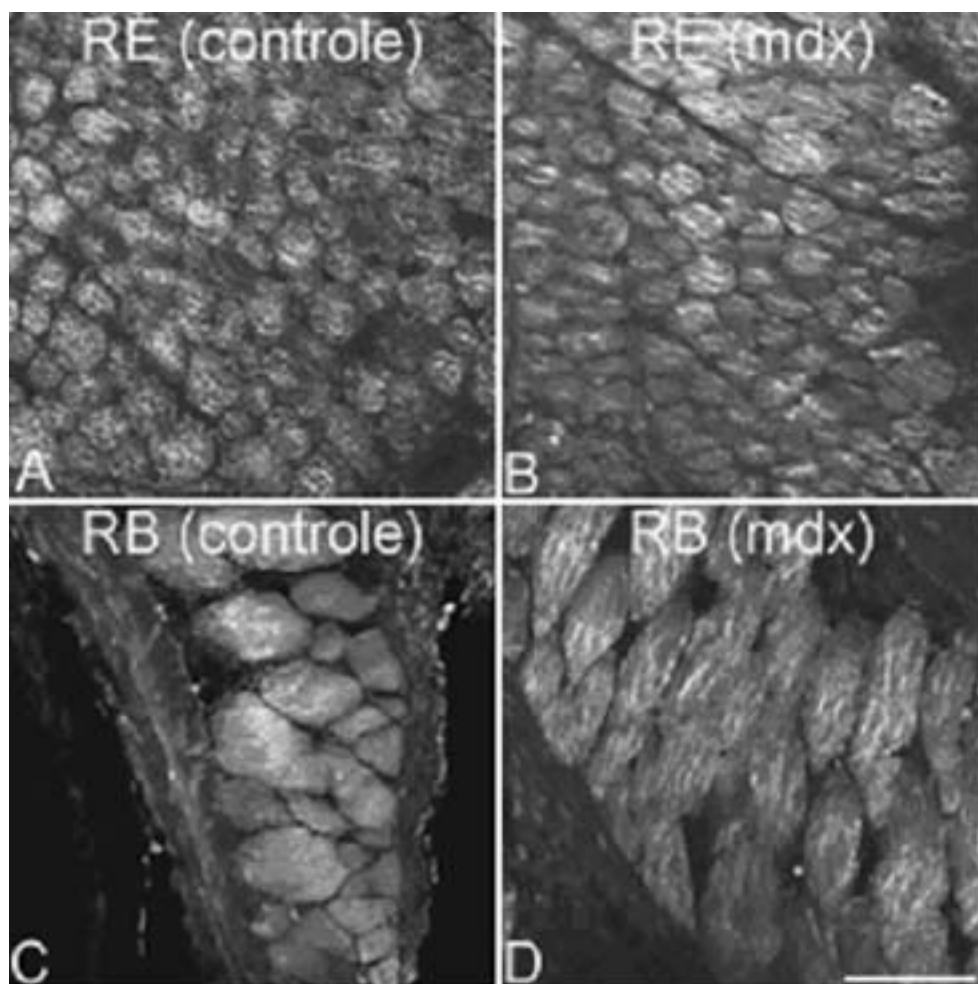


Figura 6. Localização da SERCA1 nos músculos extra-oculares controle (A e C) e *mdx* (B e D). As marcações imunohistoquímicas dos músculos *mdx* reto (B) e retrator do bulbo (RB) não apresentaram diferença em relação aos músculos controle (A e C). Escala A, B: 20 μ m, C: 25 μ m, D: 50 μ m.

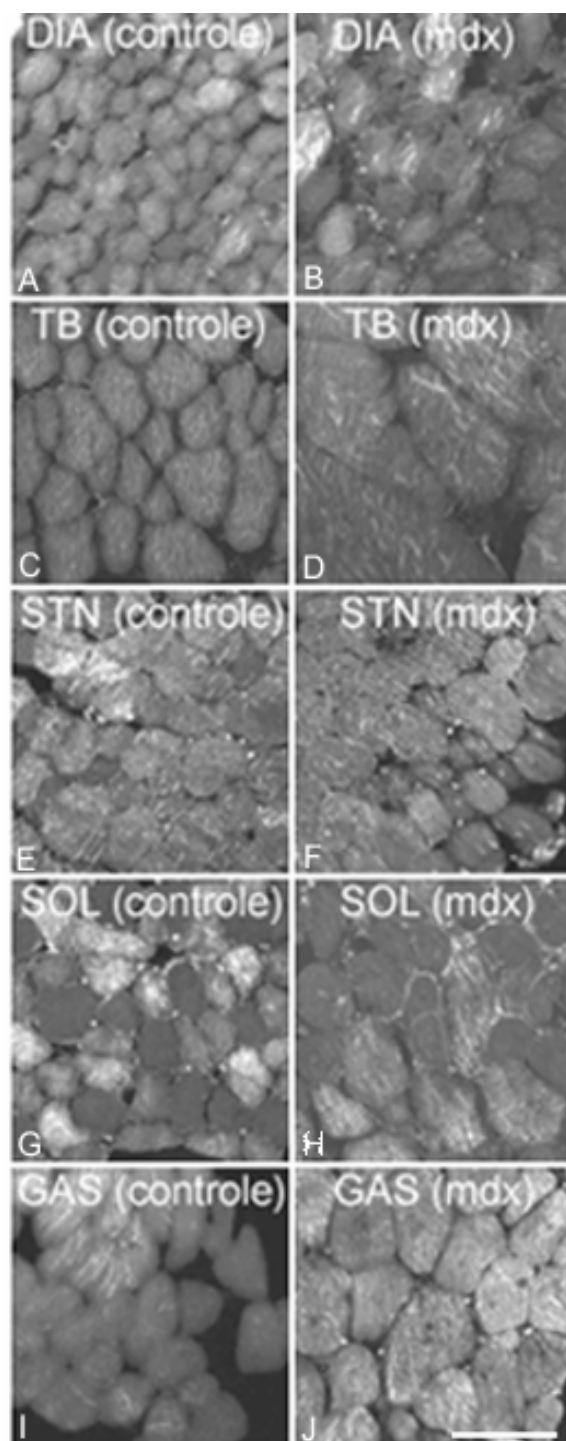


Figura 7. Localização da SERCA1 nos músculos diafragma (DIA), tibial (TA), esternomastóide (STN), sóleo (SOL), gastrocnêmio (GAS) e controle e *mdx*. Não foram observadas diferenças na distribuição da SERCA1 entre os músculos *mdx* (B, D, F, H e J) e controle (A, C, E, G e I). Escala A, B, C, E, F, G, H, I: 20 μ m, J: 25 μ m, D: 50 μ m.

5.3 Imunofluorescência das proteínas do sarcolema: distrofina, utrofina e β -dystroglicana

A distrofina foi observada no sarcolema dos músculos controles. Nenhuma marcação foi vista nos músculos distróficos (Figura 8) (artigo publicado: Figuras 1 D-F).

A utrofina foi observada nos EOM controles co-localizada com os receptores de acetilcolina da junção neuromuscular (Figura 9 B). Nos EOM *mdx*, a expressão da utrofina apresentou o mesmo padrão de distribuição dos EOM controles (Figura 9 D, F). Uma aparente marcação da utrofina também foi vista no sarcolema extra-juncional dos EOM distróficos (Figura 9 D), não sendo observada nos EOM controles (Figura 9 B). No músculo tibial anterior distrófico, a expressão da utrofina também foi vista co-localizada com os receptores de acetilcolina e no sarcolema extra-juncional (Figura 9 E, F).

A proteína β -dystroglicana (β -DG) foi observada em todo sarcolema da fibra dos EOM e sua expressão foi preservada nos EOM distróficos (Figura 10 B e D). Embora a marcação fluorescente permita uma análise semi-quantitativa, observamos um aumento aparente da fluorescência nos EOM *mdx* (Figura 10 B) em relação aos controles EOM (Figura 10 A) e músculos da pata controle e *mdx* (Figuras 10 C e D). O aumento da β -DG nos EOM foi confirmado pelo immunoblotting, havendo diminuição significativa da β -DG nos músculos da pata, DIA e STN, em comparação com os músculos normais (Figura 13).

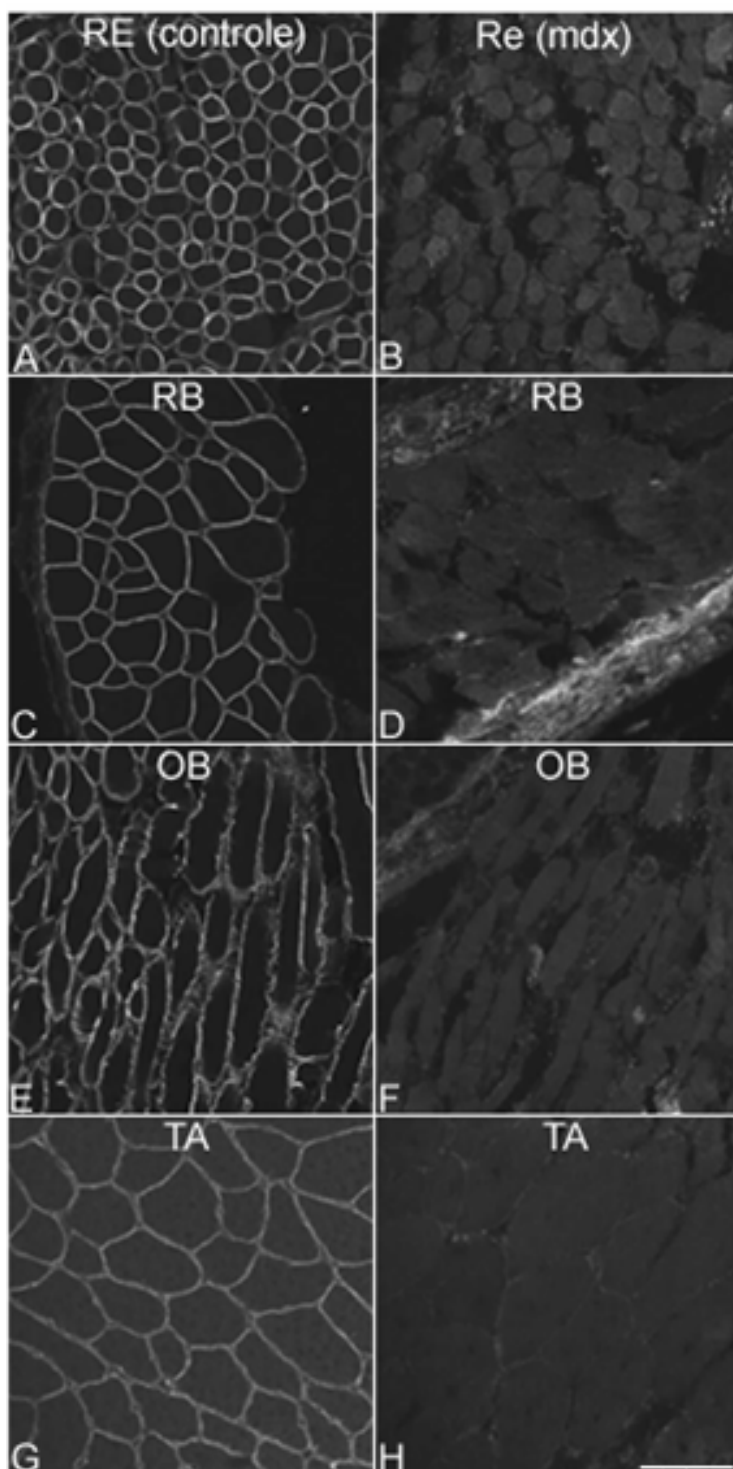


Figura 8. Localização da distrofina no sarcolema dos músculos extra-oculares e tibial anterior controles e *mdx*. Secções transversais de músculos controle (A, C, E, G) e *mdx* (B, D, F, H). Os músculos retos (RE), retrator do bulbo (RB), obliquo (OB) e tibial anterior (TA) distróficos não apresentam nenhuma marcação, diferentemente dos músculos controles. Escala: 20µm.

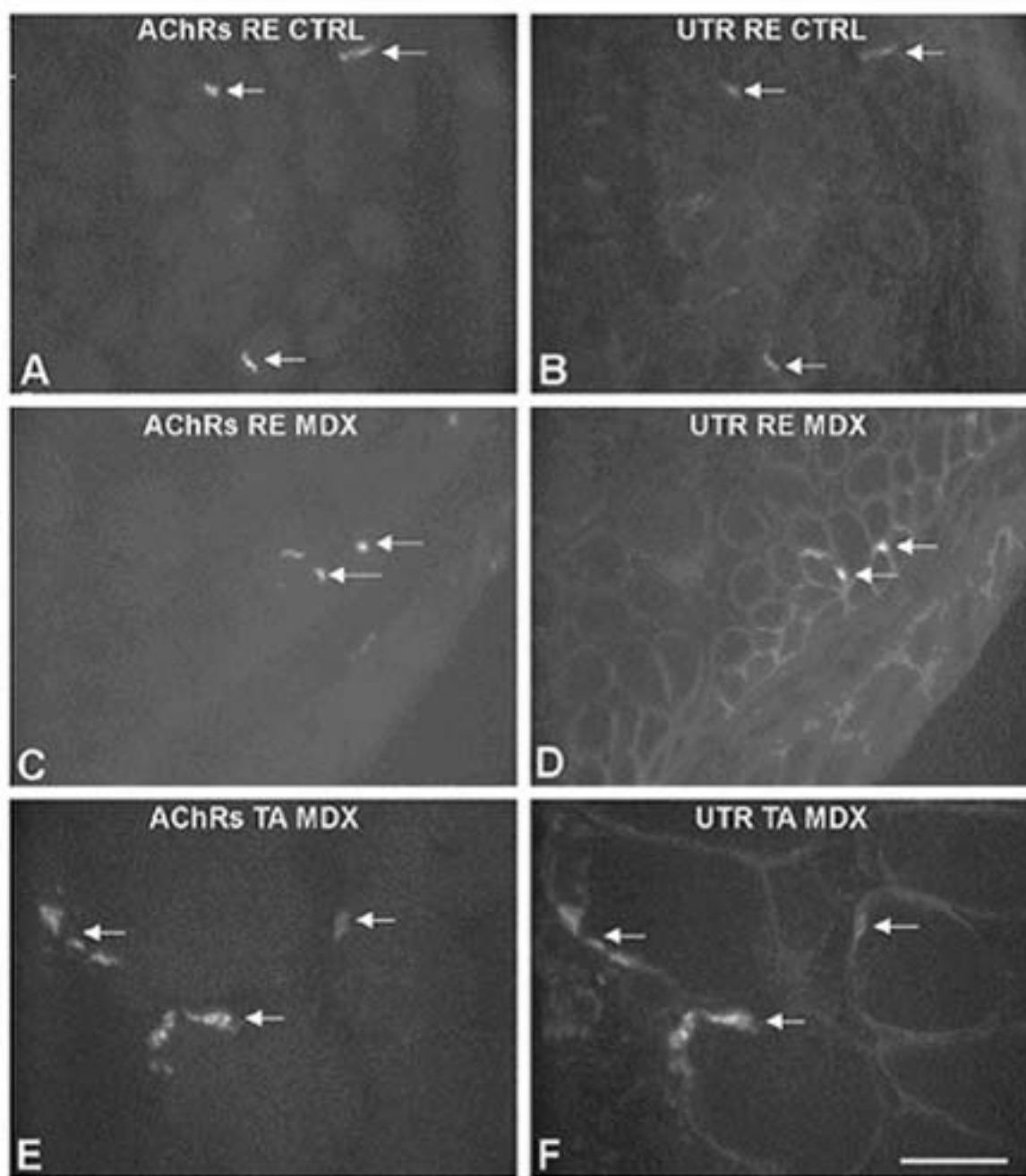


Figura 9. Localização da utrofina (UTR) em EOM reto controle (RE CTRL) (A e B), reto distrófico (RE MDX) (C e D) e músculo tibial anterior *mdx* (TA MDX) (E e F). Em A, C e E observa-se os receptores de acetilcolina (AChRs, indicados pelas setas). Em B, D e F a utrofina está co-localizada com os AChRs da junção neuromuscular (seta). Nota-se em D e F aparente marcação no sarcolema extra-juncional. Escala: 20µm.

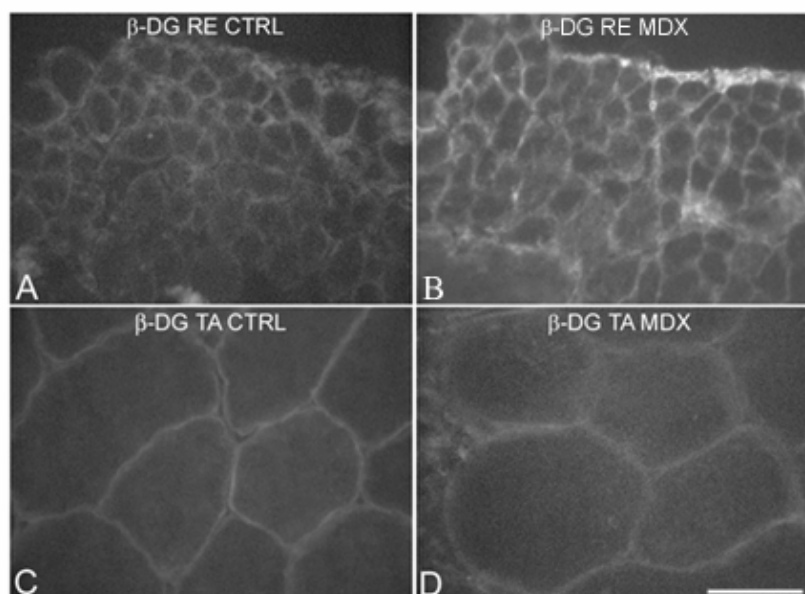


Figura 10. Localização da β -Distroglicana no sarcolema dos músculos extra-oculares retos (RE) controle e *mdx* e tibial anterior controle (TA CTRL) e *mdx* (TA MDX). O músculo TA *mdx* não apresentou marcação diferente dos músculos controle. Observa-se aumento da fluorescência nos EOM *mdx* (B) em relação ao controle (A). Escala A, B: 20 μ m, C, D: 25 μ m.

5.4 Immunoblotting

A análise do immunoblotting para a proteína calsequestrina mostrou aumento significativo nos níveis desta proteína no grupo dos músculos *mdx* extra-oculares protegidos e no grupo dos músculos extra-oculares total, e diminuição significativa nos demais músculos *mdx* comparados ao controle.

Os músculos tibial anterior *mdx*, gastrocnêmio *mdx* e sóleo *mdx* apresentaram diminuição de 13,6%, 22,3%, 49,2%, respectivamente em relação aos controles. Os músculos diafragma e esternomastóide *mdx* apresentaram diminuição de 20,3% e 31,7%, respectivamente. Já nos músculos extra-oculares protegidos observamos aumento de 38,3% e nos músculos extra-oculares totais *mdx*, 41,8% maior que no controle.

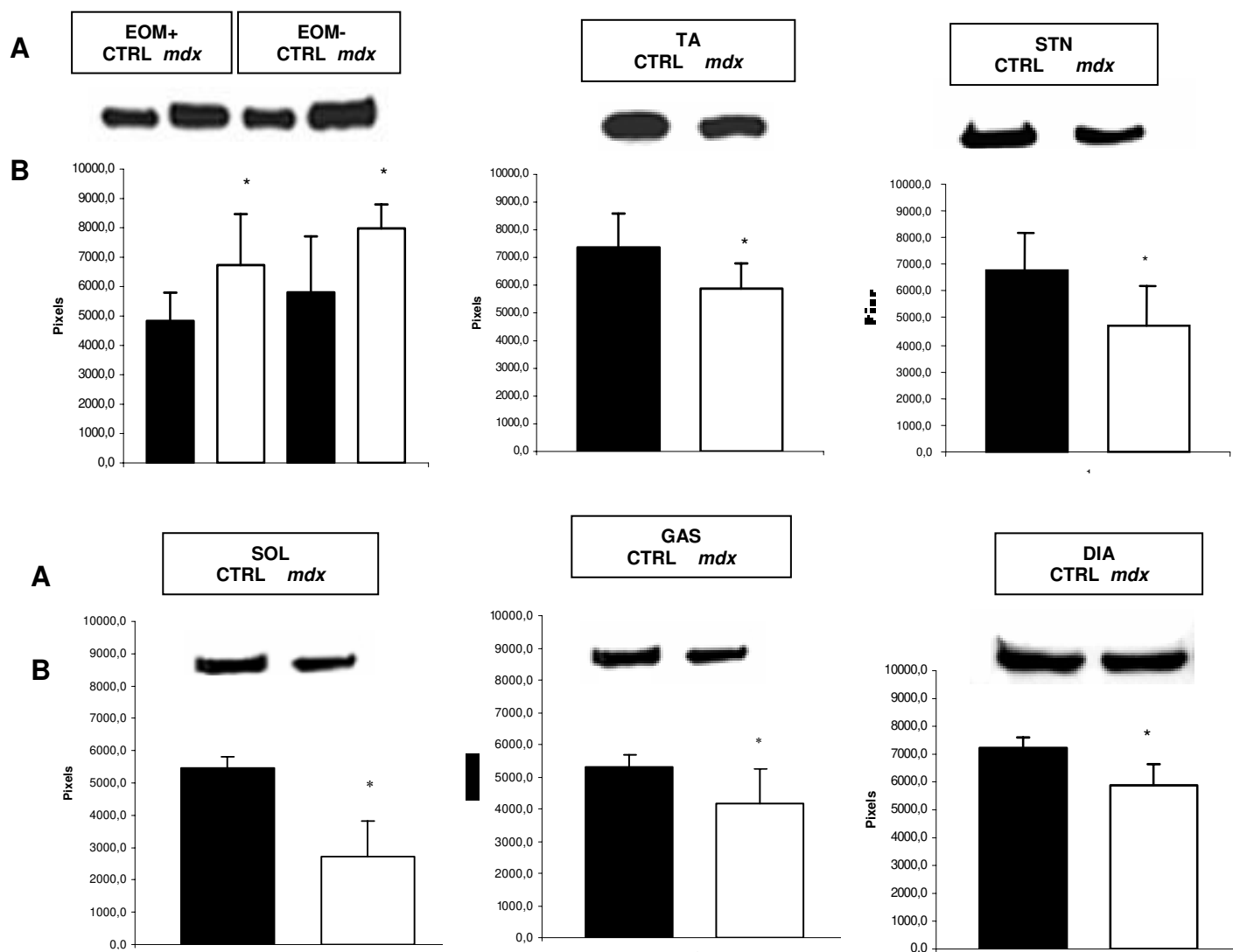


Figura 11. Análise do conteúdo de calsequestrina através do immunoblotting. **Em A:** immunoblotting mostrando as dos músculos extra-oculares total (EOM⁺), extra-oculares protegidos (EOM⁻), tibial anterior (TA), esternomastóide (STN), sóleo (SOL), gastrocnêmio (GAS) e diafragma (DIA), comparando controle (CTRL) e *mdx*. **Em B:** representação gráfica dos conteúdos de calsequestrina expressos em pixels. Houve aumento significativo entre controle e *mdx* nos músculos EOM⁺ e EOM⁻, e diminuição significativa nos músculos TA *mdx*, STN *mdx*, SOL *mdx*, GAS *mdx* e DIA *mdx* em comparação com os controles (* $P \leq 0.05$; Student's t teste).

Dentre os músculos controles, o tibial anterior apresentou maior expressão de calsequestrina e o EOM⁺, a menor expressão. Nos músculos distróficos, o EOM⁻ teve a maior expressão, sendo que a menor expressão foi observada no músculo sóleo.

Em relação a SERCA1, os resultados mostraram aumento significativo no conteúdo desta proteína nos EOM⁺ e EOM⁻, em relação aos controles, de 13,5% e 16,9%, respectivamente. Já os músculos distróficos TA, STN, GAS mostraram diminuição significativa de 19,4%, 20,9% e 21,9%, respectivamente, em relação aos seus controles.

Não foi identificada SERCA1 nos músculos sóleo e diafragma, os quais apresentam o predomínio de fibras de contração lenta. Desta forma, como esta proteína é expressa em músculos de contração rápida, as poucas fibras de contração rápidas existentes nos músculos sóleo e diafragma foram insuficientes para exibirem o conteúdo em pixels evidenciado no immunoblotting.

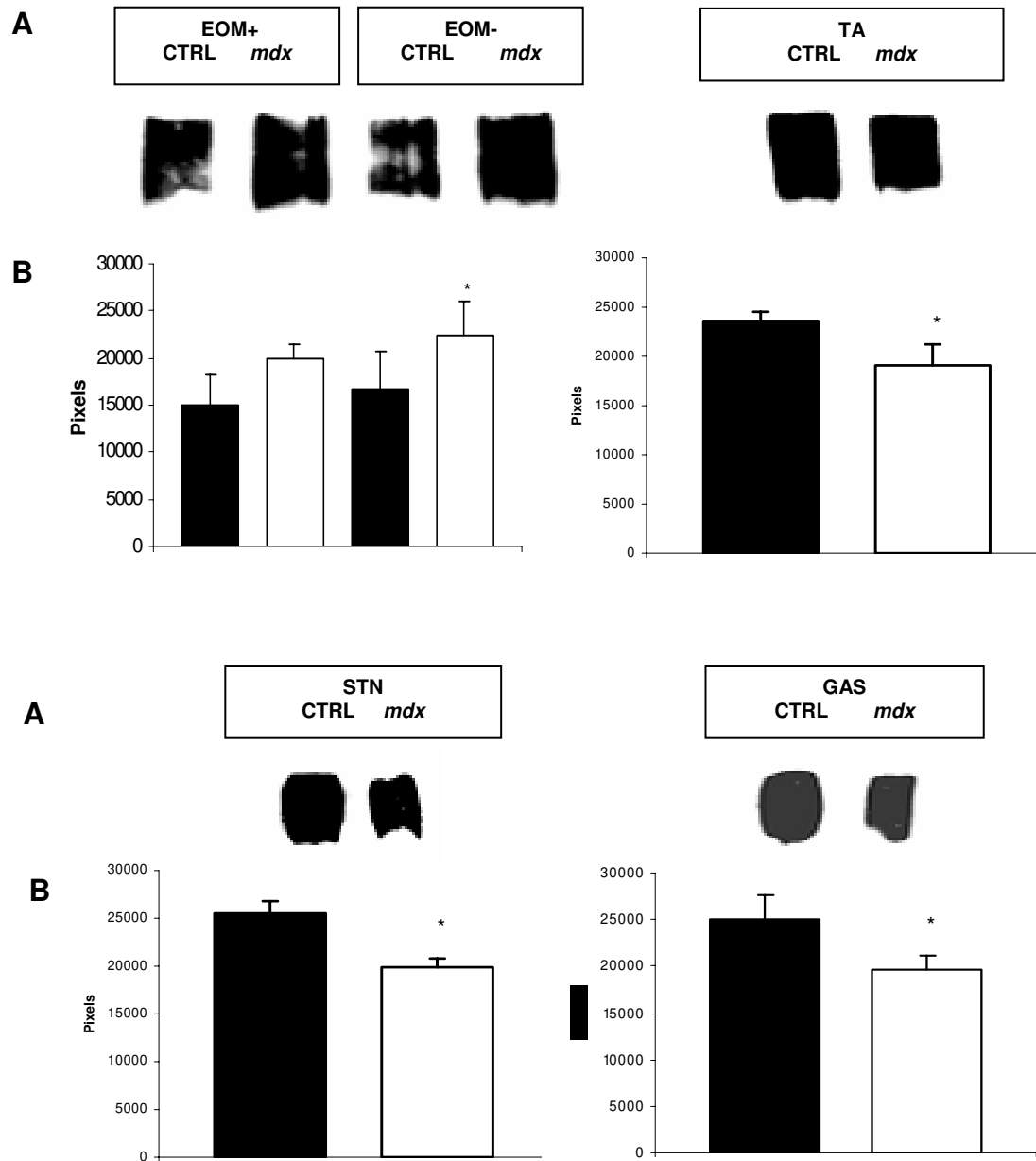


Figura 12. Análise do conteúdo de SERCA1 através do immunoblotting. **Em A:** immunoblotting mostrando os músculos extra-oculares total (EOM⁺), extra-oculares protegidos (EOM⁻), tibial anterior (TA), esternomastóide (STN) e gastrocnêmio (GAS) comparando controle e *mdx*. **Em B:** representação gráfica dos conteúdos da SERCA1, expressos em pixels. Houve aumento significativo entre controle (CTRL) e *mdx* nos músculos EOM⁺ e EOM⁻, e diminuição significativa nos músculos TA *mdx*, STN *mdx*, GAS *mdx* e DIA *mdx* em comparação com os controles (* $P \leq 0.05$; Student's t teste).

A análise do imunoblotting para proteína β -distroglicana (β -DG), mostrou aumento significativo nos níveis desta proteína nos músculos *mdx* extra-oculares protegidos (EOM⁻) em relação ao controle e diminuição não significativa dos músculos *mdx* extra-oculares totais (EOM⁺) *mdx*, comparado ao controle. Os demais músculos *mdx* apresentaram diminuição significativa comparados ao controle.

Os músculos tibial anterior *mdx*, esternomastóide *mdx*, diafragma *mdx* e sóleo *mdx* apresentaram diminuição de 91%, 32%, 28% e 68%, respectivamente em relação aos controles. Já nos músculos EOM⁻ *mdx* observamos aumento significativo de 77,2 % em relação ao controle e nos EOM⁺ *mdx* diminuição de 3% em relação ao controle.

Dentre os músculos controle, o músculo sóleo apresentou maior expressão de β -distroglicana e o esternomastóide, a menor expressão. Nos músculos distróficos, o EOM⁻ manteve a maior expressão, sendo que a menor expressão foi observada no esternomastóide.

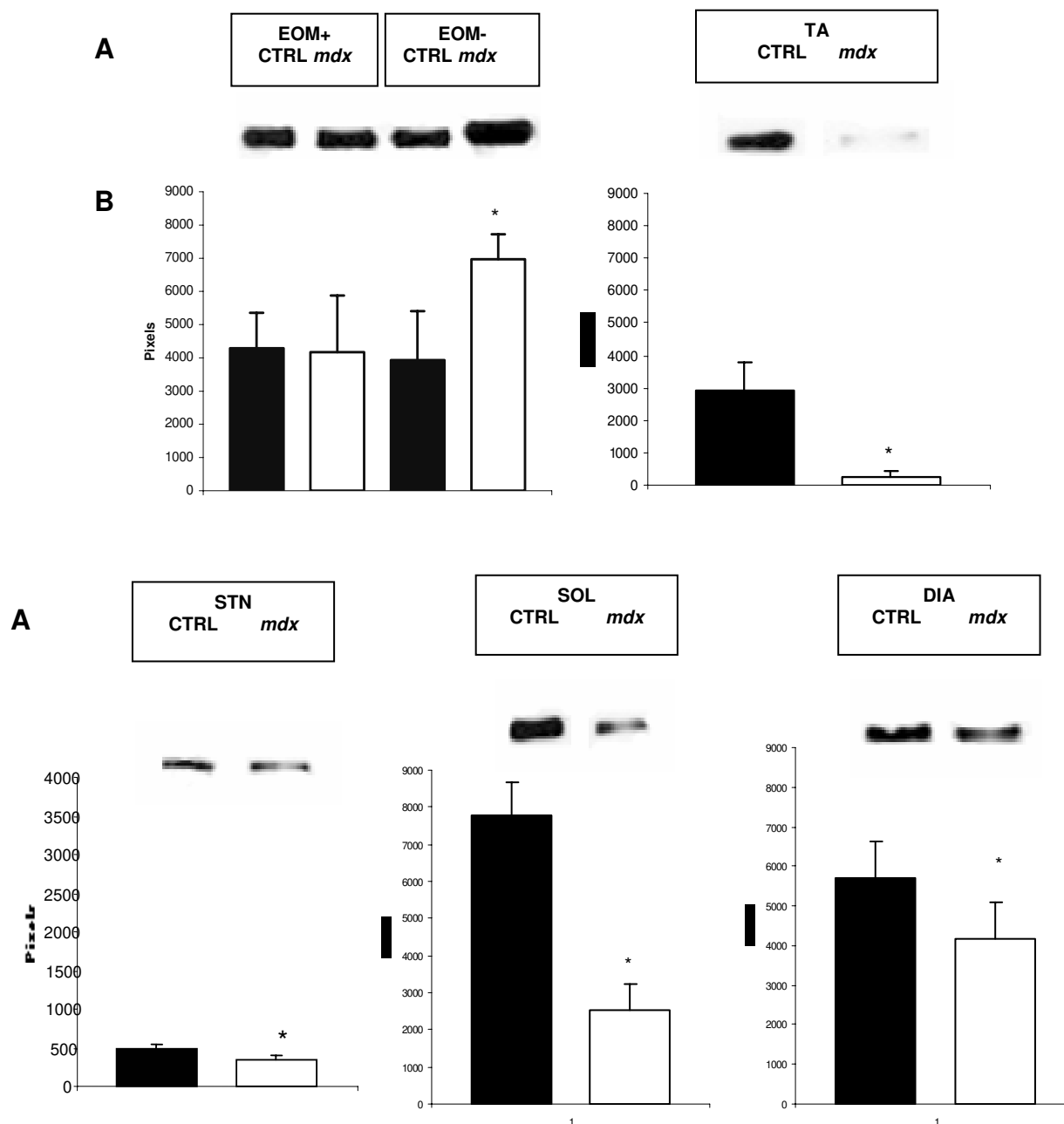


Figura 13. Análise do conteúdo de β -DG através do imunoblotting. **Em A:** imunoblotting mostrando os músculos extra-oculares total (EOM⁺), extra-oculares protegidos (EOM⁻), tibial anterior (TA), esternomastóide (STN), sóleo (SOL) e diafragma (DIA), comparando controle (CTRL) e *mdx*. **Em B:** representação gráfica dos conteúdos da β -DG expressos em pixels. Houve aumento significativo entre controle e *mdx* nos músculos EOM⁺ e EOM⁻, e diminuição significativa nos músculos TA *mdx*, STN *mdx*, SOL *mdx* e DIA *mdx* em comparação com os controles (* $P \leq 0.05$; Student's t teste).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Intensidade da miopatia nos diferentes músculos esqueléticos

Neste trabalho demonstramos que a ausência da distrofina, característica dos animais distróficos, tal como humanos portadores de distrofia muscular progressiva, parece não ser essencial para que ocorra a mionecrose. Nossos resultados mostram que os músculos *mdx* extra-oculares retos (superior, medial, lateral e inferior) e oblíquos (superior e inferior) não apresentaram nenhum sinal de degeneração-regeneração muscular, como necrose de fibras musculares, presença de núcleos centrais, processo inflamatório e aumento da fibrose intersticial. Assim, conclui-se que mesmo com a ausência da distrofina, os EOM são protegidos da mionecrose. Esses resultados são concordantes com aqueles obtidos nos estudos realizados por KHURANA *et al.*, 1995; PORTER e BEKER, 1996; ANDRADE *et al.*, 2000, referentes à proteção dos músculos extra-oculares a distrofia muscular.

Os resultados histológicos dos demais músculos estudados (tibial anterior, gastrocnêmio, sóleo, esternomastóide e diafragma) revelaram a posição do núcleo periférico para o animal controle, porém estes mesmos músculos analisados nos animais distróficos apresentaram sinais de regeneração muscular, caracterizado pela presença dos núcleos centrais. Observamos diferentes intensidades de regeneração-degeneração muscular nos músculos da pata, DIA e STN. Este fato é possivelmente explicado pela existência de diferenças na evolução e intensidade das lesões musculares, de acordo com a função desempenhada pelos músculos, tais como locomoção, manutenção postural e respiração (PASTORETI e SIBILLE, 1995). Existe ainda a hipótese de que os tipos de fibras musculares existentes em cada músculo possam ser responsáveis pelas diferentes resistências às lesões decorrentes das distrofinopatias (HASLETT *et al.*, 2005). Fibras

musculares de contração rápida são mais suscetíveis a distrofia (LYNCH *et al.*, 2001), porém nossos resultados mostraram que o músculo sóleo, com predomínio de fibras de contração lenta, apresentou diferença significativa, com maior quantidade de núcleos centrais, característicos de regeneração muscular, do que os músculos tibial anterior e gastrocnêmio, que apresentam predomínio de fibras de contração rápida.

6.2 Proteínas reguladoras do Ca^{++}

6.2.1 SERCA 1 e Calsequestrina nos EOM e demais músculos

A importância de determinar as características dos músculos extra-oculares e os mecanismos que os fazem protegidos da distrofia poderia levar ao desenvolvimento de novas terapias farmacológicas, celulares e genéticas. Além do mais, a relativa inacessibilidade e quantidade disponível dos EOMs comparado com outros músculos tornou nosso trabalho o pioneiro em conseguir separar os músculos extra-oculares protegidos (reto superior, reto inferior, reto medial, reto lateral, oblíquos superior e inferior) dos músculos acometidos, como o levantador da pálpebra e retrator do bulbo.

Uma das possibilidades para explicar a proteção contra a mionecrose dos EOMs protegidos (retos e oblíquos) distróficos seria a habilidade intrínseca desses músculos em manter a homeostase do Ca^{2+} (KHURANA *et al.*, 1995). Contudo, os mecanismos pelos quais os músculos extra-oculares conseguem manter essa homeostase ainda não são esclarecidos.

Em relação aos EOM+ e EOM⁻ distróficos, nossos resultados mostraram aumento nos níveis de calsequestrina e SERCA1 comparado com seus controles (Figuras 11, 12).

Considerando que os EOM são parcialmente afetados pela ausência da distrofina, o presente estudo confirma a hipótese de que alterações dos níveis de cálcio estão envolvidas na distrofia muscular. Estudos demonstraram que os EOM são mais resistentes à necrose causada por uma elevação farmacológica dos níveis de cálcio, sugerindo que esses músculos apresentam uma melhor habilidade na manutenção da homeostase do cálcio do que outros grupos musculares (KHURANA *et al.*, 1995). Sugerimos que esta melhor habilidade possa estar relacionada com o aumento e/ou a expressão normal das proteínas ligadas ao cálcio citosólico ou sarcoplasmático. Adicionalmente, a proteção do EOM distrófico pode ser explicada pela melhor capacidade da regulação do cálcio intracelular.

Em relação aos demais músculos estudados, observamos que os níveis de CSQ foram significativamente reduzidos, incluindo o músculo diafragma, que é o mais afetado. Os resultados estão de acordo com o fato de que o tamponamento do Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático é diminuído nas fibras distróficas. Possivelmente relacionado com a diminuição dos níveis de calsequestrina. Entretanto, esta diminuição não parece correlacionar com a intensidade da patologia, visto que o músculo diafragma, que é o mais afetado, mostrou pequena redução da calsequestrina (20,3%) em comparação com esternomastóide e sóleo (31,7% e 49,2%, respectivamente).

A imunomarcação para a proteína calsequestrina não revelou diferença no padrão de localização desta proteína ou intensidade nos sinais de fluorescência entre animais controle e *mdx*, como já descrito na literatura (CULLIGAN *et al.*, 2002). Já a utilização desta mesma técnica para a Ca^{++} -ATPase do retículo sarcoplasmático, SERCA1, confirmou a maior expressão da proteína em músculos de contração rápida (DIVET *et al.*, 2005). No músculo sóleo, o qual apresenta predomínio de fibras de contração lenta, foi observado

poucas fibras musculares com brilho no sarcoplasma, sugerimos desta forma que sejam fibras de contração rápida. Porém, com a utilização da técnica de immunoblotting, nossos resultados quanto aos níveis da calsequestrina e SERCA1 revelaram que os músculos tibial anterior, gastrocnêmio, sóleo, esternomastóide e diafragma distróficos apresentaram diminuição significativa destas proteínas em relação aos músculos controles. Interessante salientar que nos músculos sóleo e diafragma, com predomínio de fibras de contração lenta, não foram detectados SERCA1 pelo immunoblotting. Uma vez que a calsequestrina parece ser a reguladora central dos ciclos de Ca^{2+} através do retículo sarcoplasmático e representa um mediador essencial no acoplamento excitação-contração e relaxamento muscular, é provável que sua diminuição resulta em um maior dano ao tecido (DOWLING *et al.*, 2003).

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que mostra diminuição dos níveis de CSQ e SERCA1 nos músculos estriados do *mdx* (DORAN *et al.*, 2004) e está também de acordo com a hipótese que a regulação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático está diminuída nos músculos distróficos. De acordo com este achado, também foi observada na literatura a redução da proteína sarcalumenina, outra proteína relacionada ao cálcio dentro do lúmen do retículo sarcoplasmático, que apresenta interação com a SERCA1, (DOWLING *et al.*, 2004; DORAN *et al.*, 2006). Animais deficientes em sarcalumenina apresentaram redução na expressão de SERCA1 (YOSHIDA *et al.*, 2005). Esses resultados confirmam a hipótese de que alterações no tamponamento do cálcio citosólico estão envolvidas na degeneração muscular do *mdx*.

6.3 Complexo Distrofina-Glicoproteínas: análise da utrofina e quantificação β -dystroglicana

Analizamos a proteína utrofina, componente do DGC que poderia compensar a deficiência da distrofina (LOVE *et al.*, 1989; GRADY *et al.*, 1997). A utrofina está localizada no sarcolema de músculos em regeneração, apresenta-se diminuída ao nascimento e restrita a junção neuromuscular e miotendinosa em músculos adultos normais. Como a utrofina e a distrofina apresentam as mesmas proteínas associadas (dystroglicanas, sarcoglicanas e sintrofins), sugeriu-se que a utrofina poderia compensar a deficiência da distrofina (LOVE *et al.*, 1989; GRADY *et al.*, 1997). Através das técnicas de imunohistoquímica observamos a utrofina na junção neuromuscular. Nos EOMs distróficos a expressão da utrofina foi preservada na junção neuromuscular, concomitante com o aumento da fluorescência no sarcolema extra-juncional (Figura 9 D), resultado similar também encontrado no músculo tibial anterior distrófico, fato constatado também na literatura (KHURANA *et al.*, 1995). Essas observações sugerem que a expressão da utrofina não é responsável pela proteção do EOM distrófico no camundongo *mdx*, como relatado por PORTER *et al.*, 2003 que verificaram aumento somente em três dos seis tipos de fibras encontradas no EOM, não sendo portanto significativo, sugerindo assim um mecanismo adicional ser o responsável pela proteção. Diferentemente, KHURANA *et al.*, 1991; MATSUMURA *et al.*, 1992, observaram aumento na expressão da utrofina no EOM distrófico, sugerindo que seu aumento pode contribuir para a proteção dos músculos extraoculares distróficos (PORTER *et al.*, 1998). O aumento da utrofina pode promover mudanças na β -dystroglicana, a qual também está associada com a proteção dos músculos

distroficos dos dedos da pata e EOM (DOWLING *et al.*, 2003). Estudos futuros de imunoblotting serão interessantes para quantificar o conteúdo da utrofina e sua relação com a proteção dos EOM distróficos.

Observamos que a concentração da β -DG, proteína trans-sarcolemal ligada a distrofina, fazendo parte do CDG, estava significativamente diminuída nos músculos tibial anterior, sóleo, diafragma e esternomatóide. A mudança na expressão das proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) é consequência da ausência da distrofina no músculo distrófico (DOWLING *et al.*, 2003).

Os EOM- *mdx* apresentaram aumento significativo na concentração da β -distroglicana (β -DG), diferentemente, os EOM+ *mdx* mostraram uma diminuição de apenas 3%, não sendo significativa em relação ao controle. Esse resultado observado nos EOM+ é devido possivelmente a esse grupo também apresentar músculos não protegidos da mionecrose. De acordo com os resultados da literatura (DOWLING *et al.*, 2003), a β -DG estava preservada nos extra-oculares. Embora a razão desse aumento nos EOMs não esteja clara, sugere-se que a β -DG possa estar envolvida na proteção das fibras musculares do EOM a necrose. Sabe-se que a ausência da distrofina ocasiona drástica redução em várias glicoproteínas sarcolemas (OHLENDIECK *et al.*, 1991), como as distroglicanas, sarcoglicanas, distrobrevinas, sintrofinas e sarcospan (CULLIGAN *et al.*, 1998). Nos músculos dos dedos da pata de camundongos *mdx*, que parecem ser protegidos do processo de degeneração muscular, estas proteínas não são severamente afetadas como nos músculos *mdx* não protegidos (DOWLING *et al.*, 2002). Acredita-se que a presença da distroglicana no sarcolema e sua interação com a laminina possam proteger a integridade do sarcolema

(ERVASTI *et al.*, 1991) sendo assim importante para a manutenção da fibra muscular (BROWN *et al.*, 1999). Segundo Vandebrouck *et al.*, 2007, na ausência da distrofina a β -DG pode interagir com a utrofina, α -sintrofina ou outras proteínas subsarcolemas envolvidas na sinalização do cálcio, conferindo melhor tamponamento da concentração de cálcio intracelular e conseqüente proteção a mionecrose.

7. CONCLUSÃO

Devido ao fato dos EOM, que são protegidos, apresentarem aumento da concentração das proteínas reguladoras de cálcio (calsequestrina e SERCA1), enquanto que, nos demais músculos distróficos atingidos pela degeneração muscular, os níveis das mesmas proteínas estarem diminuídos significativamente, concluímos que essas proteínas têm papel fundamental na diminuição ou prevenção da degeneração da fibra muscular distrófica. Entretanto, os músculos distróficos não protegidos não apresentam correlação entre a diminuição da calsequestrina e intensidade da miopatia. Adicionalmente, sugerimos que a β -DG parece estar mais diretamente relacionada com a proteção a mionecrose do que a utrofina.

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que a reposição da β -DG, calsequestrina e SERCA1, através de terapias genéticas ou farmacológicas, possa ser útil para atenuar as conseqüências da ausência da distrofina, em músculos esqueléticos que apresentam mionecrose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

* De acordo com a NBR 6023/2002

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

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

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

BERCHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiological Reviews*, v.80, p. 1215 – 1265, 2000.

BLAKE, D.J.; TINSLEY, J.M.; DAVIES, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.*, v.6, p.37-47, 1996.

BOCKHOLD, K.J.; ROSENBLATT, J.D.; PARTRIDGE, T.A. Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve*, v.21, n.2, p.173-183, 1998.

BODENSTEINER J.B.; ENGEL A.G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology (Minneapolis)*, v.28, p.439-446, 1978.

BOLAND B.; HIMPENS B.; DENEFF J.F.; GILLIS J.M. Site-dependent pathological differences in smooth muscles and skeletal muscles of the adult *mdx* mouse. *Muscle & Nerve*, v.18, p.649-657, 1995.

BONILLA, E.; SAMIT, C.E.; MIRANDA, A.F.; HAYS, A.P.; SALVIATI, G.; DIMAURO, S.; KUNKEL, L.M.; HOFFMAN, E.P.; ROWLAND, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, v.54, p.447-452, 1988.

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

BRON, A.J.; TRIPATHI, R.C.; TRIPATHI, B.J. *Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit*. London: Chapman and Hall Medical, 1997.

BROWN, S.C.; FASSATI, A.; POPPLEWELL, L.; PAGE A.M.; HENRY, M.D.; CAMPBELL, K.P.; DICKSON, G. Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle α -dystroglycan-laminin interaction. *J.Cell Sci.*, v.112, p.209-216, 1999.

BRUECKNER, J.K.; ITKIS, O.; PORTER, J.D. Spatial and Temporal patterns of myosin heavy chain expression in developing rat extraocular muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.17(3), p.297-312, 1996

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGTH, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-like muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.1189-1192, 1984.

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

CARPENTER C.; KARPATI G. Duchenne muscular dystrophy: plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. *Brain*, v.102, p.147-161, 1979.

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.

DIVET A.; HUCHET-CADIOU C. Sarcoplasmic reticulum function in slow- and fast-twitch skeletal muscles from *mdx* mice. *Pflugers Arch.*, v.444, n.5, p.634-643, 2002.

DIVET, A.; LOMPRÉ, A.M.; HUCHET-CADIOU, C. Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, on skeletal muscles from normal and *mdx* mice. *Acta Physiol Scand.* v.184, p.173-186, 2005.

DORAN, P.; DOWLING P.; LOHAN J.; Mc DONNELL, 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.

DORAN, P.; DOWLING P.; DONOGHUE, P.; BUFFINI, M.; OHLENDIECK, K. Reduced expression of regucalcin in young and age *mdx* diaphragm indicates abnormal cytosolic calcium handling in dystrophin-deficient muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1764, p. 773-785, 2006.

DORLAND'S illustrated: Medical Dictionary. 25 ed. Philadelphia: Saunders, 1748p, 1974.

DOWLING, P.; CULLIGAN, K.; OHLENDIECK, K. Distal *mdx* muscle groups exhibiting up-regulation of utrophin and rescue of dystrophin-associated glycoproteins exemplify a protected phenotype in muscular dystrophy. *Naturwissenschaften*, v.89, p.75-88, 2002.

DOWLING, P.; LOHAN, J.; OHLENDIECK, K. Comparative analysis of Dp427-deficient *mdx* tissue shows that the milder dystrophic phenotype of extraocular and toe muscle fibers is associated with a persistent expression of β -dystroglycan. *European Journal of Cell Biology*, v.82, p.222-230, 2003.

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

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

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

ERVASTI J.M.; CAMPBELL K.P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, v.66,p.1121-1131, 1991.

FILL, M.; COPELLO, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* v.82, p.893-922, 2002.

FONG, P.Y.; TURNER, P.R.; DENETCLAW, W.F.; STEINHARDT, R.A. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science*, v. 2;250(4981), p. 673-676, 1990.

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.

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

GASGHENER E.R.; HOFFMAN E. P.; GOROSPE J.R.; UHL E.W.; SENIOR D.F; CARDINET G.H; PEARSE L K. Dystrophy Deficience causes lethal muscle hipertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.*, v.110, p.149-153, 1992.

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

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

GRANOLINI A.O.; JASMIN B.J. Molecular mechanisms and putative signalling events controlling utrophin expression in mammalian skeletal muscle fibers. *Neuromusc. Disorders*, v.8, p.351-361, 1998.

GROUND S M.D.; RADLEY H.G.; LYNCH G.S.; NAGARAJU K.; DE LUCA A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis.*, v.31, p.1-19, 2008.

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

HASLETT, J.N. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. *Mammalian Genome*, v.16, n.10, p.739-748, 2005.

HAMILTON, S.L.; SERYSHEVA, I.; STRASBURG, G.M. Calmodulin and excitationcontraction coupling. *News Physiol. Sci.*, v.15, p.281-284, 2000.

HASLETT, J.N.; KANG, P.B.; HAN, M.; KHO, A.T.; SANOUDOU, D.; VOLINSKI, J.M.; BEGGS, A.H.; KOHANE, I.; KUNKEL, L.M. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. *Mammalian Genome*, v.16, p.739-748, 2005

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

HUANG, C.L-H.; PEACHEY, L.D. Distribution of voltage-dependent membrane capacitance in frog skeletal muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* v.93, p.565-584, 1989.

ISHIKAWA-SAKURAI, M.; YOSHIDA, M.; IMAMURA, M.; DAVIES, K.E.; OZAWA, E. ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to β -dystroglycan. *Hum. Mol. Genet.*, v.13, p.693-, 2004.

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

JUNG D.; DUCLOS F.; APOSTOL B.; STRAUB V.; LEE J.C.; ALLAMAND V.; VENZKE D.P.; SUNADA Y.; MOOMAW C.R.; LEVEILLE C.J.; SLAUGHTER C.A.; CRAWFORD T.O.; McPHERSON J.D.; CAMPBELL K.P. Characterization of - sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.32321-32329, 1996.

JUNG D.; YANG B.; MEYER J.; CHAMBERLAIN J.S.; CAMPBELL K.P. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on -dystrophican. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.27305-27310, 1995.

KAMINSKI, H.J.; RICHMONDS, C.R.; KUSNER, L.L.; MITSUMOTO, H. Differential susceptibility of the ocular motor system to disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.956, p. 42-54, 2002.

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

KARPATI, G.; CARPENTER, S.; MORRIS, G.E.; DAVIES, K.E.; GUERIN, C.; HOLLAND, P. Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.52, p.119-128, 1993.

KHANNA, S.; PORTER, J.D. Conservation of synapse-signaling pathways at the extraocular muscle neuromuscular junction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 956, p. 394-396, 2002.

KHURANA, T.S.; PREDERGAST, R.A.; ALAMEDDINE, H.S.; TOMÉ, F.M.S.; FARDEAU, M.; ARAHATA, K.; SUGITA, H.; KUNKEL, L.M. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. *J. Exp. Med.*, v.182, p.467-474, 1995.

KHURANA, T.S.; WATKINS, S.C.; KUNKEL, L.M. The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J. Cell Biol.*, v.119, p.357-366, 1992.

KJELLGREN, D.; RYAN, M.; OHLENDIECK, K.; THORNELL, L.E.; PEDROSA-DOMELLOF, F. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPases (SERCA1 and -2) in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 44, p. 5057-5062, 2003.

KOENIG, M.; MONACO, A.P.; KUNKEL, L.M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, v.53, p.219-226, 1988.

LEFAUCHEUR J.P.; PASTORET C.; SEBILLE A. A phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.*, v.242, p.70-76, 1995.

LIEBER, R.L. *Skeletal Muscle Structure, Function, & Plasticity*, 2. ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 302, 2002.

LIN, S.; BURGUNDER, J.M. Utrophin may be a precursor of dystrophin during skeletal muscle development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v.119, p.289-295, 2000.

LIN, S.; GASCHEN, F.; BURGUNDER, J.M. Utrophin is a regeneration-associated protein transiently present at the sarcolemma of regenerating skeletal muscle fibers in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.57, p.780-790, 1998.

LOVE, D.R.; HILL, D.F.; DICKSON, G.; SPUR, N.K.; BYTH, B.C.; MARSDEN, R.F.; WALSH, F.S.; EDWARDS, Y.H.; DAVIES, K.E. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*, v.339, p.55-58, 1989.

LOVE, D.R.; MORRIS, G.E.; ELLIS, J.M.; FAIRBROTHER, U.; MARSDEN, R.F.; BLOOMFIELD, J.F.; EDWARDS, Y.H.; SLATER, C.P.; PARRY, D.J.; DAVIES, K.E. Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the *mdx* and *dy* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.3243-3247, 1991

LYNCH, G.S.; HINKLE, R.T.; CHAMBERLAIN, J.S.; BROOKS, S.V.; FAULKNER, J.A. Force and power output of fast and slow skeletal muscle from *mdx* mice 6-28 months old. *J. Physiol (Lond)*, v.535, p.591-600, 2001.

McCOMAS A.J. The muscle fiber. In: *Skeletal Muscle Form and Function*. EUA, Ed. *Human kinetics*, p.3-24, 1996

MacLENNAN, 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.; KORNELOUK, 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.559-61, 2000b.

MARQUES, M.J.; PERTILLE, A.; CARVALHO, C.L.T.; SANTO NETO, H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *The Anatomical Record*, v.290, n.7, p.846-854, 2007.

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.

MATHEUS, S.M.; SOARES, J.C. Ultrastructural aspects of the retractor ocular bulbi muscle in the opossum (*Didelphis albiventris*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.31(1), p. 163-168, 1999.

MATSUMURA, K.; ERVASTI, J.M.; OHLENDIECK, K.; KAHL, S.D.; CAMPBELL, K.P. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in *mdx* mouse muscle. *Nature*, v. 360, p. 588-, 1992.

MATSUMURA K.; CAMPBELL K.L. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, v.17, p.2-15, 1994.

MAUNDER SEWRY C.A.; GORODETSKY R.; YARON R.; DUBOWITZ V. Element analyses of skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy using x-ray fluorescence spectrometry. *Muscle & Nerve*, v.3, p.502-508, 1980.

MITCHELL, R.D.; SKIMMERMANN, H.K.B.; JONES, L.R. Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interaction of canine cardiac calsequestrin. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.1376-1381, 1988.

NGUYEN, T.M.; ELLIS, J.M.; LOVE, D.R.; DAVIES, K.E.; GATTER, K.C.; DICKSON, G.; MORRIS, G.E. Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscle, and in proliferating brain cell lines. *J. Cell Biol.*, v.115, p.1695-1700, 1991.

NICOLAS-METRAL V.; RADDATZ E.; KUCERA P.; RUEGG U.T. Mdx myotubes have normal excitability but show reduced contraction-relaxation dynamics. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, v.22, n.1, p.69-75, 2001.

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

NIGRO V.; PILUSO G.; BELSITO A.; POLITANO L.; PUCA A.A.; PAPPARELLA S.; ROSSI E.; VIGLIETO G.; ESPOSITO M.G.; ALBONDANZA C.; MEDICI N.; MOLINARI A.M.; NIGRO G.; PUCA G.A. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35kDA glycoprotein. *Hum. Mol. Genet.*, v.5, p.1179-1186, 1996.

OBERC M.A.; ENGEL W.K. Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab. Invest.*, v.36, p.566-577, 1977.

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

OHLENDIECK, K. CAMPBELL, K.P. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from *mdx* mice. *J. Cell Biol.*, v.115, p.1685-1694, 1991.

PASTERNAK C.; WOUNG S.; WILSON E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.*, v.128 (3), p.355-361, 1995.

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

PATEL K.; VOIT T.; DUNN M.J.; STRONG P.N.; DUBOWITZ V. Dystrophin and nebulin in the muscular dystrophies. *J. Neurol. Sci.*, v.87, p.315-326, 1988.

PEARCE M.; BLAKE D.J.; TINSLEY J.M. The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure. *Hum.Mol. Genet.*, v.2, p.1765-1772, 1993.

PORTER, J.D. Introduction to muscular dystrophy. *Microsc Res Tech.*, v.48, n.3-4, p.127-130, 2000.

PORTER, J.D. Commentary: extraocular muscle sparing in muscular dystrophy: a critical evaluation of potential protective mechanisms. *Neuromusc Disord*, v.8, p.198-203, 1998.

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

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

PORTER, J.D.; MERRIAN, A.P.; LEAHY, P.; GONG, B.; KHANNA, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deicient (*mdx*) mice. *Hum. Mol. Gen.*, v.12, p.1813-1821, 2003.

QUINLAN, J.G.; HAHNB, H.S.; WONGC, B.L.; LORENZD, J.N.; WENISCHA, A.S.; LEVINE, L.S. Evolution of the *mdx* mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscular Disorders*, v.14, p. 491–496, 2004.

QUIRICO-SANTOS T.J.; RIBEIRO M.M.; SAVINO W. Increased deposition of extracellular matrix components in the thymus gland of *mdx* mouse: correlation with the muscular lesion, *J. Neuroimmunol.*, v.59, p.9-18, 1995.

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

RAGUSA R.J.; CHOW C.K.; ST CLAIR D.K.; PORTER J.D. Extraocular, limb and diaphragm muscle group-specific antioxidant enzyme activity patterns in control and *mdx* mice. *J. Neurol. Sci.*, v.139, n.2, p.180-186, 1996.

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.

RYBAKOVA I.N.; AMANN K.J.; ERVASTI J.M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.*, v.135, p.661-672, 1996.

RYBAKOVA I.N.; ERVASTI J.M. Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments *in vitro* through association. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.28771-28778, 1997.

RYBAKOVA, I.N.; PATEL, J.R.; ERVASTI, J.M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.*, v.150, n.5, p.1209-1214, 2000.

RYBAKOVA, I.N.; HUMSTON, J.M.; SONNEMANN, K.J.; ERVASTI, J.M. Dystrophin and utrophin bind actin filaments through distinct modes of contact. *J. Biol. Chem.*, v.281, p. 9996-, 2006.

ROBBINS S.L.; KUMA R.V.; COTRAN R.S. The Musculoskeletal System. In: _____. *Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders International Edition, 1519p, p.1315-1384. ISBN 0721631584, 1989.

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

RUEGG U.T.; NICOLAS-METRAL V.; CHALLET C.; BERNARD-HELARY K.; DORCHIES O.M.; WAGNER S.; BUETLER T.M. Pharmacological control of cellular calcium handling in dystrophic skeletal muscle. *Neuromuscul Disord.*, Suppl 1, p. S155-161, 2002.

SCHOTLAND D.L.; BONILLA E.; VAN METER M. Duchenne dystrophy alteration in muscle plasma membrane structure. *Science*, v.196, p.1005-1007, 1977.

SEIXAS S., WAJSENZON I.J.; SAVINOW, QUIRICO SANTOS T. Altered deposition of extracellular matrix components in the skeletal muscle and lymph node of the mdx dystrophic mouse. *Braz J. Med. Biol.*, v.27, p.2229-2240, 1994.

SICINSKI P.; GENE Y.; RYDER-COOK A.S.; BARNARD E.A.; DARLINSON M.E.; BARNARD P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, v.244, p.1578-1580, 1989.

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.

SPERELAKIS, N. *Cell Physiology*. 2.º Edition, Ed. Academic Press.,1998.
SPURNEY C.F.; KNOBLACH S.; PISTILLI E.E.; NAGARAJU K.; MARTIN G.R.;
HOFFMAN E.P. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: Expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul Disord*, v.18, n.5, p.371-381, 2008.

SUNADA Y.; CAMPBELL K.P. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Current. Opinion in Neurology*, v.8, p.379-384, 1995.

TAKEMITSU, M.; NONAKA, I.; SUGITA, H. Dystrophin-related protein in skeletal muscle in neuromuscular disorders: immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.*, v.85, p.256-259, 1993.

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.

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

TINSLEY J.M.; BLAKE, D.J.; ROCHE, A.; FAIRBROTHER, U.; RISS, J. BYTH, B.C.; KINIGHT, A.E.; KENDRICK-JONES, J.; SUTHERS, G.K.; LOVE, D.R. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*, v.360, p.591-593, 1992.

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

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

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

VALENTINE B.A.; COOPER B.J.; CUMMINGS J.F.; DE LAHYNTA A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscopic and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol (Berl)*, v.71, p.301-305, 1986.

VIRES, M.A. Calcium ATPase and respiratory muscle function. *Eur. Resp. J.* v.11, p.758-766, 1998.

WINDER, S.J.; HEMMINGS, L.; MACIVER, S.K.; BOLTON, S.J.; TINSLEY, J.M.; DAVIES, K.E.; CRITCHLEY, D.R.; KENDRICK-JONES, J. Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J. Cell Sci.*, v.108, p.63-, 1995.

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.

WIRTSCHAFTER J.D.; FERRINGTON D.A.; McLOON L.K. Continuous remodeling of adult extraocular muscles as an explanation for selective craniofacial vulnerability in oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neuroophthalmol.*, v.24, p.62-67, 2004.

YANG B.; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA O.; MOOMAW C.R.; SLAUGHTER C.A.; CAMPBELL K.P. Heterogeneity of the 59 kDa dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning and expression. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.6040-6044, 1995.

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 sarcoplumenin-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. ANEXO
ARTIGO PUBLICADO E ARTIGO SUBMETIDO

Acetylcholine Receptor Organization at the Dystrophic Extraocular Muscle Neuromuscular Junction

MARIA JULIA MARQUES,* ADRIANA PERTILLE,

CANDIDA LUIZA T. CARVALHO, AND HUMBERTO SANTO NETO

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Grant numbers: 95/6110-2, 01/00570-4, 04/15526-9 and 05/55719-3; Grant sponsor: Conselho Nacional de Pesquisas; Grant numbers: 302880/04-6, 306689/06-5.

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

Received 27 June 2006; Accepted 12 February 2007

DOI 10.1002/ar.20525

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

AChRs IN DYSTROPHIC EXTRAOCULAR MUSCLES

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult *mdx* mice (5–6 months old) and control C57Bl/10 ScSn mice were obtained from the mouse breeding colony of the State University of Campinas and were housed on a 12-hr light/dark cycle with free access to water and standard rodent chow until the time of use. All experiments were done in accordance with the guidelines for the use of animals set forth by our Institution.

Muscle Preparation

The mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of chloral hydrate (600 µg/kg) and perfused intracardially with phosphate-buffered saline (PBS), followed by freshly prepared cold fixative (4% paraformaldehyde in PBS). Globes with intact extraocular muscles and associated connective tissue were obtained by orbital dissection. Individual rectus, oblique, and retractor bulbi muscles were carefully dissected from their origin to insertion. Next, the muscles (from 5 *mdx* and 5 C57Bl/10 mice) were placed in a Sylgard dish and washed with PBS for confocal microscopy observation of neuromuscular junction organization. Enucleated specimens from five *mdx* and five C57Bl/10 mice were dissected out and snap frozen with isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at –80°C for hematoxylin and eosin and dystrophin labeling.

Light Microscopy

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

Immunofluorescence

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

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

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

^aValues are reported as means ± SD.

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

848

MARQUES ET AL.

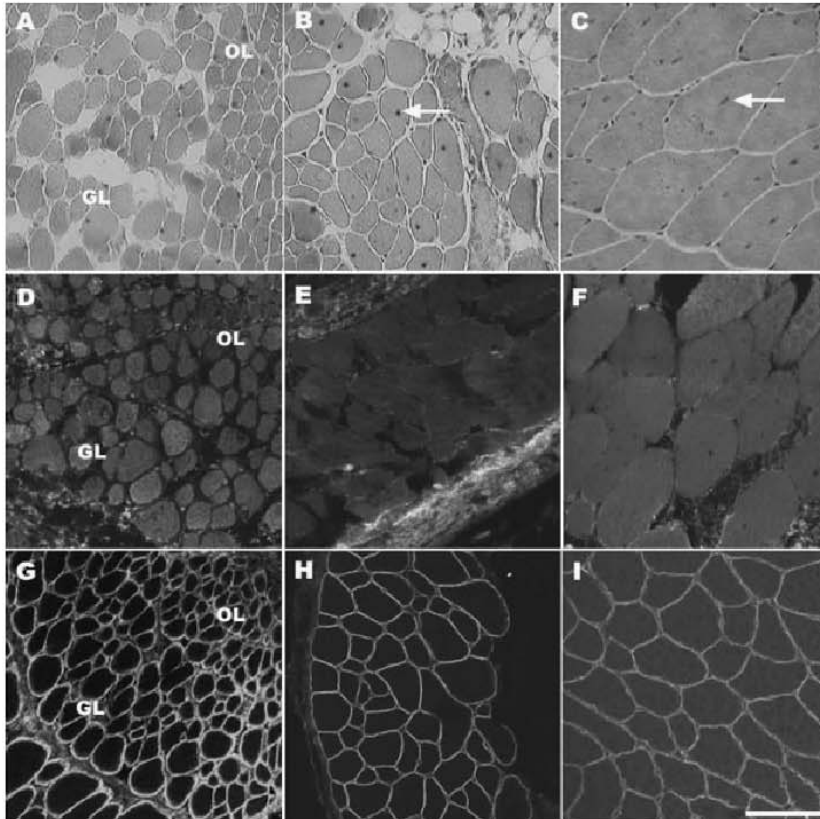


Fig. 1. A–I: Muscle regeneration (A–C) and dystrophin expression (D–I) in spared and nonspared extraocular muscles. **A:** Central nucleated fibers were not seen in dystrophic rectus muscles. **B,C:** Dystrophic retractor bulbi (B) and tibialis anterioris (C) showed central nucleated fibers (arrows).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

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

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

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

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

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

Confocal Microscopy

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

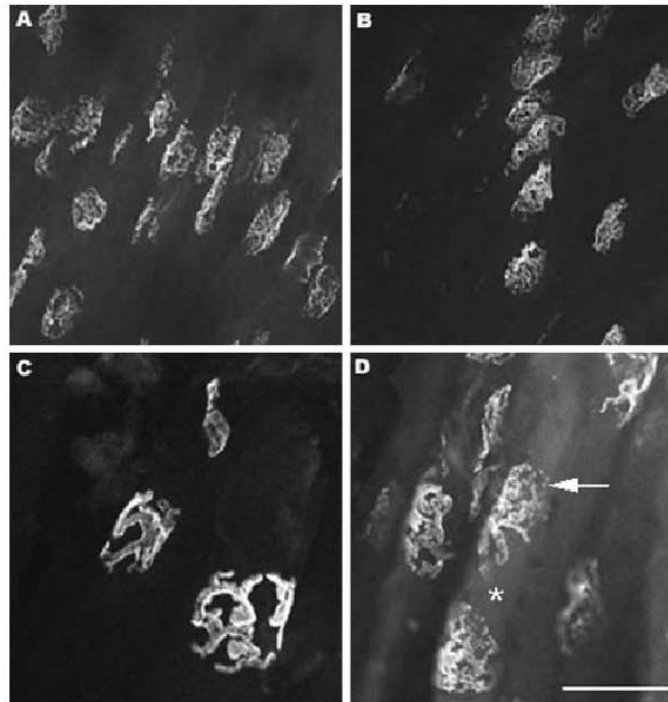


Fig. 2. Acetylcholine receptor (AChR) distribution in spared extraocular muscles. A and B show receptor topography at the endplate band. **A–D:** Continuous branches of AChRs are typically seen in controls (A) and dystrophic muscles (B–D). In D, muscle fiber (asterisk) with two distinct endplates zones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

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

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

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

RESULTS

Histological Characteristics and Dystrophin Labeling

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

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

Neuromuscular Junction Organization

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

850

MARQUES ET AL.

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

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

^aValues represent the mean $\pm$ SD. n = 1,000 branches/muscle.
^{*}Significantly different from respective control ($P < 0.05$, Student t -test and χ^2).
^{***}Length/width ratio values equal to or less than 1.5 were used to classify the AChRs clusters as islands (Marques et al., 2007). AChR, acetylcholine receptor.

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

	Control			<i>Mdx</i>		
	Rectus/ Oblique	Retractor bulbi	Tibialis anterioris	Rectus/ Oblique	Retractor bulbi	Tibialis anterioris
Junctional length (μm)	44.6 $\pm$ 13.6	46.3 $\pm$ 16.3	76.3 $\pm$ 18.7	42.5 $\pm$ 7.8	31.8 $\pm$ 8.0	61.1 $\pm$ 15.6
Junctional width (μm)	18.3 $\pm$ 7.2	17.0 $\pm$ 4.6	29.0 $\pm$ 6.3	17.8 $\pm$ 5.4	13.6 $\pm$ 4.0	23.5 $\pm$ 5.5
						Soleus
						55.0 $\pm$ 15.0
						29.0 $\pm$ 9.8

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

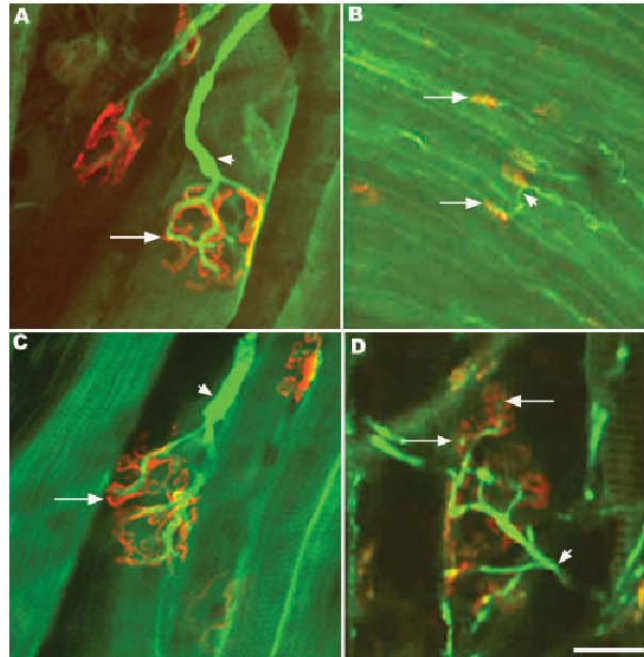


Fig. 3. A–D: Acetylcholine receptor (red) and nerve terminal (green) distribution in branched (A,C,D) and *en grappe* (B) neuromuscular junctions. **A:** Branches of receptors covered by continuous processes of nerve terminal, seen in *mdx* rectus muscle (arrow). **B:** *En grappe* junctions, characterized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

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

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

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

DISCUSSION

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

852

MARQUES ET AL.

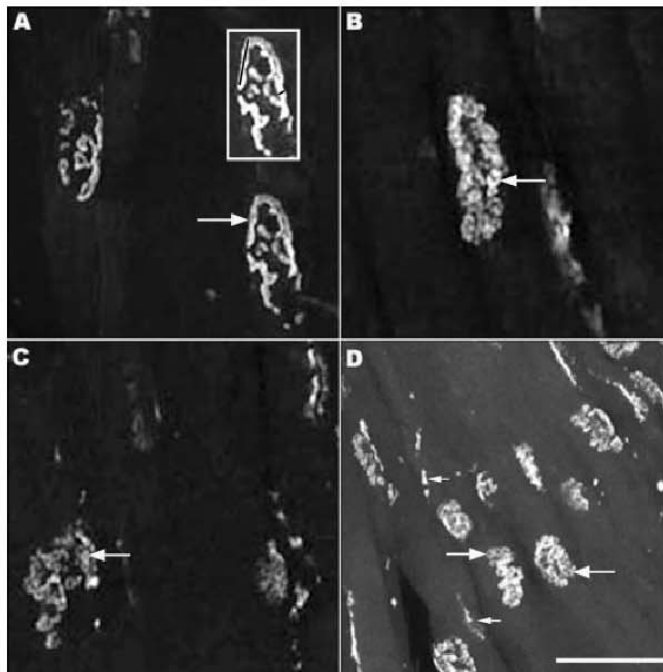


Fig. 4. Acetylcholine receptor (AChR) distribution in nonspared retractor bulbi. **A:** In controls, AChRs are distributed in continuous branches (arrow). **B–D:** Islands of receptors with a bright outline and a dark center are seen in dystrophic retractor bulbi junctions (arrows). **D:** Scattered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

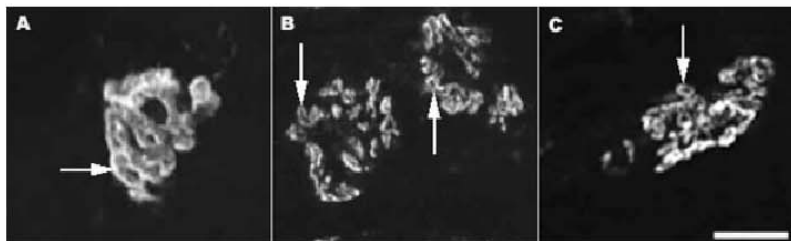


Fig. 5. Acetylcholine receptor (AChR) distribution in limb muscles. **A:** In control tibialis anterioris, AChRs are distributed in branches (arrow). **B,C:** Islands of receptors with a bright outline and a dark center are seen in dystrophic tibialis (B, arrows) and soleus (C, arrow) junctions. Scale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

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

LITERATURE CITED

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

854

MARQUES ET AL.

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

Expression of calcium-binding proteins in dystrophin-deficient muscles of the *mdx* mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy.

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

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

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

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

Campinas, SP - 13083-970, Brazil.

fax: 55-19-3521-6101.

email:marques@unicamp.br

phone: 55-19-3521-6395

Expression of calcium-binding proteins in dystrophin-deficient muscles of the *mdx* mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy.

Duchenne muscular dystrophy is one of the most common hereditary diseases. Abnormal ion handling renders dystrophic muscle fibers more susceptible to necrosis and a rise in intracellular calcium is an important initiating event in dystrophic muscle pathogenesis. In the *mdx* mice, muscles are affected with different intensities and some muscles are spared. We investigated the levels of the calcium-binding proteins calsequestrin, calmodulin and a Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase, the myosin light chain kinase, in the non-spared axial (sternomastoid and diaphragm) and limb (tibialis anterior and soleus) muscles and in the spared extraocular muscles of control and *mdx* mice. Immunoblotting analysis showed a significant increase of all proteins in the spared *mdx* extraocular muscles. In the non-spared dystrophic muscles, calmodulin and myosin light chain kinase levels were comparable to control, except in the tibialis anterior, where it was decreased. Calsequestrin was significantly decreased in the non-spared dystrophic muscles. These results suggest that differential levels of the calcium-handling proteins may be involved in the pathogenesis of the dystrophic *mdx* muscles. Signaling mechanisms involving Ca^{2+} -calmodulin activation and calsequestrin expression may be a valuable way to develop new therapeutic approaches to the dystrophinopathies.

Key words: calmodulin; calsequestrin; Duchenne muscular dystrophy; extraocular muscles; *mdx* mice; myosin light chain kinase.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by a mutation in the X chromosome which results in the absence of dystrophin in cardiac, skeletal and smooth muscles (Hoffman et al. 1987; Engel et al. 1994). An established animal model of X-linked muscular dystrophy is the *mdx* mouse (Bulfield et al. 1984; Grounds et al. 2008), which is unable to express dystrophin due to a point mutation (Sicinski et al. 1989). *Mdx* mice exhibit elevated serum creatine kinase levels (Bulfield et al. 1984), and muscle necrosis (Torres and Duchen 1987) followed by muscle regeneration (Lyons and Slater 1991; Minatel et al. 2003).

Several studies have suggested that a rise in intracellular calcium is an important initiating event in dystrophic muscle pathogenesis (Tidball and Spencer 2000; Whitehead et al. 2006). There is a general concept that the lack of dystrophin renders the sarcolemma more susceptible to rupture (Petrof et al. 1993) or affects the normal functioning of calcium channels (Alderton and Steinhardt 2000; Vandebrouck et al. 2007) that ultimately leads to an increased calcium entry into the muscle fiber. These elevated calcium levels activate proteases, such as calpain, resulting in myonecrosis (Tidball and Spencer 2000). In addition to disturbed cytosolic calcium levels, the calcium-buffering capacity of dystrophic muscles also seems to be impaired (Culligan et al. 2002; Doran et al. 2006).

Despite the common etiology of dystrophin deficiency, differential response of various skeletal muscles to dystrophin deficiency supports the hypothesis that secondary mechanisms have a substantial effect on phenotypic severity. In the *mdx*, limb and neck

muscles exhibit extensive necrosis and regeneration between two and six weeks of age, followed by stabilization, hypertrophy and degeneration in older mice (McArdle et al. 1994). In contrast, mdx diaphragm suffers intensive degeneration similar to the phenotype of DMD patients (Stedman et al. 1991), while dystrophic extraocular and laryngeal muscles are spared (Andrade et al. 2000; Marques et al. 2007a). We hypothesized that differences in the expression of calcium-binding proteins amongst dystrophic muscles may be important in determining their phenotypic severity. We studied the expression of the key calcium-regulatory muscle proteins calmodulin (CaM), Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase (myosin light chain kinase; MLCK) and calsequestrin (CSQ) in five different skeletal muscles (tibialis anterior, soleus, sternomastoid, diaphragm and extraocular) from wild-type and *mdx* mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male *mdx* and C57Bl/10 mice (2 months old) 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. The animal experiments described here were done in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and the guidelines set forth by our Institution.

The calcium-binding proteins calmodulin (CaM; 17 kDa), myosin light chain kinase (MLCK, 79 kDa) and calsequestrin (CSQ; 68 kDa) 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 CaM, MLCK and CSQ.

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

collected and mounted on coated microscope slides. Some sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope.

The other sections were air dried, hydrated for 30 min in PBS, incubated with 0.3% Triton X-100 for 10 min, and then blocked with blocking solution (1% glycine, 3% BSA and 0.6% Triton X-100 in PBS; Sigma) for 3 h. The sections were incubated with one of the calcium-binding proteins antibodies described below overnight at 4°C. The sections were washed with PBS and incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit 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; 1:500) in blocking solution instead of the primary antibody. No stained structures were seen in these controls.

Immunoblotting

Adult (2 months old) *mdx* (n = 9) and C57Bl/10 (control; n = 9) mice were used for the quantification of calcium-binding proteins. Western blots were run in triplicate and for each repetition muscles were pooled from 3 mice per strain

An established feature of the extraocular muscles (EOM) is that they contain spared (rectus and oblique) and non-spared (retractor bulbi and levator palpebrae) muscles (Porter and Baker 1996; Marques et al. 2007b). Immunoblotting was performed with samples containing only the spared muscles, with the retractor bulbi and levator palpebrae muscles

being removed. Samples obtained from the tibialis anterior (TA), soleus (SOL), sternomastoid (STN) and diaphragm (DIA) muscles were also studied.

Muscles were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, and 0.25 mM Na₃VO₄). 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, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M β-mercaptoethanol) before separation on 12%-15% SDS-polyacrylamide gels. 30 µg of total protein homogenate from C57BL/10 and *mdx* EOM, TA, SOL, STN and DIA was loaded on a 12%-15% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane using a submersion electrotransfer apparatus (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skim milk-Tris/HCl Buffer Saline-Tween buffer (TBST; 10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). The membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C, washed in TBST, incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature, and developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce Biotechnology). To control for protein loading, western blot transfer, and non-specific changes in protein levels, the blots were stripped and re-probed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Band intensities were quantified using ImageJ 1.38X (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) calsequestrin (monoclonal VIIID12, Affinity BioReagents), 3) calmodulin (polyclonal CaM I-FL 149; Santa Cruz Biotechnology), 4) skeletal muscle myosin light chain kinase (goat polyclonal MLCK_{sk}; Santa Cruz Biotechnology) and 5) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology).

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

Statistical analysis

Control and *mdx* groups were compared using a Student *t*-test. For all comparisons, $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

The histological appearance of muscles from *mdx* and control mice is shown in Figure 1. In control mice, muscle fibers were 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. Muscle fibers had a relatively uniform diameter, and no degenerating myofibers or extensive areas of inflammatory reaction were observed (Fig. 1A). Dystrophic sternomastoid, limb and diaphragm muscles displayed evidence of myopathy, represented by an increased percentage of central nucleated fibers when compared to their respective control at the same age (Table 1). Areas of inflammatory reaction were mostly seen in the DIA (Fig. 1C). Dystrophic extraocular muscles showed no histological signs of myopathy (Fig. 1D) and levels of central nucleation similar to their respective control (Table 1).

Control muscles exhibited a normal pattern of dystrophin distribution, with dystrophin labeling associated with the sarcolemma (Fig. 2A). In *mdx* mice, all muscles were negative for dystrophin (Fig. 2B).

The pattern of distribution of the key calcium-binding proteins is shown in Figure 2C-F (calmodulin) and Figure 3 (calsequestrin). Calmodulin and calsequestrin distribution was similar in normal and dystrophic STN, limb and EOM, with an apparent decrease in the intensity of both proteins fluorescence in some dystrophic muscles.

The comparison of proteins levels among muscles showed that, in control muscles, the highest level of CaM was seen in SOL (6066 ± 1576 pixels). STN and EOM showed the

lowest expression of CaM (STN: 1546 ± 111 pixels; EOM: 717 ± 218 pixels). CSQ expression was highest in TA and lowest in EOM (TA: 8305 ± 2595 pixels; EOM: 4618 ± 592 pixels). In dystrophic muscles, the highest level of CaM was seen in SOL (4935 ± 1625 pixels) and the lowest level was observed in the STN (1396 ± 248 pixels). CSQ expression was highest in EOM (6678 ± 2247 pixels) and TA (7222 ± 2774 pixels) dystrophic muscles. The lowest level of CSQ was seen in SOL (2963 ± 1554 pixels).

Comparative immunoblotting data of the calcium-binding proteins are shown in Figures 4-6. Dystrophic EOM showed a significant increase in CaM expression compared to its control (Fig. 4). In the *mdx* limb and DIA muscles, there was a trend for a decrease in CaM expression when compared to their respective control, but this was different ($p > 0.05$) only in TA. MLCK levels (Fig. 5) followed the same pattern obtained for CaM, i.e., significantly increased in dystrophic EOM and significantly decreased in TA. When compared to its respective control, dystrophic EOM showed increased expression of CSQ (Fig. 6; $p < 0.05$, compared to control). Dystrophic STN, DIA and SOL showed a significant decrease in CSQ ($p < 0.05$, compared to their controls).

DISCUSSION

Free intracellular calcium concentration is higher in muscle fibers from *mdx* mice compared to wild-type fibers (Gailly 2002; Whitehead et al. 2006). It is postulated that in the absence of dystrophin contraction leads to membrane tears or that a lack of dystrophin may cause abnormal calcium channel function (Franco and Lansman 1990; Vandebrouck et al. 2007), with a consequent rise in intracellular calcium followed by the loss of calcium homeostasis and the activation of degradative pathways that lead to muscle fiber necrosis (Turner et al. 1993). In *mdx* mice, abnormal calcium handling has been suggested to play a major role in the secondary steps leading to the chronic fiber necrosis (Khurana et al. 1995; Culligan et al. 2002; Dowling et al. 2004).

Calmodulin is one of the major cytosolic calcium buffers in muscle, and calcium-calmodulin interactions serves as regulators of calcineurin and calmodulin kinases (Olson and Williams 2000). We observed that the pattern of distribution and the levels of CaM and MLCK were not altered in dystrophic STN, SOL and DIA muscles. Since calmodulin is anchored to the dystrophin-glycoprotein complex through dystrophin (Anderson et al. 1996; Rando 2001), apparently the lack of dystrophin did not interfere with the location and expression of CaM, as it does with other proteins of the DGC (Ervasti 2007). Ca^{2+} /CaM-regulated factors, such as calcineurin/NFAT and PGC-1 α are known to be able to regulate the expression of utrophin in skeletal muscle (Angus et al. 2005). The normal levels of calmodulin observed in *mdx* STN, SOL and DIA fibers might be related to the presence of

utrophin in the extrajunctional sarcolemma, where it may replace dystrophin (Matsumura et al. 1992).

Myosin light chain phosphorylation by skeletal muscle MLCK is a biochemical mechanism for the physiological potentiation of twitch contractions by repetitive stimuli in fast-twitch skeletal muscles (Ryder et al. 2007). Ablation of the MLCK expression results in inhibition of myosin regulatory light chain phosphorylation in response to electrical stimulation (Zhi et al. 2005) and contractile alterations have been reported to occur in other dystrophic muscles (Kumar et al. 2004; Lowe et al. 2006). In the present, the *mdx* TA muscle showed a significant decrease of both CaM and MLCK. This suggests that TA muscle may have contractile dysfunctions in response to repetitive stimuli and that fiber-type composition, in addition to functional activity, may explain the different responses of dystrophic muscles regarding the calcium-binding proteins.

Histopathological data suggest that DIA, with an apparent increase in the inflammatory response, is the mostly affected muscle compared to STN, SOL and TA at this age. Although there was a trend for a decrease of CaM and MLCK in the dystrophic DIA, this was not significant and the levels of CaM and MLCK were comparable between DIA control and *mdx*. This suggests that CaM is not related to the worst phenotype of DIA and that other cytosolic calcium handling proteins, such as regucalcin (Doran et al. 2006), may be involved. Calcineurin is essential for muscle regeneration in *mdx* mice (Stupka et al. 2008). Differently from DMD, the *mdx* mice are able to regenerate and compensate for muscle degeneration. It could be possible that normal levels of CaM lead to normal calcineurin activity, which in turn contributes to muscle regeneration in the *mdx*. DMD

patients show decreased calcineurin activity in serum (Sundaram et al. 2007) and it would be interesting to verify the levels of CaM in these patients to further develop new therapeutic approaches more focused to this signaling pathway to promote muscle regeneration in DMD.

Calsequestrin is the most important calcium binding protein inside the sarcoplasmic reticulum. Previous report using total muscles extract demonstrated decreased CSQ expression in *mdx* skeletal muscles (Doran et al. 2004), although the 63-kDa fast CSQ isoform was comparable between normal and *mdx* gastrocnemius (Dowling et al. 2003), and a drastic reduction of calsequestrin-like proteins of 150 to 220 kDa had been reported in *mdx* leg muscle (Culligan et al. 2002). In the present, by studying extracts of individual muscles, we observed that CSQ levels were significantly reduced at most of the *mdx* muscles, including the most affected DIA. This is in agreement with the general concept that dystrophic fibers have an impairment of calcium-handling ability by the SR, possibly related to a decrease in CSQ expression. However, this impairment does not seem to correlate with intensity of pathology, since DIA, which is the most affected muscle, showed lower levels of CSQ reduction (about 20% of CSQ reduction) in comparison to the STN and SOL (about 30%-50% of CSQ reduction).

In the EOM muscles, CSQ, CaM and MLCK were significantly increased in the *mdx* mice, suggesting that these muscles may have a better cytosolic and SR calcium handling capacity, which is in agreement with previous report showing that EOM are more resistant to necrosis caused by pharmacologically elevated calcium levels (Khurana et al. 1995). Previously, no changes were observed in the 63-kDa CSQ expression in dystrophic

EOM and toe muscles, both spared, compared to normal muscles (Dowling et al. 2003). In the present, by using muscles extracts only from the spared dystrophic EOM, removing the retractor bulbi and elevator palpebrae, which are affected by the lack of dystrophy, we observed a significant increase in the levels of CSQ suggesting that EOM muscles also have a better sarcoplasmic reticulum ability to handle calcium.

The target inhibition of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ signaling lead to a significant reduction in A-utrophin and exacerbated the dystrophic phenotype in *mdx* soleus muscle (Chakkalakal et al. 2006). Immunoblotting studies have demonstrated increased utrophin expression in EOM (Khurana et al. 1991; Matsumura et al. 1992), being suggested that upregulation of utrophin protects the dystrophic EOM (Porter et al. 1998). Thus, in addition to promote a better cytosolic calcium homeostasis, the increased levels of CaM in the dystrophic EOM may guarantee an up-regulation of utrophin expression in these muscles, which in turn protects them against myonecrosis, as previously suggested. The up-regulation of utrophin can also promote changes in β -dystroglycan, which is also associated to the protection of dystrophic EOM and toe muscles (Dowling et al. 2003). Increased utrophin levels in dystrophic *mdx* muscle by L-arginine lead to relocalization of β -dystroglycan with utrophin to the membrane, with consequent improvement in muscle morphology and decreased serum CK levels in *mdx* mice (Voisin et al. 2005). Thus, the up-regulation of utrophin and β -dystroglycan in these muscles may be related to their CaM-calcineurin signaling activity, which could explain their protection.

In conclusion, the present study further supports the concept that abnormal Ca^{2+} -handling is involved in dystrophinopathies. Dystrophic extraocular muscles may be protected due to a better cytosolic and sarcoplasmic reticulum ability to handle changes in calcium concentration, through increased levels of calcium-binding proteins. Among non-spared dystrophic muscles, no correlation seems to exist between changes in calmodulin, calmodulin-kinase and calsequestrin and intensity of myopathy. Further studies of the signaling mechanisms involving Ca^{2+} -calmodulin activation in the *mdx*, possibly leading to restoration of the DGC in spared muscles or to muscle regeneration through calcineurin activity in the non-spared muscles, may be of importance to further develop new therapeutic strategies to dystrophinopathies.

Acknowledgments

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

LITERATURE CITED

Alderton JM, Steinhardt RA (2000) Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 275: 9452–9460

Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW (1996) Ca^{2+} -calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 271:6605-6610

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

Angus LM, Chakkalakal JV, Mejat A, Eibl JK, Belanger G, Megeney LA, Chin ER, Schaeffer L, Michel RN, Jasmin BJ (2005) Calcineurin/NFAT signaling, together with GABP and PGC-1 α , drives utrophin gene expression at the neuromuscular junction. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C908-C917

Bulfield G, Siller WG, Wigth PAL, Moore KJX (1984) Chromosome-like muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1189-1192

Chakkalakal JV, Michel SA, Chin ER, Michel RN, Jasmin BJ (2006) Targeted inhibition of Ca^{2+} /calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in mdx mouse muscle. *Human Molecular Genetics* 15:1423-1435

Culligan K, Banville N, Dowling P, Ohlendieck K (2002) Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic *mdx* muscle. *J Appl Physiol* 92: 435-445

Doran P, Dowling P, Donoghue P, Buffini M, Ohlendieck K (2006) Reduced expression of regucalcin in young and aged *mdx* diaphragm indicates abnormal cytosolic calcium handling in dystrophin-deficient muscle. *Biochem Biophys Acta* 1764: 773-785

Doran P, Dowling P, Lohan J, McDonnell K, Poetsch S, Ohlendieck K (2004) Subproteomics analysis of Ca^{2+} -binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem* 271: 3943-3952

Dowling P, Doran P, Ohlendieck K (2004) 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* 379: 479-488

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

Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH (1994) Muscular dystrophies. In Engel AG, Franzini-Armstrong C, ed. *Myology*. New York, McGraw-Hill, 1133-1187

Ervasti JM (2007) Dystrophin, its interaction with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochem Biophys Acta* 1772: 108-117

Franco Jr A, Lansman JB (1990) Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in *mdx* myotubes. *Nature* 344: 670-673

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

Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A (2008) Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 31:1–19

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

Khurana TS, Predergast RA, Alameddine HS, Tome FM, Farden M, Arahata K, Sugita H, Kunkel LM (1995) Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. *J Exp Med* 182: 467-474

Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tomé FMS, Fardeau M, Kaplan J-C, Kunkel LM (1991) Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1:185-194

Kumar A, Khandelwal N, Malya R, Reid MB, Boriek AM (2004) Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *FASEB J* 18:102–113

Lowe DA, Williams BO, Thomas DD, Grange RW (2006) Molecular and cellular contractile dysfunction of dystrophic muscle from young mice. *Muscle Nerve* 34: 92–100

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

Marques M. J., Ferretti R., Vomero V. U., Minatel E., Santo Neto H (2007a) Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 35:349-353

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

Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP (1992) Association of dystrophin-related protein with dystrophin associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 360: 588-591

McArdle A, Edwards RH, Jackson MJ (1994) Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient mdx mouse. *Muscle Nerve* 17:1378-1384

Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ (2003) Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. *Muscle Nerve* 28: 561-569

Olson EN, Williams RS (2000) Remodeling muscles with calcineurin. *Bioassays* 6: 510-519

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3710-3714

Porter JD, Baker RS (1996) Muscles of a different color: the unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology* 46:30-37

Porter JD, Rafael JA, Ragusa RJ, Brueckner JK, Trickett JI, Davies KE (1998) The sparing of extraocular muscle is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J Cell Sci* 111: 1801-1811

Rando TA (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24:1575-1594

Ryder JW, Lau KS, Kamm KE, Stull JT (2007) Enhanced skeletal muscle contraction with myosin light chain phosphorylation by a calmodulin-sensing kinase. *J Biol Chem* 282: 20447–20454

Sicinski YG, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science* 244: 1578-1580

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguirre HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT, Kelly AM (1991) The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352:536-539

Stupka N, Schertzer JD, Bassel-Duby R, Olson EN, Lynch GS (2008) Stimulation of calcineurin A alpha activity attenuates muscle pathophysiology in *mdx* dystrophic mice. *American J Physiol* 294: R983-R992

Sundaram JS, Rao VM, Meena AK, Anandaraj MPJS (2007) Decreased calcineurin activity in circulation of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Biochem* 40: 443-446

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

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

Turner PR, Schultz R, Ganguly B, Steinhardt RA (1993) Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in *mdx* muscle. *J Membr Biol* 133:243-251

Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Sebillé S, Kitzis A, Raymond G, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B (2007) Regulation of capacitative calcium entries by $\alpha 1$ -syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of $\alpha 1$ -syntrophin. *FASEB J* 21: 608-617

Voisin V, Sébrié C, Matecki S, Yu H, Gillet B, Ramonatxo M, Israël M, Porte S (2005) L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. *Neurobiol Dis* 20:123-130

Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG (2006) Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 657-662

Zhi G, Ryder JW, Huang J, Ding P, Chen Y, Zhao Y, Kamm KE, Stull JT (2005) Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. *PNAS* 102:17519–17524

Figure legends

Figure 1. Histological appearance of tibialis anterior (TA), diaphragm (DIA) and extraocular rectus (EOM) muscles. In A, control TA shows fibers with uniform diameter and peripheral nuclei. In dystrophic TA (B), central nucleated fibers (arrows), indicative of muscle degeneration-regeneration, are seen. The dystrophic DIA (C) shows areas of inflammatory reaction and fibers with central nuclei (asterisks). In D, EOM from *mdx* mice with no signs of muscle degeneration-regeneration.

Figure 2. Dystrophin (A-B) and calmodulin (C-F) immunofluorescence in control (CTRL; A, C, E) and dystrophic (MDX; B, D, F) muscles. While normal sarcolemmal labeling using dystrophin antibody is visible in control EOM rectus muscle (A), there is no detectable labeling in *mdx* rectus (B). Calmodulin showed a cytoplasmic pattern of distribution in EOM rectus (C, D) and tibialis anterior (E, F).

Figure 3. Immunofluorescence localization of calsequestrin in controls (CTRL; A, C, E) and dystrophic (MDX; B, D, F) EOM rectus (A, B), tibialis anterior (C, D) and soleus (E, F) muscles. Calsequestrin showed a cytoplasmic pattern of distribution in controls and dystrophic muscles.

Figure 4. Immunoblot analysis of calmodulin (CaM) expression in crude extracts of spared extraocular muscles (EOM), sternomastoid (STN), diaphragm (DIA), tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscles from control (Ctrl) and dystrophic (*mdx*) mice. A. Western blot of CaM. B. Same blot as A reprobed for GAPDH as a loading control. C. Levels of CaM expressed in percentage relative to CaM control value (100%). The asterisk (*) means significantly different from control at $p < 0.05$. Error bars, SD.

Figure 5. Immunoblot analysis of myosin light chain kinase (MLCK) expression in crude extracts of spared extraocular muscles (EOM), sternomastoid (STN), diaphragm (DIA), tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscles from control (Ctrl) and dystrophic (*mdx*) mice. A. Western blot of MLCK. B. Same blot as A reprobed for GAPDH as a loading control. C. Levels of MLCK expressed in percentage relative to MLCK control value (100%). The asterisk (*) means significantly different from control at $p < 0.05$. Error bars, SD.

Figure 6. Immunoblot analysis of calsequestrin (CSQ) expression in crude extracts of spared extraocular muscles (EOM), sternomastoid (STN), diaphragm (DIA), tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscles from control (Ctrl) and dystrophic (*mdx*) mice. A. Western blot of CSQ. B. Same blot as A reprobed for GAPDH as a loading control. C.

Levels of CSQ expressed in percentage relative to CSQ control value (100%). The asterisk (*) means significantly different from control at $p < 0.05$. Error bars, SD.

Table 1. Central nucleated fibers in C57Bl/10 (control) and mdx mice in spared EOM rectus (EOM rectus), sternomastoid (STN), tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and diaphragm (DIA) muscles.

	EOM rectus	STN	TA	SOL	DIA
Control	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1
mdx	0,5 ± 0,1	62,0 ± 1,5 ^a	51,0 ± 1,0 ^{a,b}	64,0 ± 1,5 ^a	60,0 ± 1,5 ^a

Values are expressed as the percentage (mean ± SD; n = 5 mice) of the total number of fibers of each muscle.

^a Significantly different from control mice within the same muscle group ($P < 0.05$, Student *t*-test).

^b Significantly different from the other muscles studied ($P < 0.05$, Student *t*-test).

Figure 1

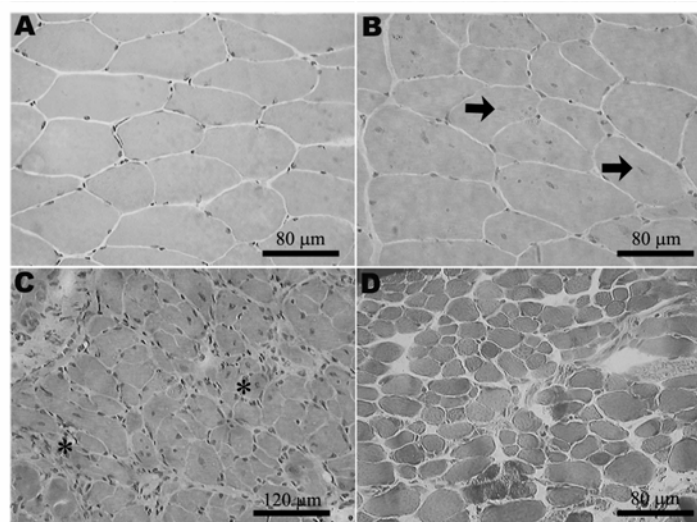


Figure 2

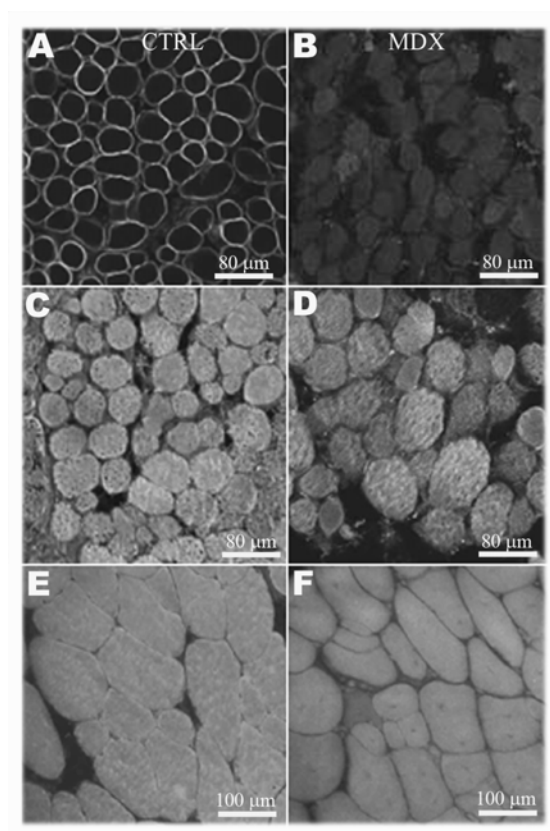


Figure 3

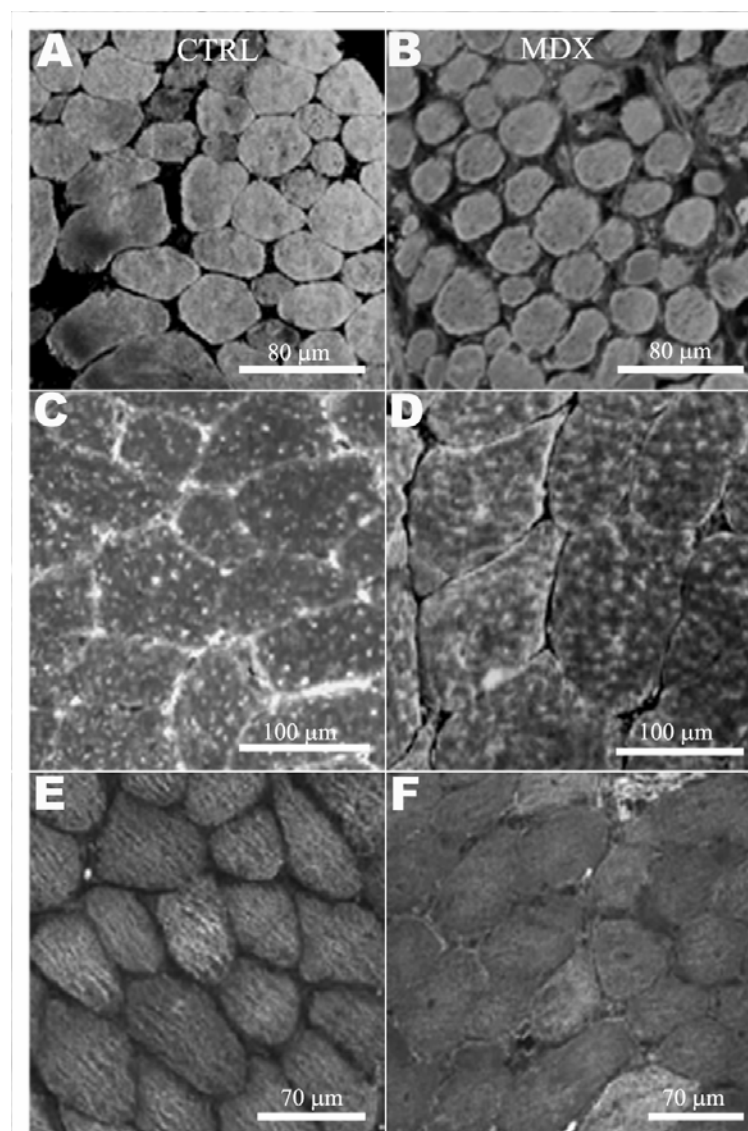


Figure 4 - Calmodulin

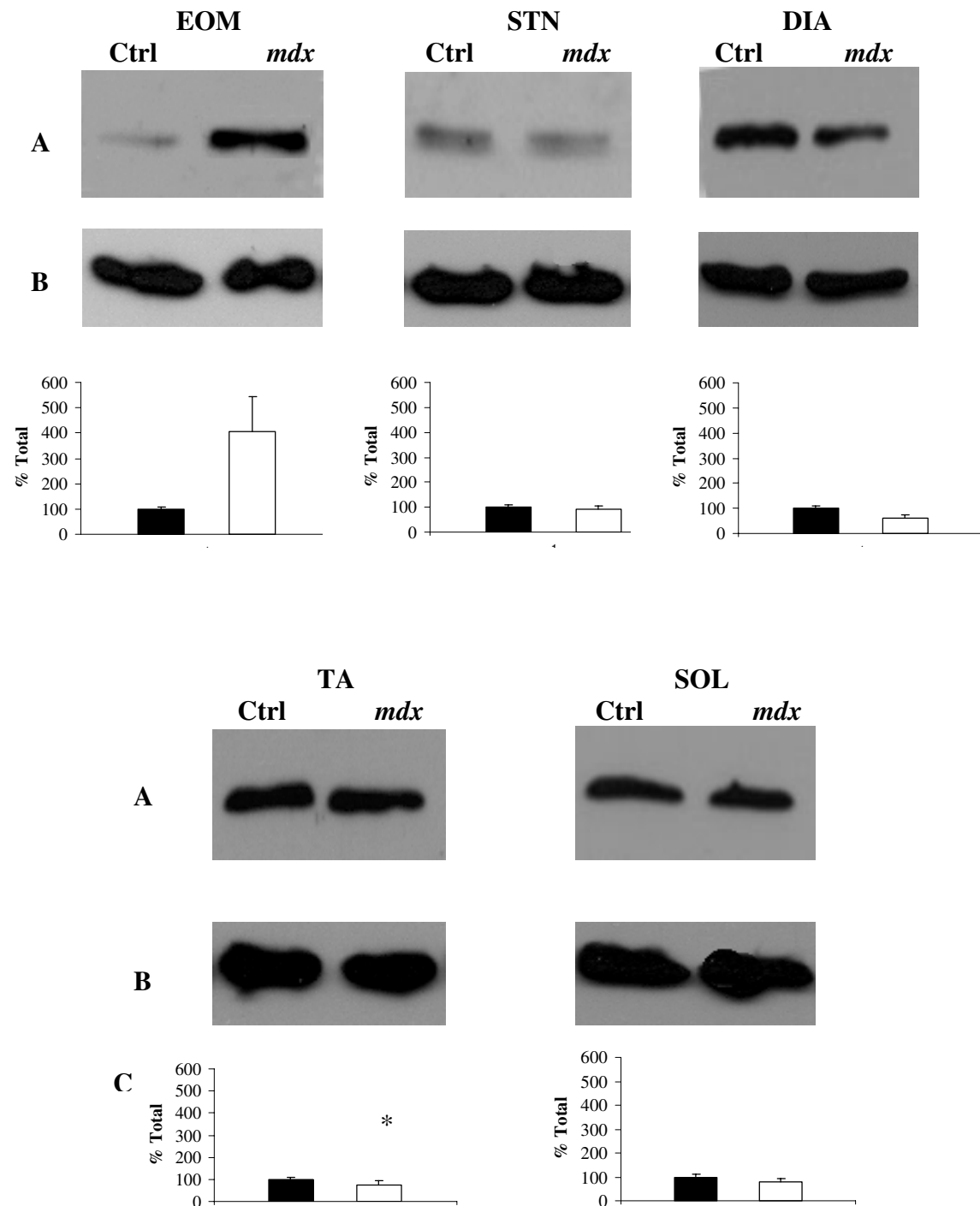


Figure 5 – MLCK

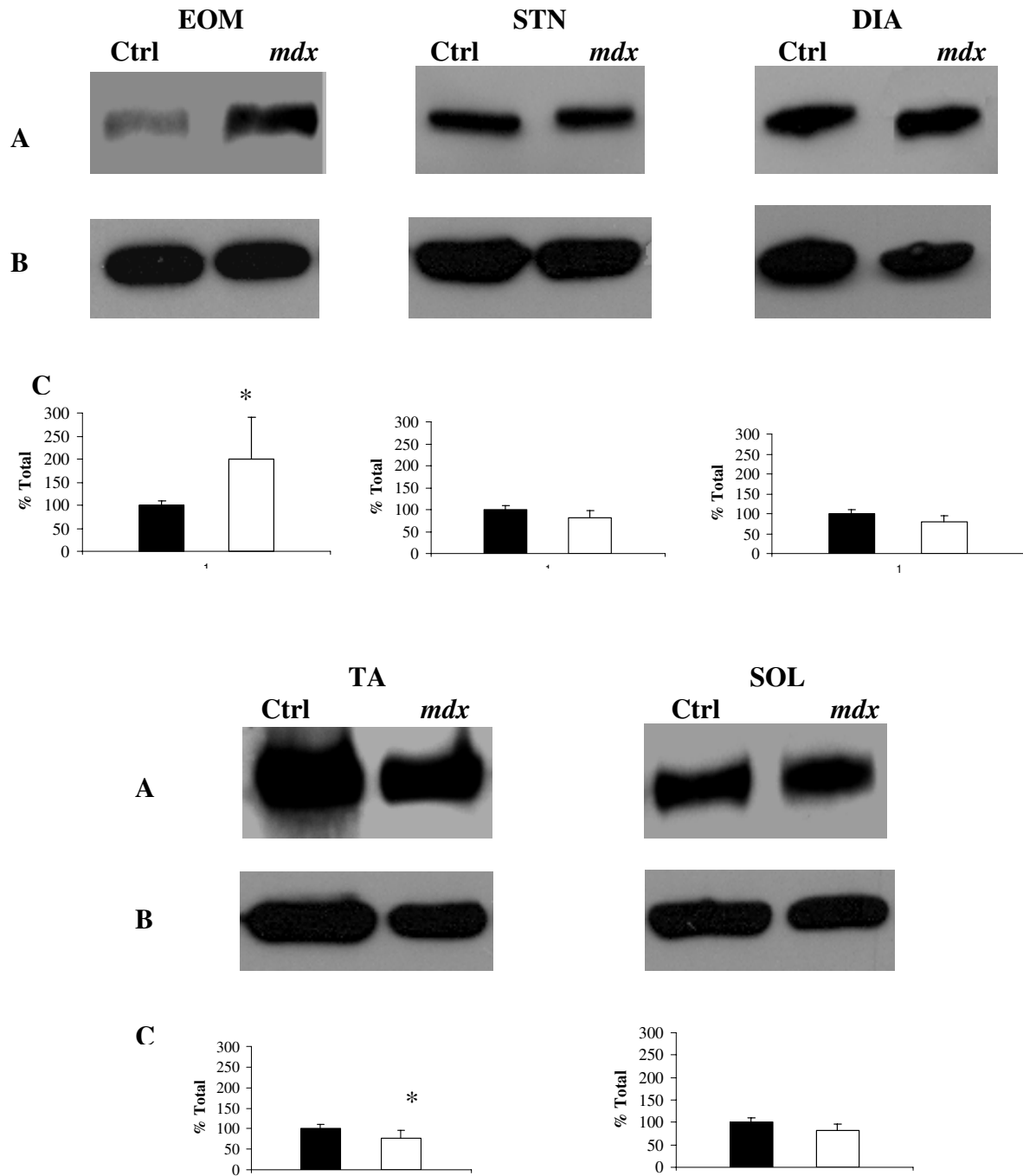
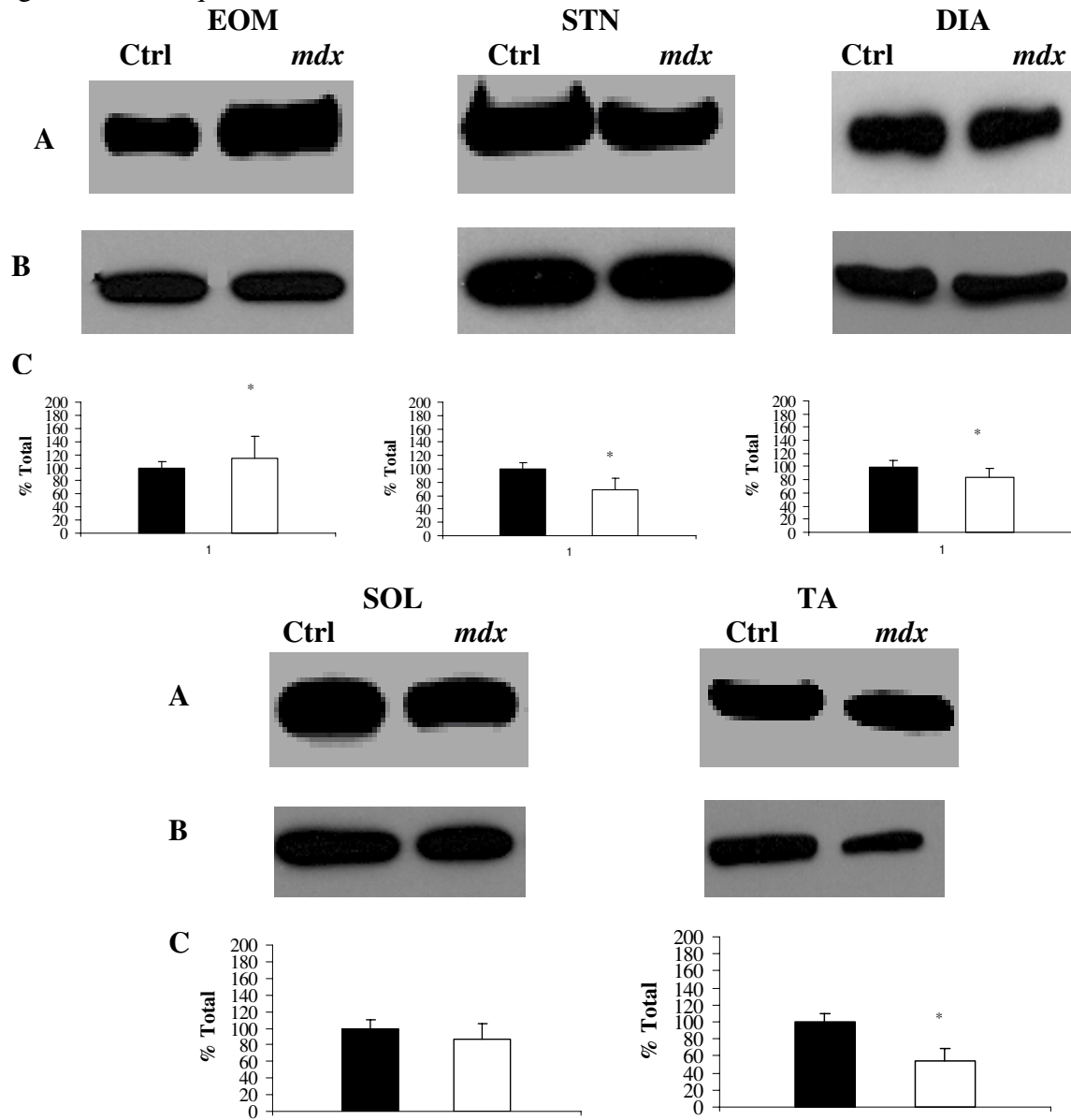


Figure 6 – Calsequestrin



ARTIGO SUBMETIDO – Journal Histochemistry & Cytochemistry

Title: Expression of calcium-binding proteins in dystrophin-deficient muscles of the mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy.

Authors: Maria Julia Marques, Adriana Pertille, Candida Luiza Carvalho, and Humberto Santo Neto

Dear Dr. Marques,

Thank you for submitting your manuscript to The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Please use the manuscript accession number JHC/2008/952325 in all future communications with us, so that we can quickly identify the paper.

To follow the progress of your paper please go to <<http://submit.jhc.org>> and log in to your Author Area. If you have not registered with Bench>Press before, please click on 'Create a new account', which is located towards the top of the window, to begin the registration process.

If you have any questions or comments, please contact us at johc@u.washington.edu.

Yours sincerely,
Christine Brushwood

JHC Editorial Office

Journal of Histochemistry & Cytochemistry

WEB: <http://www.jhc.org>

TEL: 206-616-5894

FAX: 206-616-5842

DECLARAÇÃO

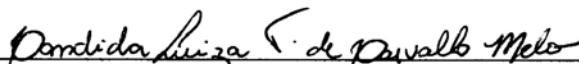
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada
“MECANISMOS DE PROTEÇÃO A MIONECROSE NOS MÚSCULOS EXTRA-
OCULARES DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *MDX*”.

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

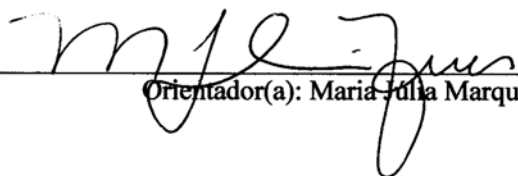
() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1175-1).

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



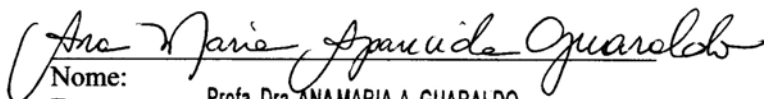
Aluno(a): Candida Luiza Tonizza de Carvalho Melo



Orientador(a): Maria Júlia Marques

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/IB - UNICAMP