

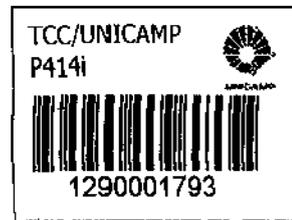


**“Influência da atividade física e potencial
efeito de agente farmacológico sobre
fibras musculares de camundongos
distróficos”**

Márcia Cristina Leite Pereira

CAMPINAS/2004

Márcia Cristina Leite Pereira

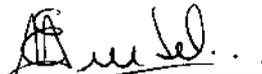


**“Influência da atividade física e potencial
efeito de agente farmacológico sobre
fibras musculares de camundongos
distróficos”**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Educação Física na modalidade de Treinamento em Esportes oferecido pela Faculdade de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas.

**Orientadora: Prof^a Dr^a Elaine Minatel
CAMPINAS, 2004.**

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Elaine Minatel (orientadora)

Prof.^a Dr Edison Duarte

Prof. Dr.^a Evanisi Teresa Palomari

Dedicatória

Dedico a **Deus**, por iluminar o meu caminho.

A minha mãe **Orminda** e minha irmã **Elaine**, pela presença, apoio e incentivo significativo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Elaine Minatel pela valiosa orientação, confiança, respeito e incentivo durante toda a realização do trabalho.

À Profª Drª Maria Júlia Marques e ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto, pelas sugestões dadas durante a realização deste trabalho e por permitir a realização deste no laboratório de Junção Neuromuscular.

Ao Prof Dr Edison Duarte, pela preciosa disposição em participar como membro titular da banca examinadora deste trabalho.

À Profª Drª Evanisi Teresa Palomari, pela disposição em participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Prof Dr Adilson Nascimento de Jesus, por orientar na disciplina de monografia.

Ao Prof Dr Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, chefe do Departamento de Anatomia, por possibilitar a realização deste trabalho no referido departamento.

Aos Srs Marco Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino, pela disposição em auxiliar os procedimentos experimentais.

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

À Sra Ana Floriano Rodrigues, pela atenção que dispensou durante a execução do trabalho de conclusão de curso.

À equipe do laboratório de Junção Neuromuscular pelo apoio e auxílio durante a execução deste trabalho.

A todos os colegas e funcionários do departamento de Anatomia que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Marcelo Vivan Borro pela paciência, contribuição e auxílio.

A Thais, Marcela, Karina e Raquel pela amizade e paciência, neste período.

À todos os colegas e funcionários da Faculdade de Educação Física que participaram da minha vida acadêmica durante esses quatro anos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1.0 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Distrofias Musculares.....	4
1.2 Distrofia Muscular De Duchenne (DMD).....	4
1.2.1 Aspectos Clínicos.....	4
1.2.2 Patogênese.....	5
1.3 Distrofina.....	5
1.4 Animais Distróficos.....	8
2.0- OBJETIVOS.....	12
3.0-MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1- Animais.....	15
3.2.1- Grupo mdx sedentário (mdx s).....	15
3.2.2- Grupo mdx sedentário + Cromolim (mdx s+c).....	15
3.2.3- Grupo mdx + exercício (mdx e).....	16
3.2.4- Grupo mdx + exercício + Cromolim (mdx e+c).....	16
3.3-Tratamento com Cromolim.....	16
3.4- Protocolo do Exercício.....	17
3.5- Procedimento cirúrgico para retirada do músculo.....	17
3.6 Seleção do material.....	19
3.7- Análise histológica.....	19
4.0 RESULTADOS.....	21
4.1 Grupo mdx sedentário.....	22
4.2 Grupo mdx sedentário+cromolim.....	22
4.3 Grupo mdx esteira.....	22
4.4 Grupo mdx esteira+cromolim.....	23
TABELAS.....	24
GRÁFICO.....	25
FIGURAS.....	26
5.0 DISCUSSÃO.....	27
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMO

A deficiência da expressão da distrofina, proteína associada à membrana sarcoplasmática, tem sido considerada como a principal causa da distrofia muscular de Duchenne. A ausência da distrofina alteraria a integridade estrutural do sarcolema ocasionando sua desestabilização, o que permitiria a entrada elevada de cálcio para dentro da fibra muscular, levando a sua degeneração. Estudos realizados com camundongos *mdx*, modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne, demonstraram que a degeneração muscular inicia-se ao redor do 20º dia de vida pós-natal. Sendo sugerido que o início da degeneração das fibras musculares seria em consequência do aumento normal da atividade muscular, neste período. Entretanto, esta hipótese não é totalmente aceita, pois há trabalhos que demonstram que exercícios voluntários diminuem a progressão da distrofia muscular. Assim sendo, no presente trabalho verificamos se o exercício físico contínuo realmente acelera o processo de degeneração das fibras musculares distróficas e se o tratamento com um estabilizador de membrana (Cromolim) protege os músculos dos animais distróficos. Para tanto, foram utilizados 20 camundongos da linhagem *mdx* divididos em 4 grupos: *mdx* s, *mdx* s+c, *mdx* e, *mdx* e+c. Os animais dos grupos *mdx* e e *mdx* e+c foram submetidos a 6 semanas de treinamento de exercício contínuo em esteira com duração de 30 minutos. Adicionalmente os animais tratados com Cromolim receberam a droga adicionada na água do bebedouro. Após 6 semanas de treinamento e tratamento com Cromolim os animais foram sacrificados e o músculo tibial anterior foi retirado e analisado morfologicamente. Nossos resultados demonstraram que a atividade física não acelera o processo de degeneração muscular nos camundongos distróficos e que o tratamento com o Cromolim não previne a degeneração muscular nos referidos animais.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe X-linked hereditary disease caused by the absence of functional dystrophin. In DMD muscle, the lack of dystrophin is accompanied by alterations in the dystrophin-glycoprotein complex (DGC). The alteration of the DGC leads to membrane fragility and loss of membrane integrity, resulting in degeneration of skeletal muscle. Dystrophin-deficient skeletal muscles of *mdx* mice undergo their first round of degeneration-regeneration at the age of 20-21 days post natal. A number of studies have suggested that this results from an increase in motor activity at weaning, however there is controversy. The purpose of this study was to use the mouse model of muscular dystrophy (*mdx*) to determine if the progression of the dystrophic phenotype in tibialis anterior muscle is associated with an increase in motor activity at the age of 20-21 days and if the treatment with Cromolyn sodium protects the dystrophic muscles. The *mdx* (both untreated and treated) mice belonging to exercise groups underwent a 30-min run on a horizontal treadmill at 10 cm/seg, five days a week, for 6 weeks. The results showed that exercise was not detrimental to dystrophin-deficient muscle and that Cromolyn sodium did not prevent muscle degeneration.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Distrofias Musculares

O termo distrofia muscular progressiva faz referência a um grupo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração progressiva da fibra muscular, sendo a distrofia muscular de Duchenne (DMD) a mais grave e comum dentre as distrofias (SWASH & SCHWARTZ, 1988).

1.2 Distrofia Muscular De Duchenne (DMD)

1.2.1 Aspectos Clínicos

A distrofia muscular de Duchenne foi primeiramente descrita por MERYON (1852) e DUCHENNE (1868) e é considerada a mais devastadora das distrofias musculares, afetando aproximadamente uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. Em média, 1 em 3 casos é resultado de uma mutação no óvulo da mãe ou da avó da criança (ENGEL *et al.*, 1994).

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. Os sinais clínicos, como fraqueza muscular manifestam-se inicialmente nos membros inferiores, onde posteriormente desenvolve-se pseudohipertrofia muscular caracterizada por fibrose intersticial e proliferação de tecido adiposo. Este fato cria dificuldades para a deambulação, manutenção da posição ortostática, e em levantar-se a partir da posição agachada. A degeneração muscular progride, resultando em intensa fraqueza de outros grupos musculares (ENGEL *et al.*, 1994).

No período correspondente à segunda década de vida, após a perda da capacidade de locomoção, há uma redução da massa muscular dos membros acompanhada de uma cifo-

escoliose pronunciada, seguida do comprometimento dos músculos respiratórios e cardíaco. Assim sendo, o óbito ocorre frequentemente por insuficiência respiratória ou cardíaca, ao redor dos 20 anos de idade (ENGEL *et al.*, 1994).

1.2.2 Patogênese

Acredita-se que a patogênese da DMD está relacionada com uma anormalidade da membrana da fibra muscular, a qual permite a saída de enzimas intracelulares e o ingresso de cálcio (LAPIDOS *et al.*, 2004; MAUNDER *et al.*, 1980). O acúmulo de cálcio é um fator importante na evolução da degeneração muscular (RUEGG *et al.*, 2002; EBASHI & SUGITA, 1979). Um aumento elevado na concentração de cálcio em biópsias de músculos de pacientes com DMD tem sido extensamente reportado (JACKSON *et al.*, 1985; MAUNDER *et al.*, 1980). Outras alterações histopatológicas importantes são múltiplos focos de necrose associados a intenso infiltrado inflamatório, fagocitose e regeneração parcial das fibras musculares (SEIXAS *et al.*, 1997).

Hoje sabe-se que a DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, sendo que as translocações e deleções detectadas neste foram observadas na banda I da região 2 do braço curto do cromossomo, denominada de banda Xp21. Essa banda apresenta uma sequência de nucleotídeos responsáveis pela expressão de uma proteína denominada distrofina. Devido ao tamanho e complexidade do gene, é bastante elevada a taxa de mutação, deleções ou duplicações (HOFFMAN, 1996). Isto resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (BIGGAR *et al.*, 2002; PETROF, 1998; SEIXAS *et al.*, 1997).

1.3 Distrofina

A distrofina é uma proteína de massa molecular relativa de 427 kDa, presente em músculos normais, mas deficiente em músculos distróficos (ENGEL *et al.*, 1994). O código de sequência para a expressão de distrofina é realizado por 79 exons, e comandada 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 a distrofina é bastante ativo nos músculos esqueléticos e cardíacos. A expressão da distrofina muscular é regulada de acordo com as etapas do desenvolvimento. Nos músculos fetais, a distrofina é detectada no sarcolema depois da nona semana de gestação, aumentando progressivamente sua expressão nas junções neuromusculares e miotendinosas, na superfície das membranas dos túbulos T e junto à diversas junções celulares (ENGEL *et al.*, 1994).

Quanto à organização molecular, a distrofina é um dímero antiparalelo associado a outras proteínas estruturais do sarcolema. O dímero de distrofina apresenta-se dividido em quatro domínios; o primeiro relacionado com a α -actina, o segundo ligado à espectrina, o terceiro à ancarina e o último à um complexo de proteínas unidas à laminina (ENGEL *et al.*, 1994).

A distrofina é encontrada principalmente na face citoplasmática do sarcolema, fazendo parte do citoesqueleto subsarcolemal, ligada aos miofilamentos da fibra muscular e a um complexo de glicoproteínas da membrana (SUNADA & CAMPBELL, 1995).

O complexo distrofina-glicoproteínas é constituído por proteínas sarcolemais e expresso em alta concentração no músculo estriado (ERVASTI & CAMPBELL, 1991; CAMPBELL & KAHL, 1989). Os componentes integrais deste complexo incluem: a distrofina, que liga-se à actina F (RYBAKOVA & ERVASTI, 1997; RYBAKOVA *et al.*, 1996; HOFFMAN *et al.*, 1987);

a α -dístroglicana e a β -dístroglicana, que encontram-se ligadas ao domínio G da laminina 2 e a uma parte da dístrofina mais rica em cisteína (JUNG *et al.*, 1995), respectivamente; as sintrofinas, proteínas intracelulares que ligam-se ao terminal C da dístrofina (YANG *et al.*, 1995); uma proteína que apresenta quatro domínios transmembrânicas, denominada de sarcospan (CROSBIE *et al.*, 1997); e as sarcoglicanas (NIGRO *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1996). O complexo de sarcoglicanas consiste de quatro proteínas transmembrânicas denominadas de α -sarcoglicana, β -sarcoglicana, γ -sarcoglicana, δ -sarcoglicana, as quais estão ligadas a β -dístroglicana (NIGRO *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1996; SUNADA & CAMPBELL, 1995). Em adição à laminina 2 e actina F há evidências de que a óxido nítrico sintase neuronal (BRENMAN *et al.*, 1995) e uma proteína chamada dístrobrevina (SADOULET-PUCCIO *et al.*, 1997; BLAKE *et al.*, 1996) também interagem com os componentes do complexo dístrofina-glicoproteínas (Figura 1).

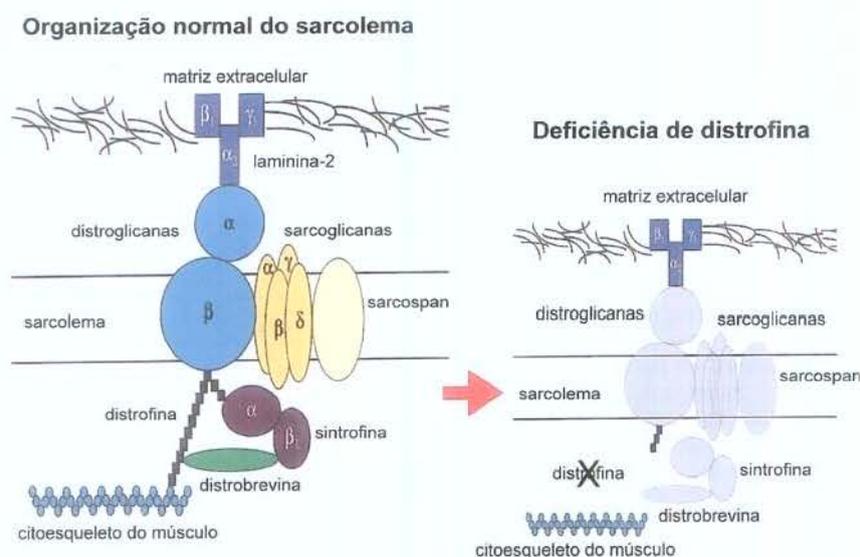


Figura 1. Esquema da organização do complexo dístrofina-glicoproteínas no sarcolema da fibra muscular. Adaptado de John Porter, *Microscopy Research and Technique*, 48, p.127-130, 2000.

O complexo distrofina-glicoproteínas confere a estabilidade da membrana da fibra muscular durante sua contração e relaxamento (ENGEL *et al.*, 1994). Portanto, a ausência de distrofina ou de outras proteínas integrantes do complexo alteraria a integridade estrutural do sarcolema (PASTERNAK *et al.*, 1995) levando a sua desestabilização. Acredita-se que essa desestabilização permitiria a saída de enzimas intracelulares e o ingresso de cálcio (RUEGG *et al.*, 2002; GAILLY, 2002; MAUNDER *et al.*, 1980). A entrada elevada de cálcio ativaria o sistema de contração muscular resultando em hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (para revisão vide BOGDANOVICH *et al.*, 2004; BIGGAR *et al.*, 2002; BLAKE *et al.*, 2002; RANDO, 2001; LEFAUCHEUR *et al.*, 1996; VATER *et al.*, 1995).

Após a fagocitose, parte das fibras degeneradas são substituídas por fibras musculares neoformadas às custas de processo regenerativo. A capacidade regenerativa, contudo, declina acentuadamente a partir de 3 anos de idade, quando então as fibras necróticas passam a ser substituídas por tecido fibro-adiposo. Quando este processo atinge os músculos da respiração, em especial o diafragma, uma grande parte dos pacientes vai a óbito por insuficiência respiratória (ENGEL *et al.*, 1994).

1.4 Animais Distróficos

Até o final da década de 80, o estudo da DMD estava restrito às análises de biópsias ou ao cultivo de células, sendo impossível uma observação experimental controlada da degeneração muscular. Entretanto, surge nesse período uma linhagem de camundongos mutantes originados da linhagem C57BL/10, denominados *mdx*, X chromosome-linked muscular dystrophy (BULFIELD *et al.*, 1984).

Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos *mdx* o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995). Esses camundongos apresentam deficiência na produção da distrofina nas suas fibras musculares, reproduzindo assim, as características das fibras musculares dos pacientes portadores de DMD (BULFIELD *et al.*, 1984; SICINSKI *et al.*, 1989). Face a isto, os camundongos distróficos são extensivamente utilizados como modelo experimental para investigação de diversos aspectos da DMD. Assim sendo, muito o que se sabe hoje sobre a fisiopatologia da doença deve-se aos estudos realizados com esses animais (BERWID *et al.*, 2004; VILQUIN *et al.*, 1998; BOCKHOLD *et al.*, 1998; ANDERSON *et al.*, 1998; IRINTCHEV *et al.*, 1997; LEFAUCHEUR *et al.*, 1995; PASTERNAK *et al.*, 1995; PASTORET & SEBILLE, 1995).

Apesar da ausência da distrofina ser um achado comum tanto nos pacientes portadores de DMD quanto nos camundongos *mdx*, ultraestruturalmente há algumas diferenças evidentes entre a patologia de cada um deles. Os camundongos *mdx* não apresentam fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos; machos e fêmeas são afetados e os músculos regeneram sucessivamente após necrose (CULLEN & JAROS, 1988).

Nos músculos de camundongos *mdx* os ciclos de degeneração/regeneração se iniciam efetivamente por volta dos 20 dias de idade. Estudos mostraram que no sétimo dia pós-nascimento os camundongos apresentam cerca de 0,62% das fibras musculares regeneradas. No décimo quarto e vigésimo primeiro dias, 2,2% e 5%, respectivamente, período caracterizado como estado pré-necrótico (MINATEL *et al.*, 2003; PORTER *et al.*, 2003). Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE *et al.*, 1986). O fato de que a degeneração muscular só é observada após o 20º dia de vida pós-natal, apesar dos camundongos *mdx* nascerem sem a proteína distrofina, levou alguns autores a sugerirem que a degeneração é consequência do aumento da atividade muscular neste período

(STEDMAN *et al.*, 1991; CULLEN & JAROS, 1988). Estudos utilizando vários tipos de exercício demonstraram que a atividade muscular promove lesões nas fibras musculares distróficas (BRUSSEE *et al.*, 1997; VILQUIN *et al.*, 1998; WELLER *et al.*, 1990). Adicionalmente, em músculo inativo por desnervação ou transecção da medula espinhal, não foram observados necrose e presença de núcleos centrais em suas fibras musculares (KARPATI *et al.*, 1988). Entretanto, a hipótese de que a atividade muscular promove lesões nas fibras musculares distróficas ainda não é totalmente aceita, pois há trabalhos que demonstram que exercícios voluntários diminuem a progressão da distrofia muscular (DUPONT-VERSTEEGDEN *et al.*, 1994; DUPONT-VERSTEEGDEN, 1996; HAYES & WILLIAMS, 1996).

Adicionalmente, têm-se relatado que o processo inflamatório, mediado por células polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos, possui papel fundamental no avanço da doença. No período pré-necrótico, além da presença de fibras regeneradas, observou-se também que este fenômeno ocorre ao mesmo tempo em que o número de mastócitos encontra-se elevado, quando comparado com músculos não distróficos (LEFAUCHEUR *et al.*, 1996). Nos pacientes com DMD, em presença de processo inflamatório intenso, observou-se que o número de mastócitos se encontrava elevado ao mesmo tempo em que os sintomas mostravam-se mais pronunciados (GOROSPE *et al.*, 1994a). Além disso, a injeção intramuscular direta de grânulos e/ou substâncias dos mastócitos promoveu prejuízo nos músculos do *mdx*, mas não em músculos normais, sugerindo que os músculos distróficos possuem sensibilidade aumentada aos produtos dos mastócitos (GOROSPE *et al.*, 1994b).

Em 1996, GRANCHELLI e colaboradores submetem camundongos adultos da linhagem *mdx* a estresse físico e tratamento diário com Cromolim (Intal® - Aventis) na tentativa de estabilizar a membrana plasmática de mastócitos, inibindo a liberação de histamina e leucotrienos

em órgãos alvo (GRANCHELLI *et al.*, 1996). O Cromolim é um agente antiinflamatório não hormonal que foi introduzido primeiramente para o tratamento da asma brônquica, na década de 60. Com o passar dos anos, evidenciou-se que também poderia ser utilizado no tratamento de outras patologias em que os mastócitos estivessem envolvidos, tal como as distrofias musculares (BERMAN, 1983). Através deste experimento, observou-se que embora os camundongos *mdx* apresentassem aumento significativo na força muscular, esta melhora funcional não foi acompanhada por uma diminuição significativa nos níveis da enzima triptase, a qual é liberada pela degranulação dos mastócitos. Sendo sugerido que o cromoglicato de sódio atuaria através de mecanismos desconhecidos, que não a estabilização dos mastócitos (GRANCHELLI *et al.*, 1996). Baseados neste trabalho levantam a hipótese de que o Cromolim poderia estabilizar a fibra muscular, impedindo a entrada de cálcio e com isso diminuir a degeneração muscular.

Se realmente o início da degeneração muscular é consequência do aumento da atividade física, conduzindo a uma maior concentração de cálcio para dentro da fibra muscular, uma vez que, a ausência de distrofina nas fibras distróficas altera a integridade do sarcolema, é possível que um agente estabilizador de membrana possa proteger os músculos dos pacientes distróficos das lesões provocadas pelo aumento da atividade física.

2.0- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Verificar se o exercício físico contínuo, realmente acelera o processo de degeneração das fibras musculares distróficas.

- Verificar se o tratamento com Cromolim, um estabilizador de membrana, diminui a degeneração muscular das fibras musculares dos camundongos *mdx* submetidos a exercício contínuo.

3.0-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados 20 camundongos de ambos os sexos da linhagem *mdx*, os quais foram adquiridos do 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*. Os referidos animais foram pesados semanalmente desde o início do experimento até o dia do sacrifício. Sendo que, os animais tratados com cromoglicato de sódio foram pesados diariamente.

3.2- Grupos Experimentais

3.2.1- Grupo *mdx* sedentário (*mdx s*)

Constituído de 5 animais com 21 dias de vida. Este grupo teve por objetivo verificar a presença e quantificar o número de fibras que apresentam núcleo central, indicativo de fibras musculares regeneradas, servindo de controle para o grupo submetido ao exercício.

3.2.2- Grupo *mdx* sedentário + Cromolim (*mdx s+c*)

Constituído de 5 animais com 21 dias de vida, tratados com cromoglicato de sódio adicionado à água do bebedouro por 6 semanas. Este grupo teve por objetivo verificar a presença e quantificar o número de fibras musculares regeneradas, indicadas pela presença de núcleo central, servindo de controle para o grupo submetido ao exercício e ao tratamento com Cromolim.

3.2.3- Grupo *mdx* + exercício (*mdx e*)

Constituído de 5 animais com 21 dias de vida, submetidos a treinamento de corrida contínua em esteira motorizada por 6 semanas. Este grupo teve por objetivo verificar a presença e quantificar o número de fibras musculares regeneradas, indicadas pela presença de núcleo central.

3.2.4- Grupo *mdx* + exercício + Cromolim (*mdx e+c*)

Constituído de 5 animais com 21 dias de vida, submetidos a períodos de treinamento de corrida contínua em esteira motorizada e tratados com Cromolim, adicionado à água do bebedouro por 6 semanas. Este grupo teve por objetivo verificar a presença e quantificar o número de fibras musculares regeneradas, indicadas pela presença de núcleo central.

3.3-Tratamento com Cromolim

O Cromolim (cromoglicato de sódio) foi sintetizado em 1965 como parte de uma tentativa de melhorar a atividade broncodilatadora de quelina, uma cromona (benzopirona) derivada da planta *Ammi visnaga*. Tem como efeito farmacológico inibir a secreção de histamina e de outros autacóides no pulmão humano durante respostas alérgicas mediadas por IgE. Acredita-se que atuam em mastócitos pulmonares, as células-alvo primárias na reação de hipersensibilidade imediata. Maior atenção tem sido focalizada na sua capacidade em reduzir o acúmulo intracelular de cálcio induzido por antígenos em mastócitos sensibilizados, sendo sugerido que o cromoglicato de sódio atua estabilizando a membrana celular, mais especificamente, bloqueando canais de cálcio (CHURCH, 1978; JOHNSON, 1978).

Em virtude dessa característica utilizamos o Cromolim como agente estabilizador de membrana. Para tanto, o grupo *mdx s+c* e o grupo *mdx e+c*, receberam a droga adicionada à água

do bebedouro na concentração 50 mg/kg/dia durante todo o experimento diariamente. Para realização de tal procedimento, os animais foram acompanhados diariamente uma semana antes do início do tratamento para avaliação da quantidade de água ingerida. Com base nesse dado, a droga foi diluída exatamente na quantidade de água que o animal consome diariamente.

3.4- Protocolo do Exercício

Os camundongos do grupo *mdx* e e os animais do grupo *mdx* e+c foram submetidos a períodos de 6 semanas de treinamento de corrida contínua, praticados 5 vezes por semana, sob uma esteira motorizada com uma velocidade de 10 cm/seg (ZEMAN *et al.*, 2000; GRANCHELLI *et al.*, 1996). As sessões de treinamento foram iniciadas com corridas de duração de 15 minutos e gradativamente aumentadas, alcançando por volta da terceira semana os 30 minutos de corrida contínua.

3.5- Procedimento cirúrgico para retirada do músculo

Após as 6 semanas de treinamento, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intra-peritonal (0,2 ml do anestésico, para cada 20 g de peso corporal) e perfundidos com 20 ml de solução tampão (PBS), pH 7,5.

O músculo tibial anterior direito e esquerdo foram retirados e fixados com formalina e submetidos a técnicas histológicas de rotina (inclusão em historesina) e corados com hematoxilina e eosina (HE), para posterior observação ao microscópio de luz.

Técnica de inclusão em historesina

A historesina é um meio de inclusão pertencente ao grupo das resinas poliméricas, as quais se constituem em massas sólidas através da ação de agentes polimerizantes.

O processamento do material incluiu as seguintes etapas:

Desidratação e inclusão

Os fragmentos previamente fixados foram lavados e imersos em etanol 70% e progressivamente desidratados em etanol 95%, etanol absoluto I e etanol absoluto II ficando imersos por 30 minutos em cada solução.

Após o último banho de etanol absoluto, os fragmentos foram transferidos para uma solução de etanol-resina por 3 horas sendo sequencialmente transferidos para a resina pura, onde permaneceram overnight.

Emblocamento

No momento do emblocamento, o material foi adicionado em formas diminutas à qual adicionou-se a resina polimerizador. A polimerização foi realizada a vácuo. A influência de temperaturas mais elevada acelera a polimerização, podendo utilizar-se deste recurso em alguns casos. Uma vez polimerizada a resina, os blocos foram retirados das formas.

Microtomia e coleta dos cortes

Para obtenção de cortes em historesina utilizou-se navalha de vidro em ângulo reto, a partir da qual foi possível obter-se cortes de 5 μm . Os cortes foram colocados em lâminas e a seguir corados.

Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina

Os cortes foram hidratados e corados em solução de hematoxilina por 15 minutos. Em seguida foram lavados em água corrente para retirar o excesso do corante. Sequencialmente, foram corados com eosina por 10 minutos. Novamente foram lavados em água destilada. A seguir realizou-se a desidratação e montagem dos cortes em verniz.

3.6 Seleção do material

O músculo selecionado para o desenvolvimento deste trabalho, conforme já citado, foi o músculo tibial anterior. A escolha do referido músculo deve-se não só ao fato deste já ser empregado nos experimentos desenvolvidos no laboratório de junção neuromuscular, onde este trabalho foi realizado (LUZ *et al.*, 2002), mas também por ser bastante utilizado nos experimentos que envolvem atividade física (LANG *et al.*, 2004; SACCO *et al.*, 1992) e por ser altamente susceptível a lesão provocada por aumento da atividade contráctil (DELORUSSO *et al.*, 2001).

3.7- Análise histológica

Os cortes histológicos (5 μm de espessura) foram observados em microscópio de luz e o parâmetro avaliado foi o número de fibras que apresentam núcleo central indicativo de fibras musculares regeneradas (TORRES & DUCHEN, 1987).

Para contagem da população de fibras foram selecionadas 2 secções do músculo tibial anterior de cada um dos animais empregados no experimento. A contagem foi obtida através de um retículo de cem pontos, acoplado a ocular do microscópio em objetiva de 40 X, com auxílio de um contador manual. Foram contadas todas as fibras do corte (fibras normais e regeneradas) para a estimativa da população total de fibras do músculo. Desta forma foi possível obter a porcentagem de fibras normais e regeneradas dos animais empregados no experimento. Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste 't de Student.

4.0 RESULTADOS

4.1 Grupo *mdx* sedentário

Após a pesagem semanal dos animais verificou-se um ganho significativo no peso desses, como mostra a Tabela 1.

Observamos que cerca de 25% das fibras musculares do músculo tibial anterior dos camundongos *mdx*, com aproximadamente 2 meses de vida, apresentavam núcleo central, indicativo de fibra muscular regenerada (ver Tabela 2 e Gráfico 1). As fibras regeneradas apresentaram diâmetros variados, núcleo central pequeno e hiper cromático e nucléolo proeminente (Fig. 1A). Observamos também grande quantidade de infiltrado de células inflamatórias (Fig. 1B).

4.2 Grupo *mdx* sedentário+cromolim

Após a pesagem semanal dos animais verificou-se um ganho significativo no peso desses, como mostra a Tabela 1.

Cerca de 23% das fibras musculares apresentavam núcleo central (ver Tabela 2 e Gráfico 1), caracterizadas da mesma forma que o grupo *mdx* sedentário.

4.3 Grupo *mdx* esteira

Verificou-se um ganho significativo no peso dos animais desse grupo durante o experimento (ver Tabela 1).

Verificamos 25% de fibras musculares regeneradas no músculo tibial anterior dos camundongos *mdx* submetidos ao treinamento em esteira (ver Tabela 2 e Gráfico 1). Estas fibras

apresentavam características semelhantes as fibras musculares dos grupos experimentais descritos anteriormente.

4.4 Grupo *mdx* esteira+cromolim.

Após análise estatística (Teste't de Student) verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) no peso desses animais em relação ao demais grupos experimentais. Esta diferença provavelmente deve-se ao fato desses animais já apresentarem um peso menor no início do tratamento em relação aos demais grupos. Embora exista esta diferença, observamos que durante todo o experimento houve um ganho significativo no peso desses animais (ver Tabela 1).

Verificamos que cerca de 23% das fibras musculares desse grupo apresentavam núcleo central indicativo de fibra muscular regenerada (ver Tabela 2 e Gráfico1), apresentando características semelhantes as fibras regeneradas dos grupos experimentais descritas anteriormente.

TABELAS

Tabela 1 – Média do peso (g) corpóreo dos animais distróficos nos diferentes grupos experimentais, desde o início do tratamento (21 dias pós-natal) até o dia do sacrifício (63 dias pós-natal).

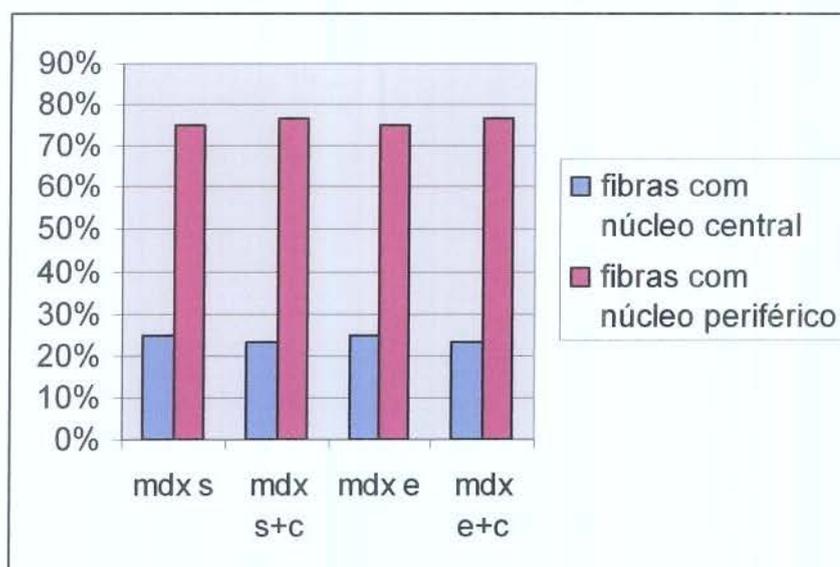
	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana	5ª Semana	6ª Semana
<i>mdx s</i>	9,00	12,00	17,20	22,00	26,00	28,87
<i>mdx s+c</i>	9,92	12,35	18,77	22,89	26,08	29,44
<i>mdx e</i>	9,70	11,99	13,09	16,86	20,21	22,05
<i>mdx e+c</i>	5,01	7,27	9,46	10,35	11,55	14,25

Tabela 2 – Média e desvio padrão das fibras musculares que apresentavam núcleo central e periférico nos 4 grupos experimentais.

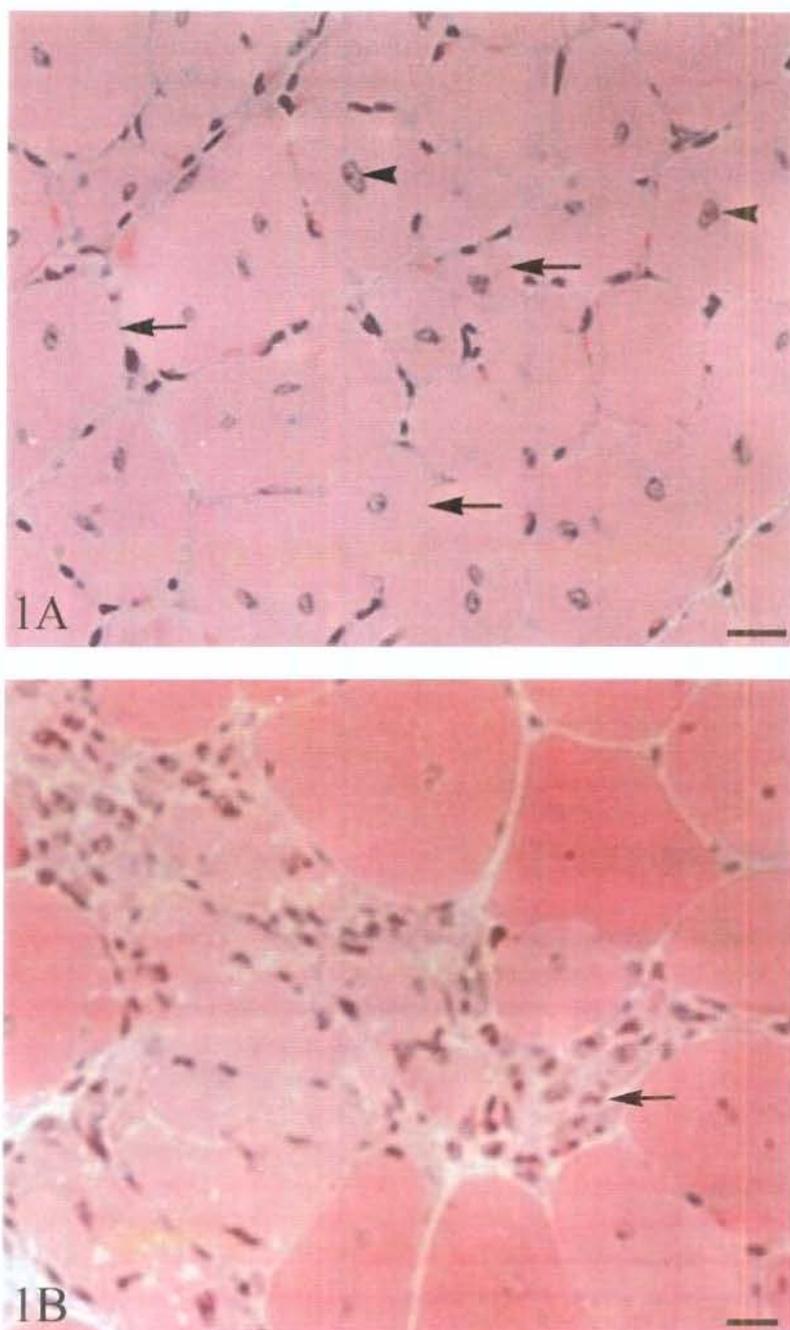
	Fibras com núcleo periférico	Fibras com núcleo central
<i>mdx s</i>	3175 ± 807,3	1014 ± 328
<i>mdx s+c</i>	3075 ± 952,5	899 ± 333
<i>mdx e</i>	3060 ± 875,4	900 ± 300
<i>mdx e+c</i>	2975 ± 782,0	851 ± 187

Após análise estatística (Teste't de Student) constatou-se que não há diferença significativa entre o número de fibras com núcleo central e periférico entre os diferentes grupos experimentais.

GRÁFICO 1 - Porcentagem de fibras musculares com núcleo centralizado e periférico determinadas no músculo tibial anterior de camundongos *mdx* nos diferentes grupos experimentais.



FIGURAS



Figuras 1A e B. Corte transversal do músculo tibial anterior do camundongo mdx. Observe em A fibras musculares regeneradas (setas), indicadas pela presença de núcleo central com nucléolo proeminente (cabeças de seta). Em B, observe a presença de infiltrado inflamatório (seta). Barra: 80 μ m.

5.0 DISCUSSÃO

A descoberta da distrofina e de seu gene permitiu um grande avanço no entendimento da base molecular da distrofia muscular de Duchenne (para revisão ver MARQUES, 2004). Apesar desse fato ter ocorrido há quase 20 anos (KOENIG *et al.*, 1987) ainda não há um tratamento definitivo para esta patologia. Muitos pesquisadores têm-se empregado no estudo da terapia genética (para revisão ver BOGDANOVICH *et al.*, 2004), porém ainda há um longo caminho a trilhar nessa direção. Ainda há uma demanda contínua de pacientes e clínicas médicas em busca de novas estratégias terapêuticas que diminuam os sintomas e melhorem a qualidade de vida dos pacientes distróficos (DUBOWITZ, 1997). Para avaliar algumas terapias, a utilização de animal modelo para essa patologia é fundamental. Nesse sentido o camundongo *mdx*, geneticamente e bioquimicamente homólogo a distrofia muscular de Duchenne, é o modelo animal mais utilizado para o estudo das distrofinopatias e pode prover uma plataforma experimental para testar drogas que poderão ser potencialmente úteis no tratamento dos pacientes distróficos. Além de ser valioso para experimentação de terapias celulares, genéticas e farmacológicas, o camundongo *mdx* também pode auxiliar nas controvérsias existentes quanto à realização de atividade física pelos pacientes distróficos.

A utilização de exercícios físicos como potencial estratégia de terapia para a distrofia muscular de Duchenne ainda é muito discutida. Estudos utilizando vários tipos de exercício demonstraram que a atividade muscular promove lesões nas fibras musculares distróficas (BRUSSEE *et al.*, 1997; VILQUIN *et al.*, 1998; WELLER *et al.*, 1990). Entretanto, outras pesquisas demonstraram que a atividade contrátil não excêntrica não é lesiva para o músculo distrófico (MOENS *et al.*, 1993; SACCO *et al.*, 1992; HEAD *et al.*, 1992; McARDLE *et al.*, 1991; SCOTT, *et al.*, 1990). Suportando esta idéia, estudo com animais *mdx* submetidos a períodos de natação de alta intensidade, demonstrou aumento da capacidade oxidativa e resistência à fadiga (HAYES *et al.*, 1993). Similarmente, exercícios de corrida voluntária de

longo tempo aumentaram a força do músculo diafragma dos camundongos *mdx*, sugerindo que exercícios de endurance leve podem ser útil como estratégia terapêutica da função pulmonar nos pacientes distróficos (DUPONT-VERSTEEGDEN *et al.*, 1994).

No presente estudo nossos resultados estão de acordo com as pesquisas que demonstram que exercícios aeróbicos não aceleram a progressão da distrofia muscular de Duchenne. Uma vez que, observamos por meio de análise morfológica que o exercício físico contínuo não acelera o processo de degeneração das fibras musculares distróficas. Adicionalmente, confirmando também nossos resultados, Carter e colaboradores em 2002, sugeriram que exercícios aeróbicos leves aumentam a força muscular e reduzem a degeneração muscular. Segundo este trabalho, exercícios de baixo impacto e alta repetição aumentam a capacidade oxidativa e a proporção de fibras oxidativas, especialmente em fibras de contração lenta. Além disso, pesquisas com pacientes com distrofia muscular progressiva lenta também demonstraram adaptação benéfica ao exercício aeróbico, similar ao observado nos animais distróficos (WRIGHT *et al.*, 1996).

Adicionalmente, em nosso experimento além de submeter os camundongos *mdx* à atividade física também avaliamos o potencial efeito de um agente farmacológico (Cromolim) no processo de degeneração das fibras musculares distróficas. Nossos resultados demonstram que não ocorreu uma diminuição significativa no número de fibras regeneradas, tanto no grupo *mdx* s+c quanto no grupo *mdx* e+c, indicando que o Cromolim não impediu a degeneração muscular nos animais distróficos. Assim sendo, o Cromolim provavelmente não tem efeito na estabilização da membrana muscular, como previamente sugerido.

Em conclusão, nós demonstramos que a atividade física não acelera o processo de degeneração muscular nos camundongos distróficos e que o tratamento com o Cromolim não previne a degeneração muscular nos referidos animais.

Finalmente, ressaltamos que este trabalho complementa e abre novas perspectivas para o maior conhecimento da biologia da fibra muscular distrófica, o qual é fundamental para o aprimoramento de novas técnicas terapêuticas para a distrofia muscular.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.E.; GARRETT, K.; MOOR, A.; MCINTOSH, L.; PENNER, K. Dystrophy and myogenesis in mdx diaphragm muscle. Muscle Nerve, v. 21, p. 1153-1165, 1998.

BERMAN, B.A. Cromolyn: past, present and future. Pediatr. Clin. North Am, v.30 (5), p. 915-930, 1983.

BERWID, S.J.; BURDZINSKA, A.; OSTASZEWSKI, R. Characteristic of select animal models of muscular dystrophies. Med. Weteryn, v.60(9), p. 906-910, 2004

BIGGAR, W.D.; KLAMUT, H.J.; DEMACIO, P.C.; STEVENS, D.J. RAY, P.N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. Clin. Orthop. Relat. Research, v.401, p. 88-106, 2002.

BLAKE, D.J.; TINSLEY, J.M.; DAVIES, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. Brain Pathol., v.6, p. 37-57, 1996.

BLAKE, D.J.; WEIR, A.; NEWAY, S.E.; DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiological Reviews, v.82, p. 291-329, 2002.

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

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: Current approaches and future directions. Journal of Molecular Medicine, v. 82, p. 102-115, 2004.

BRENNAN, J.E.; CHAO, D.S.; XIA, H.; ALDAPE, K.; BRETT, D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell, v.82, p. 743-752, 1995.

BRUSSE, V.; TARDIF, F.; TREMBLAY, J.P. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. Neuromuscular Disorders, v. 7, p. 487-492, 1997.

BUFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 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.

CHURCH, M.K. Cromoglycate- like anti-allergic drugs: a review. Medicaments Actualidad / Drugs of today, v. 14, p. 281-341, 1978.

CROSBIE, R.H.; HEIGHWAY, J.; VENZKE, D.P.; LEE, J.C.; CAMPBELL, K.P. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. J. Biol. Chem., v. 272, p. 31221- 31224, 1997.

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

DELORUSSO, C.; CRAWFORD, J.S.C.; BROOKS, S.V. Tibial anterior muscles in mdx mice are highly susceptible to contraction-induced injury. J. Muscle Research and Cell Motil. 22: 467-475, 2001.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E.; MC-CARTER, R.J.; KATZ, M.S. Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. Journal Applied Physiology, v. 77, n.4, p. 1736-1741, 1994.

DUBOWITZ, V. Report of 47 th ENMC International Workshop: treatment of muscular dystrophy. Neuromusc Disord. V.7, p. 261-267, 1997.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. Exercise and clenbuterol as strategies to decrease the progression of muscular dystrophy in mdx mice. Journal Applied Physiology, v.80, n.3, p. 734-741, 1996.

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.

ERBASHI, S.; SUGITA, H. The role of calcium in physiological and pathological processes of skeletal muscle. In: Aguayo AJ, Karpatis G, eds. Current topics in nerve and muscle research. Amsterdam: Excerpta Medica, ICS No v.445, p. 73-84, 1979.

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

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.

GOROSPE, J.R.M.; THARP, M.; DEMITSU, T.; HOFFMAN, E.P. Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. Neuromusc. Disord, v.4, p. 325-333, 1994a.

GOROSPE, J.R.M.; THARP, M.; HINCKLEY, J.; KORNEGAY, J.N.; HOFFMAN, E.P. A role for mast cells in progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs and mice. J. Neurol. Sci, v.122, p. 44-56, 1994b.

GRANCHELLI, J.A.; AVOSSO, D.L.; HUDECKI, M.S.; POLLINA, C. Cromolyn increases strength in exercised mdx mice. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, v.91, p. 287-296, 1996.

HAYES, A.; LYNCH, G.S.; WILLIAMS, D.A. The effects of endurance exercise on dystrophic *mdx* mice. I. Contractile and histochemical properties of intact muscle. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci, v.253, p. 19-25, 1993.

HAYES, A.; WILLIAMS, D.A. Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. Journal. Applied Physiology, v.80, n.2, p. 670-679, 1996.

HEAD, S.I.; WILLIAMS, D.A.; STEPHENSON, D.G. Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibers of dystrophic *mdx* mice. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci, v.248, p.163-169, 1992.

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

HOFFMAN, E.P. Clinical and histopathological features of abnormalities of dystrophin-based membrane cytoskeleton. Brain Pathol, v.6, p. 46-61, 1996.

IRINTCHEV, A.; ZWEYER, M.; WERNING, A. Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophy *mdx* mice. Neuromuscular Disorders, v.7, p. 117-125, 1997.

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.

JOHNSON, H.G. Specific inhibitors of mediator release and their modes of action. In: Immediate hypersensitivity: Modern concepts and Developments, New York: Marcel Dekker, p.566-577, 1978.

JUNG, D.; DUCLOS, F.; APOSTOL, B.; STRAUB, B.; LEE, J.C.; ALLAMAND, V.; BENZKE, D.P.; SUNADA, Y.; MOOMAW, C.R.; LEVEILLE, C.J.; SLAUGHTER, C.A.; CRAWFORD, T.O.; MCPHERSON, J.D.; CAMPBELL, K.P. Characterization of δ -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 β -dystroglycan. J. Biol. Chem, v.280, p. 27305-27310, 1995.

LANG, J.M.; ESSER, K.A.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. Altered activity of signaling pathways in diaphragm and tibialis anterior muscle of dystrophic mice. Exp. Biol. Med., v.229, p.503-511, 2004.

LAPIDOS, K.A.; KAKKAR, R.; McNALLY, E.M.; KASS, D. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. J. Am. Heart Association, v.94(8), p. 1023-1031, 2004.

LEFAUCHEUR, J.P.; GJATA, B.; SEBILLE, A. Factors inducing mast cell accumulation in skeletal muscle. Neuropath. Appl. Neurobiol, v.22, p. 248-255, 1996.

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

LUZ, M.A.; MARQUES, M.J.; NETO, H.S. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. Braz. J. Med. Biol. Res. 35(6): 691-695, 2002.

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

KOENIG, M.; HOFFMAN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MÔNACO, A.P.; FEENER, C.; KUNKEL, L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell, v.50, p. 509-517, 1987.

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

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

MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.T.; JACKSON, M.J. Effects of contractile activity on muscle damage in the dystrophin-deficient *mdx* mouse. Clin. Sci. Lond. V.80, p. 367-371, 1991.

MINATEL, E.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. Musc-Nery, v.28 (5), p. 561-569, 2003.

MOENS, P. BAASTSEN, P.H.W.W.; MARECHAL, G. Increased susceptibility of EDL muscles from *mdx* mice to damage induced by contractions with stretch. J. Muscle Res. Cell Motil. v.14, p.446-451, 1993.

NIGRO, V.; PILUSO, G.; BELSITO, A.; POLITANO, L.; PUCA, A.A.; PAPPARELLA, S.; ROSSI, E.; VIGLIETTO, 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 35 kDa glycoprotein. Hum. Mol. Genet., v.5, p. 1179-1186, 1996.

PASTERNAK, C.; WONG, S.; ELSON, E.L. Mechanical function of dystrophin muscle cells. J. Cell. Biol., v.128, n.3, p. 355-361, 1995.

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

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

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-deficient (mdx) mice. Hum Mol Genetics, v.12 (15), p. 1813-1821, 2003.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. Musc-Nerv, v.24: 1575-1594, 2001.

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

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 a lateral association. J. Biol. Chem, v.272, p. 28771-28778, 1997.

SACCO, P.; JONES, D.A.; DICK, J.R. T.; VRBOVA, G. Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle. Clin. Sci, v.82, p. 227-236, 1992.

SADOULET-PUCCIO, H.M.; RAJALA, M.; KUNKEL, L.M. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction trough coiled-coil motifs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.94, p. 12413-12418 1997.

SCOTT, O.M.; HYDE, S.A.; VRBOVA, G.; DUBOWITS, V. Therapeutic possibilities of chronic low frequency electrical stimulation in children with Duchenne muscular dystrophy. J. Neurol. Sci, V.95, p.171-182, 1990.

SEIXAS, S.L.; CÂNDIDO, J.L.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo *mdx* na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. Arq. Neuropsiquiatr, v.55(3-B):p. 610-617, 1997.

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

STEDMAN, H.H.; SWEENEY, H.L.; SHRAGER, J.B.; MAGUIRRE, H.C.; PANETTIERI, R.A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J.T.; KELLY, A.M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of duchenne muscular dystrophy. Nature, v.352, p. 536-539, 1991.

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.

SWASH, M.; SCHWARTS, M.S. Neuromuscular diseases: a practical approach to diagnosis and management. New York: Springer-Verlag, 1988. v.2. 456p. p. 273-296. ISBN 0354019505X.

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

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

VATER, R.; HARRIS, J.B.; ANDERSON, L.V.B.; ROBERDS, S.L.; CAMPBELL, K.P.; CULLEN, M. The expression of dystrophin-associated glycoproteins during skeletal muscle degeneration and regeneration. An immunofluorescence study. J. Neuropathol. Exp. Neurol., v.54 (4), p. 557-569, 1995

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

ZEMAN, R.J.; PENG, H.; DANON, J.M.; ETLINGER, J.D. Clenbuterol reduces degeneration of exercise or aged dystrophic (mdx) muscle. Muscle & Nerve, v.23, p. 521-528, 2000.

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.

WRIGHT, N.C.; KILMER, D.D.; MCCRORY, M.A. Aerobic walking in slowly progressive neuromuscular disease: Effect of a 12-week program. Arch Phys Med Rehabil, v.77, p. 64-9, 1996.

WELLER, B.; KARPATI, G.; GARPENTER, S. Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions. J. Neurol. Sci., v.100, p. 9-13, 1990.