Maria Denise Fernandes Carvalho

EFEITOS DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA DISTRÓFICA DO MODELO MURINO *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*

São Paulo

2009

Maria Denise Fernandes Carvalho

EFEITOS DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA DISTRÓFICA DO MODELO MURINO *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador(a): Profa. Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Denise

C 331e Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na evolução da doença distrófica do modelo Murino *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J* / Denise Carvalho . -- São Paulo : D. C., 2009.

207 p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, 2009.

1. Hormônio do Crescimento 2. Distrofia muscular 3. Citocina TGFbeta-1 4. Camundongos anões distróficos I.Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. II. Título.

LC QH 431

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos pacientes portadores de Distrofias Musculares. Razão principal e estímulo incansável à procura científica de uma terapia.

EPÍGRAFE

"Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida".

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus, aquele que faz a sua obra pelas mãos dos homens e que não privilegia os capacitados e sim capacita os privilegiados.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mayana Zatz, pelo exemplo de ciência e luta, oportunidade e suporte em seu laboratório para execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Paolo Bartolini pelas sugestões e apoio.

A Nanci Nascimento e Luiz Augusto Correa Passos pelos ensinamentos de como lidar com os camundongos.

A Profa. Dra. Mariz, pelas sugestões e ajudas.

Ao Prof. Dr. Krishnamurti Carvalho pelo carinho, sensibilidade e apoio científico farmacológico no momento certo.

Ao Prof. Dr. Rui Curi pelo apoio inestimável ao meu crescimento científico.

Aos colegas Carlos Roberto Bueno Junior, Raquel Fontenele, Mariane Secco, Marcos Valadares, Eder Zucconi, Miguel Mitne pelas sugestões e ajudas e aos demais colegas do laboratório.

Aos colegas Carlos Hermano e Kaio pelas inestimáveis sugestões.

Ao meu filho Davi Kurti M. Carvalho que com sua pouca idade, me aguardava todos os dias, sem ainda ter noção da grandeza que isso representava para nós.

A minha família, meu pai Krishnamurti, minha mãe Dóris e minhas irmãs Anna Elise, Isabella e Ellaine pelo incentivo e apoio constantes como prova de amor maior. Minha célula Mater. Ao meu cunhado Paulo Tarcio, continuação real da nossa família, pelo apoio e carinho sempre presentes. A tia Gisela (primeira pessoa que me mostrou o currículo da Dra. Mayana).

A amiga tia Sílvia Raquel de Mesquita Dummar.

Ao Manuel Ribeiro Junior pelo apoio certo no momento certo, com carinho e zelo.

À Mirian, Neide e a todos os amigos do IPEN.

À Constancia Gotto, Marta, Antônia Cerqueira, Roberto Rivelino, Sr. Walter, Sr. Siqueira, Sr.Carlos e todos os demais funcionários do Departamento de Genética e do Genoma.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

RESUMO

As distrofias musculares (DM) se caracterizam por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Dentre estas, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), constitui doença letal ligada ao cromossomo X, caracterizada pela ausência de distrofina na membrana das fibras musculares, afetando um em cada 3.000 meninos nascidos vivos, sendo que a maioria será confinada à cadeira de rodas a partir dos 6 anos de idade e com sobrevida, sem cuidados especiais, em torno dos 25. Apesar do uso de técnicas modernas de diagnóstico, ainda não existe tratamento eficaz para essas doenças. Alguns trabalhos das décadas de 70 e 80 sugeriram que a inibição do hormônio do crescimento (GH) poderia retardar a evolução do processo distrófico de pacientes com DMD. Entretanto, como essas observações não foram comprovadas cientificamente até a presente data, neste trabalho estudamos os efeitos do excesso e da inibição do GH na evolução do quadro distrófico em modelo murino de distrofia muscular: i) administrou-se GH (10µg/ camundongo/dia, i.p., por 10 dias) em camundongos: a) distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) com fenótipo, resultando na aceleração dos sintomas da doença, traduzida pela piora das performances de 17% no teste de deambulação (TD), 64% no teste de sustentação (TS), 28% no teste da esteira (TE) e 55% no teste de força máxima (TFM), em relação aos distróficos que não tomaram GH; apenas no teste de resistência à inclinação (TRI) não houve diferença significativa; entretanto, cortes histológicos do músculo gastrocnêmico desses camundongos, não mostraram alterações significativas em relação aos distróficos que não tomaram a droga; quanto aos marcadores de degeneração e regeneração (MDR) na musculatura desses animais, o GH não alterou os níveis de Pax7, MyoD, Laminina e Desmina, mas aumentou de 90% os níveis de TGFβ-1, uma citocina inflamatória que induz fibrose; b) já nos camundongos normais, o GH, ao contrário dos resultados acima, aumentou as performances de 13% no TD e de 28% TS, e ligeiramente, de forma não significativa, em outros dois testes; cortes histológicos revelaram que o GH aumentou de 16,5% a área de secção transversal dos músculos desses animais, o que poderia explicar os resultados descritos acima; já os níveis dos MDR, incluindo o de TGFβ-1, estavam semelhantes aos dos animais controles; ii) desenvolveu-se um novo modelo experimental resultante de cruzamentos de camundongos geneticamente deficientes em GH *(Ghrhr*^{lit}*)* com os distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), mostrando um retardo na evolução da doença: as performances dos anões distróficos em relação aos anões normais foram melhores que aquelas dos distróficos em relação aos animais normais, ou sejam, 14% maior TD, 71% maior no TS, 18% maior no TE, 5,5% maior no TRI e 102% maior no TFM; cortes histológicos mostraram que a área do interstício nos músculos dos anões distróficos foi 29% menor que a dos distróficos não anões; os níveis de TGFβ-1 nestes animais, foram os únicos entre aqueles dos MDR estudados, que encontravam-se diminuidos de 36% em relação àqueles dos distróficos não anões; iii) a inibição da liberação do GH pela octreatida, análogo da somatostatina, mostrou também uma relativa melhora ou uma estabilização na evolução do quadro distrófico, traduzido pelo aumento, após 60 dias de tratamento, das performances nos testes funcionais da musculatura em relação àquelas dos animais distróficos sem tratamento: foi 12% maior no TD enquanto os distróficos controles diminuíram em 14%; foi 27% maior no teste de Rota Rod, enquanto os distróficos controles diminuíram em 32%; mantiveram a mesma performance no TE, enquanto os distróficos controles pioraram em 23%, e foram 29% maiores no TS, e 43% no teste de força de preensão, enquanto os distróficos controles não melhoram as suas performances nestes testes. Esses resultados sugerem um efeito patológico do GH na musculatura distrófica, com seu excesso levando a uma piora da doença, possivelmente através do aumento dos níveis de TGFβ-1. A diminuição do GH, consequentemente, poderia levar a um retardo da evolução da doença. Estes estudos experimentais abrem perspectivas bastante promissoras para se testar inibição dos efeitos do GH na evolução das doenças distróficas humanas.

ABSTRACT

ABSTRACT

Muscular dystrophies (DM) are characterized by progressive and irrevertible degeneration of the skeleton muscles. Among them, Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) consitutes lethal disease linked to chromossome X, distinguished by the absence of dystrophyn in the muscular fibers membrane, affecting one in each 3,000 boys born alive, who, most of them, will be confined to wheel chairs since the age of 6 and with life expectance, without special care, of 25 years. Despite modern diagnosis techniques, there is not an efficient treatment for these diseases. Some works from the 1970´s and 1980´s suggested that the inhibition of the growth hormone (GH) could retard the dystrophy process evolution in DMD patients. Nevertheless since this observation has not been proven scientifically, in the present work, the GH excess and inhibition effects on a murino model of muscular dystrophy, were studied: i) GH (10µg/mouse/day, i.p., for 10 days) was given to mice: a) dystrophic *dy/dy* (B6.WK-*Lama*^{2dy}-^{2J}/J), with phenotype , resulting in the acceleration of the disease symptoms, confirmed by the performance worsening by 17% in the deambulation test (DT), 64% in the sustaining test (S), 28% in the mat test and 55% in the maximum strength test (MST), in relation to dystrophic mice which had not taken GH; only in the inclination resistance test (IRT) there was no significant difference; however, histological cuts of the gastrocnemius muscle of these mice did not show significant alterations, comparing to dystrophic mice which had not taken the drug: as to degeneration and regeneration markers (DRM) in these animals muscles, the GH did not alter Pax7, MyoD. Laminin and Desmin levels, although it increased by 90% the TGFβ-1 levels, an inflammatory cytokine, that induces fibrosis b) in normal mice, the GH, opposite to the results above, increased the performances by 13% in the DT and by 28% in the ST, and slightly, not significantly, in other two tests; histological cuts revealed that the GH increased by 16.5% the transversal section area of these animals muscles, what could explain the results described above; as to the MDR levels, including those of the TGFβ-1, they were similar to the control animals; ii) a new experimental model, resulting from the crossing of GH genetically deficient mice (*Ghrth*^{lit}) with dystrophic *dy/dy* (*B6.WK-Lama*^{2dy}-^{2J} /J), showing retardation in the disease evolution; the performances of the dystrophic dwarfs, compared to the normal dwarfs, were better than those of the dystrophic compared to normal animals, namely, 14% larger DT, 71% superior in the ST, 18% larger in the MT, 5.5% larger in the IRT and 102% superior in the MST; histological cuts showed that the interstice area in the dystrophic dwarfs muscles was 29% smaller than that of non-dwarfs dystrophic; the TGFβ-1 levels in these animals were the only MDR studied, which were found to be diminished by 36%, compared to those of the non-dwarfs dystrophic; the GH release inhibition by octreotide, somatostatin analogous, also showed a relative improvement or stabilization in the dystrophy evolution, demonstrated by the increase, ater 60 days treatment, of the performances in the muscle functional tests, compared to those of the dystrophic animals, without treatment: it was 12% larger in the DT, while the control dystrophic animals worsened by 32%; they maintained the same performance in the ST, and 43% in the seizing strength test, while the control dystrophic did not improve their performances in these tests. These results suggest a GH pathologic effect, possibly through the TGFβ-1 levels increase. The GH diminishing, consequently, could lead to the retardation in the disease evolution. These experimental studies open promissing perspectives to test the GH effects inhibition in human dystrophic diseases evolution.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 01: Interações de IGF-I com diferentes IGFBPs nas células musculares----------015

Tabela 02: Superfamília TGFbeta ----------029

Gráfico 01: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2Dy-2J/J*) antes e depois da administração de GH(**)----------058

Gráfico 02: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2Dy-2J/J*) antes e depois da administração de GH(**)----------059

Gráfico 03: Teste da esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2Dy-2J/J*) antes e depois da administração de GH(**)----------061

Gráfico 04: Teste de força máxima nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2Dy -2J/J*) antes e depois da administração de GH(**)----------063

Gráfico 05: Teste de resistência a inclinação nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2Dy-2J/J*) antes e depois da administração de GH(**)----------064

Gráfico 06: Área da secção transversa do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados

GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**067**

Gráfico 07: Área do interstício em % no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**068**

Gráfico 08: Número de fibras com núcleo central no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**070**

Gráfico 09: Conteúdo do Pax7 no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**072**

Gráfico 10: Conteúdo do MyoD no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**073**

Gráfico 11: Conteúdo da Laminina no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**075**

Gráfico 12: Conteúdo da Desmina no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$----------**076**

Gráfico 13: Conteúdo do TGFβ-1 no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH$^{(**)}$ e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH$^{(**)}$**----------078**

Gráfico 14: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------083**

Gráfico 15: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------084**

Gráfico 16: Teste de inclinação nos camundongos C57Black6: controles, distróficos (dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J), anões (little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J) e anões distróficos (little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J) x (dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J). **----------085**

Gráfico 17: Teste de esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------087**

Gráfico 18: Teste de força máxima sob eletroestimulação do nervo ciático nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------089**

Gráfico 19: Área de secção transversa do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------092**

Gráfico 20: Área do interstício em % do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------093**

Gráfico 21: Número de fibras com núcleo central no músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------095**

Gráfico 22: Conteúdo do Pax7 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------098**

Gráfico 23: Conteúdo do MyoD no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. **----------099**

Gráfico 24: Conteúdo da Laminina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. ----------**100**

Gráfico 25: Conteúdo da Desmina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*. ----------**103**

Gráfico 26: Conteúdo do TGFβ-1 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)*, anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J)* ----------**104**

Gráfico 27: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida $^{(***)}$----------**106**

Gráfico 28: Teste da esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida $^{(***)}$----------**109**

Gráfico 29: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida $^{(***)}$----------**110**

Gráfico 30: Teste de força de preensão nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)----------**111**

Gráfico 31: Teste de Rota rod nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)----------**113**

Gráfico 32: Teste de resistência à inclinação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)----------**114**

Gráfico 33: Medidas dos pesos nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)----------**116**

Gráfico 34: Medidas dos comprimentos nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)----------**118**

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complexo de proteínas associadas a distrofina e laminina e doenças relacionadas **----------003**

Figura 2: Exemplos de quatro modelos de camundongos para doenças neuromusculares mostrando suas respectivas alterações histopatológicas no músculo ressaltando aqui o modelo Dy^{2J}/ Dy^{2J}**----------010**

Figura 03: Musculatura esquelética com micrografia eletrônica e representação esquemática de um sarcômero, a unidade básica de contração do músculo esquelético**----------012**

Figura 04: Coloração hematoxilina-eosina (HE); músculo distrófico humano (400X); lesões musculares primárias em vermelho em contraste às secundárias**----------012**

Figura 05: Modelo de ativação de GHR**----------016**

Figura 06: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos**---------017**

Figura 07: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos via IGF-I**----------017**

Figura 08: Vias ativadas pela ligação do IGF-I no receptor do músculo esquelético Modificado**----------020**

Figura 09: Genes de desenvolvimento muscular: regeneração**----------023**

Figura 10: Mecanismo de ação de TGFβ**----------028**

Figura 11: Resumo simplificado da coordenação entre a inflamação e regeneração crucial para recuperação muscular após injúria**----------030**

Figura 12: Representação da octreotida, um análogo sintético da Somatostatina**----------036**

Figura 13: Sequenciamento do DNA dos camundongos *little.* O DNA genômico foi extraído do rabo dos camundongos e amplificado por PCR. Os amplicons gerados foram submetidos a seqüenciamento. A seta indica a presença da mutação (GGT) de troca de base (A→G)----------044

Figura 14: Genotipagem dos Camundongos *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*. O DNA genômico foi extraído do rabo dos camundongos e amplificado por PCR. Os amplicons gerados foram digeridos com a enzima *NdeI*, capaz de reconhecer o sítio mutado no gene da laminina, submetido à eletroforese e visualizado após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo. As bandas selvagem e mutante são indicadas com as setas. ----------045

Figura 15: Teste de deambulação----------048

Figura 16: Teste de resistência à inclinação----------048

Figura 17: Teste de sustentação----------049

Figura 18: Teste de corrida em esteira rolante----------050

Figura 19: Teste de eletroestimulação----------052

Figura 20: Teste de preensão palmar (Grip) ----------053

Figura 21: : Rotarod----------053

Figura 22: Histologia do gastrocnêmio para análise: da área das fibras musculares, da área do insterstício e da proporção de fibras musculares com a presença de núcleos centrais. Histologia do Músculo em HE (Hematoxilina-Eosina) a) Controle b) Controle com GH$^{(***)}$ c) Distrófico d) Distrófico com GH$^{(***)}$----------065

Figura 23: Camundongos *C57Black6:* a) anão/distrófico (duplo homozigoto) b) anão c) controle----------080

Figura 24: Camundongos *C57Black6*: a) anão/distrófico (duplo homozigoto) b) controle c) distrófico----------**080**

Figura 25: Histologia do gastrocnêmio para análise: da área das fibras musculares, da área do insterstício e da proporção de fibras musculares com a presença de núcleos centrais. Histologia do Músculo em HE (Hematoxilina-Eosina) a) Anão b) Anão Distrófico c) Controle d) Distrófico----------**090**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de Siglas e Abreviaturas

Bcl-2 *B-cell lymphoma 2*

BMP proteínas morfogenéticas do osso

C57black6 camundongo normal (controle)

cDNA DNA codificante total

CMD distrofia muscular congênita

C – terminal região carboxi terminal

CS células satélites

CT células-tronco

DGC complexo de glicoproteínas associadas a distrofina

DL_{50} dose letal média

DMB distrofia muscular de becker

DMD distrofia muscular de duchenne

DMP distrofia muscular progressiva

DNA acido desoxirribonucléico

dNTP dinucleotídeo

***dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J)** camundongos distróficos com fraqueza evidente

FGF fator de crescimento de Fibroblastos

GEP sistema endócrino gastro-entero-pancreático

GDF fatores de diferenciação e crescimento

GH hormônio do crescimento

GH1	gene do hormônio do crescimento
GHBP	GH *binding protein*
GHR	receptor do hormônio do crescimento
GHRH	hormônio liberador de GH
GHRIH	hormônio inibitório da liberação do GH
HE	coloração hematoxilina-eosina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HLH	família protéica *helix-loop-helix*
IGF-I e IGF-2	fatores de crescimento insulina-*like* I e II
IL-6	interleucina 6
i.p.	injeção intra-peritoneal
JAK	*janus kinase 2*
l/kg	litros por quilo
Litlit (Ghrhr^{lit})	camundongo anão
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
MAPKs/ERK	cascata de quinases ativadas por mitógenos
MB	megabases
Mdx	camundongos distróficos sem fraqueza evidente
mg/kg	miligramas por quilo
mg/ml	miligramas por mililitros
ml/min	mililitros por minutos

MPC	células precursoras musculares
mRNA	RNA mensageiro
Myf4	miogenina
Myf5	proteína chave na diferenciação muscular
MyoD	antígeno de diferenciação miogênico
ng/mL	nanogramas por mililitros
N – terminal	região amino terminal
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
Pax7	*paired box transcription factor* 7
PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação da polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PEG-hGH G120K	pegvisomante
PKB	*protein kinase* B
rhIGF-1	fator de crescimento humano recombinante insulina-*like* I
RNA	ácido ribonucléico
R-SMAD	*receptor regulated Smads*
STAT	*Signal Transducers and Activators of Transcription protein*
s.c	injeção subcutânea
TBE	tampão tris-borato EDTA
TGF-β1	fator de crescimento transformador β

TNF	fator de necrose tumoral
TSH	hormônio estimulante da tireóide
Xp21	braço curto do cromossomo X

SUMÁRIO

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO---------- 001

I.1 Distrofias Musculares---------- 001

I.1.1 A Organização Molecular da Proteína Laminina----------004

I.1.2 Mutações em CMD----------005

I.2 Modelos murinos de distrofia muscular----------006

I.2.1 Camundongo *mdx* (*C57BL/10ScSn-Dmd*^{mdx}*/J*) ----------006

I.2.2 Camundongo *dy/dy* (*B6.WK- Lama2*$^{dy\text{-}2J}$*/J*) ----------008

I.3 Músculo e GH----------013

I.3.1 GH----------013

I.3.1.1 Produção e Liberação do GH ----------013

I.3.1.2 Mecanismo de Ação do GH e Estrutura do Receptor (GHR) --------015

I.3.1.3 Genética do GH----------018

I.3.1.4 Eixo GH/IGF-I ----------018

I.3.1.5 GH e seu papel no músculo esquelético----------019

I.4 Processo de degeneração–regeneração muscular----------021

I.4.1 Fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na regeneração e diferenciação muscular----------023

I.4.2 TGFβ-1----------025

I.5. Deficiência de GH----------032

1.5.1 Inibidores do GH----------032

1.5.1.1 Pegvisomante----------033

1.5.1.2 Sandostatina: derivado sintético da Somatostatina e inibidor da liberação do GH ----------034

1.5.1.2.1 Farmacodinâmica da droga----------036

1.5.1.2.2 Farmacocinética ----------037

1.5.1.2.3 Dados de Segurança pré-clínicos----------037

1.5.1.2.4 Principais Indicações ----------039

1.5.2 Modelo Animal de deficiência de GH: Camundongo *little (Ghrhr^{lit})*-039

II – JUSTIFICATIVA----------040

III – OBJETIVOS ----------041

IV – METODOLOGIA----------042

IV.1 Animais ----------042

IV.1.1 Considerações Éticas----------042

IV.1.2 Estabelecimento de Linhagens Animais----------042

IV.1.3 Genotipagem dos camundongos ----------043

IV.1.3.1 Genotipagem dos camundongos *little/little* ----------043

IV.1.3.2 Genotipagem dos camundongos B6.WF-Lama 2dy2J----------044

IV.1.4 Alojamento----------045

IV.1.5 Acasalamentos programados----------046

IV.1.5.1 Resumo dos esquemas de acasalamento ----------046

IV.1.6 Avaliação Funcional ----------046

IV.1.6.1 Testes comportamentais e funcionais da musculatura esquelética apendicular----------046

Teste de Deambulação----------047

Teste de Resistência a inclinação----------048

Teste de Sustentação----------049

Teste de Corrida em Esteira Rolante----------049

IV.1.7 Testes de funcionalidade da musculatura esquelética apendicular com eletroestimulação----------050

IV.1.8 Teste do Grip----------052

IV.1.9 Teste do Rotarod----------053

IV.1.10 Técnica de *Western Blotting* ----------054

IV.2 Administração do inibidor da liberação do GH. ----------055

IV.3 Análise Estatística ----------055

V- RESULTADOS----------057

V.1 PARTE 1: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO GH (10µg/camundongo/dia, i.p., por 10 dias consecutivos) SOBRE A MUSCULATURA DOS ANIMAIS *C57Black6* CONTROLES e DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) ----------057

Teste de Deambulação----------057

Teste de Sustentação----------057

Teste da Esteira----------060

Teste da Força Máxima sob Eletroestimulação do Nervo Ciático-062

Teste de Resistência à Inclinação----------062

Área da secção transversal ----------066

Área do interstício----------066

Número de fibras com núcleo central ----------069

Pax7 ----------071

MyoD----------071

Laminina----------074

Desmina----------074

TGFβ-1----------077

V. 2PARTE 2:AVALIAÇÃO DO QUADRO DISTRÓFICO DE CAMUNDONGOS OBTIDOS PELO CRUZAMENTO DE ANIMAIS *C57Black6* DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) COM ANÕES COM DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J). ----------079

Teste de Deambulação----------081

Teste de Sustentação----------081

Teste de Resistência à Inclinação----------082

Teste da Esteira----------086

Teste da Força Máxima sob Eletroestimulação do Nervo Ciático-088

Área da secção transversal ----------091

Área do interstício----------091

Número de fibras com núcleo central ----------094

Pax7----------096

MyoD----------096

Laminina----------097

Desmina----------101

TGFβ-1----------101

V.3 PARTE 3:ESTUDO DOS EFEITOS DA OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA INIBIDOR DA LIBERAÇÃO DO GH, SOBRE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA DOS CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) ----------105

Teste de Deambulação----------105

Teste da Esteira----------107

Teste de Sustentação----------107

Teste de Força de Preensão ----------108

Teste de Rota Rod----------112

Teste de Resistência à Inclinação----------112

Peso----------115

Comprimento----------117

VI – DISCUSSÃO----------120

PARTE 1: ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO GH SOBRE A MUSCULATURA DOS ANIMAIS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) ----------120

PARTE 2: GH E PAPEL DO TGF-β1 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DOS MÚSCULOS INJURIADO E DISTRÓFICO----------133

PARTE 3: OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA, UMA ESPERANÇA DE MELHORA PARA O QUADRO DISTRÓFICO DE DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS ? ----------137

VII – CONCLUSÕES----------140

VII – REFERÊNCIAS----------142

I – INTRODUÇÃO

I.1 Distrofias Musculares

As distrofias musculares progressivas (DMPs) podem ocorrer em qualquer idade constituindo um grupo heterogêneo de doenças genéticas que se caracterizam por degeneração irreversível da musculatura esquelética. Já foram mapeados genes responsáveis por mais de 30 formas de distrofias, cuja herança pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X (ZATZ *et al.,* 2000). Em biópsia muscular, os achados histológicos característicos consistem em variação no tamanho das fibras, infiltração do músculo por tecido conjuntivo e adiposo, e áreas de necrose, provocado por repetidos ciclos de regeneração e degeneração muscular com uma eventual falha em sua regeneração (GARDER-MEDWIN, 1980; BUSHBY & BECKMANN, 1995; ZATZ *et al.,* 2000).

Dentre as diferentes miopatias, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), de herança recessiva ligada ao cromossomo X, é a mais comum, com uma incidência de 1 em cada 3.000 nascimentos do sexo masculino. Já a Distrofia Muscular de Becker (BMD), alélica a DMD, é aproximadamente 10 vezes mais rara. A diferença entre estas duas formas está na idade de início da doença e velocidade de progressão (ZATZ *et al.,* 2001). Na DMD, os sinais clínicos iniciam-se entre três e cinco anos de idade, com quedas freqüentes, dificuldades para subir escadas, correr e levantar do chão. O confinamento em cadeira de rodas se dá até os 12 anos de idade e os afetados raramente sobrevivem após 25 anos sem cuidados especiais. Já na BMD, os sintomas iniciam-se em geral, na segunda década: os afetados sempre andam após os

16 anos, e a velocidade de progressão é extremamente variável (McNALLY & PYTEL, 2007)

O gene responsável pela DMD/BMD localiza-se no braço curto do cromossomo X, na banda Xp21. Com 2,3 megabases (Mb), o gene DMD é o maior gene humano já caracterizado. É constituído por 79 exons, sendo transcrito em um mRNA de 14 kilobases (Kb). (ZATZ *et al.,* 1981; VERELLEN-DUMOULIN *et al*., 1984; FRANCKE *et al.,* 1985; BLAKE *et al.,* 2002).

Após a sua localização que levou a clonagem em 1987 (HOFFMAN *et al.,* 1987), descobriu-se que o produto do gene DMD/DMB é uma proteína de 427-kDa, denominada distrofina, localizada no citoesqueleto das fibras musculares esqueléticas e cardíacas. A função da distrofina seria a de manter a estabilidade da membrana da célula muscular, garantindo assim, o tráfego de informações através da membrana da célula muscular (HOFFMAN & DRESSMAN, 2001). Estudos de solubilização da distrofina a partir de frações do sarcolema mostraram que esta proteína está associada a um complexo de proteínas e glicoproteínas da membrana sarcolemal denominado Complexo Glicoproteína-Distrofina (DGC) (ERVASTI & CAMPBELL, 1991), que também teriam um papel fundamental na manutenção da estrutura da fibra muscular e liga o citoesqueleto miofibrilar com a matriz extracelular. Mutações em outros componentes desse complexo podem acarretar no aparecimento de tipos diferentes de distrofias como a Distrofia Muscular Congênita (CMD) (ZATZ *et al.,* 2001).

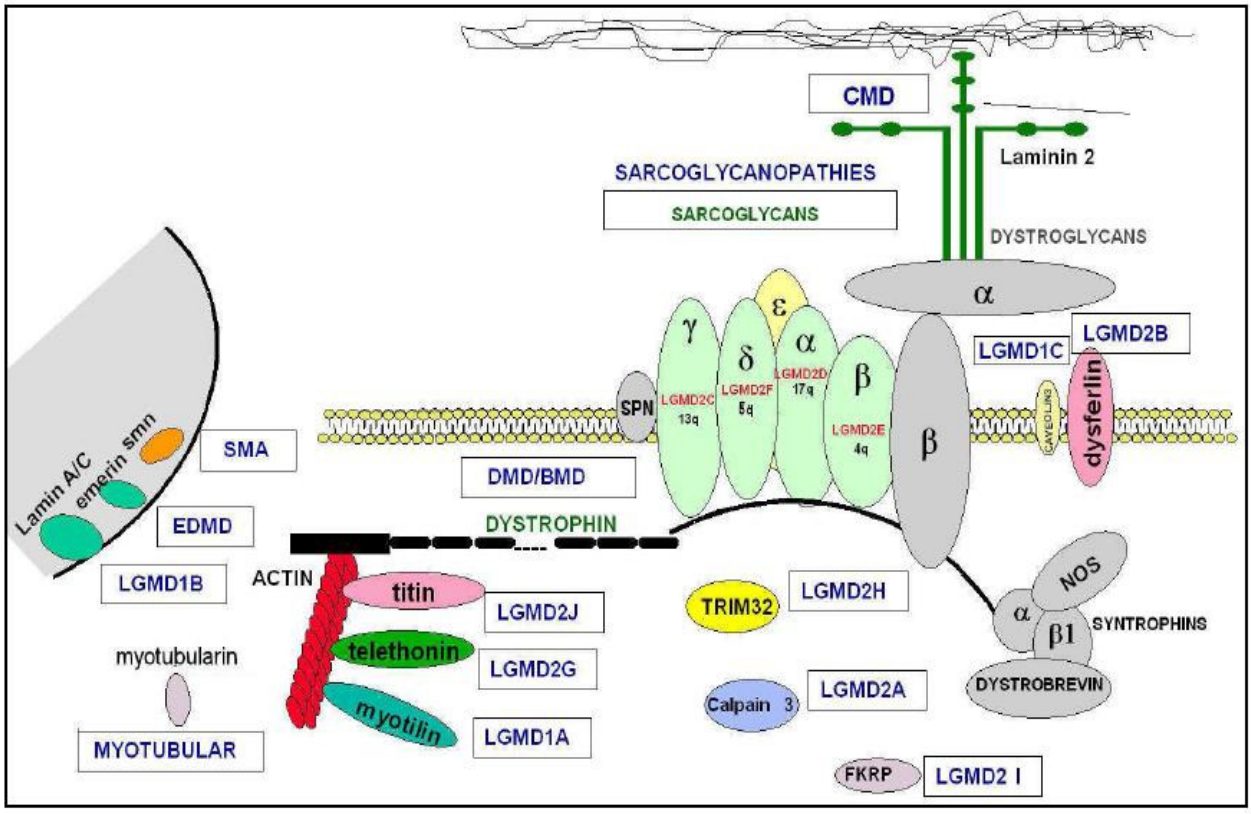

Figura 01: Complexo de proteínas associadas a distrofina e laminina e doenças relacionadas (VAINZOF & ZATZ, 2003)

As Distrofias Musculares Congênitas formam um grupo de doenças musculares clinicamente heterogêneas, caracterizadas pela presença de fraqueza muscular difusa no período neonatal, grau variável de contratura nas articulações e possível associação com anormalidades no sistema nervoso central ou nos olhos. A biópsia muscular invariavelmente apresenta alterações histopatológicas distróficas. A doença costuma ser lentamente progressiva ou não progressiva, e eventualmente, pode ocorrer melhora funcional (DUBOWITZ, 1996, 1997, 1999). Em aproximadamente 50% dos casos classificados como forma clássica de CMD, a doença é causada por mutações em um gene mapeado em 6q2 (HILLAIRE *et al.,* 1994). Em 1994, Tomé *et al.* identificaram a proteína merosina ou laminina α2 como a responsável pela

patogênese da doença. A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Forma um heterotrímero em forma de cruz com as cadeias α2-β1-□1. A laminina 2 liga-se ao citoesqueleto subsarcolemal por um grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. O bom funcionamento do complexo seria responsável por um correto mecanismo de contração muscular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993) Assim como a deficiência de distrofina leva às distrofias de Duchenne e Becker, a deficiência da proteína merosina leva a uma das formas de distrofia muscular congênita. O camundongo *dy/dy* é o modelo animal para a CMD-merosina-deficiente, pois também apresenta deficiência da proteína no músculo associada a uma significativa fraqueza muscular. O desenvolvimento de modelos animais merosina deficientes com comprometimento clínico poderá contribuir para a melhor compreensão da patogênese da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

I.1.1 A Organização Molecular da Proteína Laminina

A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Forma um heterodímero em forma de cruz com as cadeias α2-β-1-□1. A laminina liga-se ao citoesqueleto subsarcolemal por um grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. O bom funcionamento do complexo seria responsável por um correto mecanismo de contração muscular (ERVASTI & CAMPBELL,1993). Portanto, assim como a deficiência de distrofina leva às distrofias de Duchenne e Becker, a deficiência de merosina leva a uma das formas de CMD. A cadeia α2 da laminina, originalmente com 400 kDa, sofre uma clivagem pós-tradução, originando os

fragmentos de 80 e 300 KDa. A maioria dos estudos imuno-histoquímicos utiliza um anticorpo monoclonal comercial que reage com o fragmento de 80 kDa da região C-terminal. Aproximadamente 95% dos pacientes com mutações no gene em 6q apresentam deficiência total da proteína enquanto os restantes 5% apresentam deficiências parciais, relacionadas às mutações de sentido trocado, ou deleções que não alteram o quadro de leitura (HAYASHI *et al.,* 1997; ALLAMAND *et al.,* 1997) A laminina está presente também nas células de Schwann, trofoblasto e membrana basal de queratócitos da epiderme, o que permite o seu estudo em tecidos de obtenção mais fácil, como biópsia de pele, e a realização de diagnóstico pré-natal. Clinicamente, o grupo de pacientes merosina-negativos apresenta um fenótipo mais grave, e a maioria dos pacientes é incapaz de adquirir marcha independente. (TOMÉ *et al.,* 1994; VAINZOF *et al.,* 1995; ALLAMAND *et al.,* 1997).

I.1.2 Mutações em CMD

O gene LAMA2 é composto por 260 Kb organizados em 64 éxons, e o cDNA tem cerca de 9,5 Kb. O estudo de mutações no gene LAMA2 mostrou grande heterogeneidade, com presença de deleções e mutações de sentido trocado levando a códons de parada (HELBLING-LECLERC *et al.,* 1995; GUICHENEY *et al.,* 1997). A mutação mais freqüente, encontrada em cerca de 23% dos pacientes, é uma deleção de 2pb (2096-2097). Mutações de sentido trocado e pequenas deleções que não alteram o quadro de leitura levam a formação de uma proteína truncada e à deficiência parcial da merosina no músculo. A maioria das mutações leva à formação de uma proteína truncada em um dos domínios que formam o braço curto da cadeia α2 da laminina. O

mRNA formado é provavelmente muito instável, e mesmo em caso de formação de polipeptídio, acredita-se que este não teria o domínio globular G (C-terminal) e os domínios I e II do braço longo da cadeia, e, portanto, não poderia participar da formação do heterodímero normal da laminina (TOMÉ *et al.,* 1999). Não foi identificado um *hot spot* de mutações no gene LAMA2. Entretanto, ocorre um efeito fundador para algumas das mutações encontradas (GUICHENEY *et al.,* 1998). Dado o grande tamanho do gene e a variabilidade de mutações (grande parte dos pacientes são heterozigotos compostos e as mutações pontuais são muito freqüentes), a triagem de mutações não é feita rotineiramente nos grandes centros do mundo.

I.2 Modelos murinos de distrofia muscular

Recentes avanços em biologia molecular têm indicado que muitos modelos mutantes de animais com distrofia muscular apresentam alterações genéticas e protéicas semelhantes às encontradas nas doenças humanas. Homólogos de DMD, por exemplo, têm sido identificados em vários animais incluindo cães, gatos, ratos, peixes e invertebrados (COLLINS & MORGAN, 2003).

Apresentaremos a seguir alguns dos mais importantes modelos de distrofias em camundongos que apresentam alterações protéicas e genéticas semelhantes àquelas vistas em pacientes com distrofias musculares e que têm sido extensivamente utilizados para examinar os efeitos da terapia gênica e da administração de fatores farmacológicos e tróficos.

I.2.1 Camundongo *mdx (C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J)*

Um exemplo de modelo de distrofia muscular de Duchenne (DMD) bastante estudado é o camundongo *mdx,* apesar dele não apresentar sinais clínicos evidentes de distrofia muscular (SICINSKI *et al.,* 1989).

A mutação do gene da distrofina ligado ao cromossomo X (*Dmd*) do camundongo *mdx* é recessiva e fêmeas heterozigotas são visualmente indistinguíveis do camundongo tipo selvagem. Fêmeas homozigóticas e machos hemizigóticos para o alelo Dmd^{mdx} possuem uma expectativa de vida normal e podem sobreviver acima de dois anos. Assim como os pacientes que sofrem de DMD, os mutantes Dmd^{mdx} não expressam distrofina e, embora tenham sido rotineiramente utilizados como um modelo animal de doença, a miopatologia resultante é muito menos grave, comparada ao curso da doença humana (SICINSKI *et al.,* 1989).

O músculo de mutantes Dmd^{md} é histologicamente normal no início do desenvolvimento pós-natal, mas, em torno de três semanas, a necrose muscular se inicia com leves sinais de fraqueza muscular. Análises bioquímicas incluem elevados níveis séricos de creatinoquinase e piruvatoquinase, juntamente com acúmulo de macrófagos, ambos marcadores precoces de degeneração muscular. Enquanto os membros do músculo esquelético são caracterizados por degeneração e necrose persistentes e progressivas, este quadro é compensado por uma resposta regenerativa ativada por células satélites e hipertrofia muscular. As fibras regeneradas são morfologicamente tipificadas por fibras nucleadas centrais de pequeno calibre e o camundongo apresenta comportamento normal. Os músculos dos mutantes Dmd^{mdx} apresentam uma redução geral de elasticidade, tornando-os mais suscetíveis à

injúria. O fenótipo comparativamente leve do camundongo *Dmd*^{mdx} tem sido atribuído por alguns pesquisadores (TINSLEY *et al.,* 1996, 1998; SQUIRE *et al.,* 2002; ZHOU *et al.,* 2008) a utrofina, uma proteína relacionada à distrofina, a qual está aumentada nas fibras musculares regeneradas em adultos mutantes *Dmd*^{mdx}. Isto porque foi demonstrado que camundongos duplamente mutantes para distrofina e utrofina tinham um fenótipo muito mais severo e morte prematura. Em contraste com os músculos dos membros, o diafragma não apresenta uma fase de regeneração à medida que a distrofia avança com a idade, comprometendo progressivamente a sua fisiologia contrátil (SICINSKI *et al.,* 1989). O *locus* da distrofina *Dmd* está localizado na parte central do braço curto do cromossomo X. A proteína distrofina é codificada por um gene extremamente grande com transcrição completa de 14 kb. Ela está abundantemente expressa em fibras musculares cardíacas e esqueléticas, e menos expressa em neurônios e nas células da glia do sistema nervoso central (RIDER-COOK *et al.,* 1988).

I.2.2 Camundongo *dy/dy (B6.WK- Lama2*$^{dy\text{-}2J}$*/J)*

Um outro modelo, também bastante conhecido e extensivamente estudado, é o camundongo *dy/dy*, que apresenta ausência de merosina (laminina alpha 2), uma subunidade da proteína de membrana básica, a laminina. Devido ao fato de que aproximadamente metade de todos os pacientes com a forma clássica de distrofia muscular congênita também apresentarem ausência de merosina, este modelo animal tem despertado inestimável interesse no estudo do mecanismo patológico de fibras necróticas resultantes deste defeito de membrana.

Camundongos homozigotos para a mutação espontânea de distrofia muscular *Lama2*$^{dy\text{-}2J}$ são caracterizados por paralisia e fraquezas progressivas iniciando em torno de três semanas e meia de idade. Os membros traseiros são afetados primeiramente, seguido dos axiais e da musculatura dianteira. A morte usualmente ocorre antes dos seis meses de idade, e os camundongos mutantes são usualmente estéreis. A doença é transmitida como um traço autossômico recessivo e os animais heterozigotos são assintomáticos. O músculo esquelético mostra alterações degenerativas com proliferação do núcleo sarcolêmico, aumento na quantidade de tecido intersticial, e variação de tamanho das fibras musculares individuais (MEIER & SOUTHARD, 1970).

O camundongo mutante para esta distrofia muscular apresenta uma mudança de pares de bases no gene da laminina alpha 2 (merosina), *Lama2.* A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Elas apresentam um papel na adesão celular, migração, proliferação, e diferenciação. Humanos com distrofia muscular congênita causada por deficiência de merosina têm mutações no gene LAMA 2 que resulta em uma cadeia laminina alpha 2 truncada. Os camundongos mutantes *Lama2*$^{dy\text{-}2J}$ apresentam uma deficiência parcial da cadeia semelhante àquela encontrada no homem (SUNADA *et al.,*1995). O primeiro modelo descrito para *dy* apresenta ausência total da merosina com fenótipo mais grave (MICHELSON *et al.,* 1955; VILQUIN *et al.,* 2000).

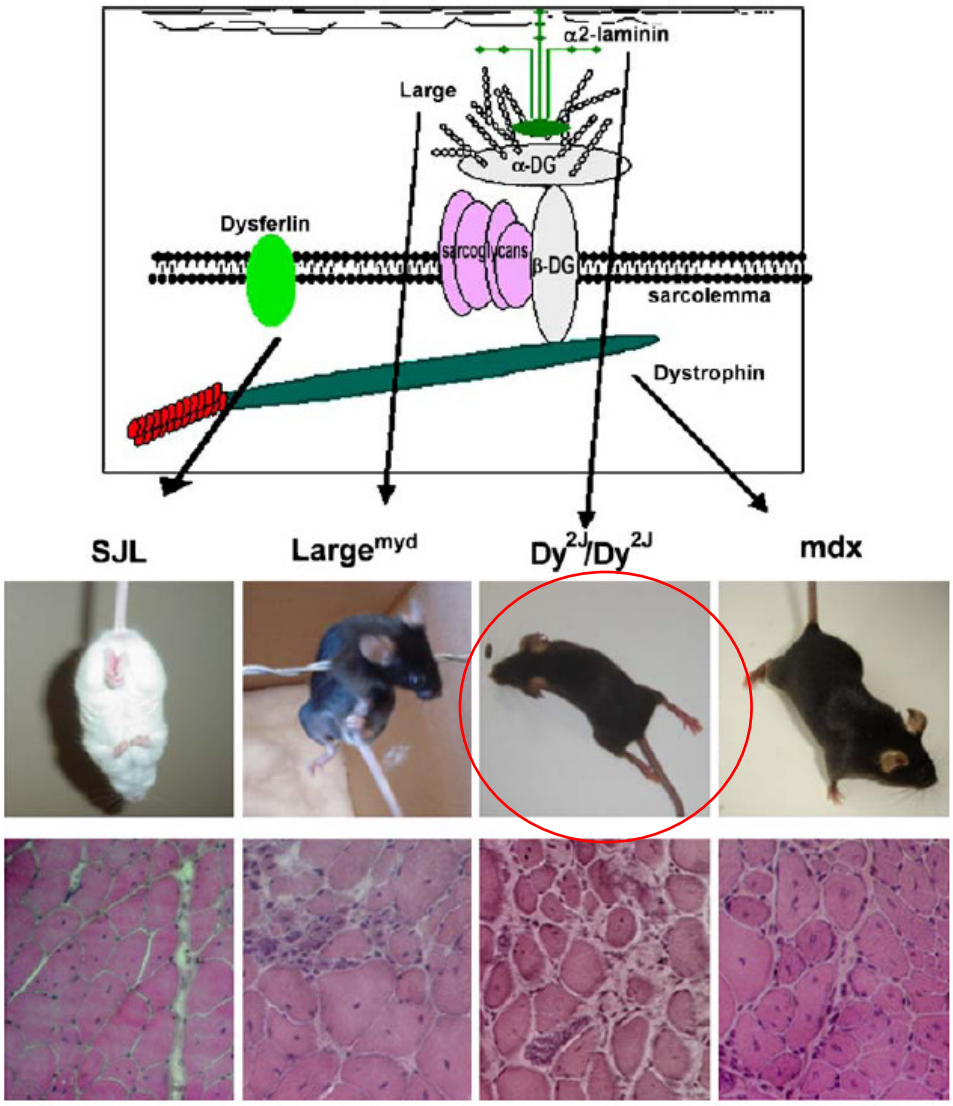

Figura 02: Exemplos de quatro modelos de camundongos para doenças neuromusculares mostrando suas respectivas alterações histopatológicas no músculo ressaltando aqui o modelo Dy^{2J}/ Dy^{2J} (Modificado de VAINZOF *et al.,* 2008).

O camundongo *dy/dy* é o modelo animal para a CMD-merosina deficiente, pois também apresenta deficiência da proteína no músculo associada a uma significativa fraqueza muscular (SUNADA *et al.,* 1994). O desenvolvimento de modelos animais merosina-deficientes com diferentes

mutações tem contribuído para a melhor compreensão da patogênese da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas em humanos através da utilização de terapias hormonais, celulares, gênicas e farmacológicas (COHN *et al.,* 2007; MILLAY *et al.,* 2008).

Uma das *estratégias* mais utilizadas na busca de tentativas terapêuticas para as distrofias musculares envolve o Hormônio do Crescimento (GH). ZATZ *et al.* (1981) relataram o caso de um menino afetado por DMD e que apresentava deficiência de GH cuja evolução clinica era benigna. Lynch *et al.* (2000) mostraram que a administração exógena de rhIGF-1(Fator de Crescimento humano recombinante Insulina-*like* I e principal efetor endócrino do GH) melhorou a patologia distrófica em camundongos mdx. Apesar dos resultados controversos, inúmeros trabalhos tentam correlacionar os efeitos do GH no músculo normal (Figura 3) e na evolução do quadro distrófico (Figura 4) nas doenças neuromusculares.

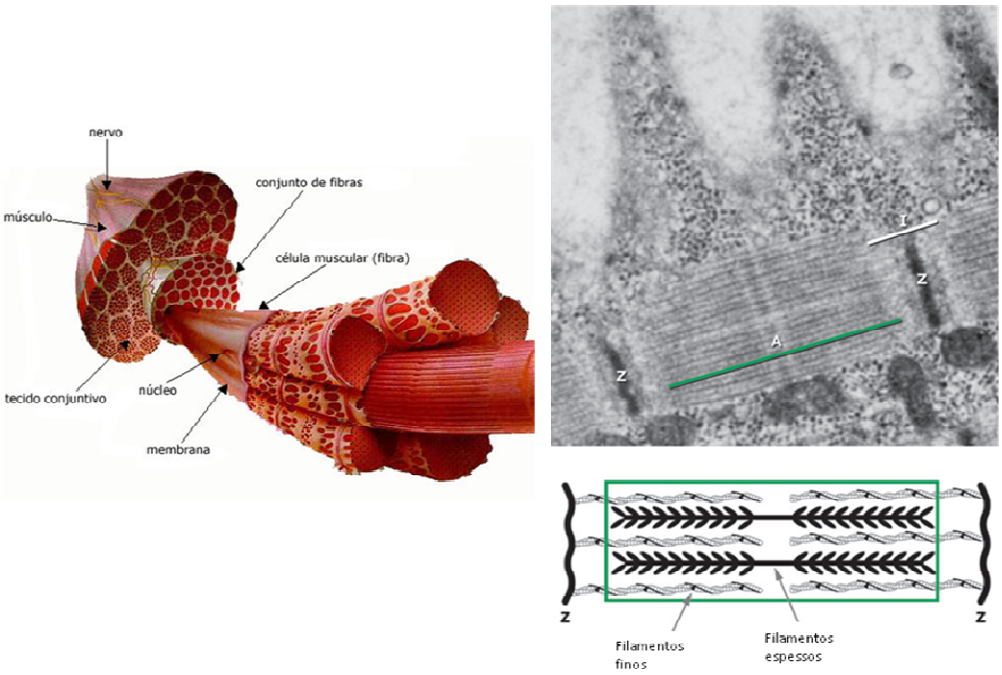

Figura 03: Musculatura esquelética com micrografia eletrônica e representação esquemática de um sarcômero, a unidade básica de contração do músculo esquelético (modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005)

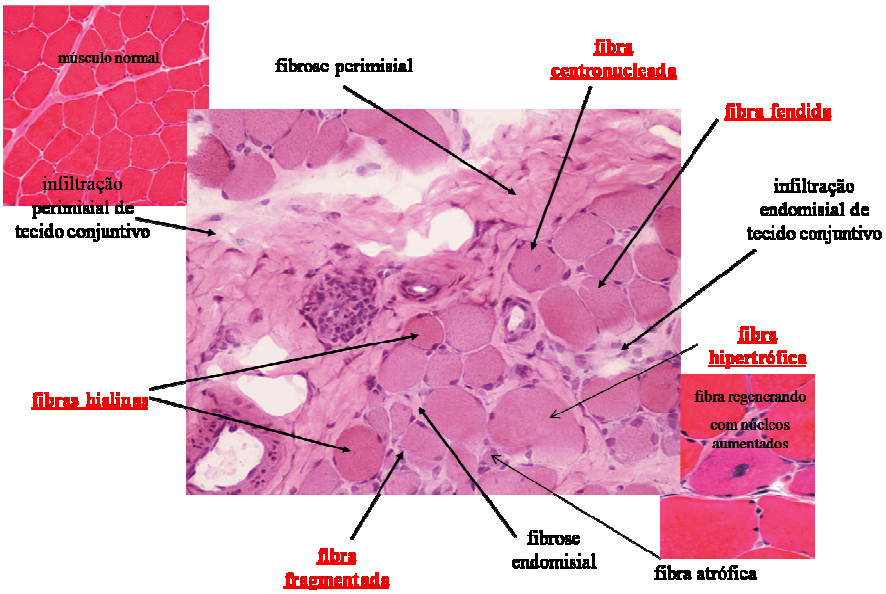

Figura 04: Coloração hematoxilina-eosina (HE); músculo distrófico humano (400X); lesões musculares primárias em vermelho em contraste às secundárias (modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005)

I.3 Músculo e GH

1.3.1 GH

O GH é um polipeptídio de cadeia única de 191 aminoácidos contendo duas pontes dissulfeto e produzido em maior quantidade pela hipófise anterior Constitui o principal regulador do crescimento pós-natal e um importante regulador metabólico (BENGTSSON, 1999) O GH humano tem um alto grau de homologia de sequência com o GH de outras espécies, mas somente o GH humano ou de outros primatas é ativo no ser humano, apresentando uma meia-vida de 20 min. Ele age através de seu receptor de GH (GHR) para estimular elementos sinalizadores chave: JAK2, STAT5, PI3K, MAPK, STAT3 e PKC (HERRINGTON & CARTER-SU, 2001). A ausência de GH ou GHR em humanos resulta em baixa estatura, massa muscular reduzida, aumento do estoque lipídico, diminuição da densidade mineral do osso cortical e diminuição da fertilidade em fêmeas (BENGTSSON, 1999). A deficiência do GH pode ser resultado de mutação genética, mas, é também conseqüência normal do envelhecimento. Os níveis de GH e de seu principal mediador, IGF-I, têm diminuído com a idade e a terapia de reposição com GH mostrou reverter parcialmente os déficits mencionados acima (RUDMAN *et al.*, 1990).

1.3.1.1 Produção e Liberação do GH

As células somatotróficas produtoras de GH estão localizadas na hipófise anterior e são responsáveis por aproximadamente 50% da população celular local. A secreção de GH depende de diversos reguladores intra e extra-hipotalâmicos. A secreção é regulada primariamente por dois hormônios

peptídicos liberados por células neurosecretoras: Hormônio Liberador de GH (GHRH) e Hormônio Inibitório da liberação do GH (GHRIH) ou Somatostatina. O equilíbrio da produção destes dois fatores conduz a secreção de GH pelos somatotrofos. O aumento de secreção de GH inibe, *per si*, a secreção de GHRH e estimula a secreção de GHIH, que inibe a secreção de GHRH. A secreção de GH também estimula a síntese e secreção de IGF-I no organismo e principalmente no fígado. Este último, por sua vez, também inibe a secreção de GHRH e estimula a secreção de GHRIH. A secreção de GH promove uma série de efeitos fisiológicos. As principais ações fisiológicas do eixo GH/IGF-I descritos na literatura são: aumento da lipólise, produção de IGF-I pelo fígado, aumento da massa muscular magra, aumento do tamanho dos órgãos e do crescimento linear. Na circulação sanguínea, cerca de metade do GH encontra-se ligado com alta afinidade à proteína de ligação GHBP (GH *binding protein*), cuja estrutura química é homóloga à porção extracelular do GHR. Em algumas espécies, como nos roedores, a GHBP tem origem de um processamento alternativo do RNA mensageiro do gene do GHR. Na espécie humana, a porção extracelular do GHR ancorado na membrana celular sofre a ação de uma protease e, a partir desta clivagem, surge a GHBP circulante (LICHANSKA & WATERS, 2008)

IGFBPs	Expressão de IGFBPs	Papéis relatados no músculo esquelético
IGFPB1	-	Age como mediador do catabolismo muscular
IGFPB2	-	-
IGFPB3	Alta expressão no músculo neonatal, principalmente em macrófagos envolvidos com a regeneração muscular	Suporte para a diferenciação de mioblastos Aumentado durante a fase primári de regeneração muscular Níveis diminuidos no músculo sóleo durante o envelhecimento
IGFPB4	Alta expressão no músculo neonatal, expresso em tecido conectivo em regeneração muscular	Envolvido na proliferação de mioblastos Aumenta durante a fase tardia da regeneração muscular
IGFPB5	Alta expressão no músculo adulto, expresso em células musculraes em regeneração	Controla a diferenciação muscular Aumenta durante a fase tardia da regeneração muscular Níveis diminuidos no músculo sóleo durante o envelhecimento Aumentado durante a atrofia muscular
IGFPB6	Alta expressão no músculo neonatal, expresso em células musculares, tecido conectivo e endotélio	Regula a fase quiescente do programa miogênico Aumenta durante a fase tardia da regeneração muscular
IGFPB7[b]	-	-

Tabela 1: Interações de IGF-I com diferentes IGFBPs nas células musculares (modificada de MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005).

[a]Dados não disponíveis
[b] O IGFBP-7 foi identificado recentemente

1.3.1.2 Mecanismo de Ação do GH e Estrutura do Receptor (GHR)

Para exercer os seus efeitos biológicos, o GH provoca dimerização do seu receptor. Para tanto, a molécula de GH possui dois sítios de ligação na sua

estrutura, sendo que cada um deles vai se ligar de modo seqüencial a duas moléculas de GHR. Na fase inicial deste processo, o sítio 1 de ligação do GH se liga a uma molécula de GHR formando um complexo 1:1 inativo, isto é, incapaz de provocar dimerização do GHR. Em seguida, o sítio 2 de ligação do GH se liga a uma segunda molécula de GHR, constituindo assim o complexo ativo 2:1, que provoca dimerização do GHR e que inicia uma cascata de eventos intracelulares envolvendo as proteínas das famílias JAK e STAT, assim como a cascata de quinases ativadas por mitógenos (MAPKs/ERK), e a via de fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Sugere-se que Akt (PKB; protein kinase B), uma quinase de serina-treonina efetora da via de PI3K, é essencial para a conversão miogênica, estando também envolvida em processos relacionados com sobrevivência celular. Quando ativada, Akt modula a expressão dos genes codificadores de p21, MyoD, MEF2 e miogenina e inibe proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 (HERRINGTON & CARTER-SU, 2001).

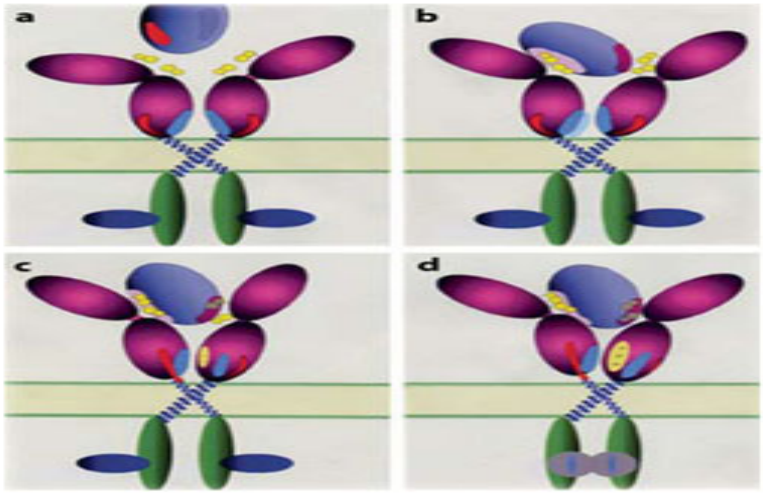

Figura 05: Modelo de ativação de GHR (LICHANSKA & WATERS, 2008)

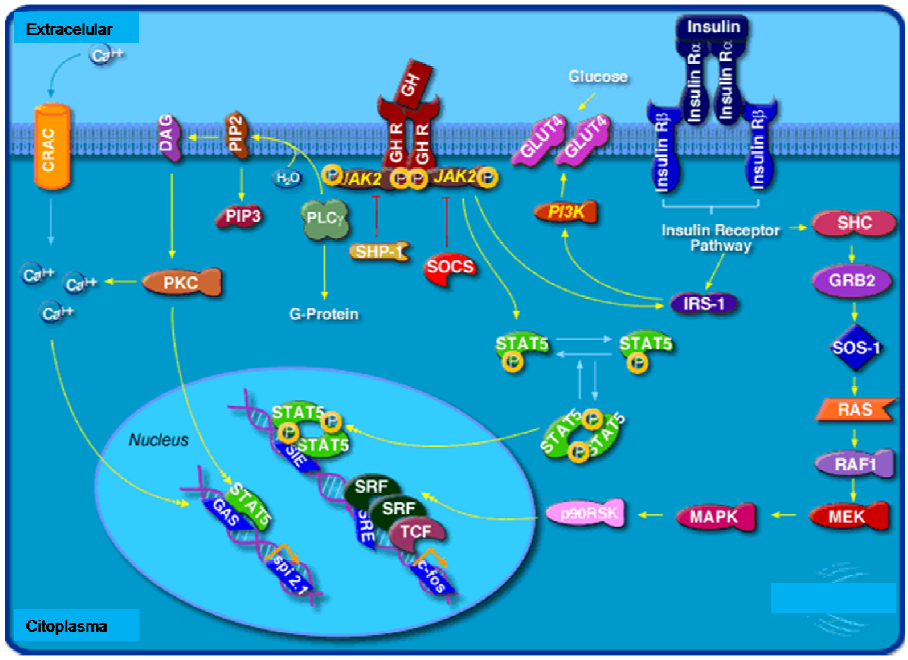

Figura 06: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos (modificado de LICHANSKA & WATERS, 2008)

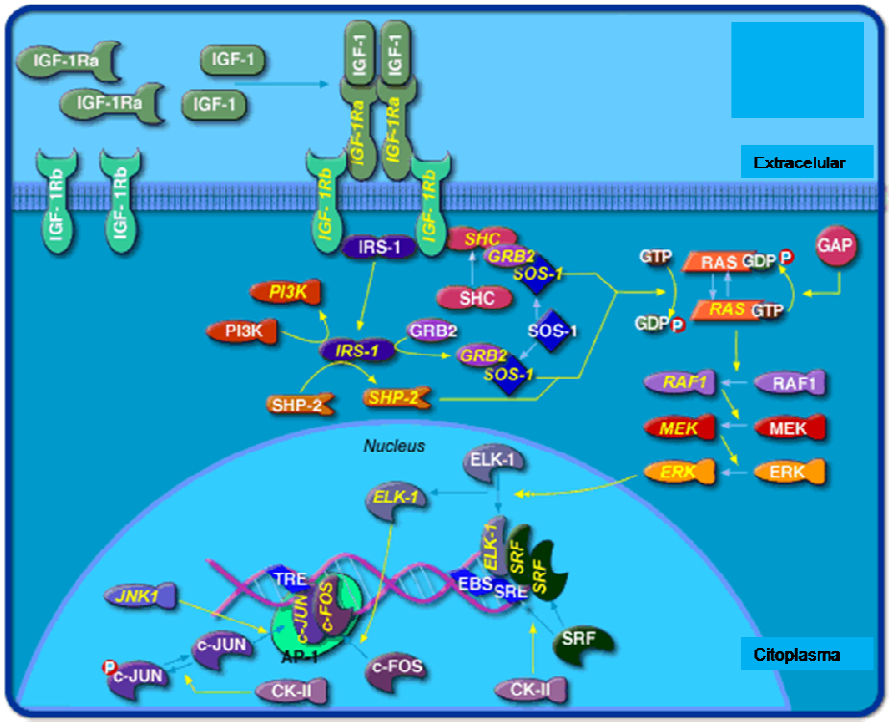

Figura 07: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos via IGF-I (modificado de LICHANSKA & WATERS, 2008)

1.3.1.3 Genética do GH

A produção de GH inicia-se com a transcrição do gene GH1 (que possui cinco éxons na sua estrutura). O principal produto do gene GH1 (~90%) origina-se da remoção de todos os seus introns, formando um mRNA que codifica uma molécula de GH com 191 aminoácidos e peso molecular de 22kDa. Um processamento alternativo do gene GH1, em que ocorre uma perda de 45 nucleotídeos do éxon 3, leva a produção de uma molécula de GH com 176 aminoácidos e peso molecular de 20kDa. Além destes dois peptídeos, outras isoformas e fragmentos da molécula de GH estão presentes em quantidades variáveis na circulação devido agregação e proteólise. O GHR é codificado por nove éxons do gene GHR numerados de 2 a 10, sendo que a parte extracelular do GHR (correspondente a GHBP) é proveniente dos éxons 3 a 7, a parte transmembrana do éxon 8 e porção intracelular dos éxons 9 e 10.

O funcionamento inadequado de algum dos genes que respondem pela produção dos diferentes componentes do eixo GH/IGF-I pode levar ao quadro clínico de retardo de crescimento. O GH está aumentado no final da vida fetal e durante as primeiras semanas de vida, mas logo cai a valores normais em repouso de 2 a 5 ng/mL (LICHANSKA & WATERS, 2008).

1.3.1.4 Eixo GH/IGF-I

IGF-I constitui o principal efetor do GH produzido principalmente pelo fígado. O IGF-I está relacionado à regulação do *turnover* de proteínas e exerce potentes efeitos mitogênicos e de diferenciação na maioria dos tipos celulares. As ações biológicas de IGF-I são mediadas pelo receptor de IGF-I formado de

2α-subunidades extracelulares. IGF-I estimula a síntese protéica, o aumento no tamanho e número de células culminando com o crescimento dos órgãos e o crescimento linear propriamente dito.

1.3.1.5 GH e seu papel no músculo esquelético

GH age diretamente e concomitante com IGF-I no músculo diminuindo a captação da glicose, aumentando a captação dos aminoácidos e aumentando a síntese protéica culminando com o aumento da massa magra muscular. A sinalização de IGF-I no músculo esquelético ocorre em três diferentes níveis (via proteína quinase mitógeno ativada; Inositol trifosfato e na via do Cálcio) após a ligação do IGF-I induzir a fosforilação do mesmo culminando e hipertrofia do músculo (Figura 08) (MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005).

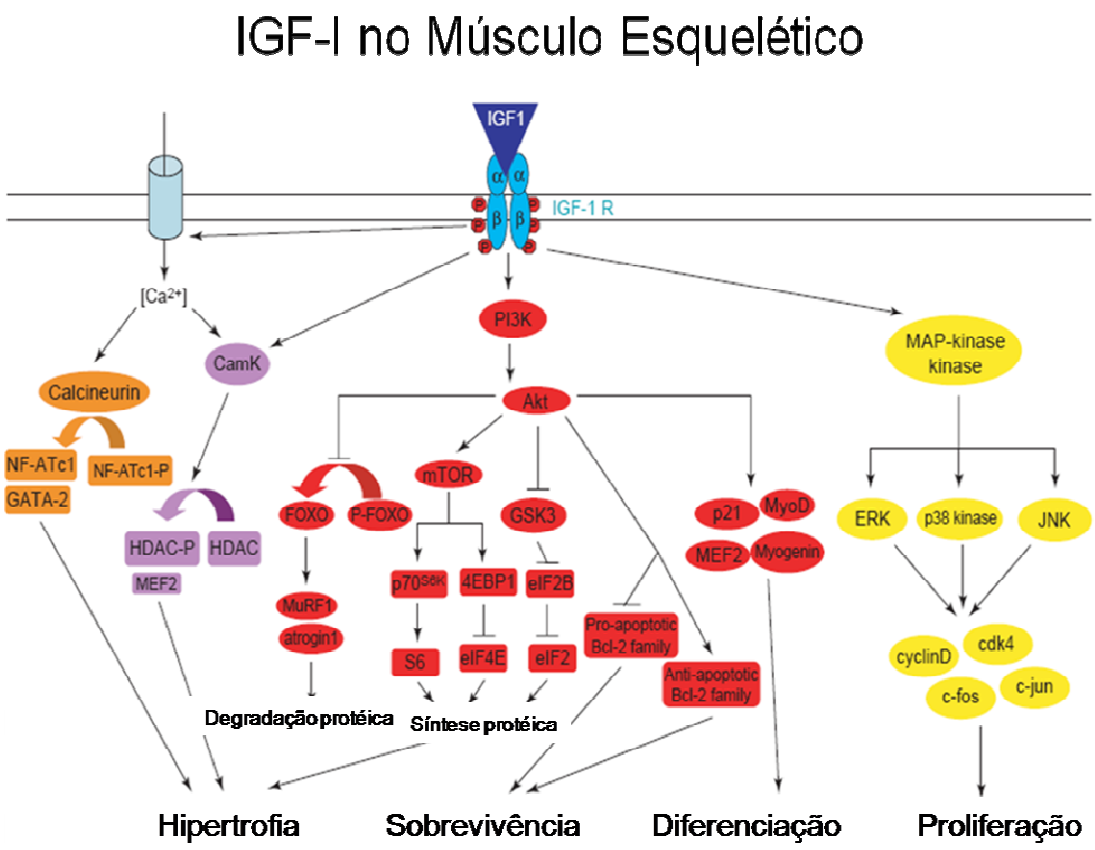

Figura 08: Vias ativadas pela ligação do IGF-I no receptor do músculo esquelético Modificado de MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005

O GH é produzido em maior quantidade pela hipófise anterior, mas sua produção ectópica tem sido observada em outros tipos celulares, tais como células-tronco (CT). Em mioblastos C2C12 superexpressando GHR, a ativação aumentada de Akt e MAPK sobre a estimulação de GH, resultou na inibição da diferenciação, indução da proliferação celular e prevenção da apoptose. IGF-I também realiza suas funções através da ativação das vias MAPK e PI3K. Alguns trabalhos demonstram que ele promove a diferenciação muscular esquelética através da via PI3K/Akt, como já mencionado anteriormente no caso do GH, enquanto em outras situações a diferenciação de mioblastos C2C12 induzida por este fator é correlacionada com a indução da via

MAPK/p38. Estes dados em conjunto, sugerem que os papéis desempenhados por cada fator dependem do tipo celular e do estímulo utilizado.

O papel do eixo GH/IGF-I também tem sido documentado em casos patológicos. A administração de GH por três meses em indivíduos afetados por DMD e DMB, acarretou em melhora da função sistólica cardíaca (CITTADINI *et al.,* 2003) Além disso, tem sido sugerido que a falta de IGF-I contribui para o catabolismo de proteínas musculares. Neste sentido, o papel terapêutico de GH tem sido proposto, por causa de suas propriedades anabólicas. Pacientes com DMD apresentaram uma inesperada resposta catabólica ao invés do efeito anabólico usual. Existem vias adicionais às quais contribuem para o crescimento pós-natal uma vez que, camundongos resultantes de cruzamentos entre camundongos IGF-1 -/- com GHR -/- são menores que IGF-1 -/- sozinhos (LICHANSKA & WATERS, 2008), e estas vias podem ser vias de sinalização de citocinas.

1.4 Processo de degeneração–regeneração muscular

Mamíferos adultos possuem músculos esqueléticos com uma grande capacidade de se adaptarem a demandas, como crescimento e injúria. Os processos responsáveis por essas adaptações são atribuídos a uma pequena população de células que são residentes no músculo denominadas células satélites (CS) ou células precursoras miogênicas. Essas células são mononucleadas e localizam-se na periferia dos miotubos maduros entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares. Não ocorrendo nenhuma perturbação, essas células encontram-se em um estado não proliferativo (quiescente). Entretanto, quando ocorre um estímulo, seja uma injúria ou uma

resposta a uma demanda aumentada de trabalho, as CS tornam-se ativadas, começam a proliferar e expressam os marcadores miogênicos (CS expressando marcadores miogênicos são também denominadas mioblastos). Finalmente, elas se fundem a fibras musculares já existentes ou fusionam-se para formar novas miofibras multinucleadas, em um processo que recapitula os eventos fundamentais do desenvolvimento muscular (HAWKE & GARRY, 2001) (Figura 09).

A população de células precursoras musculares pode tolerar inúmeros ciclos de degeneração e regeneração, entretanto, essa capacidade é finita. A exaustão do *pool* de células precursoras é um importante fator que contribui com a deterioração muscular gradual observada em pacientes com distrofias musculares. A ausência de laminina resulta em uma deficiência secundária no grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. (OHLENDIECK & CAMPBELL, 1993) e como consequência a instabilidade deste complexo, as fibras musculares ficam mais susceptíveis ao estresse mecânico causado pela contração muscular, levando ao processo de degeneração em pacientes CMD. A regeneração muscular é caracterizada por duas fases: degenerativa e regenerativa (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004). A morte das fibras musculares ou de fragmentos de fibras seja por apoptose ou necrose, acontece em consequência dos defeitos bioquímicos primários causados pela doença. A morte de células ativas varia dependendo do músculo examinado, da idade do paciente e da espécie que manifesta a patogenia. Esse evento é marcado pelo rompimento do sarcolema das miofibrilas, resultando em um aumento na permeabilidade refletido por uma elevação do nível sérico de proteínas

musculares como a creatina quinase, que é geralmente restrita ao citosol da célula muscular. Nessa fase ocorre a ativação de células mononucleadas, principalmente células inflamatórias e CS. A regeneração muscular que segue a morte celular reflete as mudanças secundárias, caracterizadas pela substituição do músculo por tecido adiposo ou conectivo, logo após a perda de sua capacidade regenerativa.

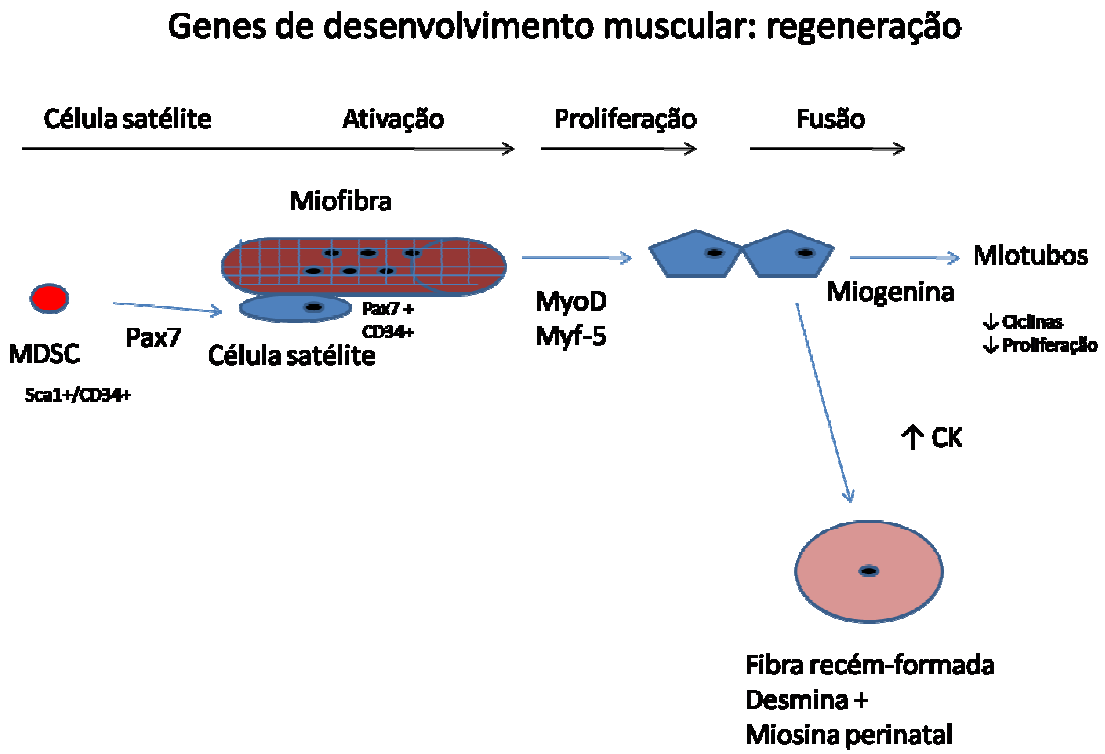

Figura 09: Genes de desenvolvimento muscular: regeneração

1.4.1 Fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na regeneração e diferenciação muscular

O processo regenerativo muscular constitui evento complexo que requer uma modulação harmoniosa entre as células satélites, fatores de crescimento, citocinas, respostas inflamatórias, componentes vasculares e da matriz extracelular (GOETSCH *et al.,* 2003). Os fatores de transcrição miogênicos

pertencem à família protéica *helix-loop-helix* (HLH) e têm papel fundamental na miogênese e na regeneração: as células onde eles não são expressos não se diferenciam em músculo (SEALE & RUDNICKI, 2000).

O MyoD (Antígeno de Diferenciação Miogênico – *Myf3*) atua na regulação da expressão de genes em tempos diferentes durante a miogênese e é essencial no reparo de lesões musculares, uma vez que participa da ativação das CS no intervalo de 6 horas depois da injúria (HAWKE & GARRY, 2001). O *Myf5* está estruturalmente relacionado ao MyoD e também atua na determinação dos mioblastos durante o desenvolvimento embrionário, auxiliando na proliferação das CS (HAWKE & GARRY, 2001). Não existe nenhuma patologia associada ao *Myf5* e ao *MyoD,* porém a sua expressão pode estar aumentada em DMD/DMB e em miopatias inflamatórias. Quando a inativação do gene *MyoD* é induzida em camundongos, observa-se atraso no desenvolvimento da musculatura dos membros. Entretanto, quando ocorre inibição do *MyoD* concomitante com inibição de *Myf5,* há ausência total de mioblastos e não há formação de tecido muscular. O MyoD desempenha um papel na regulação da diferenciação celular, sendo expressado em células satélites ativadas, mas não nas quiescentes. (MUNTONI *et al.,* 2002).

Outro fator de transcrição que influencia a atividade das células satélites é o Pax7 (*paired box transcription factor 7*), expresso em células quiescentes e em proliferação. A presença de mutações neste gene causa ausência total de progenitores miogênicos no músculo (HAWKE & GARRY, 2001; MUNTONI *et al.,* 2002). Esses dados suportam a hipótese de que Pax7 é essencial para a especificação das CS. As células satélites quiescentes expressam o Pax7 e

quando ativadas, co-expressam Pax7 e MyoD. O Pax7 é capaz de induzir transcrição em células satélites, estando envolvido na manutenção da proliferação e prevenção da diferenciação precoce.

Os Fatores de Crescimento Insulina-*like* I e II (*IGF-I e IGF-II*) participam da regulação da regeneração, pois aumentam a proliferação, a diferenciação e a fusão das CS *in vitro*, provocando aumento da massa muscular e da quantidade de células (HAWKE & GARRY, 2001; MUNTONI *et al.,* 2002; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

IGF é um fator produzido por vários tecidos, envolvido na regulação de diversos caminhos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação e diferenciação. A produção de IGF-I é positivamente regulada pelo GH, seu maior efetor endócrino. Embora tenha sido postulado que o estímulo de síntese e secreção de IGF-I pelo GH ocorra no fígado, atualmente sabe-se que esta função pode ser exercida em outros tecidos periféricos, incluindo a musculatura esquelética (ISAKSSON *et al.,* 1982; ISAKSSON *et al.,* 1987*)* Adicionalmente, Sacco *et al.* (2005) demonstraram que o IGF-I é suficiente para aumentar a fusão de células derivadas da medula óssea com o músculo esquelético adulto. Além disso, camundongos *mdx* transgênicos super expressando este fator mostravam uma melhora da força e massa muscular reforçando seu papel terapêutico (DE LUCA *et al.,* 1999; BARTON *et al.,* 2002).

1.4.2 TGFβ-1

O Fator de Crescimento Transformador β (TGF β) é uma importante citocina regulatória do crescimento celular (CHARGÉ & RUDNICK, 2004). Os

mecanismos precisos levando a fibrose no músculo distrófico não são conhecidos mas certamente envolvem a ação de várias citocinas inflamatórias, tais como TGF-β1 (GOSSELIN *et al.,* 2004).

A família do TGF-Beta, que inclui o peptídeo TGF-β1 e suas isoformas TGF-β2 e TGF-β3, pertencem à superfamília TGF-Beta que também inclui vários outros ligantes, tais como, proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fatores de diferenciação e crescimento (GDFs), hormônio anti-mullerino, Activina e Nodal. O TGF-β1, e outros membros da sua família, estão envolvidos em muitos processos celulares, tanto no adulto como no embrião, incluindo o crescimento e diferenciação celular, apoptose, homeostase celular e outras funções celulares.

A via de sinalização do TGF-β1 é relativamente simples e compreende: 1) a ligação com o receptor tipo II, o qual recruta e fosforila o receptor tipo I; 2) o receptor tipo I, por sua vez, fosforila o R-SMADs que liga-se ao coSMAD; 3) este complexo R-SMADs/coSMAD se acumula no núcleo onde age como fatores de transcrição, participando da regulação da expressão de genes alvos (Figura 10). As vias de sinalização dos outros membros da superfamília TGF Beta são semelhantes à do TGF-β1 e encontram-se ilustradas na Tabela 2 (WRANA *et al.,* 1992).

Em células normais, TGF-β1 age através da sua via de sinalização, para o ciclo celular no estágio G1 para parar a proliferação, induzir diferenciação ou promover apoptose. Entretanto, quando uma célula é transformada em um câncer, partes da via de sinalização do TGF-β1 são mutadas e este peptídio

não mais pode controlar estas células que aumentam sua proliferação sem controle.

No músculo distrófico, TGF-β1 age como uma citocina inflamatória envolvida no processo de fibrose muscular e o aumento do colágeno, um componente da matriz extracelular, tendo sido considerado como um marcador de degeneração celular (YAMAZAKI *et al.,* 1994).

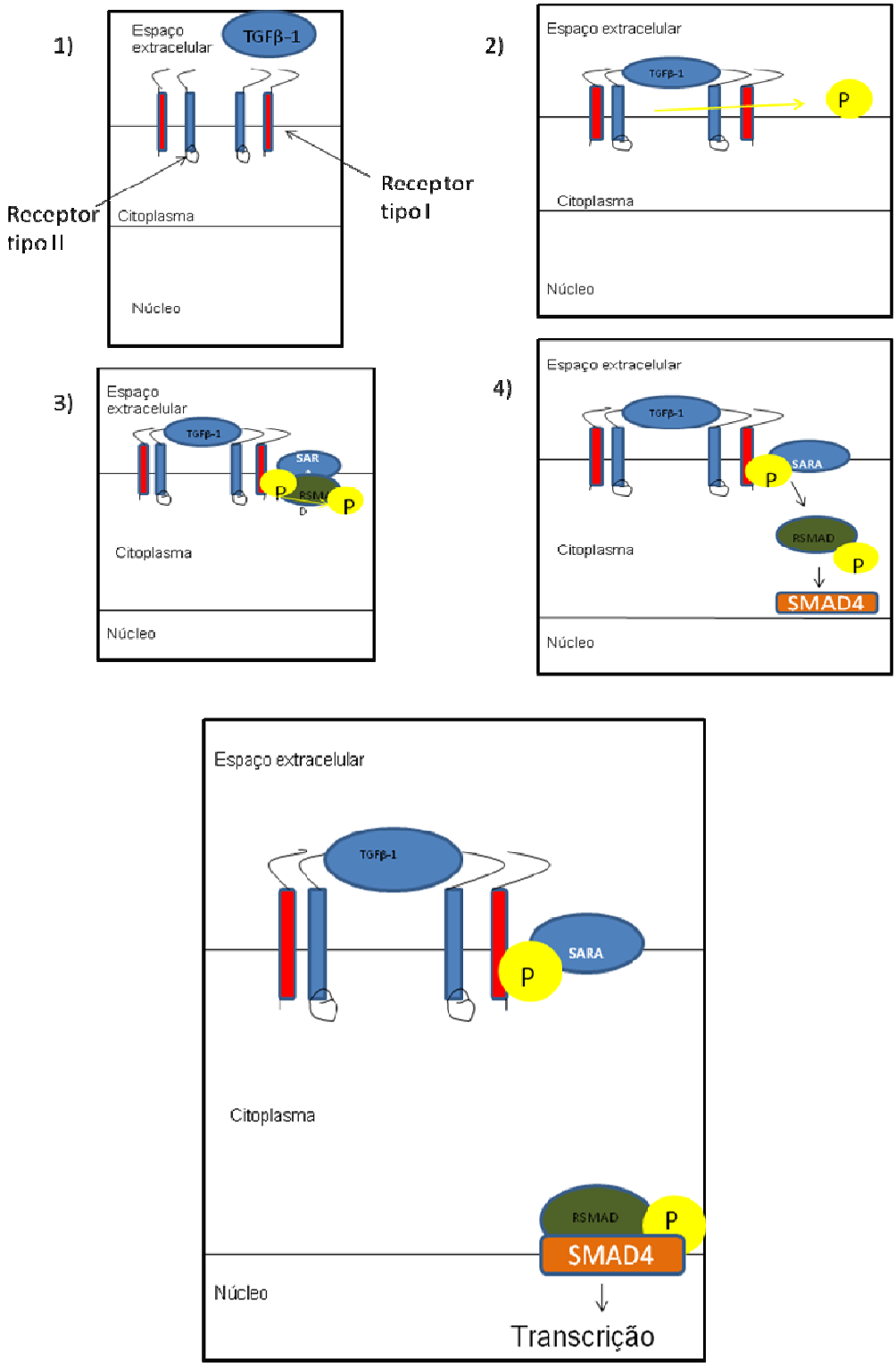

Figura 10: Mecanismo de ação de TGFβ

Superfamília TGFβ ligantes	Receptor tipo II	Receptor tipo I	R-SMADS	coSMAD	Ligantes inibidores
Activina A	ACVR2A	ACVR1B (ALK4)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	Follistatina
GDF1	ACVR2A	ACVR1B (ALK4)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	
GDF11	ACVR2B	ACVR1B (ALK4), TGFβRI (ALK5)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	
Proteínas Morfogenéticas do osso	BMPR2	BMPR1A (ALK3), BMPR1B (ALK6)	SMAD1 SMAD5, SMAD9	SMAD4	Noggin, Chordin, DAN
Nodal	ACVR2B	ACVR1B (ALK4), ACVR1C (ALK7)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	Lefty
TGFβs	TGFβRII	TGFβRI (ALK5)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	LTBP1, THBS1, Decorina

Tabela 2: Superfamília TGFbeta (modificado de MASSAGUÉ *et al.,* 1992)

Portanto, o processo de regeneração-degeneração muscular é coordenado por inúmeros fatores, sincronizado temporalmente e dependentes de concentração adequada. Mesmo com muitos aspectos da genética molecular sendo desvendados, ainda não existe uma cura efetiva para qualquer uma das distrofias musculares e vários trabalhos contraditórios sobre o efeito do GH nas distrofias musculares. Existem, no entanto, diversas técnicas experimentais desenvolvidas como terapia gênica, terapia farmacológica e terapia celular na tentativa de elucidar os efeitos do GH no músculo distrófico (CHAKKALAKAL *et al.,* 2005).

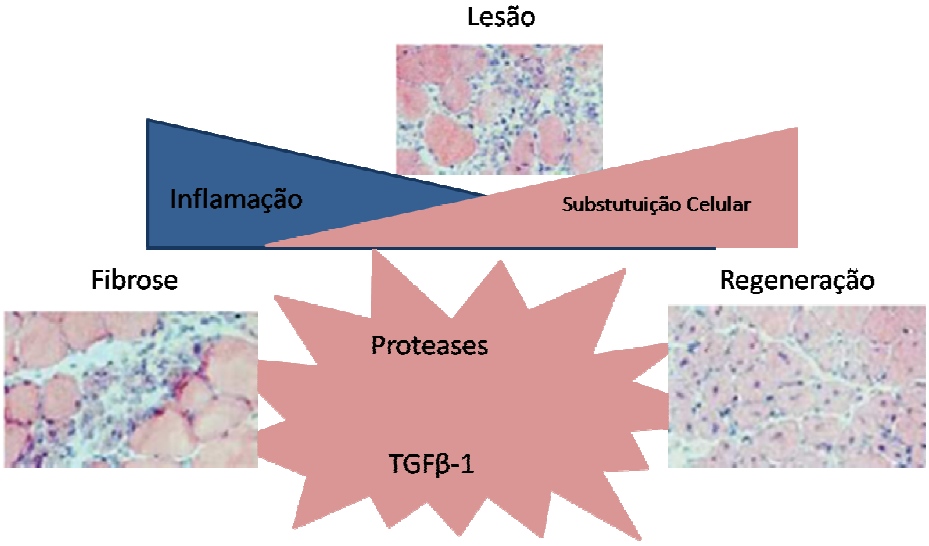

Figura 11: Resumo simplificado da coordenação entre a inflamação e regeneração crucial para recuperação muscular após injúria.

Inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de analisar os efeitos do Hormônio do Crescimento (GH) no músculo de animais e humanos, tentando esclarecer se o seu papel é direto ou mediado pela produção de Fator

de Crescimento Insulina-*like* I (IGF-I) (HALEVY *et al.,* 1996; SADOWSKI *et al.,* 2001; BARTON *et al.,* 2002; SEGARD *et al.,* 2003; SCHERTZER *et al.,* 2006; SOTIROPOULOS *et al*., 2006; SCHERTZER *et al.,* 2007). Embora a presença do receptor de GH (GHR) em células musculares seja difícil de ser detectada, evidências apontam para um papel direto deste hormônio no tecido muscular. Lynch *et al.*(2000) mostraram previamente que administração exógena de rhIGF-1 melhorou a patologia distrófica em camundongos mdx. Apesar dos efeitos da administração de rhIGF-1 na regeneração muscular esquelética terem sido bem caracterizados, o papel da administração de rhGh na regeneração muscular esquelética permanece pouco compreendida.

ZATZ *et al.* (1981) relataram o caso de um menino afetado por DMD que apresentava deficiência de GH cuja evolução clinica era benigna e sugeriram que o GH endógeno poderia estar envolvido na patogênese da doença. Aos 18 anos de idade, o paciente ainda conseguia andar pequenas distâncias sem ajuda (ZATZ & BETTI, 1986). Mais recentemente, o relato de um paciente com DMD e deficiência de GH que não apresentava nenhuma evidência de fraqueza muscular antes do início da terapia de reposição com GH foi documentado corroborando esta hipótese O tratamento com GH resultou no aparecimento de sintomas de fadiga fácil e fraqueza muscular proximal (GHAFOOR *et al.,* 2003).

Diante desses resultados, surgiram várias propostas de utilização de inibidores de GH para tentar retardar a progressão do processo distrófico na DMD, entre eles o mazindol, um inibidor de apetite, parecia atuar como inibidor de GH cujo mecanismo de ação ainda não foi estabelecido por completo,

entretanto, demonstrou-se que esta droga não era efetiva na inibição da secreção do GH por um período de tempo superior a um ano e que pacientes com DMD que fizeram o seu uso ininterrupto apresentaram uma extensa variabilidade individual de resposta, com diminuição não significativa dos níveis médios de GH após 9 a 12 meses de tratamento (Zatz *et al.,* 1988).

Com o surgimento de novas drogas inibidoras do GH e a presença de modelos carregando a mutação espontânea *little (Ghrhr^{lit}),* caracterizados por deficiência de GH, ressurgiu o interesse de estudo dos efeitos de uma inibição efetiva do GH nas distrofias musculares.

1.5 Deficiência do GH

1.5.1 Inibidores do GH

Os agonistas dopaminérgicos foram os primeiros medicamentos terapêuticos utilizados com pacientes com excesso de secreção de GH (acromegalia). Eles se ligam aos receptores D2 e aumentam a liberação do GH em indivíduos normais, mas na maioria dos pacientes com acromegalia, paradoxalmente, suprime a secreção de GH (WASS *et al*., 1977). De maneira geral, as terapias com agonistas dopaminérgicos é de eficácia limitada em pacientes com acromegalia ativa, mas devido a via de administração ser oral e seu relativo baixo custo, um teste com agonistas terapêuticos é frequentemente empregado antes do uso dos análogos da Somatostatina serem considerados.

A introdução dos análogos da Somatostatina significou um avanço no manejo do tratamento da acromegalia, como a Sandostatina e a Somatulina. Entretanto há uma proporção de pacientes (aproximadamente 50%) que não

respondem a estas drogas sozinhas ou combinadas sendo incapazes de atingir controle bioquímico satisfatório.

O surgimento do Pegvisomante, o primeiro antagonista do receptor do GH (GHR) para uso clínico abriu perspectivas de tratamento para estes pacientes não responsivos às outras drogas.

1.5.1.1 Pegvisomante

Pegvisomante, uma droga inibidora do GH, pertencente a uma classe terapêutica totalmente diferente (antagonistas do receptor de GH) com um mecanismo de ação completamente diferente dos demais inibidores. Cunnigham e Wells (1989) identificaram oito resíduos de aminoácidos em GH que, quando alterados, aumentam a afinidade de ligação do sítio I deste hormônio ao GHR. Produziu-se, então, uma molécula contendo nove substituições de aminoácidos combinada com PEG (polietilenoglicol). A molécula resultante, conhecida como PEG-hGH G120K, demonstrou manter sua ligação ao receptor e propriedades antagônicas. Ela age aumentando a afinidade ao sítio I e bloqueando a ligação ao sítio II, impedindo a dimerização funcional do receptor de GH, assim como a ação do GH e a indução da síntese e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) (MULLER *et al.,* 2004).

Semelhante ao GH, este antagonista é um análogo do hormônio que apresenta na posição 120 uma substituição de aminoácido gerando o antagonista e possui um tamanho relativamente pequeno (~22 kDa). O GH tem uma meia-vida de aproximadamente 15 minutos e é normalmente depurado

pelos rins e/ou internalizado pelo receptor. Para aumentar a meia-vida do Pegvisomante, quatro ou cinco resíduos de polietilenoglicol (PEG) foram adicionadas à sua estrutura. Estas moléculas PEG estão covalentemente ligadas aos resíduos de lisina produzindo uma molécula com uma massa de 42-46 kDa. Isto levou a um aumento da meia-vida sérica de aproximadamente 30 min para mais de 100 horas (PARKINSON *et al.,* 2003; MULLER *et al.,* 2004).

PEG-hGH G120K (cujo nome genérico é Pegvisomante) está disponível nos Estados Unidos para o tratamento da acromegalia. Os ensaios clínicos para seu uso na acromegalia foram iniciados em 1997, a droga foi aprovada nos Estados Unidos em março de 2003 e na Europa em novembro do mesmo ano. Pegvisomante é capaz de normalizar as concentrações séricas do fator de crescimento *insulin-like* (IGF-I) em 97% dos pacientes com acromegalia ativa e a terapia está associada com uma melhora significativa nos sinais e sintomas do excesso de GH (PAISLEY *et al.,* 2004). Entretanto, até a presente data, inexistem estudos realizados com essa nova droga, o Pegvisomante, em pacientes com DMD ou em modelos animais de distrofia muscular progressiva.

1.5.1.2 Sandostatina: derivado sintético da Somatostatina e inibidor da liberação do GH

Análogos da Somatostatina têm sido usados há 20 anos para tratamento de pacientes nos quais a cirurgia e/ou radioterapia não respondeu adequadamente, e também como primeira linha de terapia quando outras modalidades estão contra-indicadas ou não são efetivas no controle dos

excessos de secreção do GH e IGF-I. A Somatostatina medeia numerosas ações, incluindo a regulação da secreção de muitos hormônios tais como insulina, glucagon e hormônio estimulante da tireóide (TSH), através de uma extensa família de receptores específicos de superfície celular (REICHLIN, 1983; REUBI *et al*., 1990). Cinco subtipos de receptores de Somatostatina foram clonados todos possuindo sete domínios transmembranares (YAMADA *et al*., 1992, BRUNO *et al.,* 1992; O' CARROLL *et al.,* 1993) que são funcionalmente ligados a adenilato ciclase através do acoplamento de mecanismos envolvendo a proteína G (YASUDA *et al.,* 1992; RAYNOR *et al.,* 1993; PATEL *et al.,* 1994).

Atualmente, tem se procurado desenvolver novos análogos de Somatostatina (SAs) com diferentes seletividades de receptores e moléculas quiméricas capazes de se ligar tanto a receptores de somatostatina como dopamina (COLAO et al.,2003; GÓTH et al., 2002; CHANSON, 2008). O octapeptídeo octreotida (Sandostatina), análogo sintético da Somatostatina, se liga com alta afinidade aos receptores responsáveis pela regulação da secreção do GH. Formulações de longa duração, requerem apenas uma injeção por mês, trazendo grande melhora para aderência e conveniência do tratamento. Três estudos têm sugerido o uso da Sandostatina de longa duração (LAR) na supressão dos níveis séricos de GH e IGF-I comparado a Somatulina (TURNER *et al*., 1999; COZZI *et al.,* 1999; CHANSON *et al.,* 2000).

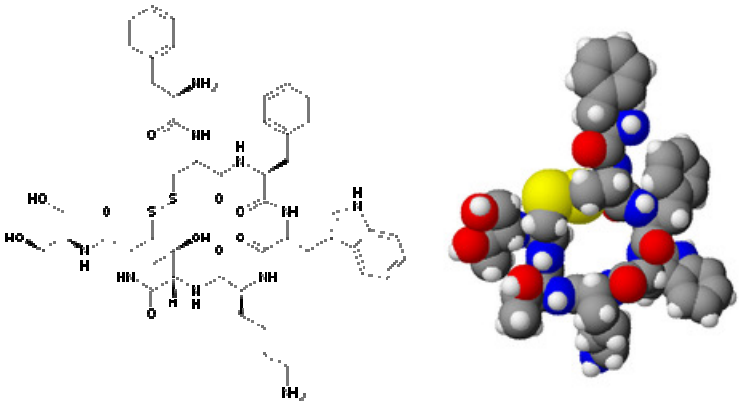

Figura 12: Representação da octreotida, um análogo sintético da Somatostatina (CHANSON *et al.,* 2000)

1.5.1.2.1 Farmacodinâmica da droga

O octapeptídio sintético da somatostatina octreotida (Sandostatin) é um derivado com efeitos farmacológicos similares, mas com duração de ação consideravelmente prolongada. Inibe a secreção patologicamente aumentada do hormônio de crescimento (GH), dos peptídios glucagon e insulina e da serotonina. Em animais, a octreotida é um inibidor mais potente que a somatostatina na liberação do hormônio de crescimento, glucagon e insulina, com maior seletividade para a supressão de GH e glucagon. A administração prolongada (26 semanas) de doses de até 1 mg/kg ao dia (via intraperitoneal) no rato e de até 0,5 mg/kg ao dia (via intravenosa) no cão é bem tolerada.

Em pacientes acromegálicos (incluindo os que não responderam à cirurgia, irradiação ou tratamento com agonistas da dopamina) Sandostatin reduz os níveis plasmáticos do hormônio de crescimento e/ou somatomedina C em doses de 0,1 mg a cada 8 ou 12 horas SC. Na maioria dos pacientes a dose diária ideal será de 0,3 mg. Ocorre redução clinicamente relevante do GH (cerca de 50% ou mais) em quase todos os pacientes e pode ser alcançada

normalização (GH plasmático < 2,5 mg/ml) em cerca de metade dos casos. Na maioria dos pacientes, Sandostatin reduz acentuadamente os sintomas clínicos da doença, tais como cefaléia, edema da pele e tecidos moles, hiper-hidrose, artralgia, parestesia. Em pacientes com um grande adenoma pituitário, o tratamento com Sandostatin pode resultar em alguma diminuição da massa tumoral. Em pacientes com tumores do sistema endócrino gastro-entero-pancreático Sandostatin, devido aos seus diferentes efeitos endócrinos, modifica diversas características clínicas. Ocorre melhora clínica e benefício sintomático em pacientes que ainda apresentam sintomas relacionados aos seus tumores, apesar das terapias anteriores, que podem incluir cirurgia, embolização da artéria hepática e várias quimioterapias, por exemplo, estreptozotocina e 5-fluorouracil (CHANSON, 2008)

1.5.1.2.2 Farmacocinética

Após injeção subcutânea, Sandostatin é rápida e completamente absorvido. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas dentro de 30 minutos. A meia-vida de eliminação após administração subcutânea (SC) é de 100 min comparada com a da somatostatina natural que é de apenas 2 min. Deve ser administrada 2 ou 3 vezes ao dia SC. Após injeção endovenosa (EV) a eliminação é bifásica, com meias-vidas de 10 a 90 minutos respectivamente. O volume de distribuição é 0,27 l/kg e o "clearance" orgânico total é 160 ml/min. A ligação protéica no plasma totaliza 65%. A quantidade de Sandostatin ligada às células sanguíneas é insignificante.

1.5.1.2.3 Dados de Segurança pré-clínicos

Estudos de toxicidade aguda com octreotida em camundongos revelaram valores de DL_{50} de 72mg/Kg por via intravenosa e de DL_{50} de 470mg/Kg por via subcutânea. Em ratos, o valor agudo da DL_{50} por via intravenosa foi determinado em 18mg/Kg. O acetato de octreotida foi bem tolerado em cachorros que receberam mais que 1mg/Kg do peso corpóreo por injeção *bolus* intravenosa.

A octreotida e seus metabólitos foram isentos de potencial mutagênico quando investigados *in vitro* em sistemas celulares e bacterianos de testes validados.

Não foram observadas lesões neoplásicas em camundongos que receberam diariamente injeções subcutâneas de octreotida em doses superiores de 2 mg/Kg por 98 semanas, nem em cachorros tratados diariamente por 52 semanas com doses subcutâneas da droga. Em ratos que receberam acetato de octreotida em doses diárias superiores a 1,25 mg/Kg de peso corpóreo, foram observados fibrosarcomas, predominantemente em animais machos no local da injeção subcutânea após 52, 104 e 113/116 semanas Tumores locais também ocorreram em ratos controles, entretanto o desenvolvimento destes tumores foi atribuído a desordens de fibroplasia produzida pelos efeitos irritantes contínuos nos locais da injeção. O estudo de carcinogênese também em ratos tratados por 116 semanas com injeções subcutâneas de octreotida também revelaram adenocarcinomas uterinos endometriais. Sua incidência só alcança significado estatístico em doses subcutâneas altas de 1,25mg/Kg por dia. As informações disponíveis indicam claramente que a descoberta de tumores mediados pelo sistema endócrino em

ratos são espécies específicas e não são relevantes para o uso de drogas em humanos.

1.5.1.2.4 Principais Indicações

A octreotida é indicada no controle sintomático e redução dos níveis plasmáticos do hormônio de crescimento e somatomedina C em pacientes com acromegalia, inadequadamente controlados por cirurgia, radioterapia ou tratamento com agonistas da dopamina. O tratamento com Sandostatin é também indicado para pacientes acromegálicos inaptos a, ou que não desejem, se submeter à cirurgia; ou ainda no período de intervalo até que a radioterapia se torne completamente eficaz (JAWIARCZYK *et al.,* 2008)

1.5.2 Modelo Animal de deficiência de GH: Camundongo *little* *(Ghrhr^{lit})*

Os camundongos homozigotos para a mutação espontânea *little (Ghrhr^{lit})* são caracterizados por uma deficiência no GH, na prolactina e retardo do crescimento. Os camundongos machos têm fertilidade reduzida e as fêmeas mostram um atraso na lactação. A mutação consiste em uma mudança simples de base que altera (*Asp 60 → Gly)* no receptor do fator de liberação do GH (LIN *et al.,* 1993; GODFREY *et al.,* 1993). Além dos camundongos *little,* surgiram também abordagens farmacológicas para a inibição do GH, como as novas drogas inibidoras da liberação do GH.

II - JUSTIFICATIVA

A ação do GH nas distrofias tem sido controversa na literatura, necessitando de novos estudos. Recentemente, com o surgimento de novas drogas que bloqueiam o efeito ou a liberação de GH e a possibilidade de desenvolvimento de novos modelos animais simulando geneticamente as distrofias humanas, novas perspectivas para estudos experimentais dos efeitos do GH na evolução das doenças distróficas foram abertas.

III – OBJETIVOS

Geral: Estudar os efeitos do excesso e da inibição do GH na evolução de doença distrófica em modelos murinos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J).

Específicos:

1. Estudar os efeitos da administração de GH na evolução da doença dos camundongos distróficos com clínica *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J);

2. Desenvolver um modelo de camundongos mutantes com distrofias musculares e deficiência de GH, obtidos pelo cruzamento dos camundongos distróficos *dy/dy* com aqueles deficientes em GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J), e avaliar a evolução das distrofias durante o desenvolvimento desses animais;

3. Estudar os efeitos da inibição da secreção do Gh pela octreotida, um derivado da somatostatina, sobre a evolução da doença dos camundongos distróficos com clínica *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J);

IV – METODOLOGIA

IV.1 Animais

IV.1.1 Considerações Éticas

Todos os animais utilizados foram obtidos do Laboratório *Jackson* (*Bar Harbor*, *ME, http:www.jax.org*). Os cuidados, armazenamentos e experimentos dos animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética e Pesquisa Animal de Biociências da Universidade de São Paulo.

IV.1.2 Estabelecimento das linhagens animais

O estabelecimento de novas linhagens murinas obtidas a partir de acasalamentos programados vem permitindo associação genética fixados em um único modelo animal que pode ser muito informativo. Os modelos murinos foram os camundongos distróficos e anões. Os camundongos distróficos (*B6.WK- Lama2*$^{dy-2J}$*/J)* foram originalmente comprados do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, http:www.jax.org) e foram mantidos em cruzamento por mais de 15 gerações em nosso laboratório. Os anões (*C57BL/6J- Ghrhrlit /J)* foram doados em colaboração pelo biotério do IPEN – Instituto de Pesquisa e Energia Nuclear e mantidos em nosso laboratório por mais de 5 gerações . Os animais foram criados em um ciclo dia-noite de 12 em 12 horas com uma temperatura ambiente de 24.5 ± 1.0 ^{o}C e umidade de 60 ± 10%. Ração seca para camundongo foi dada *ad lib.*

Fêmeas distróficas portadoras heterozigotas (dy/+ +/+) foram cruzadas com machos portadores anões (+/+ lit/+). Aproximadamente 200 camundongos híbridos para a B6 e lit foram obtidos na geração F1. Todos eles eram fenotipicamente normais. Teoricamente, entretanto os genótipos da prole F1 eram dy/+ lit/+, dy/+ +/+, +/+ lit/+, e +/+ +/+ com uma incidência de ocorrência de 1:1:1:1, respectivamente. Para assegurar a existência de camundongos duplos heterozigotos dy/+ lit/+ e identificá-los utilizamos a metodologia descrita por (LIN *et al.,* 1993; STRAUSS, 1994; VILQUIN *et al.,* 2000) implantada e adaptada em nosso laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. Então, 5 pares de machos e fêmeas de camundongos cujo genótipo foi identificado como dy/+ lit/+, foram obtidos. Eles foram cruzados e aproximadamente 100 ninhadas foram obtidas após duas ou três gestações sucessivas. Os animais híbridos obtidos na geração F2 foram o objeto do presente estudo.

As metodologias utilizadas na produção destas linhagens estão descritas abaixo:

IV.1.3 Genotipagem dos camundongos

IV.1.3.1 Genotipagem dos camundongos *little/little*

A padronização da análise molecular destes camundongos foi de fundamental importância, uma vez que teve como objetivo facilitar a obtenção do nosso modelo final (duplo homozigoto). A possibilidade de identificar precocemente a característica *little,* permitiu acasalamentos precoces com

maiores chances de maiores ninhadas e estabelecimento e perpetuação da colônia (Figura 13).

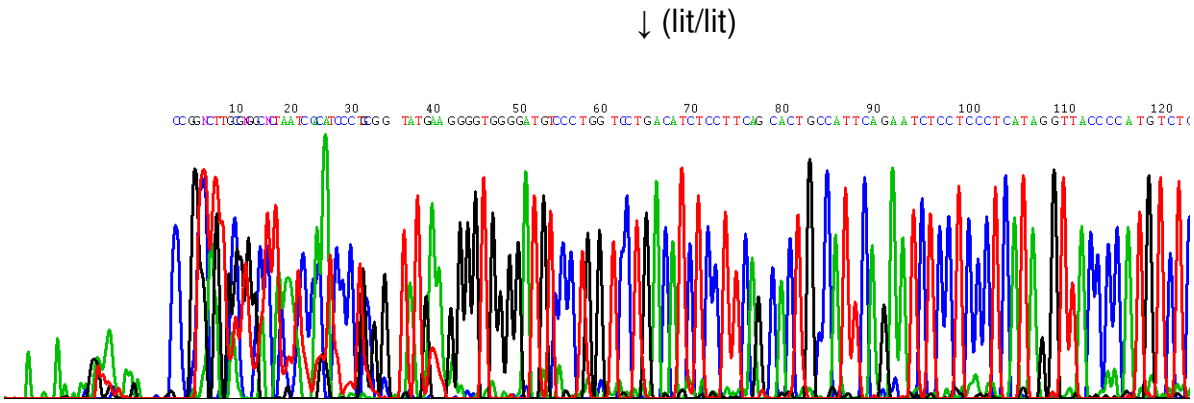

Figura 13 – Sequenciamento do DNA dos camundongos *little.* O DNA genômico foi extraído do rabo dos camundongos e amplificado por PCR. Os amplicons gerados foram submetidos a seqüenciamento. A seta indica a presença da mutação (GGT) de troca de base (A→G).

IV.1.3.2 Genotipagem dos camundongos *B6.WF-Lama 2dy2J*

A padronização da análise molecular destes camundongos foi de fundamental importância, permitindo a identificação dos casais heterozigotos que deram origem aos camundongos afetados (Figura 14) e estabelecimento da colônia uma vez que teve como objetivo o estabelecimento e perpetuação da colônia permitindo a identificação dos casais heterozigotos que deram origem aos camundongos afetados (Figura 14).

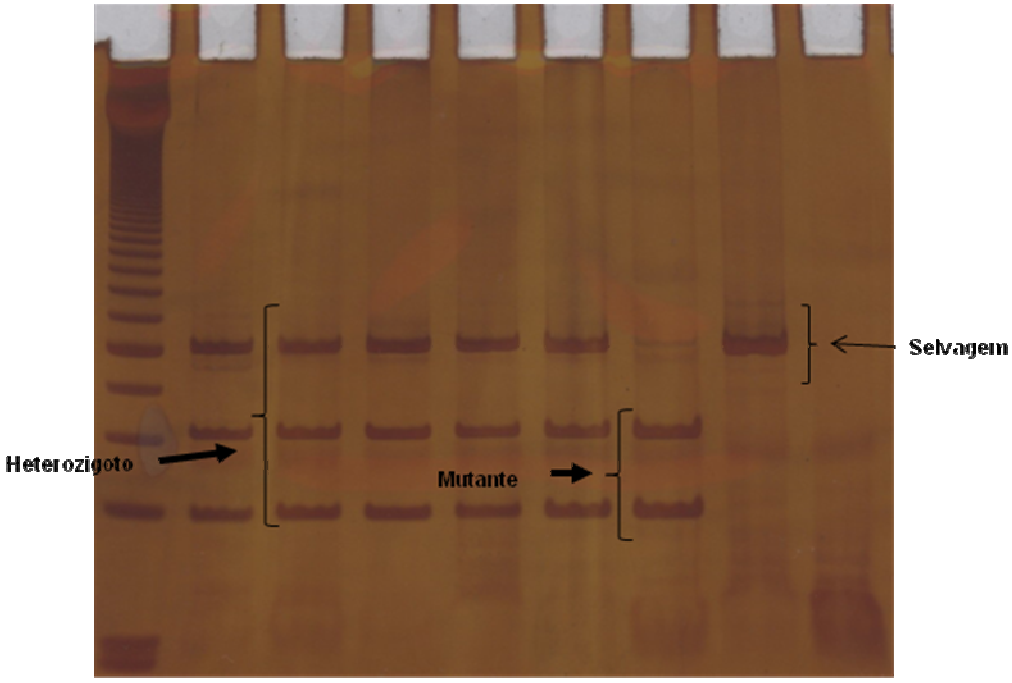

Figura 14 - Genotipagem dos Camundongos *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*. O DNA genômico foi extraído do rabo dos camundongos e amplificado por PCR. Os amplicons gerados foram digeridos com a enzima *NdeI*, capaz de reconhecer o sítio mutado no gene da laminina, submetido à eletroforese e visualizado após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo. As bandas selvagem e mutante são indicadas com as setas.

IV.1.4 Alojamento

Estes animais estão sendo mantidos em condições especiais de alojamento em *rack* (*rack* ventilada ALESCO), fotoperíodo e manejo. Através deste sistema os animais estão protegidos do contato direto com o ambiente externo. A sala possui também sistema de controle de iluminação (fotoperíodo) com intensidade luminosa reduzida; isolamento físico para o controle de acesso de pessoal e de ruídos e o manejo é realizado por pessoal técnico especializado.

IV.1.5 Acasalamentos programados

Os acasalamentos foram realizados após análise fenotípica e genética das crias. Obtivemos assim o primeiro modelo animal congênico *little/dy.* O propósito deste trabalho foi reunir os fenótipos *little e dy* em um único animal constituindo-se desta forma em uma linhagem recombinante duplamente homozigota. Os acasalamentos iniciais foram desenhados de forma a se assegurar a heterogozidade dos genótipos *lit* e *dy* nos descendentes.

IV.1.5.1 Resumo dos esquemas de acasalamento

1º) ♀ *heterozigotas para dy (DdLL)* foram acasaladas com ♂ heterozigotos para *little (DDLl)*

Os descendentes teriam uma chance de 1/4 de serem duplos heterozigotos para as características *dy* e *lit.*

2º) ♂ F1 (duplos heterozigotos para *dy* e *little*) foram acasalados com ♀ F1 (duplos heterozigotos para *dy* e *little*) (*DdLl x DdLl*)

Os descendentes F2 teriam uma chance de 1/16 de serem *dy* e *lit*.

IV.1.6 Avaliação Funcional

IV.1.6.1 Testes comportamentais e funcionais da musculatura esquelética apendicular

Para verificar se houve melhora na habilidade motora nos animais, realizamos testes de habilidade motora nos camundongos C57BL controles, distróficos, anões e anões distróficos. Os camundongos foram examinados, pesados e submetidos aos seguintes testes: (a) teste de inclinação da

prancheta que avaliou a ângulo máximo no qual o animal era colocado e deslizava; (b) teste de sustentação no fio para determinar a habilidade do animal para se manter em uma linha horizontal pelas patas dianteiras, alcançá-lo com as patas traseiras e o tempo que eles eram capazes de se manterem no fio em sustentação; (c) teste de deambulação o qual foi realizado para determinar a média do comprimento da passada medida em tinta impressa enquanto o camundongo corria livremente em um corredor (comprimento, 50 cm; largura, 8 cm; altura das paredes laterais, 20 cm) (KENNEL *et al.,* 1996)

Os testes descritos a seguir foram padronizados baseando-se em KENNEL *et al.* (1996) e feitos em colaboração com a Profa. Dra. Patricia Chakur Brum e Carlos Roberto Bueno Júnior do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Teste de deambulação (Figura 15)

As patas traseiras dos animais são colocadas em contato com tinta preta não tóxica e em seguida eles são colocados em uma caixa retangular de madeira (sem teto e forrada com papel branco) para caminharem. Posteriormente, o comprimento das passadas e as distâncias entre a pata direita e a esquerda são medidas.

Figura 15: Teste de deambulação

Teste de resistência à inclinação (Figura 16)

Os animais são colocados sobre uma prancheta de madeira, que é inclinada em velocidade constante. Anota-se o ângulo no qual os animais escorregam da prancheta.

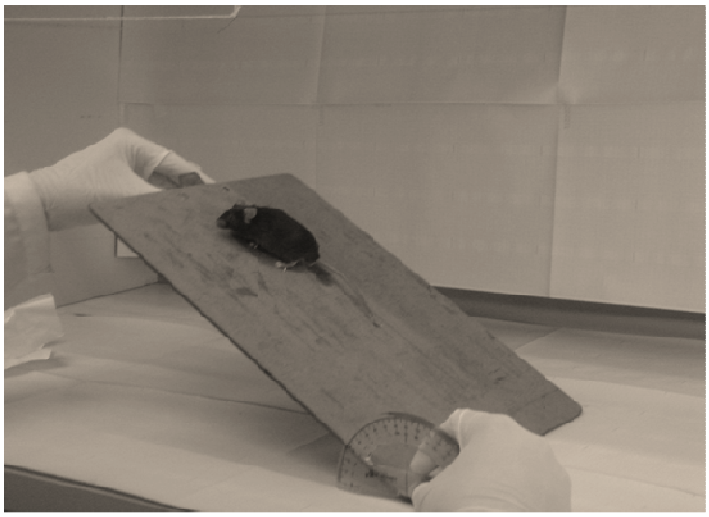

Figura 16: Teste de resistência à inclinação

Teste de sustentação (Figura 17)

As patas dianteiras dos animais são colocadas em contato com um fio e quando os animais seguram o fio com as 2 patas, o tempo começa a ser cronometrado. Anota-se com quantas patas o animal toca o fio e quanto tempo ele leva para se desprender do fio.

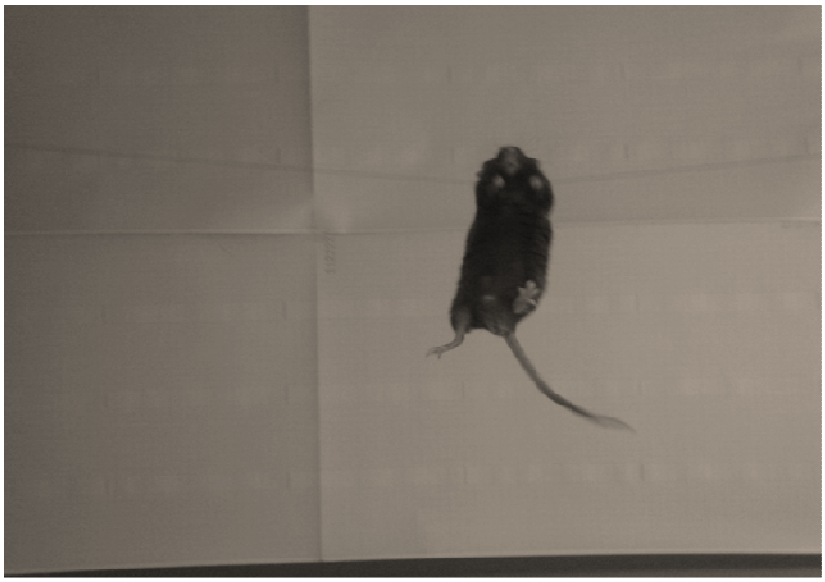

Figura 17: Teste de sustentação

Teste de corrida em esteira rolante (Figura 18)

A tolerância ao esforço físico é avaliada por meio de teste progressivo até à exaustão, onde os animais fazem um teste de protocolo escalonado de exercício físico com velocidade inicial de 6 m/min e a velocidade da esteira é aumentada para 9 m/min (a cada 3 minutos incrementos de 3m/min até a exaustão do animal) (FERREIRA *et al.,* 2007).

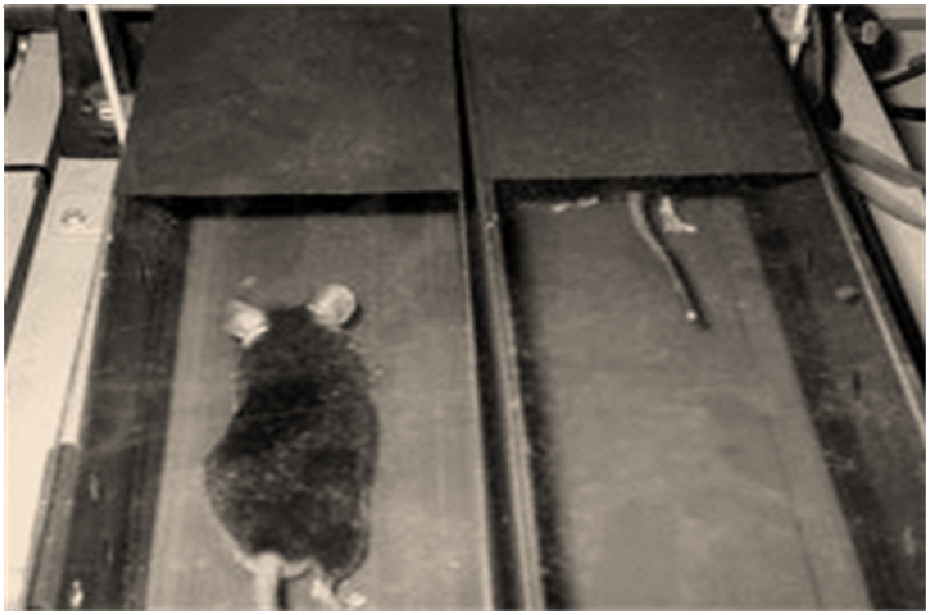

Figura 18: Teste de corrida em esteira rolante

IV.1.7 Testes de funcionalidade da musculatura esquelética apendicular com eletroestimulação (Figura 19)

Os testes descritos a seguir foram padronizados e feitos em colaboração com o Prof. Dr. Rui Curi e Carlos Hermano do Laboratório de Fisiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Teste Funcional do Músculo Esquelético (Figura 19)

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (5mg/100g de massa corporal). Uma perna foi cirurgicamente preparada para eletroestimulação do nervo ciático. O joelho foi fixado por pino na plataforma de eletroestimulação. O tendão do calcâneo foi conectado a um transdutor de força (*Narco Bio-System, Houston, EUA*). O grau

de estiramento do músculo e a voltagem foram ajustados até que se atingiu a maior amplitude dos abalos de força para cada animal (BROOKS *et al.*, 1988). As contrações musculares intensas foram induzidas por eletroestimulação durante 10min. O protocolo consistiu em *trains* de 200ms em intervalos de 1s. A freqüência de estimulação foi de 100Hz com duração de pulso de 0.1ms, respectivamente (WOJTASZEWSKI *et al.*, 1996; SILVEIRA *et al.* 2007). O transdutor de força foi conectado a um detector de sinais, e os dados foram obtidos utilizando o programa *Lynx Electronics Ltda* e analisados utilizando os programas *AqAnalysis* (*Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo*) e *Origin* (*OriginLab Corporation, EUA*).

O desenvolvimento de força máxima do tríceps sural foi avaliado pela média de picos de força produzidos durante 1 minuto de contrações intensas. O decaimento da força muscular esquelética durante contrações intensas foi avaliado por 10min e expressa como porcentagens da força máxima produzida inicialmente. O desempenho (em 10min) foi quantificado como o declínio nos valores de picos iniciais (VEDSTED *et al* 2003).

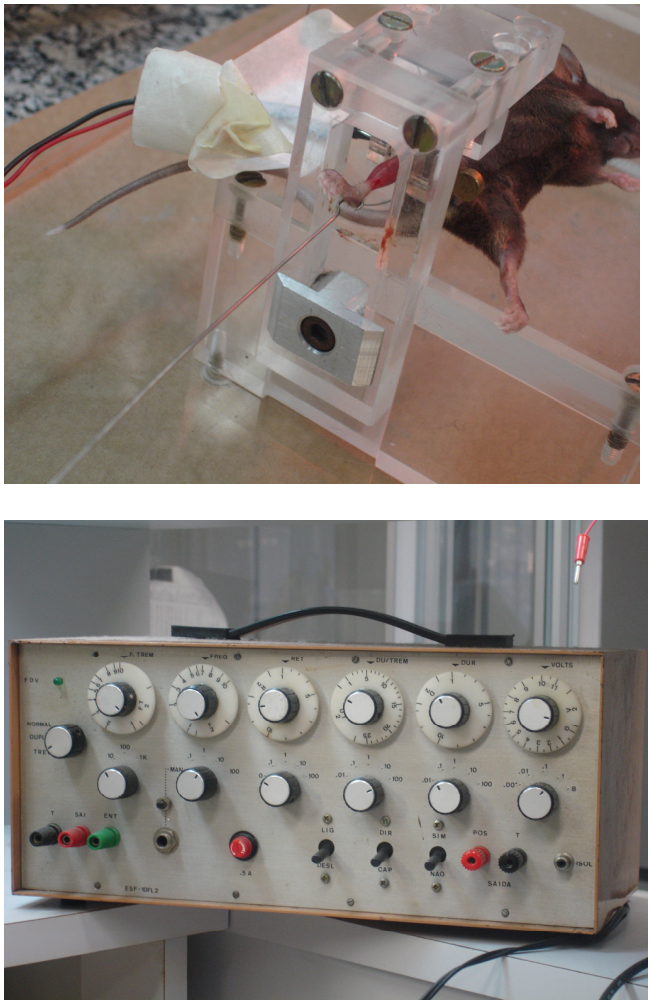

Figura 19: Teste de eletroestimulação

IV.1.8 Teste do Grip

Os animais que tomaram Sandostatina e seus respectivos controles realizaram mais dois testes: Grip (Figura 20) e Rotarod (Figura 21) implantados no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. Para o Grip, colocamos as patas dianteiras do animal em contato com a grade que traduz a força de preensão palmar através de um dinamômetro em N (Newtons). No Rotarod

medimos o tempo que o animal consegue ficar equilibrado em cada tubo (Figura 21) (KENNEL *et al.*,1996)

Figura 20: Teste de preensão palmar

IV.1.9 Teste do Rotarod

Figura 21: Rotarod

IV.1.10 Técnica de *Western Blotting*

Para a análise dos marcadores de regeneração e degeneração muscular utilizamos a técnica de *Western Blotting* (WB). As amostras de proteína de músculo foram extraídas através de tratamento com tampão contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% de Triton X-100 e 60mM octil glicosídio. As amostras foram centrifugadas a 13.000g por 10min para remover os debris insolúveis. e o sobrenadante aplicado num gel de poliacrilamida 12% e/ou 15% (SDS-PAGE) e transferido para a membrana de nitrocelulose. A Hibridização com anticorpo é precedida pela coloração com *Ponceau*, corante específico para proteínas. Em seguida, a membrana é lavada e nela aplica-se leite em pó a 5% por uma hora. Removido o leite, a membrana recebe o anticorpo primário, sendo encubada a 4°C *overnight* (ZUBRZYCKA-GAAR *et al.,* 1988).A revelação consiste na reação com um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina. Utilizamos como anticorpos primários o MyoD (1:500), a Desmina (1:200), Laminina (1:000), PAX-7(1:200) e TGFβ-1(1:1000).

As amostras de proteína de músculo foram extraídas através de tratamento com tampão contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% de Triton X-100 e 60mM octil glicosídio. As amostras foram centrifugadas a 13.000g por 10min para remover os debris insolúveis. e o sobrenadante aplicado num gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e transferido para a membrana de nitrocelulose. A Hibridização é com anticorpo é precedida pela coloração com *Ponceau*, corante específico para proteínas. Em seguida, a membrana é lavada e nela aplica-se leite em pó a 5% por uma hora.

Removido o leite, a membrana recebe o anticorpo primário, sendo incubada a 4°C *overnight* (ZUBRZYCKA-GAARN *et al.,* 1988).A revelação consiste na reação com um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina.

IV.2 Administração do inibidor da liberação do GH.

O inibidor da liberação do GH foi cedido e a dose padronizada pelo Prof. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho diretor dos Laboratórios Genpharma e Farmacologia Molecular do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará. A dose preconizada foi de 6µg/12/12hs/camundongo por injeção subcutânea (SC). O acompanhamento foi feito baseado na avaliação mensal dos sintomas clínicos (peso e comprimento). Para os experimentos de injeção, os animais tratados receberam injeção intraperitoneal de rhGH (10µg/100µL/camundongo/dia) por 10 dias, enquanto que os animais controle receberam somente salina (BELLINI & BARTOLINI, 1992). Para determinar o efeito da deficiência do GH utilizou-se o inibidor da liberação do GH (Sandostatin ®-0,1mg/mL) em uma dose de 1,5µL/injeção/12 em 12 horas. Antes de iniciarmos o tratamento medimos os valores de GH no sangue destes animais e todos apresentavam valores normais.

IV.3 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas e quantificadas em teste cego por dois autores (Carvalho MDF e Bueno Junior CR) independentemente um do outro. Os dados numéricos são as médias (standard deviation). As análises estatísticas de equivalência entre os duplos homozigotos e os camundongos controles foram obtidos pelos testes *t-student* e *ANOVA* em um nível de

significância de $p \leq 5\%$ e os resultados foram expressos em unidades reais e pela variação de percentagem entre as performances de cada grupo.

PARTE 1:

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO GH (10µg/camundongo/dia, i.p., por 10 dias consecutivos) SOBRE A MUSCULATURA DOS ANIMAIS *C57Black6* CONTROLES e DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J)

Os resultados a seguir apresentaram os efeitos da administração do GH (10µg/camundongo/dia, i.p., por 10 dias consecutivos) nos camundongos *C57Black6* controles e distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) nos seguintes testes funcionais da musculatura esquelética:

Teste de Deambulação

Os resultados do Gráfico 1 mostram que:

a) A performance dos camundongos distróficos foi 23,1% menor ($p<0,05$) que a dos normais;

b) O GH aumentou em 12,9% ($p<0,05$) a performance dos camundongos normais;

c) O GH diminuiu em 17,6% ($p<0,05$) a performance dos camundongos distróficos;

Teste de Sustentação

Os resultados do Gráfico 02 mostram que:

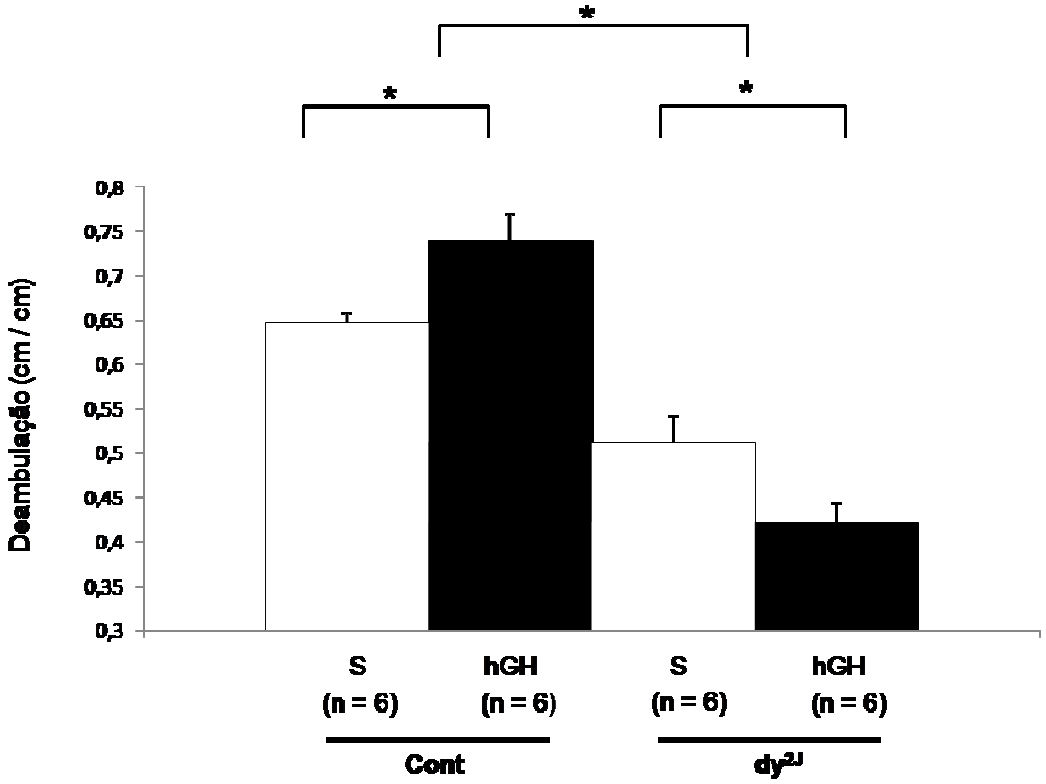

Gráfico 01: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

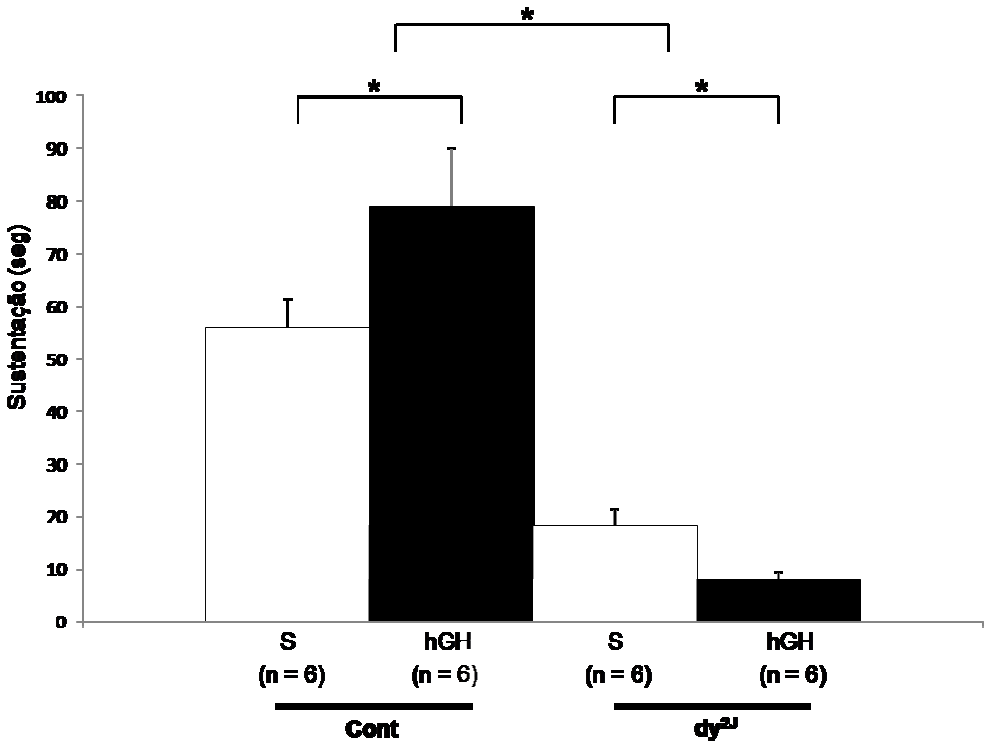

Gráfico 02: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

a) A performance dos camundongos distróficos foi 67,8% menor ($p<0,05$) que a dos normais;

b) O GH aumentou em 28,2% ($p<0,05$) a performance dos camundongos normais;

c) O GH diminuiu em 64,7% ($p<0,05$) a performance dos camundongos distróficos;

Teste da Esteira

Os resultados do Gráfico 03 mostram que:

a) A performance dos camundongos distróficos foi 39,1% menor ($p<0,05$) que a dos normais;

b) O GH aumentou a performance dos camundongos normais, mas os resultados não apresentaram diferenças significativas;

c) O GH diminuiu em 28,6% ($p<0,05$) a performance dos camundongos distróficos;

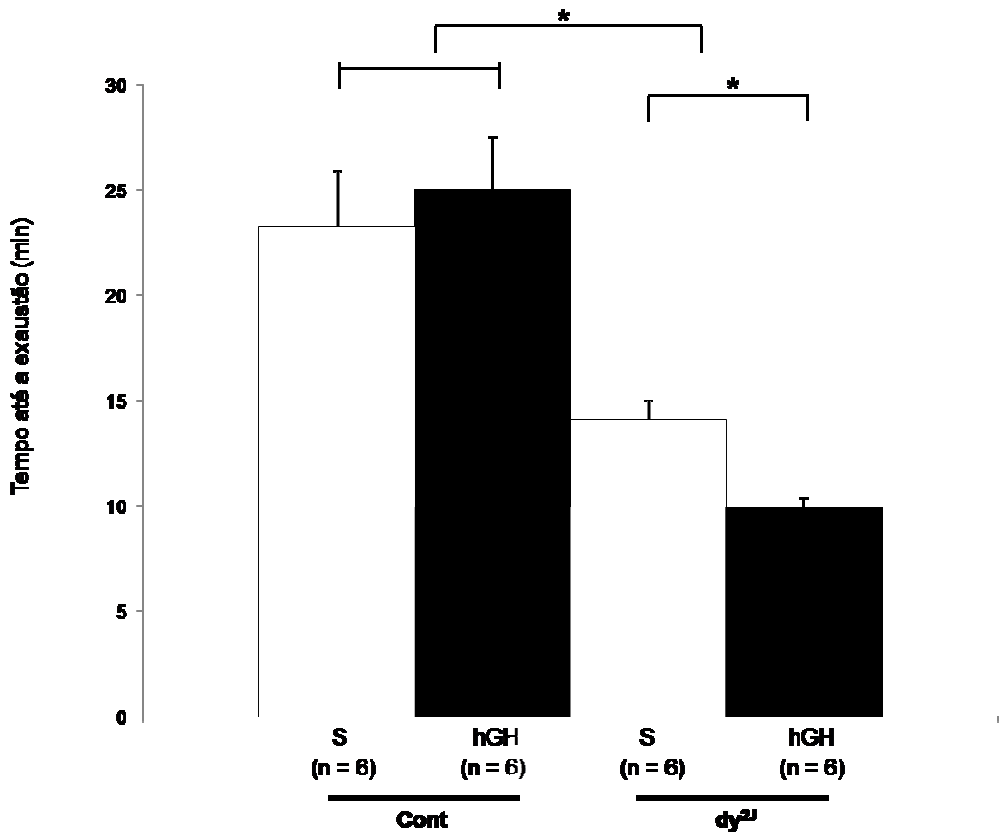

Gráfico 03: Teste da esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

Teste da Força Máxima sob Eletroestimulação do Nervo Ciático

Os resultados do Gráfico 04 mostram que:

a) A performance dos camundongos distróficos foi 63,6% menor ($p<0,05$) que a dos normais;

b) O GH aumentou a performance dos camundongos normais, mas os resultados não apresentaram diferenças significativas;

c) O GH diminuiu em 55.6% ($p<0,05$) a performance dos camundongos distróficos;

Teste de Resistência à Inclinação

Os resultados do Gráfico 05 mostram que:

a) A performance dos camundongos distróficos foi 10,8% menor ($p<0,05$) que a dos normais;

b) O GH não alterou significativamente as performances dos camundongos normais nem dos distróficos.

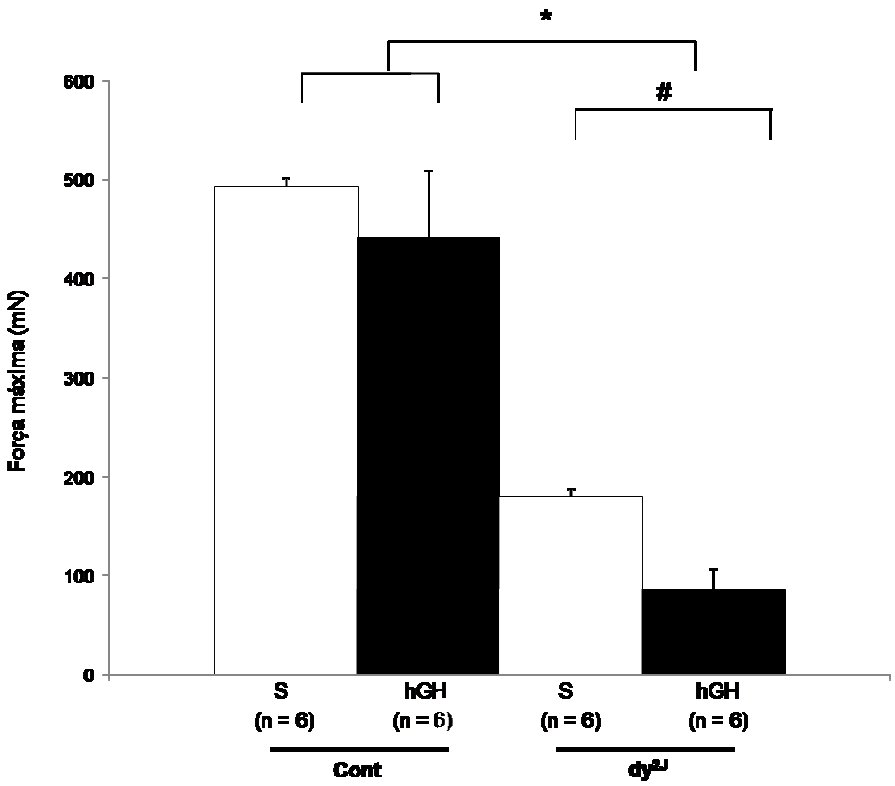

Gráfico 04: Teste de força máxima nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(#) $p < 0,01$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

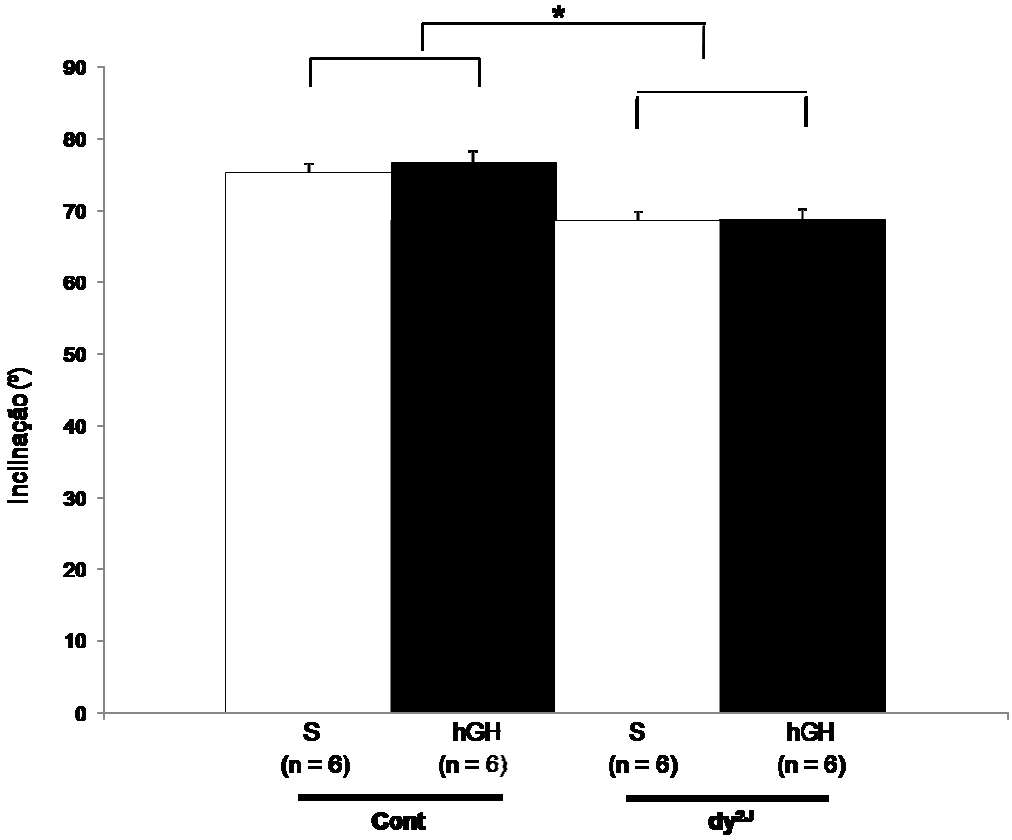

Gráfico 05: Teste de resistência a inclinação nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

Os resultados a seguir apresentam cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios dos camundongos *C57Black6* controles e distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J), antes a após a administração do GH:

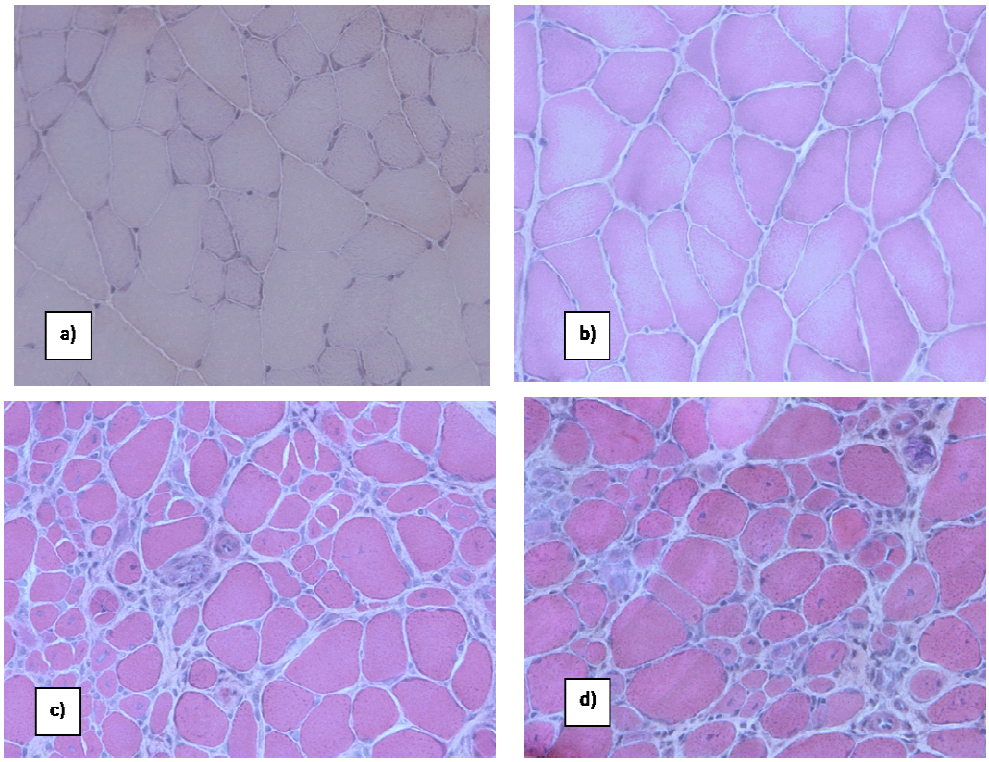

Figura 22: Histologia do gastrocnêmio para análise: da área das fibras musculares, da área do insterstício e da proporção de fibras musculares com a presença de núcleos centrais. Histologia do Músculo em HE (Hematoxilina-Eosina) a) Controle b) Controle com GH(***) c) Distrófico d) Distrófico com GH(***)

(***) Dose de GH: 10 microgramas/camundongo/dia durante 10 dias

Área da secção transversal

Os resultados do Gráfico 06 mostram que:

a) A área de secção transversal dos músculos dos animais normais foi 29,6% maior ($p<0,05$) que a dos distróficos;

b) O GH aumentou significativamente a área de secção transversal dos músculos dos camundongos normais de 16,5% ($p<0,05$);

c) O GH não alterou a área de secção transversal dos músculos dos camundongos distróficos;

Área do interstício

Os resultados do Gráfico 07 mostram que:

a) A área do interstício nos músculos dos animais distróficos foi 200% maior ($p<0,05$) que a dos animais normais;

b) O GH não alterou significativamente as áreas dos interstícios nos músculos normais e nem nos distróficos.

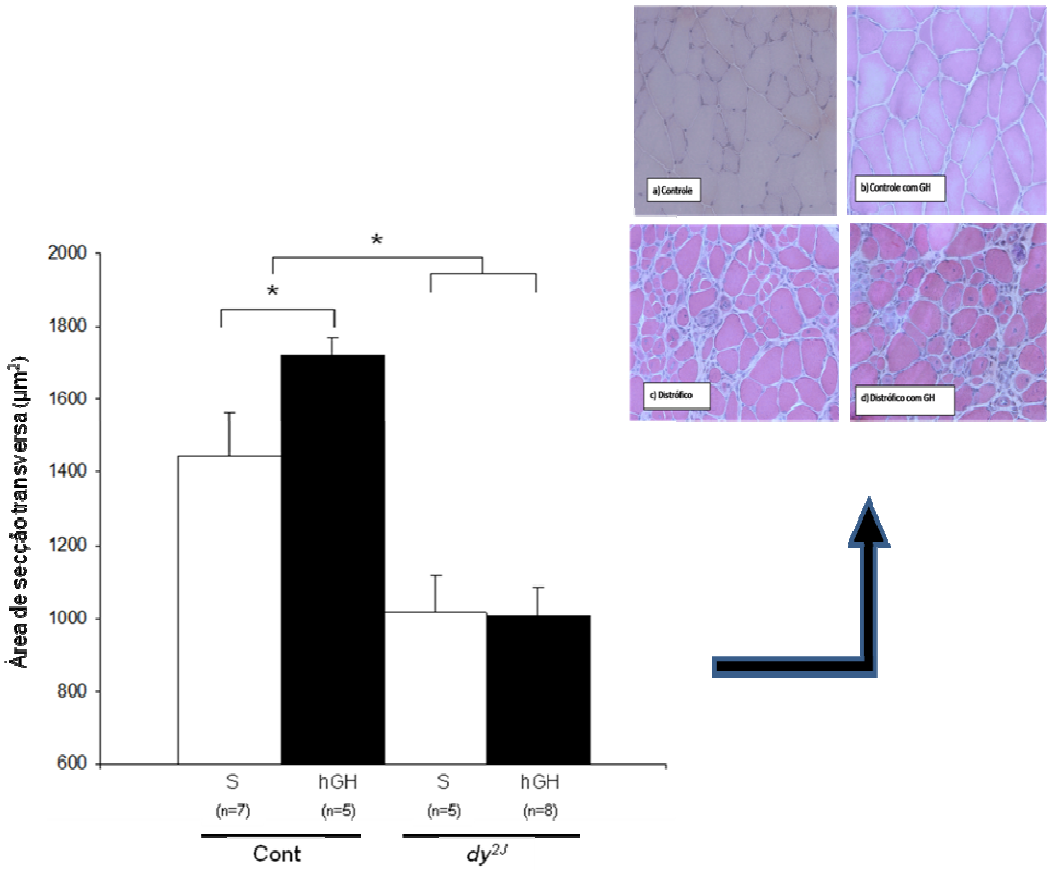

Gráfico 06: Área da secção transversa do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

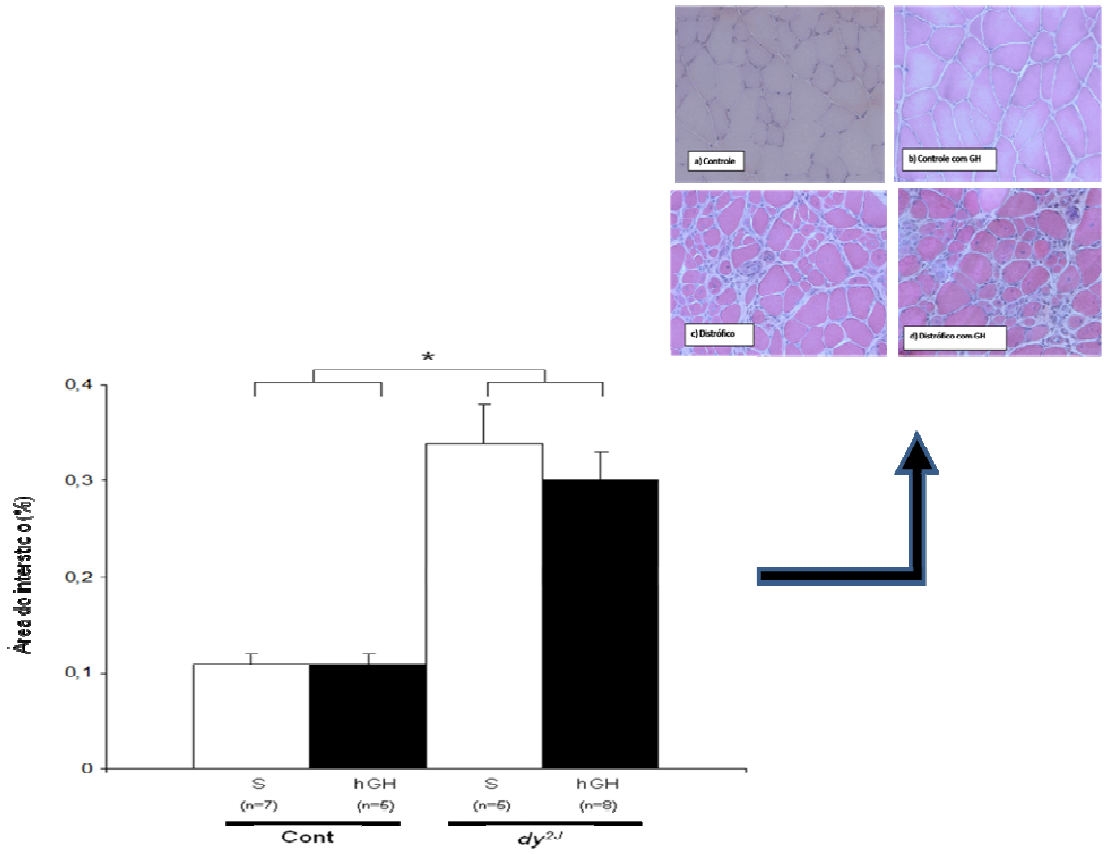

Gráfico 07: Área do interstício em % no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

Número de fibras com núcleo central

Os resultados do Gráfico 08 mostram que:

a) O número de fibras com núcleo central nos músculos dos animais distróficos foi 94% maior ($p<0,05$) que a dos animais normais;

b) O GH não alterou significativamente número de fibras com núcleo central nos músculos normais e nem nos distróficos.

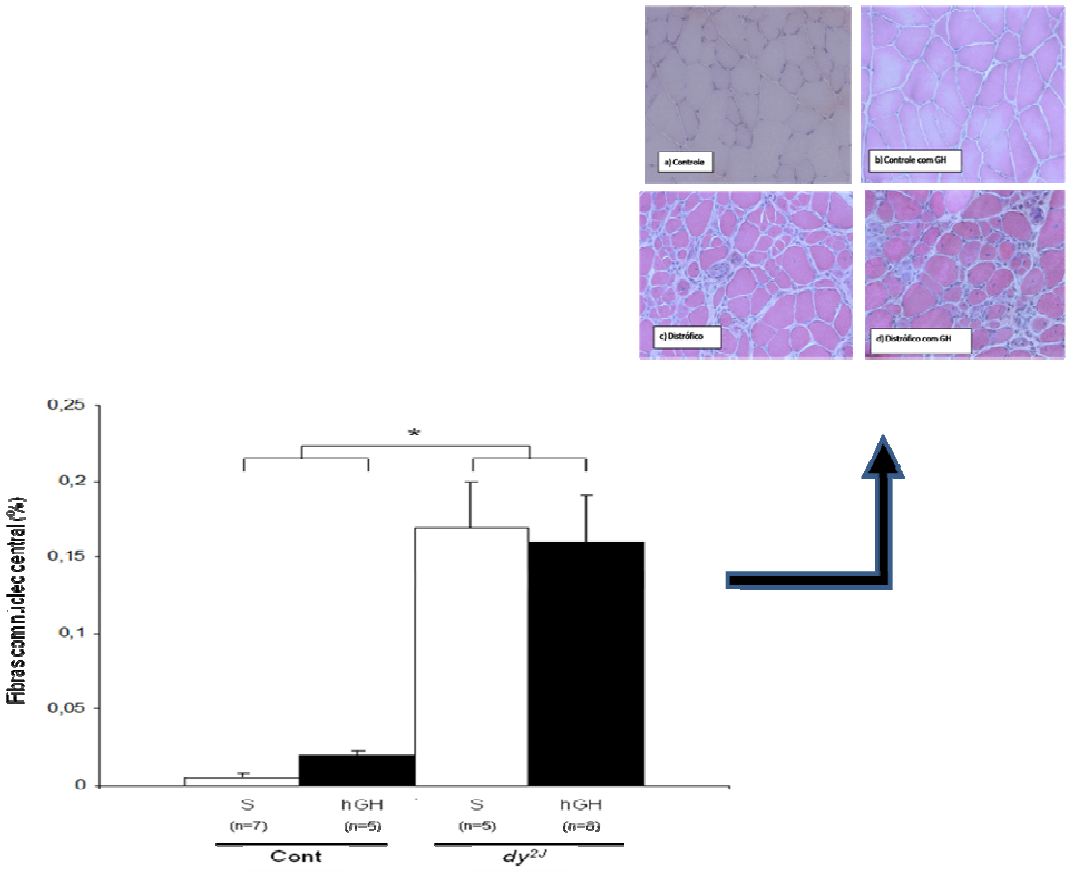

Gráfico 08: Número de fibras com núcleo central no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

Os resultados a seguir apresentam a quantificação de marcadores de regeneração e degeneração musculares nos camundongos controles e distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J), antes e após a administração do GH:

Pax7

Os resultados do Gráfico 09 mostram que:

a) Os níveis de Pax7 estavam 35% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) A administração do GH não alterou os níveis de Pax7 nos camundongos normais e distróficos.

MyoD

Os resultados do Gráfico 10 mostram que:

a) Os níveis de MyoD estavam 60% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) A administração do GH não alterou os níveis de MyoD nos camundongos normais e distróficos.

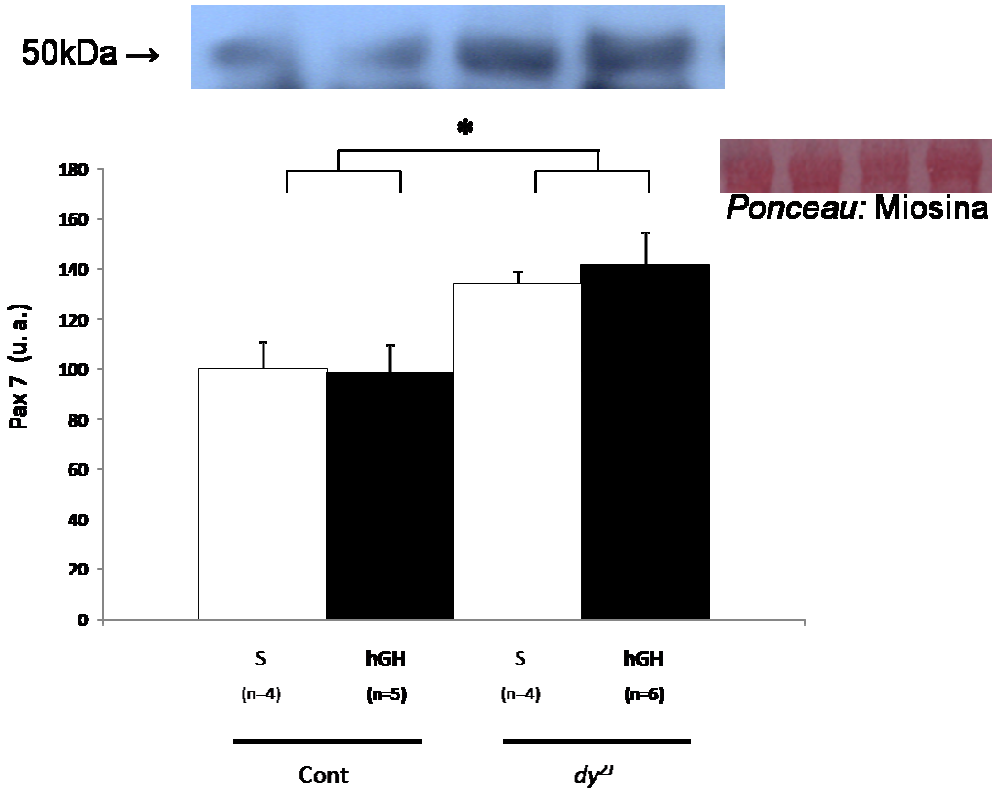

Gráfico 09: Conteúdo do Pax7 no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

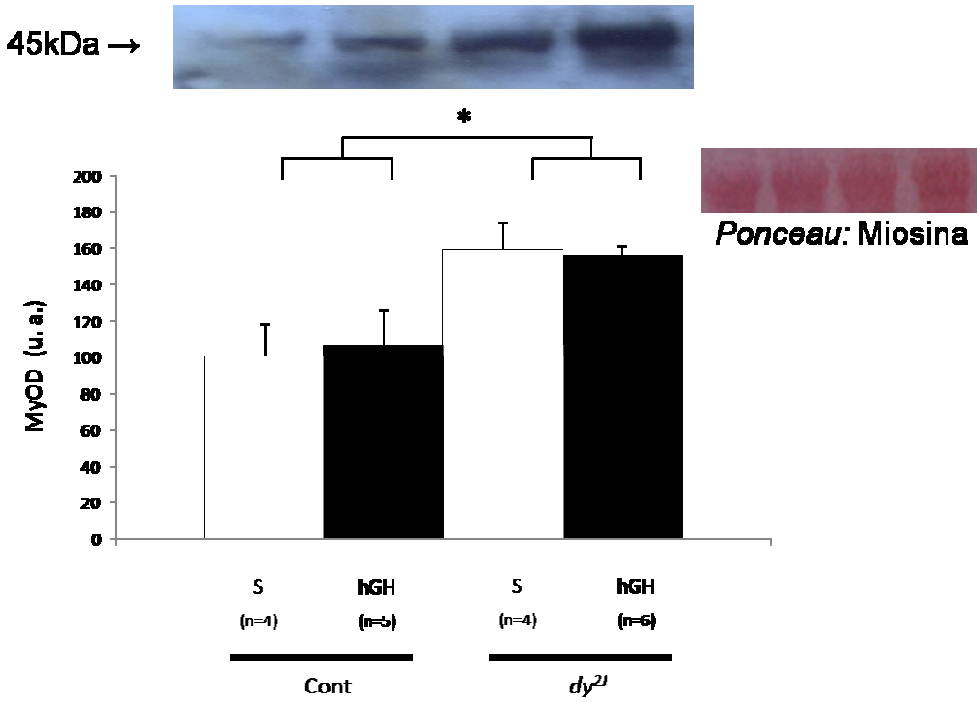

Gráfico 10: Conteúdo do MyoD no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

Laminina

Os resultados do Gráfico 11 mostram que:

a) Os níveis de Laminina estavam 55% diminuidos ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) A administração do GH não alterou significativamente os níveis de Laminina nos camundongos normais e distróficos.

Desmina

Os resultados do Gráfico 12 mostram que:

a) Os níveis de Desmina estavam 24% umentados de maneira não significativa no décimo dia de administração do GH nos camundongos distróficos;

b) Os níveis de Desmina estavam 32% umentados de maneira não significativa no décimo dia de administração do GH nos camundongos controles;

c) A administração do GH não alterou significativamente os níveis de Desmina nos camundongos normais e distróficos.

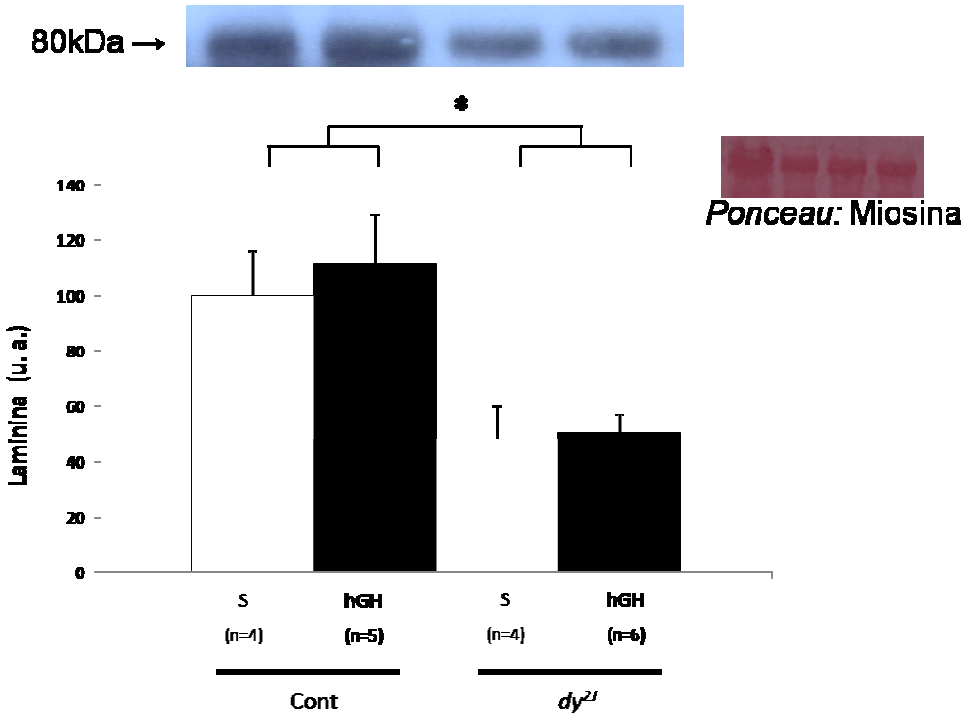

Gráfico 11: Conteúdo da Laminina no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

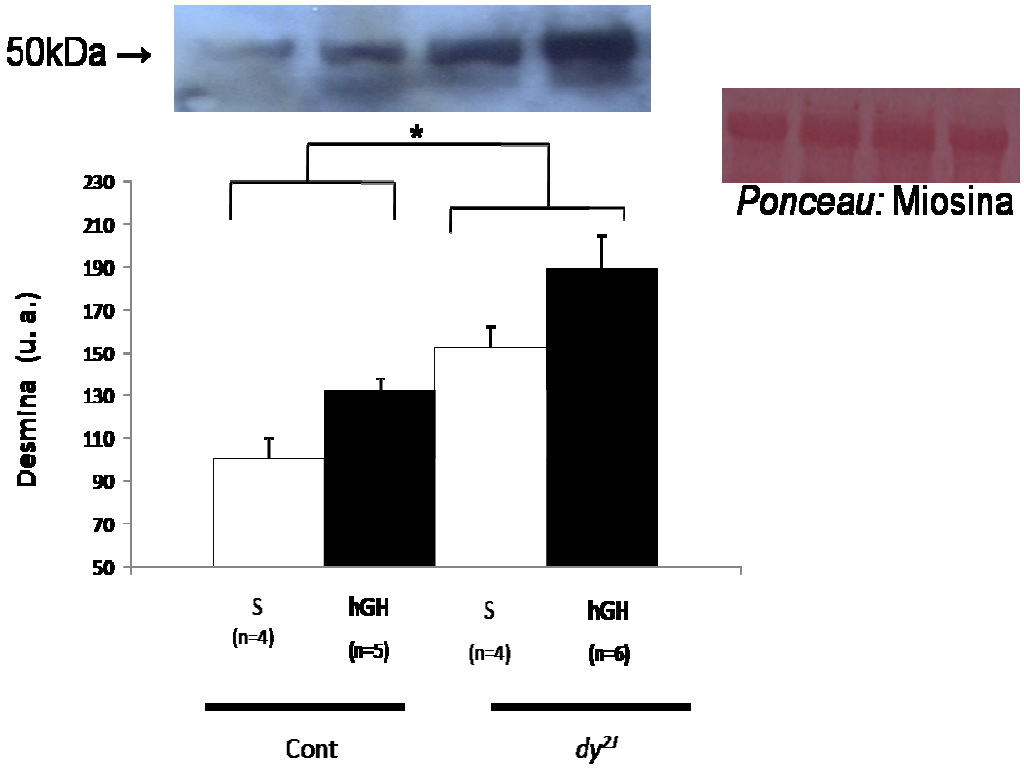

Gráfico 12: Conteúdo da Desmina no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

TGFβ-1

Os resultados do Gráfico 13 mostram que:

a) O GH aumentou os níveis de TGFβ-1 nos camundongos não distróficos, mas os resultados não mostraram diferenças significativas

b) Os níveis de TGFβ-1 estavam 35% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

c) A administração do GH aumentou em 30% ($p<0,05$) os níveis de TGFβ-1 nos camundongos distróficos.

d) Os níveis de TGFβ-1 estavam 90% mais elevados ($p<0,05$) nos camundongos distróficos que tomaram GH em relação aos camundongos controles;

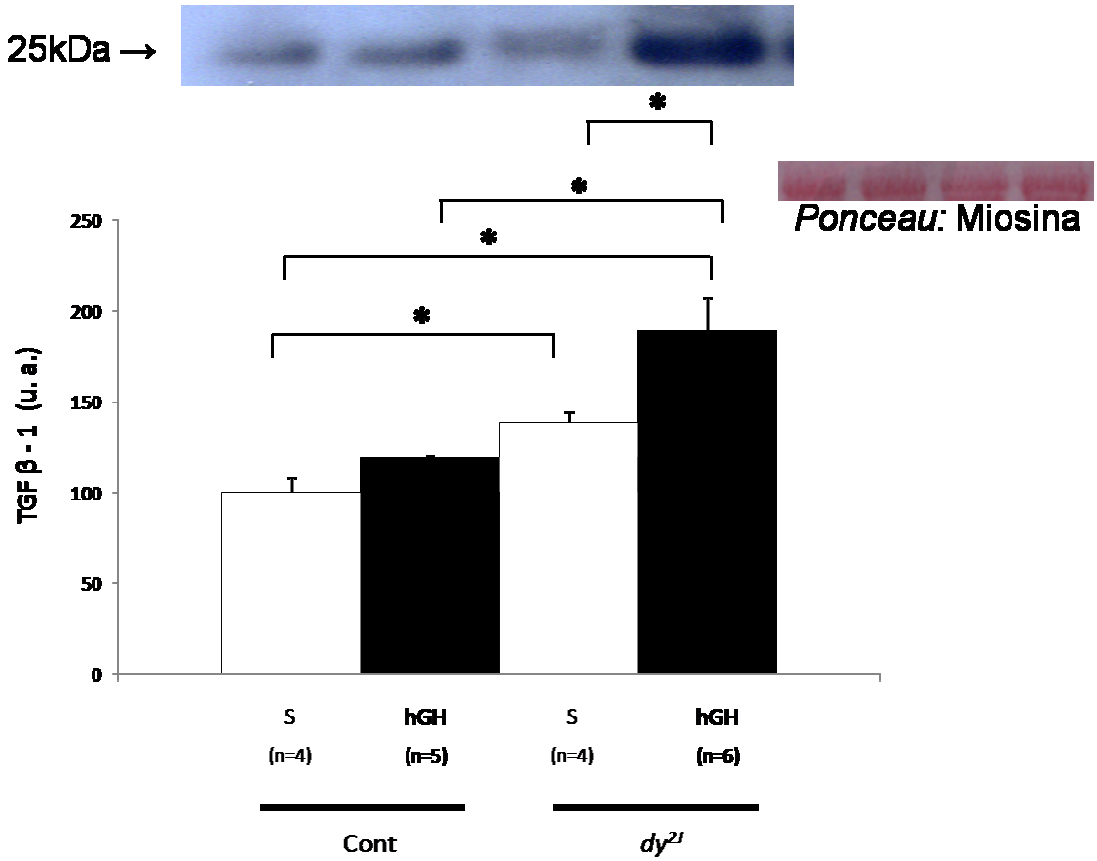

Gráfico 13: Conteúdo do TGFβ-1 no músculo dos camundongos *C57Black6:* controles, controles em que foram administrados GH(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH(**)

(*) $p < 0,05$

(**)Dose de GH: 10 microgramas / camundongo / dia

PARTE 2:

AVALIAÇÃO DO QUADRO DISTRÓFICO DE CAMUNDONGOS OBTIDOS PELO CRUZAMENTO DE ANIMAIS *C57Black6* DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) COM ANÕES COM DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J).

Os resultados a seguir (Figuras 23 e 24) mostram o resultado do trabalho de 2 anos de cruzamento entre camundongos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) e *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J) com obtenção de mais de 100 ninhadas. Finalmente obtivemos 4 exemplares duplos homozigotos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J) x *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J).

Estes animais apresentavam comprimento menor que os controles nosrmais e maior que o anão não distrófico (Figura 23). Os resultados dos testes musculares esqueléticos serão mostrados a seguir.

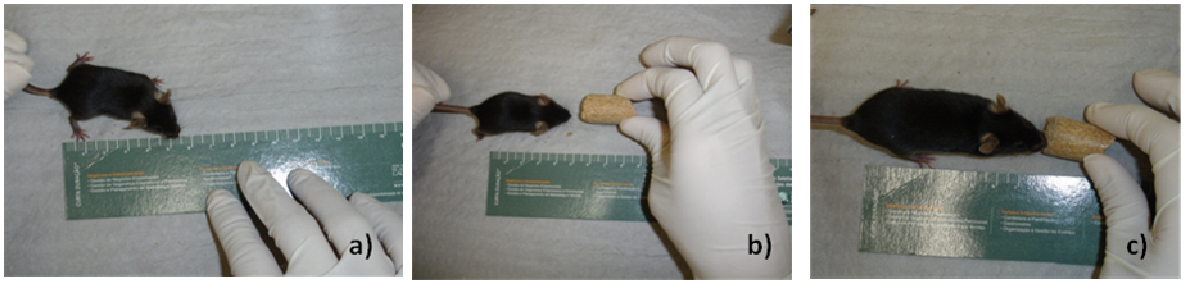

Figura 23: Camundongos *C57Black6:* a) anão/distrófico (duplo homozigoto) b) anão c) controle

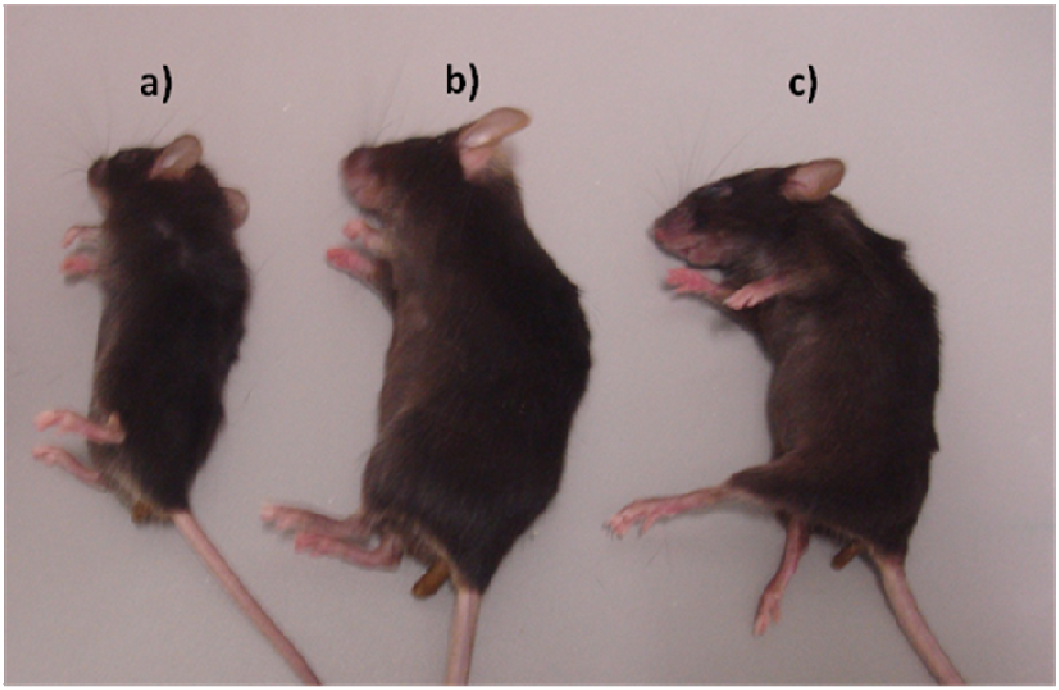

Figura 24: Camundongos *C57Black6*: a) anão/distrófico (duplo homozigoto) b) controle c) distrófico

Os resultados a seguir apresentam a avaliação do quadro distrófico de camundongos controles, distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J), anões *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J) e anões distróficos (B6.WK-*Lama2*$^{dy-2J}$/J)x *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J) nos seguintes testes funcionais da musculatura esquelética:

Teste de Deambulação

Os resultados do Gráfico 14 mostram que:

a) A performance dos anões não distróficos foi 27% maior ($p<0,05$) que a dos camundongos normais;

b) Os camundongos distróficos (não anões) apresentaram performance 21,5% menor ($p<0,05$) que aquela dos normais;

c) Os camundongos anões distróficos apresentaram performance 10,3%, menor ($p<0,05$) que aquela dos anões não distróficos;

d) Entretanto, a performance relativa dos anões distróficos em relação aos seus controles (anões não distróficos) (100%-10,3%=89,7%) foi 14,3% maior que aquela dos distróficos em relação aos seus controles, os camundongos normais (100%-21,5%=78,5%).

Teste de Sustentação

Os resultados do Gráfico 15 mostram que:

a) A performance dos anões não distróficos foi ligeiramente maior que a dos camundongos normais, mas os resultados não mostraram diferenças significativas;

b) Os camundongos distróficos (não anões) apresentaram performance 69% menor ($p<0,05$) que aquela dos normais;

c) Os camundongos anões distróficos apresentaram performance 47% menor ($p<0,05$) que aquela dos anões não distróficos;

d) Entretanto, a performance relativa dos anões distróficos em relação aos seus controles (anões não distróficos) (100%-47%=53%) foi 71% maior que aquela dos distróficos em relação aos seus controles, os camundongos normais (100%-69%=31%).

Teste de Resistência à Inclinação

Os resultados do Gráfico 16 mostram que:

a) A performance dos anões não distróficos foi ligeiramente maior que a dos camundongos normais, mas os resultados não mostraram diferenças significativas;

b) Os camundongos distróficos (não anões) apresentaram performance 13,3% menor ($p<0,05$) que aquela dos normais;

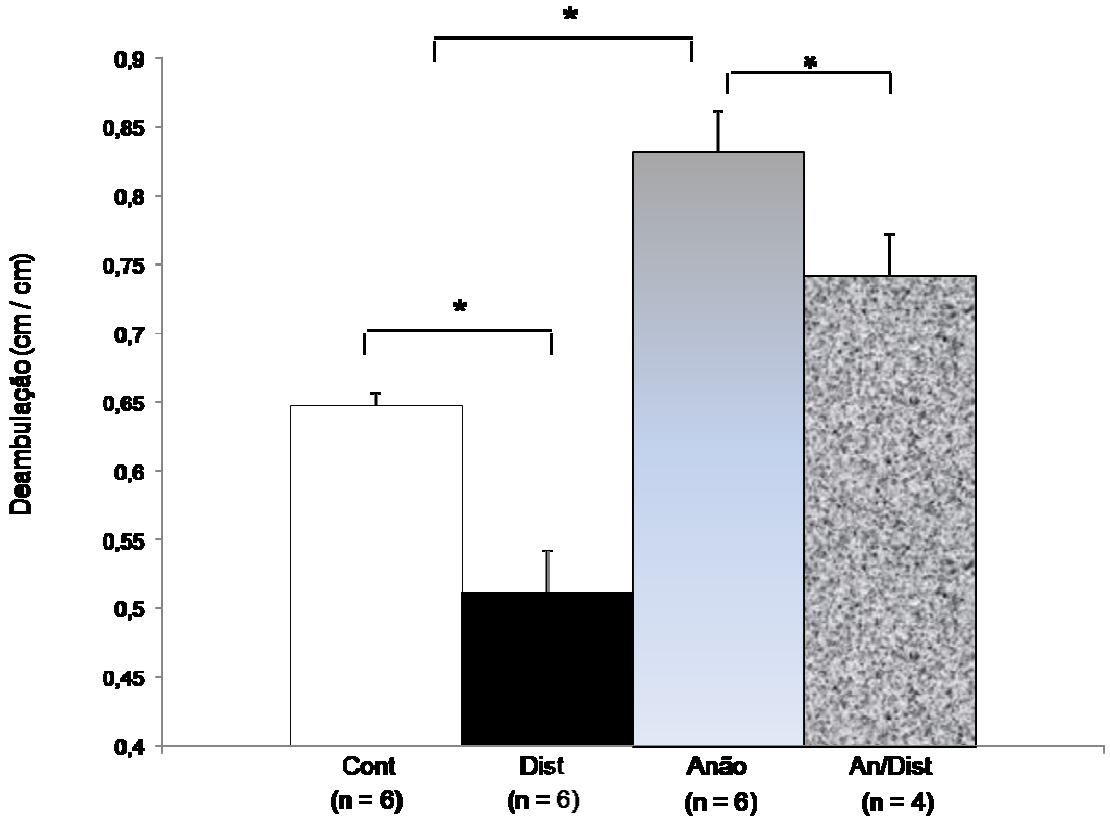

Gráfico 14: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

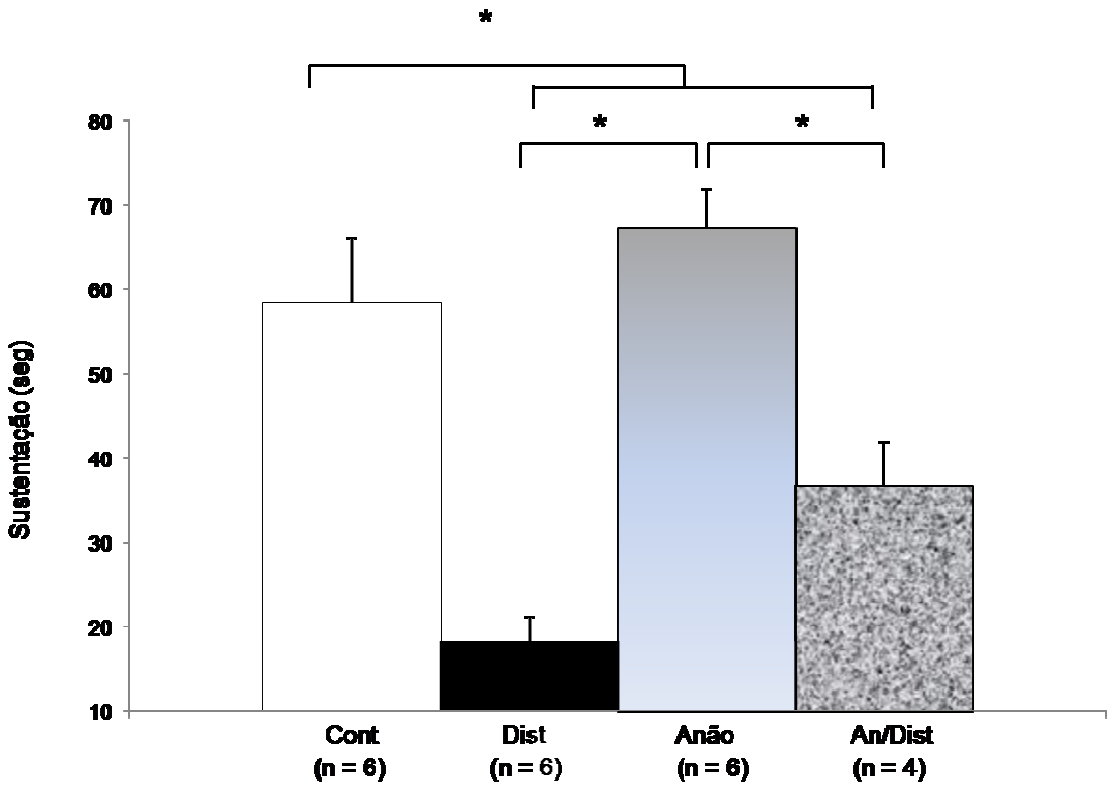

Gráfico 15: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

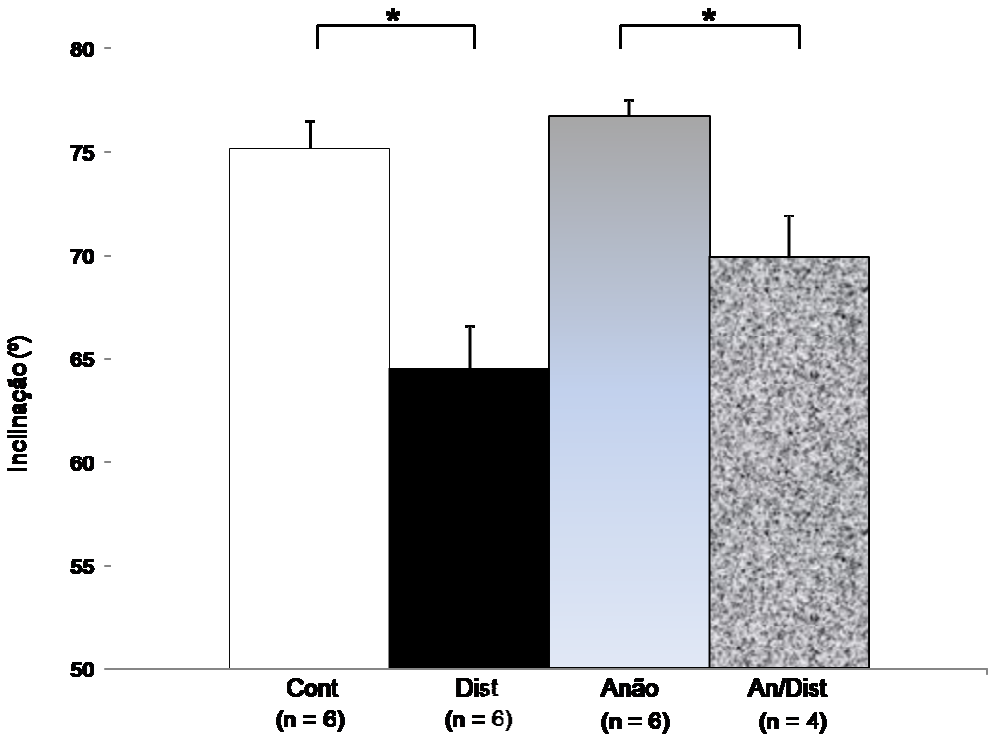

Gráfico 16: Teste de inclinação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

c) Os camundongos anões distróficos apresentaram performance 8,5% menor ($p<0,05$) que aquela dos anões não distróficos;

d) Entretanto, a performance relativa dos anões distróficos em relação aos seus controles (anões não distróficos) (100%-8,5%=91,5%) foi 5,5% maior que aquela dos distróficos em relação aos seus controles, os camundongos normais (100%-13,3%=86,7%).

Teste da Esteira

Os resultados do Gráfico 17 mostram que:

a) A performance dos anões não distróficos foi maior que a dos camundongos normais, mas os resultados não mostraram diferenças significativas;

b) Os camundongos distróficos (não anões) apresentaram performance 40,4% menor ($p<0,05$) que aquela dos normais;

c) Os camundongos anões distróficos apresentaram performance 29,6% menor ($p<0,05$) que aquela dos anões não distróficos;

d) Entretanto, a performance relativa dos anões distróficos em relação aos seus controles (anões não distróficos) (100%-29,6%=70,4%) foi 18% maior que aquela dos distróficos em relação aos seus controles, os camundongos normais (100%-40,4%=59,6%).

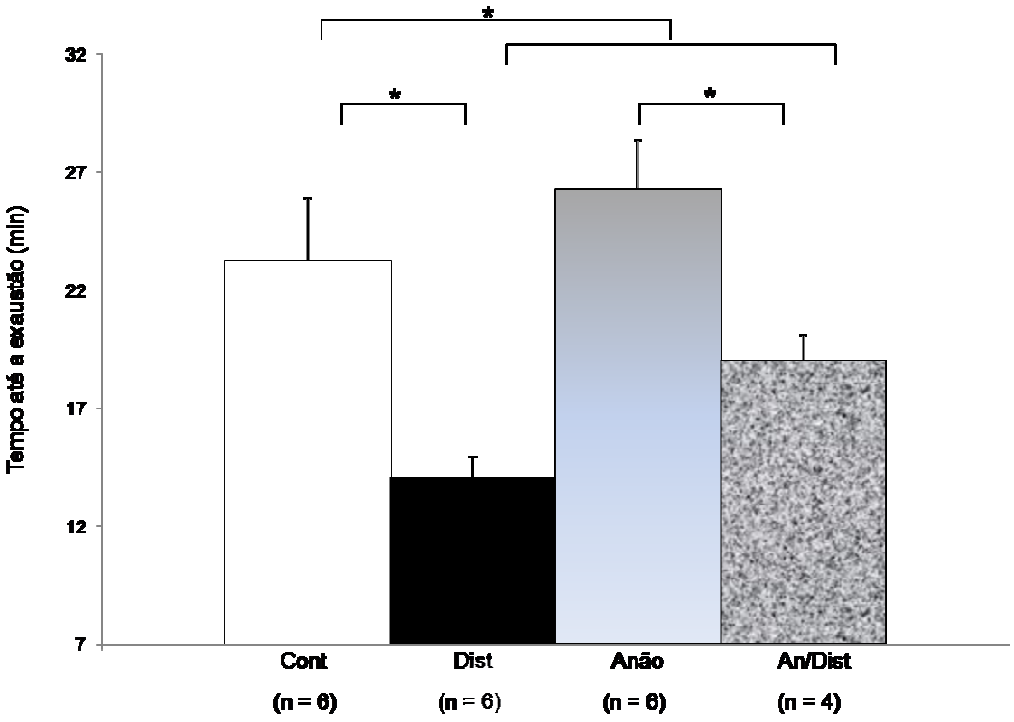

Gráfico 17: Teste de esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

Teste da medida da Força Máxima sob Eletroestimulação do Nervo Ciático

Os resultados do Gráfico 18 mostram que:

a) A performance dos anões não distróficos foi 58,3% menor que a dos camundongos normais ($p < 0,05$);

b) Os camundongos distróficos (não anões) apresentaram performance 72,9% menor ($p<0,05$) que aquela dos normais;

c) Os camundongos anões distróficos apresentaram performance 25% menor ($p<0,05$) que aquela dos anões não distróficos;

d) Entretanto, a performance relativa dos anões distróficos em relação aos seus controles (anões não distróficos) (100%-25%=75%) foi 102% maior que aquela dos distróficos em relação aos seus controles, os camundongos normais (100%-72,9%=27,1%).

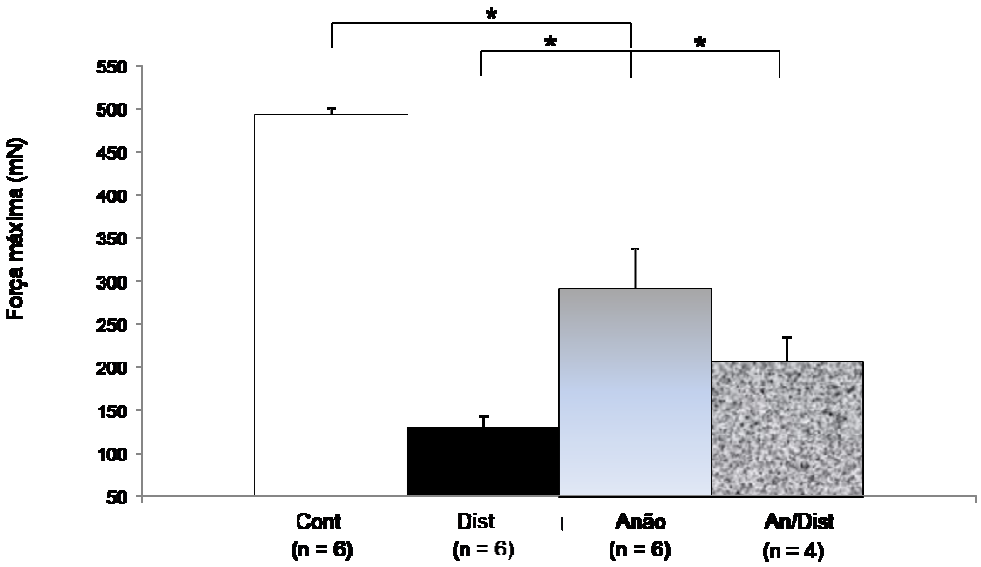

Gráfico 18: Teste de força máxima sob eletroestimulação do nervo ciático nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

Os resultados a seguir apresentam cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios nos camundongos *C57Black6* controles, distróficos *dy/dy* (*B6.WK-Lama2*$^{dy-2J}$*/J*), anões *little/little* (*C57BL/6J-Ghrhr*^{lit} */J*) e anões distróficos *(little/little-C57BL/6J-Ghrhr*^{lit}*/J) x (dy/dy-B6.WK-Lama2*$^{dy-2J}$*/J)*

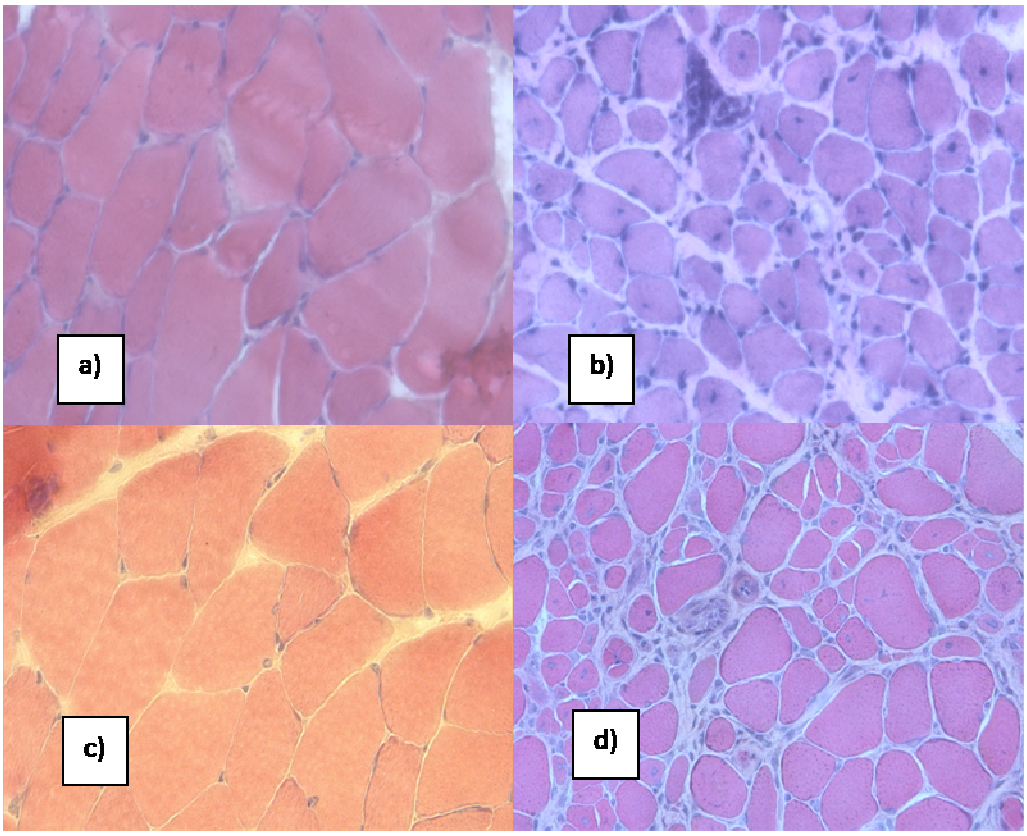

Figura 25: Histologia do gastrocnêmio para análise: da área das fibras musculares, da área do insterstício e da proporção de fibras musculares com a presença de núcleos centrais. Histologia do Músculo em HE (Hematoxilina-Eosina) a) Anão b) Anão Distrófico c) Controle d) Distrófico

Área da secção transversal

Os resultados do Gráfico 19 mostram que:

a) A área de secção transversal dos músculos dos animais normais foi 33% maior ($p<0,05$) que a dos distróficos;

b) A área de secção transversal dos músculos dos anões normais foi 36% maior ($p<0,05$) que a dos anões distróficos;

c) Não houve diferenças significativas entre as áreas de secção transversal dos músculos dos animais controles em relação aos anões normais e nem entre os distróficos não anões em relação aos anões distróficos;

Área do interstício

Os resultados do Gráfico 20 mostram que:

a) A área do interstício nos músculos dos animais distróficos foi 200% maior ($p<0,05$) que a dos animais normais;

b) A área do interstício nos músculos dos anões distróficos foi 167% maior ($p<0,05$) que a dos anões normais;

b) A área do interstício nos músculos dos animais distróficos foi 29% maior ($p<0,05$) que a dos anões distróficos;

c) Não houve diferenças significativas entre as áreas de secção transversal dos músculos dos animais controles em relação aos anões normais.

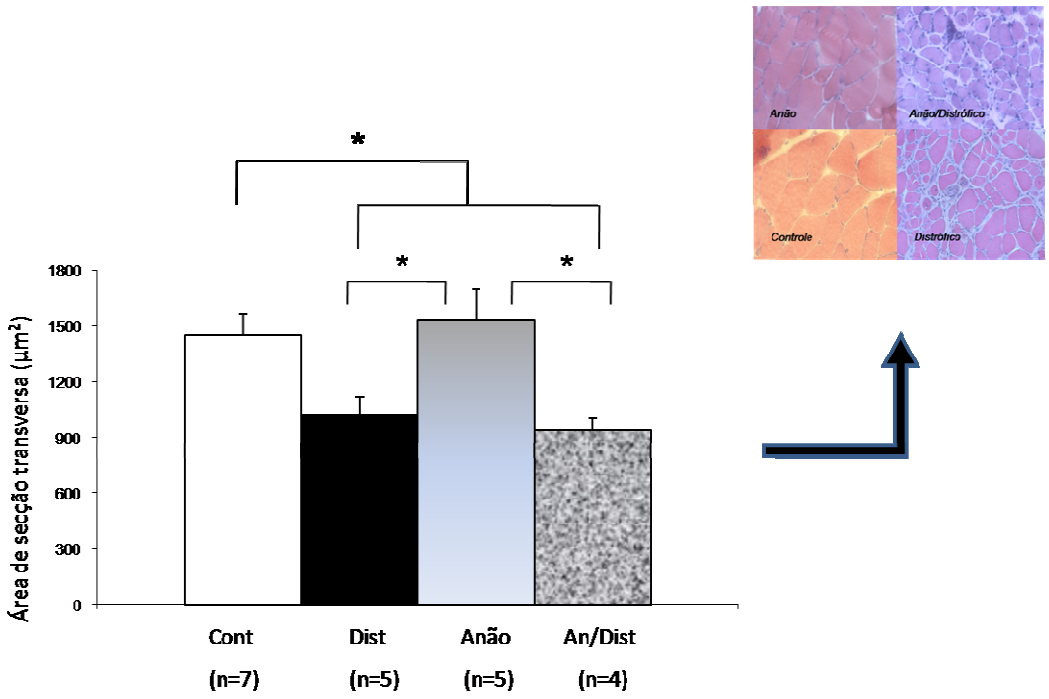

Gráfico 19: Área de secção transversa do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

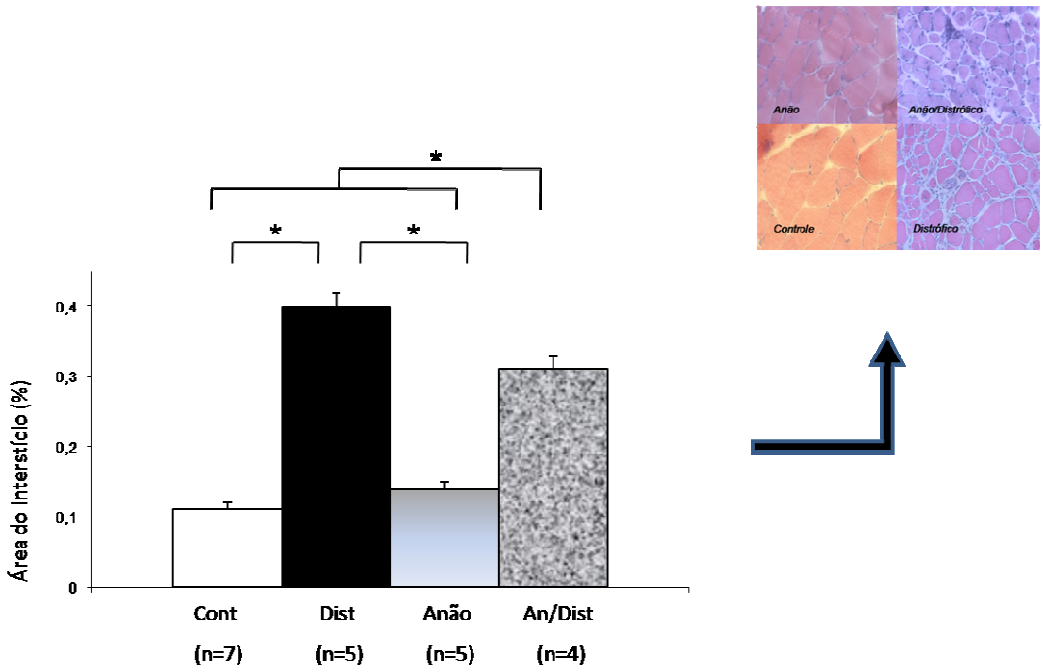

Gráfico 20: Área do interstício em % do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

Número de fibras com núcleo central

Os resultados do Gráfico 21 mostram que:

a) O número de fibras com núcleo central nos músculos dos animais controles e nos dos anões não distróficos foi insignificante;

b) O número de fibras com núcleo central nos músculos dos animais distróficos e anões distróficos foi bastante significativo em relação aos animais controles e nos dos anões não distróficos ($p<0,0001$);

c) Não houve diferenças significativas entre o número de fibras com núcleo central dos músculos dos animais distróficos e aquele do anões distróficos animais.

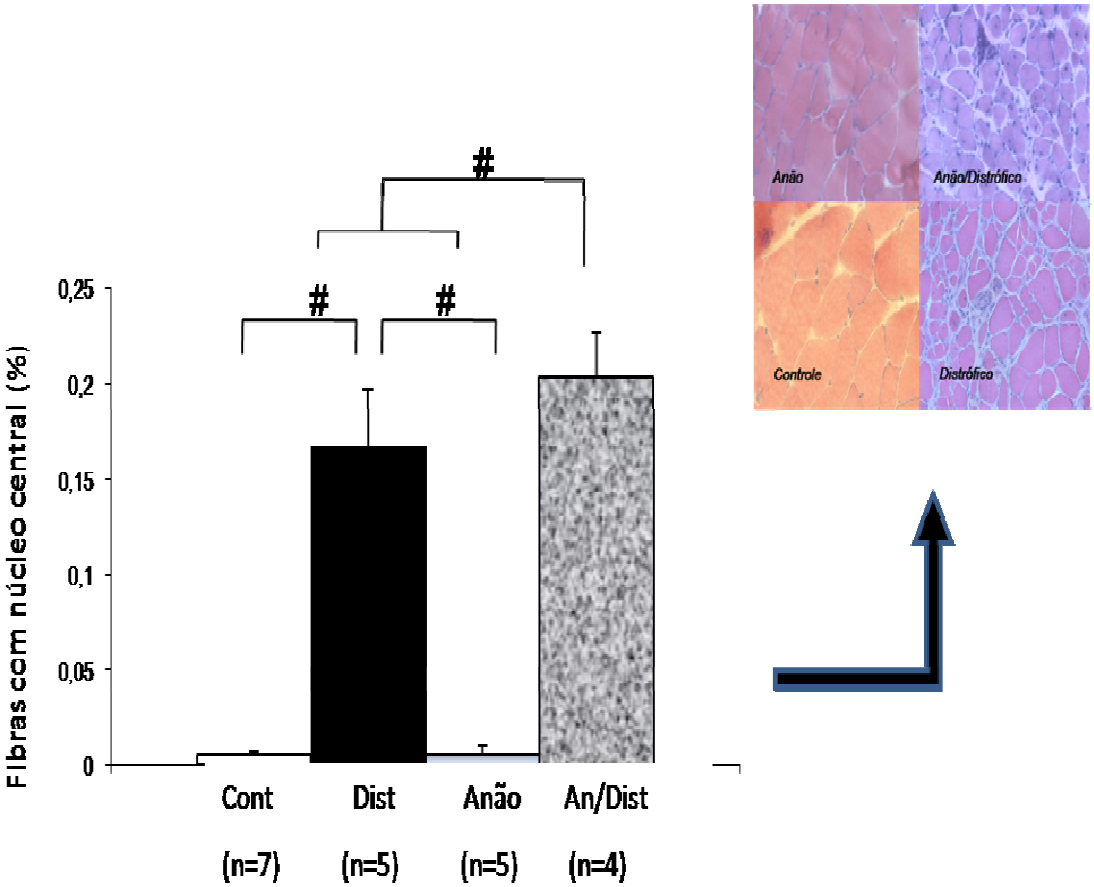

Gráfico 21: Número de fibras com núcleo central no músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(#) $p < 0,01$

Os resultados a seguir apresentam a quantificação de marcadores de regeneração e degeneração musculares nos camundongos *C57Black6* controles, distróficos *dy/dy (B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J),* anões little/little (C57BL/6J-Ghrhr^{lit} /J) e anões distróficos *(little/little-C57BL/6J-Ghrhr^{lit}/J) x (dy/dy-B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J)*

Pax7

Os resultados do Gráfico 22 mostram que:

a) Os níveis de Pax7 estavam 35% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) Os níveis de Pax7 estavam 39% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos anões distróficos em relação aos anões controles;

c) Os níveis de Pax7 não apresentaram diferenças significativas entre os camundongos controles e anões (não distróficos) e nem entre os distróficos e anões distróficos.

MyoD

Os resultados do Gráfico 23 mostram que:

Os resultados da Figura mostram que:

a) Os níveis de MyoD estavam 61% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) Os níveis de MyoD estavam 69% aumentados ($p<0,05$) nos camundongos anões distróficos em relação aos anões controles;

c) Os níveis de MyoD não apresentaram diferenças significativas entre os camundongos controles e anões (não distróficos) e nem entre os distróficos e anões distróficos.

Laminina

Os resultados no Gráfico 24 mostram que:

a) Os níveis de Laminina estavam 55% diminuidos ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) Os níveis de Laminina estavam 50% diminuidos ($p<0,05$) nos camundongos anões distróficos em relação aos camundongos controles;

b) Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis de Laminina entre controles e anões não distróficos e nem entre distróficos e anões distróficos.

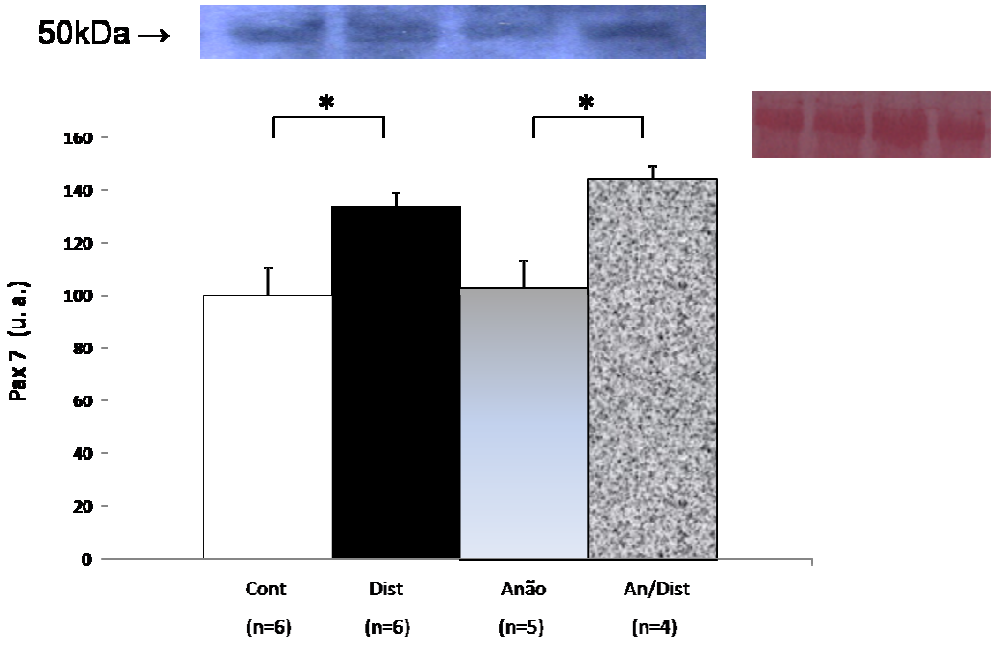

Gráfico 22: Conteúdo do Pax7 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

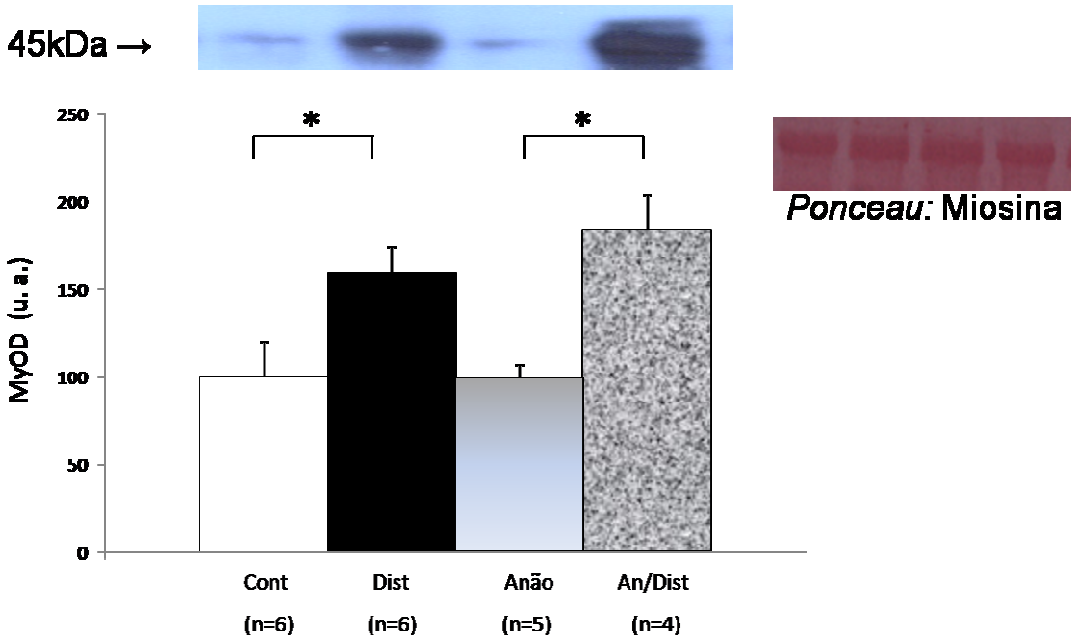

Gráfico 23: Conteúdo do MyoD no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

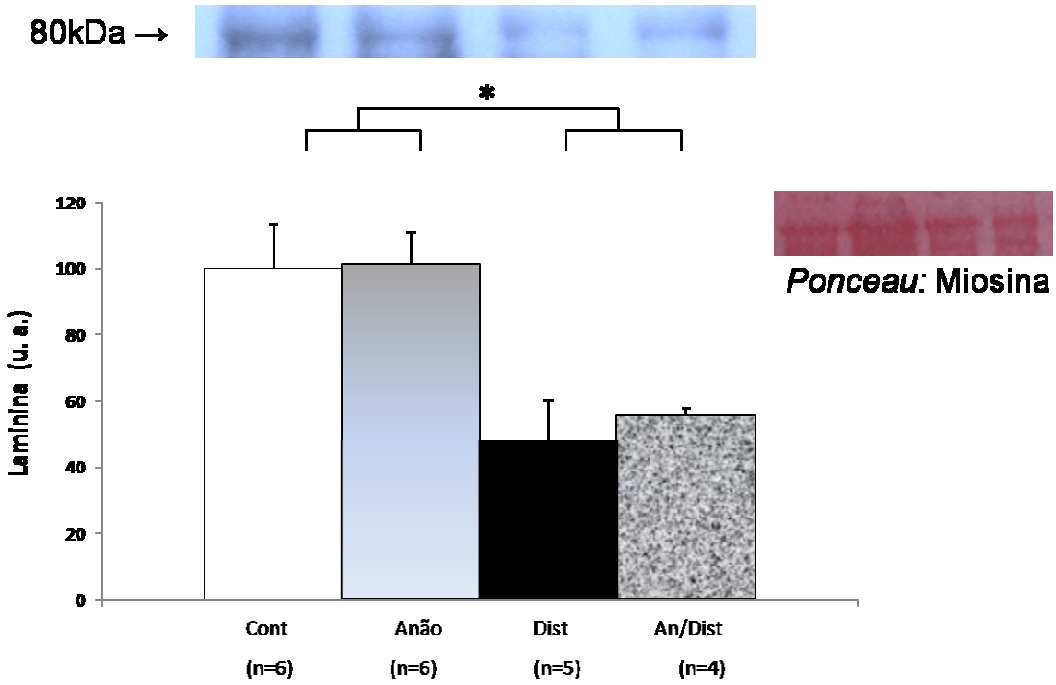

Gráfico 24: Conteúdo da Laminina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

Desmina:

Os resultados do Gráfico 25 mostram que:

a) Os níveis de Desmina estavam aumentados 52% ($p<0,05$) nos camundongos distróficos em relação aos camundongos controles;

b) Os níveis de Desmina estavam aumentados 76% ($p<0,05$) nos camundongos anões distróficos em relação aos anões não distróficos;

c) Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis de Desmina entre controles e anões não distróficos e nem entre distróficos e anões distróficos.

TGFβ-1

Os resultados do Gráfico 26 mostram que:

a)Os controles e anões não distróficos não apresentaram diferenças significativas nos níveis de TGFβ-1;

b) Os níveis de TGFβ-1 nos camundongos distróficos estavam 35% aumentados ($p<0,05$) em relação aos camundongos controles;

c) Os níveis de TGFβ-1 nos camundongos anões distróficos estavam 36% menores ($p<0,05$) que o dos camundongos distróficos;

d) Os níveis de TGFβ-1 nos camundongos anões distróficos não apresentavam diferenças significativas com aqueles dos anões não distróficos e dos controles.

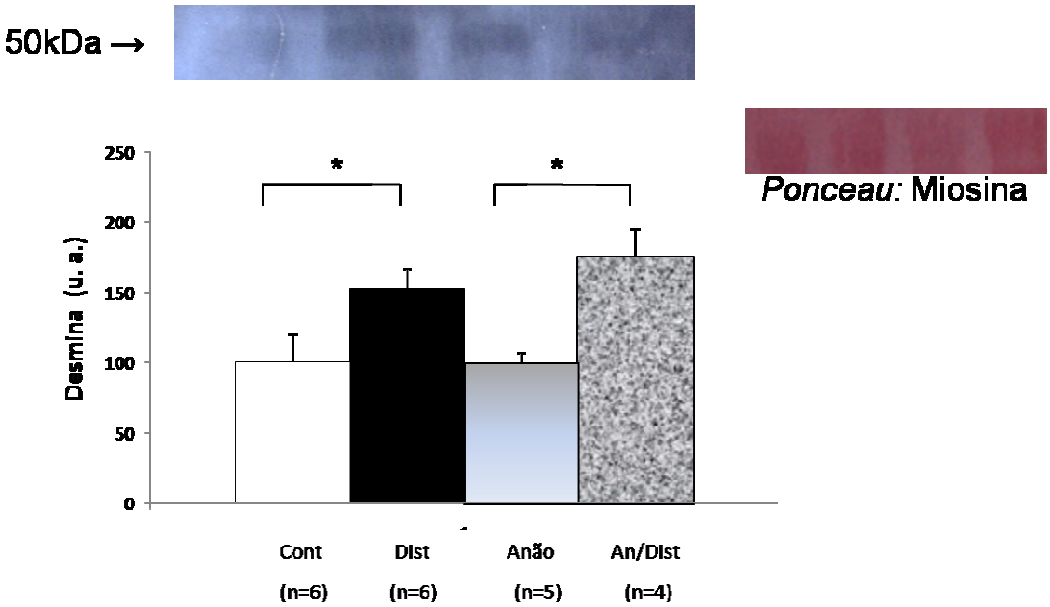

Gráfico 25: Conteúdo da Desmina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

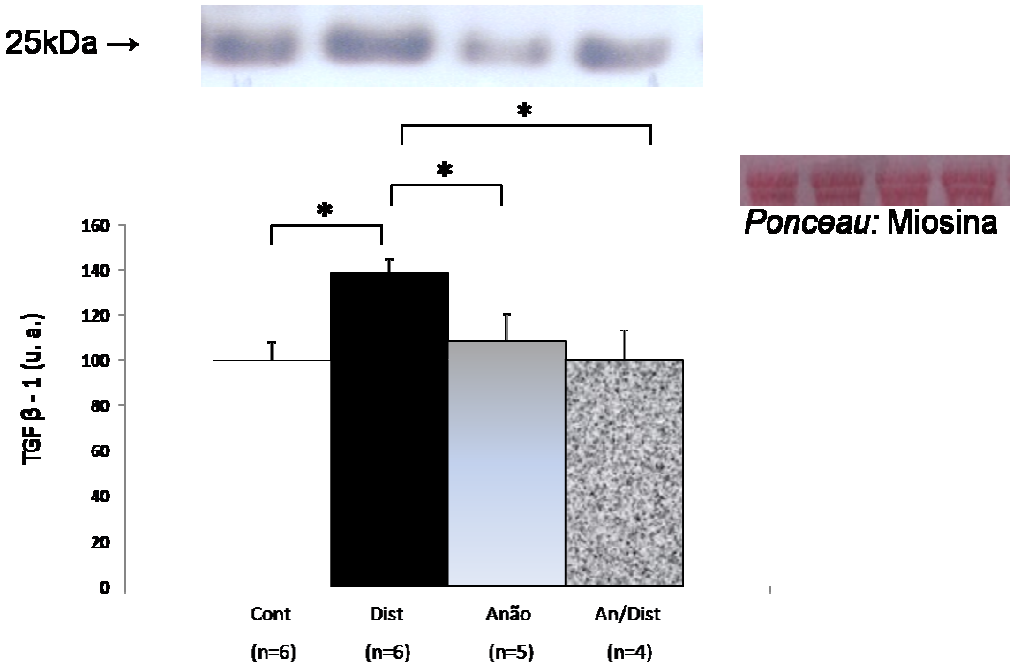

Gráfico 26: Conteúdo do TGFβ-1 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{Jit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*).

(*) $p < 0,05$

PARTE 3:

ESTUDO DOS EFEITOS DA OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA INIBIDOR DA LIBERAÇÃO DO GH, SOBRE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA DOS CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J)

Os resultados a seguir apresentam os efeitos da octreotida (6µg/camundongo/12horas, s.c.), um inibidor da secreção do GH, na performance dos camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) comparados com os controles e os distróficos nos seguintes testes funcionais da musculatura esquelética:

Teste de Deambulação

Os resultados do Gráfico 27 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais apresentaram performance significativamente superior àquela dos distróficos e daqueles em que foram administrados a octreotida.

b) Os camundongos distróficos, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 14,5% menor que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$)

c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 12,2% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$).

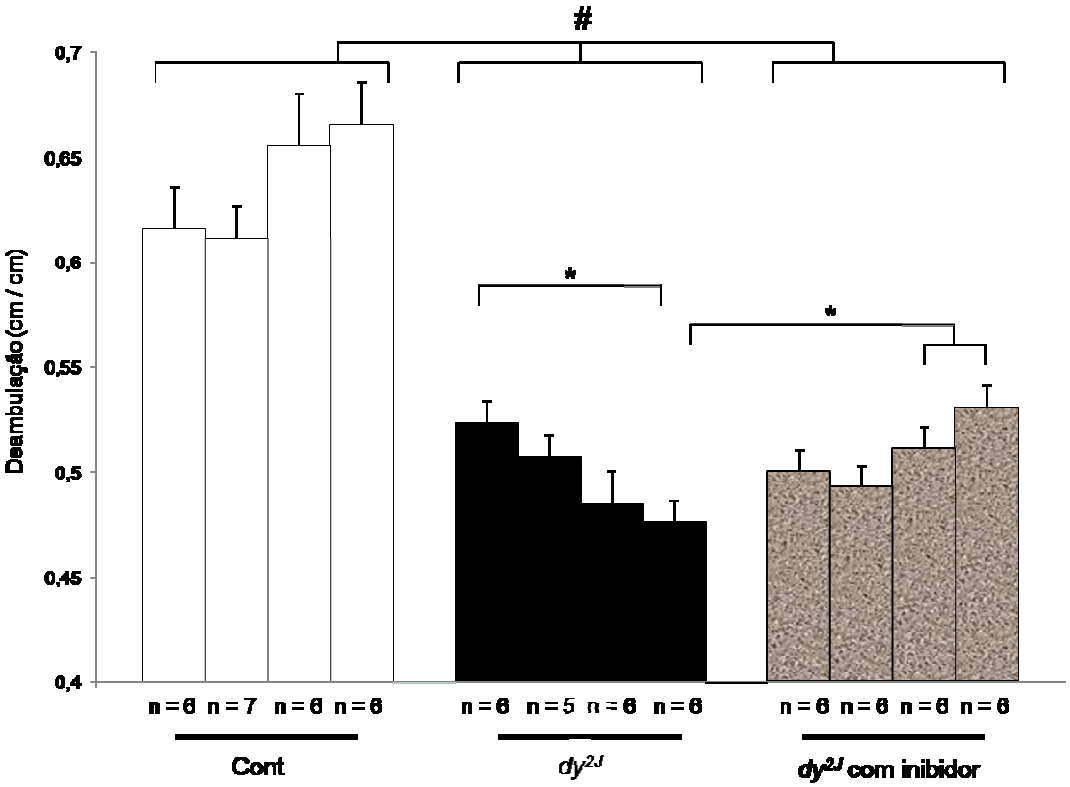

Gráfico 27: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(#) $p < 0,001$ (*) $p < 0,005$ (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

Teste da Esteira

Os resultados da do Gráfico 28 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais apresentaram performance significativamente superior àquela dos distróficos e daqueles em que foram administrados a octreotida.

b) Os camundongos distróficos, nos trigésimo e sexagésimo dias de observação, apresentaram performances 16,1% e 23,1% menores, respectivamente em relação àquelas destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$)

c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida mantiveram suas performances sem alterações significativas no período.

Teste de Sustentação

Os resultados do Gráfico 29 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais apresentaram performance significativamente superior àquela dos distróficos e daqueles em que foram administrados a octreotida.

b) Os camundongos distróficos mantiveram suas performances sem alterações significativas no período;

c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 29,2% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$).

Teste de Força de Preensão

Os resultados do Gráfico 30 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais apresentaram performance significativamente superior àquela dos distróficos e daqueles em que foram administrados a octreotida.

b) Os camundongos distróficos mantiveram suas performances sem alterações significativas no período;

c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 42,9% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$).

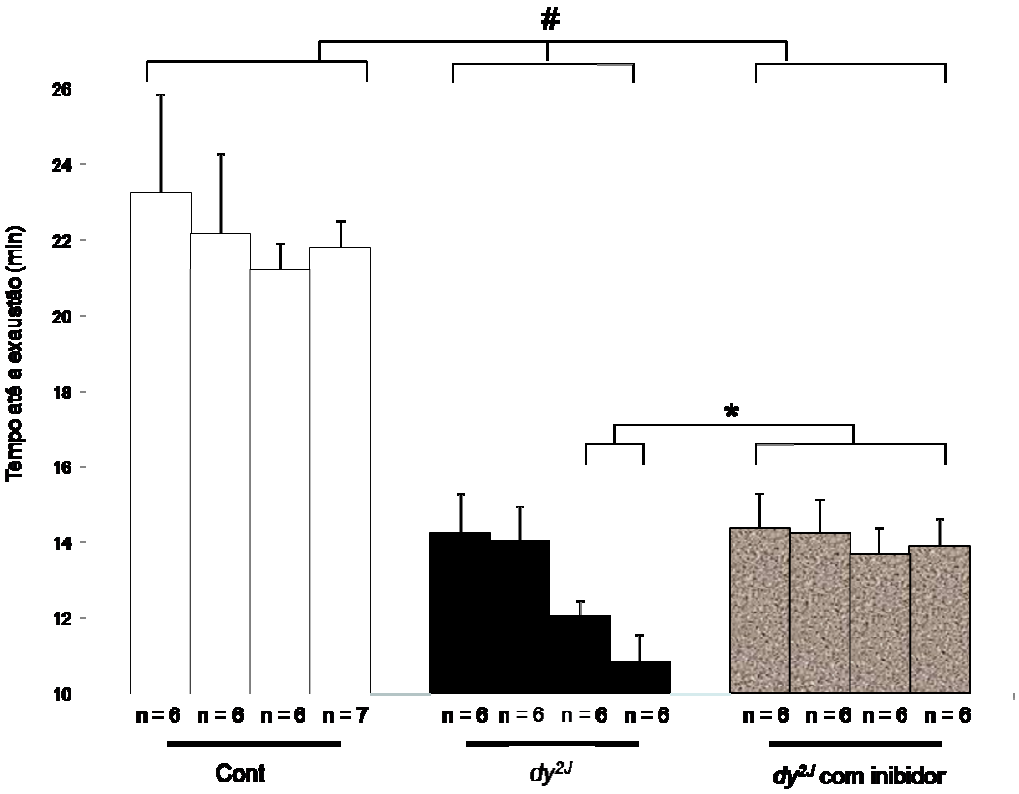

Gráfico 28: Teste da esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(#) p < 0,001 (*) p < 0,005 (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

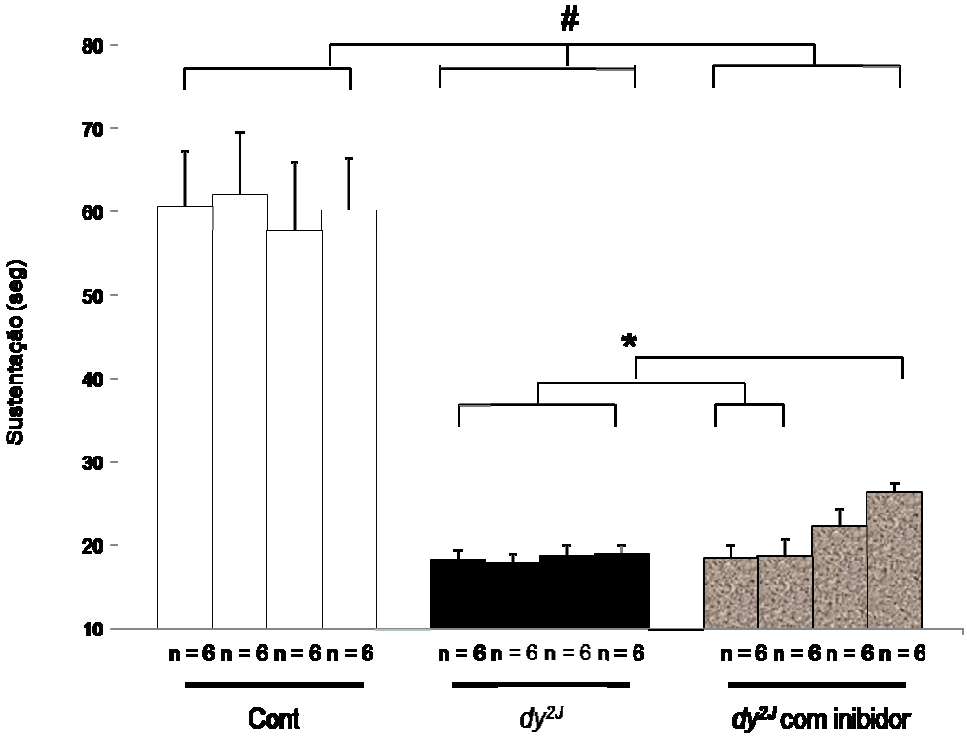

Gráfico 29: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(#) $p < 0,001$ (*) $p < 0,005$ (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

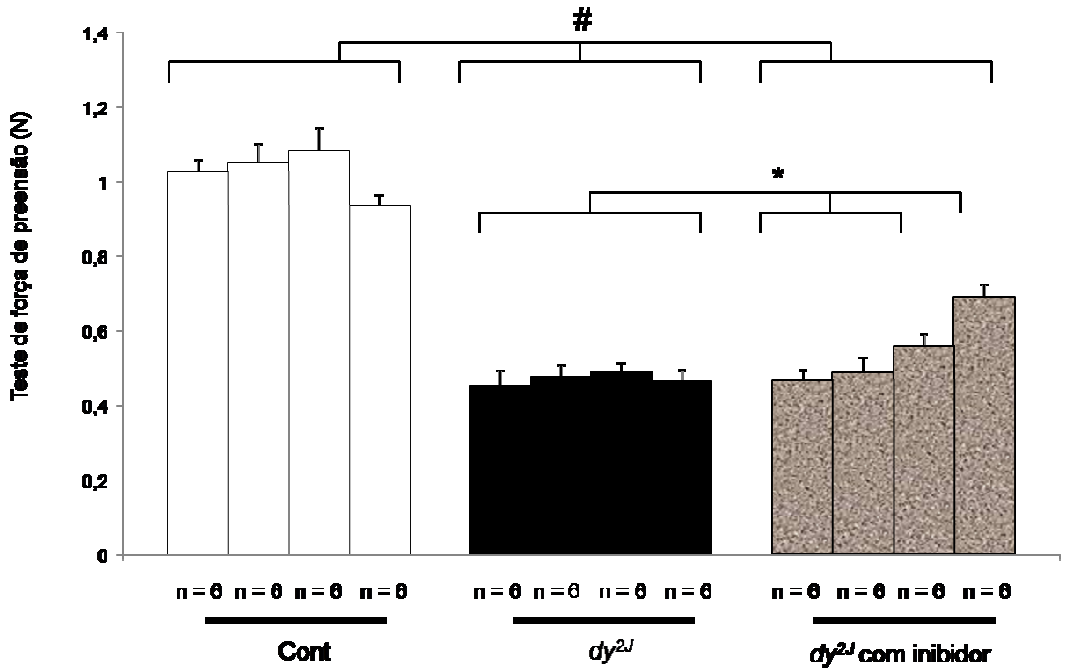

Gráfico 30: Teste de força de preensão nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(#) $p < 0,001$ (*) $p < 0,005$ (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

Teste de Rota Rod

Os resultados do Gráfico 31 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais apresentaram performance significativamente superior àquela dos distróficos e daqueles em que foram administrados a octreotida.

b) Os camundongos distróficos, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 32,7% menor que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$)

c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 27,3% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$).

Teste de Resistência à Inclinação

Os resultados do Gráfico 32 mostram que:

a) Os camundongos normais não distróficos, em todos os tempos de observação utilizados neste teste, apresentaram performance significativamente superior àquela dos distróficos e daqueles em que foram administrados a octreotida.
b) Os camundongos distróficos e os camundongos distróficos, em que foram administrados a octreotida, mantiveram as performances neste teste sem variações significativas entre si.

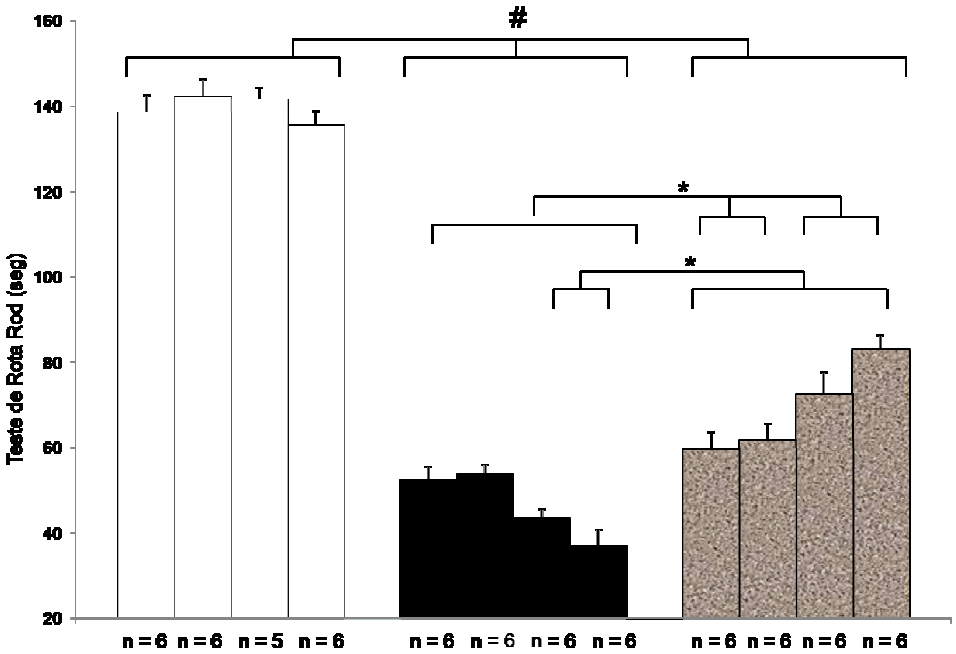

Gráfico 31: Teste de Rota rod nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(#) p < 0,001 (*) p < 0,005 (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

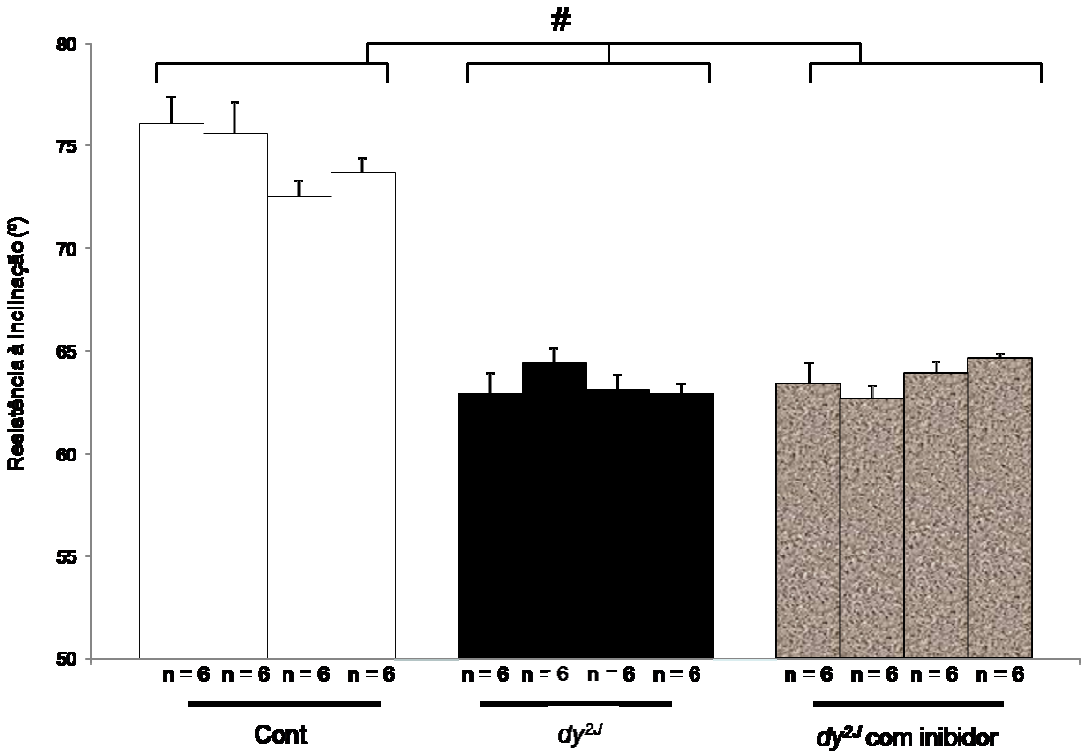

Gráfico 32: Teste de resistência à inclinação **nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida** (***)

(#) p < 0,001 (*) p < 0,005 (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

Os resultados a seguir apresentam os pesos e comprimentos dos camundongos distróficos controles *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) e dos distróficos que tomaram octreotida, durante 10, 30 e 60 dias de tratamento. Saliente-se que o experimento foi iniciado quando os animais tinham 60 dias de nascidos:

a) Peso

Os resultados do Gráfico 33 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais aumentaram progressivamente de peso, apresentando no sexagésimo dia de observação, um aumento significativo de 16,7% ($p<0,05$);em relação ao primeiro dia de observação;
b) Camundongos distróficos aumentaram progressivamente de peso, apresentando no sexagésimo dia de observação, um aumento significativo de 20% ($p<0,05$) em relação ao primeiro dia de observação;
c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida não tiveram alterações significativas em seus pesos durante o período de observação.

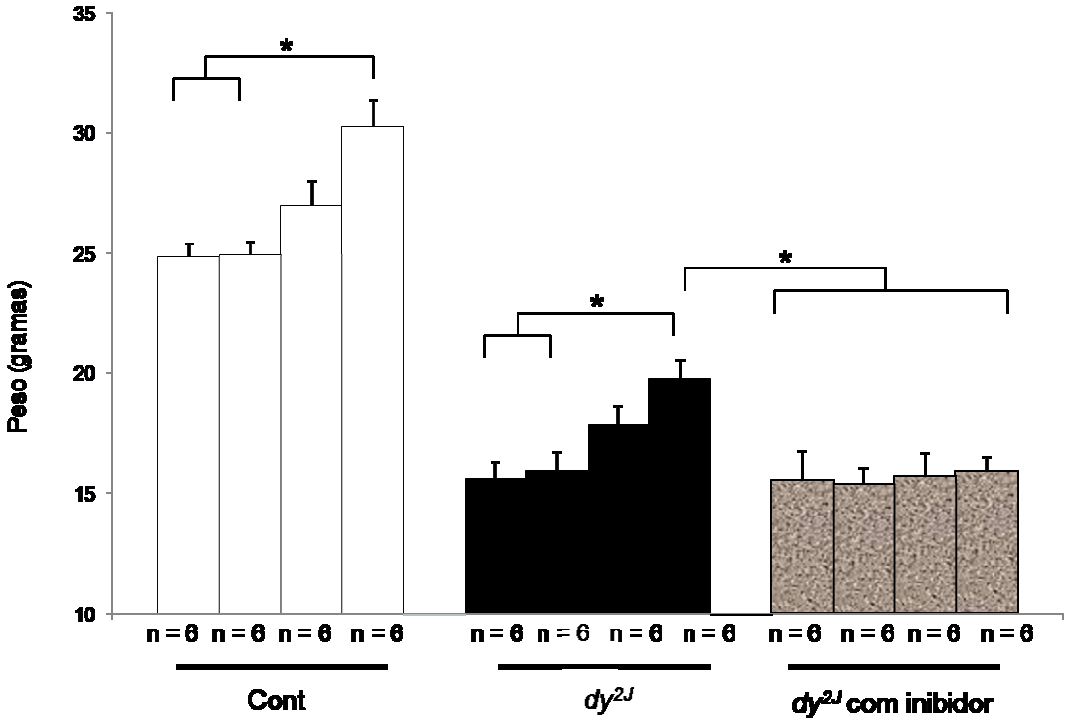

Gráfico 33: Medidas dos pesos nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(*) p < 0,005 (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

Comprimento

Os dados do Gráfico 34 mostram os resultados obtidos durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

a) Camundongos normais aumentaram progressivamente de comprimento, apresentando no sexagésimo dia de observação, um aumento significativo de 5,3% ($p<0,05$) em relação ao primeiro dia de observação;
b) Camundongos distróficos aumentaram progressivamente de comprimento, apresentando no sexagésimo dia de observação, um aumento significativo de 5,6% ($p<0,05$) em relação ao primeiro dia de observação;
c) Os camundongos distróficos tratados com octreotida não tiveram alterações significativas em seus comprimentos durante o período de observação.

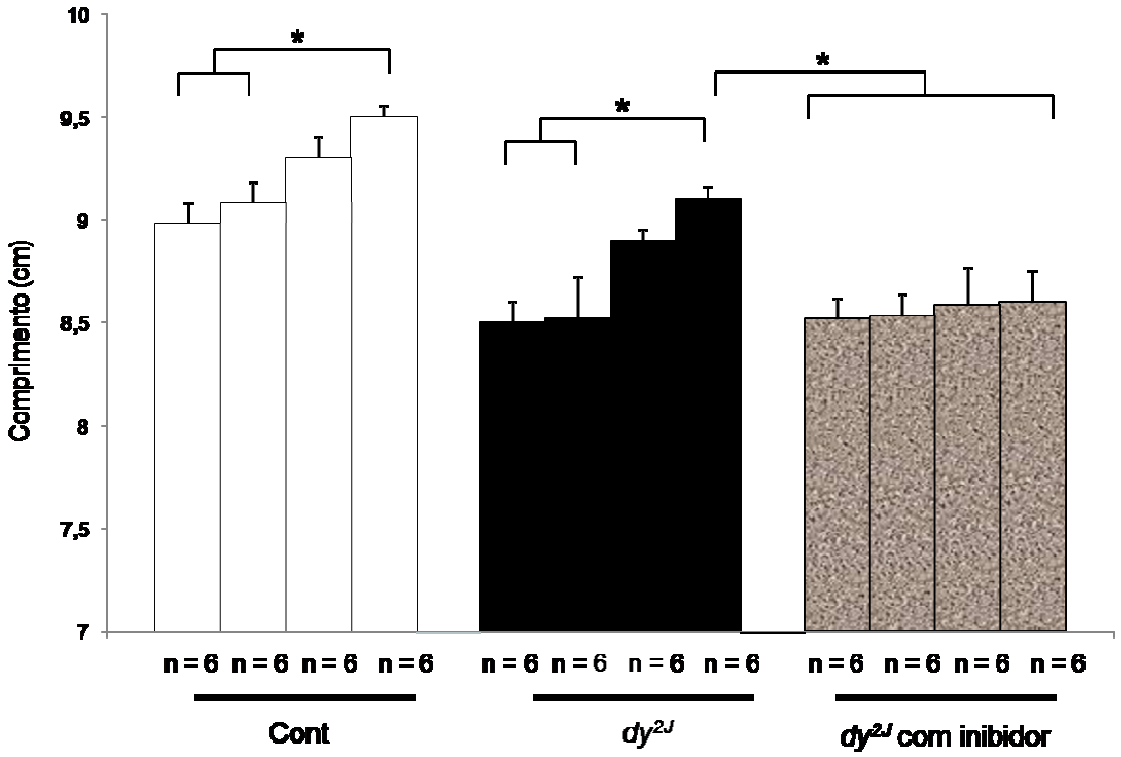

Gráfico 34: Medidas dos comprimentos nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida (***)

(#) $p < 0,001$ (*) $p < 0,005$ (***) Dose da octreotida: 6µg / camundongo / 12 horas s.c.
Cont: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
dy^{2J}: idades de 60, 70, 90 e 120 dias
***dy^{2J}* com inibidor**: idades de 60 (dia 0 de tratamento), 70 (10 dias de tratamento), 90 (30 dias de tratamento) e 120 dias (60 dias de tratamento)

PARTE 1

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO GH SOBRE A MUSCULATURA DOS ANIMAIS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J)

O primeiro objetivo deste trabalho consistiu em se estudar os efeitos da administração do GH (10µg/camundongo/dia, i.p., por 10 dias consecutivos) sobre a musculatura dos animais distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), tomando-se como controle os camundongos normais, sem fenótipo distrófico, *C57Black6.*

Os resultados mostraram que o GH levou a uma piora significativa da performance dos camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), em quatro dos cinco testes funcionais da musculatura esquelética realizados:

(a) Teste de deambulação, diminuindo, de 17,9% em relação ao controle ($p<0,05$), a média do comprimento da passada medida em tinta impressa, enquanto o camundongo corria livremente em um corredor (Gráfico 01, Figura 15);

(b) Teste de sustentação no fio, diminuindo de 64,7% em relação ao controle ($p<0,05$), a habilidade do animal em se manter em uma linha horizontal pelas patas dianteiras, alcançá-lo com as patas traseiras e o tempo que eles são capazes de se manterem no fio em sustentação, em relação ao controle (Gráfico 2, Figura 17);

(c) Teste de corrida em esteira rolante, diminuindo de 28,6% em relação ao controle ($p<0,05$), a tolerância ao esforço físico progressivo até a exaustão (Gráfico 3, Figura 18);

(d) Teste de funcionalidade da musculatura esquelética apendicular sob eletroestimulação do nervo ciático, diminuindo de 55,6% em relação ao controle ($p<0,05$), o desenvolvimento de força máxima da musculatura (Gráfico 4, Figura 19).

Apenas no teste de inclinação da prancheta, que avaliou a ângulo máximo no qual o animal era colocado e deslizava, o GH não apresentou efeitos significativos nos animais distróficos em relação aos controles (Gráfico 5, Figura 16).

Estes resultados acima, analisados em conjunto, demonstraram claramente que o GH, administrado na dose de 10µg/camundongo/dia, i.p., por 10 dias consecutivos, causou efeitos prejudiciais importantes sobre a funcionalidade da musculatura esquelética dos animais distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J).

Por outro lado, o GH, nas mesmas doses utilizadas acima, melhorou significativamente a performance dos animais controles em dois importantes testes funcionais da musculatura esquelética:

a) Teste de deambulação, aumentando 12,9% em relação ao controle ($p<0,05$), a média do comprimento da passada (Gráfico 01);

b) Teste de sustentação no fio, aumentando de 28,2% em relação ao controle ($p<0,05$), tempo que eles são capazes de se manterem no fio em sustentação, em relação ao controle (Gráfico 02);

O GH aumentou ainda, mas de maneira não significativa, a performance no teste da esteira, e não apresentou efeitos significativos nos testes de inclinação e de força máxima por eletroestimulação (Gráficos 3,4 e 5)

Em busca de explicar estes resultados obtidos pela administração do GH *in vivo*, realizamos estudos histológicos e quantificação de marcadores de regeneração e degeneração celulares nas musculaturas dos animais distróficos e normais, após o sacrifício.

Cortes histológicos foram realizados em busca de possíveis alterações morfológicas que pudessem explicar os efeitos acima, mas os resultados mostraram que administração do GH não alterou o número de fibras com núcleo central e nem área do interstício dos músculos nos animais controles e distróficos em relação aos músculos dos animais que tomaram GH (Gráficos 6, 7 e 8).

Entretanto, um resultado chamou a nossa atenção, pois enquanto o GH aumentou significativamente de 16,5% ($p<0,05$) a área da secção transversal dos músculos dos camundongos controles (Gráfico 06), este hormônio não alterou esta área nos músculos dos animais distróficos. Estes resultados do GH sobre a musculatura esquelética de camundongos normais seriam esperados, uma vez que é conhecido que este hormônio pode causar uma hipertrofia das fibras musculares (FLORINI *et al.*,1996; SOTIROPOULOS *et al.,* 2006), mas o

fato dele não causar este mesmo efeito na musculatura distrófica é desconhecido.

Analisados em conjunto, o efeito do GH em aumentar a área de secção transversal dos músculos normais, sugerindo um efeito de hipertrofia das fibras musculares (HOFFMAN *et al.*, 2004), e em contrapartida, não alterá-la nos músculos dos animais distróficos, poderia contribuir para explicar, pelo menos parcialmente, as diferenças de performances nos testes funcionais da musculatura esquelética entre os animais normais e distróficos, ambos após a administração de GH.

Entretanto, com o objetivo de se tentar explicar os efeitos do GH a nível molecular na musculatura dos animais distróficos, foram realizados em seguida estudos com marcadores de regeneração e degeneração celulares.

Primeiramente, mostramos que os níveis de Pax7 e MyoD estavam significativamente aumentados na musculatura dos animais distróficos de 35% e 60%, respectivamente, em relação àquela dos animais normais (Gráficos 9 e 10) Estes resultados eram esperados, uma vez que a injúria causada pela doença distrófica ativa células satélites quiescentes, que começam então a proliferar e expressar os marcadores miogênicos, na tentativa de recuperar o tecido lesado. É conhecido que as células satélites quiescentes expressam o Pax7, mas quando ativadas, co-expressam Pax7 e MyoD (MUNTONI *et al.,* 2002; CHARGE & RUDNICKI ., 2004)

O Pax7 é capaz de induzir transcrição em células satélites, estando envolvido na manutenção da proliferação e prevenção da diferenciação

precoce, enquanto o MyoD desempenha um papel na regulação da diferenciação celular, sendo expresso, como descrevemos, em células satélites ativadas, mas não nas quiescentes (HAWKE & GARRY, 2001).

Entretanto, como o GH não alterou significativamente os níveis desses marcadores nos camundongos normais e distróficos, parece, portanto, não estar envolvido nos processos de proliferação e diferenciação celular das células satélites ativadas (Gráficos 9 e 10).

Em seguida, determinamos que os níveis de desmina não foram poderiam alterados pela ação do GH em camundongos distróficos. Sabemos que ela é fortemente expressa em fibras musculares imaturas, seja durante a vida fetal ou na regeneração, assim como em algumas miopatias congênitas. A desmina é um componente dos filamentos intermediários do músculo, cardiomiócitos, e algumas células musculares lisas. Constitui membro do citoesqueleto ligando as linhas Z com o plasmalema e o núcleo. O gene da desmina foi localizado no cromossomo 2q35. Muitas miopatias congênitas e hereditárias têm apresentado um acúmulo de desmina, observado através de estudos imunohistoquímicos com marcação com anticorpos específicos. Entretanto mutações de sentido trocado no gene da desmina foram encontradas em apenas parte destes casos, e com uma variabilidade clínica significativa (KARPATI, 2002).

Verificamos também se os níveis de laminina poderiam estar alterados pelo efeito do GH nos camundongos distróficos, uma vez que os baixos níveis desta proteína representa a causa primária da distrofia nestes modelos animais (MICHELSON *et al.,* 1955; MEIER & SOUTHARD, 1970; XU *et al.,* 1994;

SUNADA *et al.,* 1995; KUANG *et al*., 1998; VILQUIN et al., 2000; GUO *et al.,* 2003; SHIBUYA *et al.,* 2003). Os resultados, no entanto, mostraram que o GH não alterou significativamente os baixos níveis de laminina nos camundongos normais e distróficos (Gráfico 11), descartando a possibilidade dele poder atuar diminuindo os níveis desta proteína e piorar o quadro distrófico destes animais.

Por último, determinamos se houve alterações nos níveis de TGFβ-1 nos camundongos distróficos em que foram administrados o GH.

Inicialmente, mostramos que os níveis de TGFβ-1 estavam significativamente mais elevados nos camundongos distróficos (35%, $p<0,05$) em comparação com os camundongos normais (Gráfico 13), resultado semelhante ao obtido por Oliveira-Onofre (2009). Este resultado era esperado, pois embora o TGFβ-1 possa atuar de maneira fisiológica, controlando a proliferação e diferenciação celulares em tecidos normais (FROST *et al.,* 2001), vários trabalhos recentes têm mostrado que nos tecidos distróficos ele atua como uma citocina inflamatória induzindo fibrose (MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005).

Surpreendentemente, a administração do GH aumentou em 30% ($p<0,05$) os níveis de TGFβ-1 nos camundongos distróficos (Gráfico 13). Este aumento adicional do TGFβ-1 poderia, portanto, estar contribuindo para acelerar o mecanismo de degeneração e explicar a piora da performance dos camundongos distróficos nos testes funcionais da musculatura esquelética.

Entretanto, o mecanismo para esta possível ação do GH é ainda desconhecido, mas estudos recentes têm demonstrado que este hormônio

pode atuar por outras vias independentes do IGF-1, e que não foram ainda descobertas (LUPU *et al.*, 2001; LICHANSKA & WATERS, 2008).

Uma vez demonstrado o efeito prejudicial do GH *in vivo* sobre a musculatura esquelética de animais distróficos, procuramos averiguar em seguida, se os efeitos do déficit do GH poderiam melhorar o quadro distrófico desses animais.

2. AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO QUADRO DISTRÓFICO DE CAMUNDONGOS MUTANTES APRESENTANDO DISTROFIA MUSCULAR E DEFICIÊNCIA DE GH, OBTIDOS PELO CRUZAMENTO DOS CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) COM AQUELES DEFICIENTES EM GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J)

Assim, o segundo objetivo deste trabalho consistiu em se desenvolver um modelo de camundongos mutantes apresentando distrofia muscular e deficiência de GH, obtidos pelo cruzamento dos camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) com aqueles deficientes em GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J), e avaliar a evolução do quadro distrófico durante o desenvolvimento desses animais.

Os quatro representantes inéditos do cruzamento entre *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) e *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J) corroboraram os achados obtidos na primeira parte deste trabalho, pois a inibição do GH neste modelo duplo homozigoto mostrou melhora significante na performance destes animais.

Os resultados mostraram que os anões distróficos apresentaram melhores performances relativas em relação aos seus controles, os anões não distróficos, que aquelas dos distróficos em relação aos seus controles, os camundongos normais, em todos os testes funcionais da musculatura esquelética realizados: no teste de deambulação, a performance relativa foi 14% maior (Gráfico 14); no teste de sustentação, 71% maior (Gráfico 15); no teste da esteira, 18% maior (Gráfico 17); no teste de força máxima, 102% maior (Gráfico 18), e no teste de resistência à inclinação, 5,5% maior (Gráfico 16).

A análise desses resultados acima sugere, juntamente com aqueles da primeira parte da tese, em que se demonstrou que os efeitos do excesso de GH pioravam a performance desses animais nos testes funcionais da musculatura esquelética, que o GH pode desempenhar um importante papel fisiopatológico no processo distrófico dos animais *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J).

Um resultado interessante, que chamou nossa atenção, foi o fato dos anões apresentarem performance igual ou superior aos animais controles normais (*C57Black6*) o que sugere uma melhor performance nestes animais advindas do torque, ou seja, quanto menor o braço de alavanca, maior a força (SERWAY & JEWETT, 2003).

Cortes histológicos foram realizados em busca de possíveis alterações morfológicas que pudessem explicar os efeitos acima. Os resultados mostraram que os anões distróficos não apresentaram alterações na área de secção transversal e nem o número de fibras com núcleo central em relação aos distróficos não anões (Gráficos 19 e 21). Entretanto, a área do interstício

nos músculos dos camundongos distróficos foi 29% maior ($p<0,05$) que a dos anões distróficos (Gráfico 20), sugerindo um quadro mais atenuado da distrofia destes últimos animais. As razões para esta diferença é desconhecida, embora possam estar relacionadas com os baixos níveis de TGFβ-1 encontrados neste animal (ver adiante) que por sua vez poderiam ser causados indiretamente pelos baixos níveis de GH.

Em busca de explicar as melhores performances nos testes funcionais da musculatura esquelética dos anões distróficos em relação àquelas dos distróficos, foram realizados também estudos dos níveis de marcadores de regeneração e degeneração celulares nas musculaturas desses animais, após o sacrifício.

Como já discutimos anteriormente, os níveis de Pax7 e MyoD estavam significativamente aumentados na musculatura dos animais distróficos de 35% e 61%, respectivamente, em relação àquela dos animais normais (Gráficos 22 e 23). De maneira semelhante, mostramos que os níveis os níveis de Pax7 e MyoD estavam significativamente aumentados na musculatura dos anões distróficos de 39% e 69%, respectivamente, em relação àquela dos anões normais (Gráficos 22 e 23).

Em resumo, estes resultados sugerem que a deficiência de GH nos anões distróficos não interfere nos processos de proliferação e diferenciação celular das CS, ativados pelo Pax7 e MyoD durante o processo distrófico.

Em seguida, determinamos se os níveis de desmina poderiam estar alterados nos camundongos anões distróficos em relação aos distróficos de

tamanho normal. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre eles. Não houve também alteração significativa dos níveis de desmina entre controles e anões.

Mostramos a seguir, que os níveis de laminina não diferiram significativamente nos camundongos anões distróficos em relação aos distróficos, descartando a possibilidade da deficiência de GH atuar aumentando os níveis desta proteína e melhorar o quadro distrófico destes animais.

Finalmente, determinamos se existiram alterações nos níveis do TGFβ-1 nos camundongos anões distróficos deficientes em GH em relação aos anões normais.

Como seria de se esperar, os níveis do TGFβ-1 nos camundongos anões não distróficos foram semelhantes àqueles dos camundongos normais. Além disto, já mostramos e discutimos anteriormente que os níveis de TGFβ-1 estavam significativamente mais elevados nos camundongos distróficos (35%, $p<0,05$) quando comparados com aqueles dos camundongos normais (Gráfico 25).

Entretanto, de maneira surpreendente, os níveis de TGFβ-1 nos camundongos anões distróficos estavam significativamente diminuídos de 36% ($p<0,05$) em relação aos dos camundongos distróficos, e sem diferença significativa com os dos camundongos anões não distróficos e aos dos camundongos normais.

Esses resultados acima, analisados conjuntamente com aqueles oriundos da administração do GH, reforçam a hipótese de que este hormônio em excesso piora o quadro distrófico dos camundongos *dy/dy (B6.WK-Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J)., enquanto a sua deficiência leva a uma melhora do fenótipo desses animais.

O mecanismo de ação responsável por essas ações do GH na musculatura distrófica, ainda é desconhecido, mas nossos resultados sugerem que este hormônio estimularia mais ainda a formação de TGFβ-1 no músculo distrófico o qual, nestas condições, apresentaria a função de uma citocina inflamatória com capacidade de induzir fortemente fibrose, piorando o quadro distrófico desses animais (discussão parte 2).

3. ANÁLISE DOS EFEITOS DA OCTREOTIDA (DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA) INIBIDOR DA LIBERAÇÃO DO GH, SOBRE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA DOS CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J)

Finalmente, com o intuito de se confirmar os resultados obtidos acima com o modelo do anão distrófico *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit} /J) x dy/dy-(B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J).deficiente de GH, o último objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da octreotida (derivado sintético da somatostatina) inibidor da liberação do GH, sobre a evolução da doença dos camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J).

Os resultados mostraram que a octreotida levou a uma melhora significativa da performance dos camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), em cinco dos seis testes funcionais da musculatura esquelética realizados durante os tempos de observação ou tratamento utilizados (0, 10, 30 e 60 dias):

(a) Teste de deambulação: os animais tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 12,2% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$), enquanto, os distróficos não tratados diminuiram a sua performance de 14,5% no mesmo período (Gráfico 27);

(b) Teste de Sustentação: os animais tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 29,2% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$), enquanto, os distróficos não tratados mantiveram suas performances sem alterações significativas no período (Gráfico 29);

(c) Teste da Esteira: os animais tratados com octreotida, nos trigésimo e sexagésimo dias de observação, apresentaram performances 16,1% e 23,1% menores, respectivamente em relação àquelas destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$), enquanto, os distróficos não tratados mantiveram suas performances sem alterações significativas no período (Gráfico 28);

(d) Teste de Força de Preensão: os animais tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 42,9% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação

($p<0,05$), enquanto, os distróficos não tratados mantiveram suas performances sem alterações significativas no período (Gráfico 30);

(e) Teste de Rota Rod: os animais tratados com octreotida, no sexagésimo dia de observação, apresentaram performance 27,3% maior que aquela destes animais no primeiro dia de observação ($p<0,05$), enquanto, os distróficos não tratados diminuiram a sua performance de 32,7% no mesmo período (Gráfico 31);

Apenas no teste de Resistência à Inclinação, a octreotida não alterou a performance dos camundongos distróficos, a qual não foi também significativamente diferente dos distróficos não tratados no período.

Esses resultados acima, juntamente com os obtidos anteriormente com administração do GH e com o modelo do anão distrófico, reforçam mais ainda a hipótese de que este hormônio em excesso piora o quadro distrófico dos camundongos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), enquanto a sua deficiência ou inibição da liberação levam a uma melhora do fenótipo desses animais.

DISCUSSÃO PARTE 2

GH E PAPEL DO TGFβ-1 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DOS MÚSCULOS INJURIADOS E DISTRÓFICOS

PARTE 2: GH E PAPEL DO TGF-β1 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DOS MÚSCULOS INJURIADOS E DISTRÓFICOS

Uma vez demonstrado que os níveis de TGF-β1 aumentaram significativamente com a administração do GH nos animais distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), e se encontravam significativamente diminuídos nos anões distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) deficientes de GH, e que a octreotida causou uma estabilização ou melhora no quadro distrófico dos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), poderemos agora discutir, em maiores detalhes, se o TGF-β1 poderia ser o responsável pelos efeitos observados na musculatura desses animais.

Assim como ocorre em outros tecidos, a injúria muscular está intimamente relacionada com o recrutamento de células inflamatórias (TIDBALL, 2005). Uma importante função dessas células invasivas é realizar a fagocitose de restos celulares no tecido lesado. Além do mais, a eficiência da regeneração parece ser dependente da eficiência da invasão de células inflamatórias. Em animais velhos, a lenta velocidade de fagocitose coincide com a lenta velocidade da regeneração muscular (GROUNDS, 2002). As células inflamatórias ativadas secretam várias citocinas e fatores de crescimento, os quais influenciam o fluxo sanguíneo local, aumentando a permeabilidade vascular e consequentemente aceleram a resposta inflamatória (HUARD *et al.,* 2002).

As células musculares podem também liberar fatores reguladores positivos e negativos da inflamação, os quais têm um papel ativo em modular a interação com o processo inflamatório (CHAZAUD, *et al.,* 2003; HORSLEY *et*

al., 2003). A combinação dessas citocinas com outras produzidas pelas plaquetas, macrófagos e outras fontes celulares, ativa e atrai fibroblastos para o sítio da injúria durante a inflamação muscular. Por sua vez, os fibroblastos aumentam a produção do TGF-β1, sendo, portanto, responsável pela produção da maioria do colágeno e glicoproteínas. O TGF-β1 remodela a matriz, reduz o nível de vascularidade e finalmente substitui o tecido conectivo por tecido de cicatrização (PRISK & HUARD, 2003).

O tecido fibrótico provê um primeiro suporte para a reunião de miofibrilas danificadas. Entretanto, quando a fibrose aumenta no período pós-injúria, ela restringe o potencial regenerativo das fibras (PRISK & HUARD, 2003) e pode também interferir com a junção neuromuscular, evitando que novos axônios atinjam as miofibrilas (KAARIAINEN *et al.,* 2000).

A Figura 11 apresenta de maneira resumida a coordenação entre a inflamação e a regeneração que é essencial para a recuperação dos músculos após a injúria (MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005). Concomitantemente com a regeneração do músculo esquelético, o processo de fibrose é iniciado através da ativação do TGFβ-1 para substituir o espaço dentro das miofibrilas danificadas, com tecido conectivo. A regeneração do tecido dependerá, portanto, de um balanço preciso entre os fatores pró e antiinflamatórios que determinarão se o dano evoluirá para formação de fibrose ou para completa cura da injúria muscular com substituição das células lesadas (YAMAZAKI *et al.,* 1994).

É importante salientar que várias doenças musculares, quer sejam miopatias inflamatórias tais como polimiosite, ou aquelas associadas com

danos degenerativos, como a Distrofia Muscular de Duchenne, têm sido associadas com necrose e fibrose além de níveis aumentados de TGF-β1 (PRISK & HUARD, 2003). Assim, nos tecidos distróficos, os repetidos ciclos de danos e reparos levam a uma exaustão da capacidade regenerativa do tecido e as fibras musculares são gradualmente substituídas por tecido conectivo adiposo.

Concluindo, os resultados obtidos no presente trabalho enquadram-se dentro desta análise, envolvendo a hipótese de que o aumento ou a diminuição dos níveis de TGF-β1 poderia piorar ou melhorar, respectivamente, o fenótipo dos camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), Entretanto, o mecanismo pelo qual o GH pode induzir o aumento do TGF-β1 permanece desconhecido (OLSON *et al.*, 1986; ALLEN & BOXHORN, 1987) e intensos estudos serão necessários para se esclarecer este fenômeno que parece só ocorrer nos músculos distróficos.

DISCUSSÃO - PARTE 3

OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA, UMA ESPERANÇA DE MELHORA PARA O QUADRO DISTRÓFICO DE DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS ?

PARTE 3: OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA, UMA ESPERANÇA DE MELHORA PARA O QUADRO DISTRÓFICO DE DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS?

Como vimos em nossos resultados e na parte 3 da nossa discussão, a octreotida, um derivado sintético da somatostatina, foi capaz de melhorar a performance nos testes funcionais musculares dos camundongos distróficos. Os nossos resultados sugerem que a octreotida agiu inibindo a liberação de GH e o seu déficit, por sua vez, nos leva a levantar a hipótese de que levaria à diminuição dos níveis de TGF-β1.

Como vimos anteriormente, o TGF-β1 parece estar envolvido na diferenciação celular durante a miogênese (LI *et al.*, 2004), mas existem também fortes evidências de que o TGFβ-1 esteja envolvido na formação de fibrose em resposta à injúria ou inflamação (ALLEN & BOXHORN, 1987; OLSON *et al.*, 1986) ou em outras doenças, como a Síndrome de Marfan (NEPTUNE *et al.* 2003).

Atualmente, várias pesquisas têm sido feitas no intuito de se encontrar drogas capazes de inibir a ação do TGFβ-1 ou de a de outros membros da grande família do TGF beta que também atuariam como citocinas inflamatórias, e consequentemente, melhorar o quadro das doenças distróficas.

Assim, vários estudos têm sido realizados com inibição da miostatina, que é um dos membros da grande família do TGFβ, na tentativa de se obter uma redução do processo inflamatório no músculo distrófico. Vários trabalhos

têm mostrado, de fato, que a inibição da miostatina pode levar a uma melhora da músculatura distrófica (WAGNER *et al*., 2002; BOGDANOVICH *et al.,* 2002).

Mais recentemente, diversos trabalhos têm ressaltado a importância de drogas, tais como a Losartana, que parecem atenuar as falhas da regeneração muscular em estados miopáticos múltiplos induzidos por TGFβ. (LIM *et al.,* 2001; COHN, *et al.,* 2007).

Assim, a octreotida surge também como uma nova ferramenta experimental para ser testada exaustivamente em modelos animais distróficos, representando uma esperança futura para se testar também nas doenças distróficas humanas.

VII CONCLUSÕES

1.Os efeitos do excesso de GH em camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J) causaram:

a) piora na evolução do quadro distrófico, traduzida pela diminuição das performances desses animais nos testes de funcionalidade da musculatura esquelética utilizados em relação aos camundongos normais: teste de deambulação, teste de sustentação, teste da esteira e teste de força máxima; apenas no teste de resistência à inclinação não houve diferença significativa;

b) aumento significativo dos níveis da citocina inflamatória TGFβ-1 na musculatura dos animais distróficos, que poderia explicar os efeitos do GH descritos acima; não houve alteração significativa dos níveis de outros marcadores de degeneração e regeneração, como Pax7, MyoD e das proteínas laminina e desmina;

c) ausência de alterações histológicas significativas na musculatura desses animais em relação aos controles distróficos não tratados;

2.Os efeitos do excesso de GH em camundongos normais causaram:

a) aumento significativo das performances desses animais, em relação aos animais não tratados, nos testes de deambulação e sustentação, e leve aumento, de forma não significativa, em outros dois testes, o da esteira e de força máxima; não havendo alteração apenas no teste de resistência à inclinação;

b) aumento significativo da área de secção transversal das fibras musculares em relação aos controles, o que poderia explicar, pelo menos parcialmente, os resultados descritos acima;

c) ausência de alterações nos níveis de TGFβ-1, Pax7, MyoD, Laminina e Desmina;

3. O desenvolvimento do novo modelo experimental resultante de cruzamentos de camundongos geneticamente deficientes em GH *(Ghrhr*^{lit}*)* com modelos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*$^{dy\text{-}2J}$/J), mostrou:

a) um significativo retardo na evolução da doença distrófica, traduzido pelas melhores performances dos anões distróficos (em relação aos anões normais) que aquelas dos distróficos (em relação aos animais normais), nos testes de deambulação, sustentação, da esteira, de resistência à inclinação e de força máxima;

b) nos cortes histológicos, a área do interstício foi menor que a dos distróficos não anões, sugerindo um quadro distrófico mais brando nesses animais;

c) níveis diminuidos de TGFβ-1 em relação àqueles dos distróficos não anões, sugerindo menores níveis da inflamação nos músculos desses animais;

4. A inibição da liberação do GH pela octreotida, análogo da somatostatina, mostrou:

a) uma relativa melhora ou uma estabilização na evolução do quadro distrófico, traduzido pelo aumento, após 60 dias de tratamento, das performances nos testes funcionais da musculatura, em relação àquelas dos animais distróficos sem tratamento

neste mesmo período: foram maiores nos testes de deambulação e Rota Rod, enquanto aquelas dos distróficos controles diminuíram; mantiveram as mesmas performances no teste da esteira, enquanto as dos distróficos controles pioraram; foram maiores no teste de sustentação, enquanto as dos distróficos controles não melhoraram, e finalmente, as performances no teste da força de preensão palmar foram maiores que aquelas dos camundongos distróficos, que mantiveram suas performances sem alterações significativas.

5. Esses resultados, em conjunto, sugerem um efeito patológico do GH na musculatura distrófica, com seu excesso levando a uma piora da doença, possivelmente através do aumento dos níveis de TGFβ-1. A diminuição do GH, consequentemente, poderia levar a um retardo da evolução da doença.

6. Estes estudos experimentais, abordando pela primeira vez na literatura, em um único momento, os efeitos do GH envolvendo um modelo distrófico por três diferentes ângulos, excesso exógeno do hormônio, inibição endógena por produção de modelo inédito duplo homozigoto e inibição exógena farmacológica, abrem perspectivas bastante promissoras para se testar inibição dos efeitos do GH na evolução das doenças distróficas humanas.

VIII – Referências

Allamand V, Sunada Y, Salih MA, Straub V, Ozo CO, Al-Turaiki MH, Akbar M, Kolo T, Colognato H, Zhang X, Sorokin LM, Yurchenco PD, Tryggvason K, Campbell KP (1997). Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. **Hum Mol Genet 6(5)**:747-52.

Allen RE, Boxhorn LK. (1987) Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. **J Cell Physiol**. **Dec;133(3):**567-72.

Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. (2002) Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in *mdx* mice. **J Cell Biol**. **Apr 1;157(1):**137-48.

Bellini MH, Peroni CN, Bartolini P (1992). Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes. **FASEB J 17(15)**:2322-4. Epub 2003 Oct 2.

Bengtsson BA, Koppeschaar HP, Abs R, Bennmarker H, Hernberg-Ståhl E, Westberg B, Wilton P, Monson JP, Feldt-Rasmussen U, Wüster C (1999). Growth hormone replacement therapy is not associated with any increase in mortality. KIMS Study Group. **J Clin Endocrinol Metab 84(11)**:4291-2.

Blake DJ, Weir A, Newey,SE, Davies KE (2002) Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle **Physiol Rev 82**: 291-329

Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS,Khurana TS (2002) **Nature 420:** 418-21

Brooks SV, Faulkner JA (1988). Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. **J Physiol 404**:71-82.

Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1992). Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A 89(23)**:11151-5.

Bushby KM, Beckmann JS (1995). The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. **Neuromuscul Disord 5(4)**:337-43.

Chakkalakal JV, Thompson J, Parks RJ, Jasmin BJ. (2005). Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **FASEB J 19(8)**:880-891.

Chanson P (2008). Emerging drugs for acromegaly. **Expert Opin Emerg Drugs 13(2)**:273-93.

Chanson P, Boerlin V, Ajzenberg C, Bachelot Y, Benito P, Bringer J, Caron P, Charbonnel B, Cortet C, Delemer B, Escobar-Jiménez F, Foubert L, Gaztambide S, Jockenhoevel F, Kuhn JM, Leclere J, Lorcy Y, Perlemuter L, Prestele H, Roger P, Rohmer V, Santen R, Sassolas G, Scherbaum WA, Schopohl J, Torres E, Varela C, Villamil F, Webb SM (2000). Comparison of octreotide acetate LAR and lanreotide SR in patients with acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf) 53(5)**:577-86.

Chargé SBP, Rudnicki M A (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev 84**:209– 238.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK (2003) **J Cell Biol. 2003 Dec 8;163(5):**1133-43.

Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC. (2007) Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-β-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. **Nat Med**. **Apr;13(4):**204-10.

Colao A, Pivonello R, Cappabianca P, Auriemma RS, De Martino MC, Ciccarelli A, de Divitiis E, Lombardi G (2003). The use of a GH receptor antagonist in patients with acromegaly resistant to somatostatin analogs. **J Endocrinol Invest 26(10 Suppl)**:53-6.

COLLINS, C.A.; MORGAN, J.E.(2003) Duchenne' s muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International J of Experimental Pathology, v. 84,** p. 165-172.

Cozzi R, Dallabonzana D, Attanasio R, Barausse M, Oppizzi G (1999). A comparison between octreotide-LAR and lanreotide-SR in the chronic treatment of acromegaly. **Eur J Endocrinol 141(3)**:267-71.

CUNNINGHAM B.C; WELLS J.A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. **Science, v. 244,** p. 1081-1085.

De Luca A, Liantonio A, Pierno S, Desaphy JF, Leoty C, Camerino DC (1999). Potential targets for skeletal muscle impairment by hypogravity: basic characterization of resting ionic conductances and mechanical threshold of rat fast- and slow-twitch muscle fibers. **J Gravit Physiol 5(1)**:P75-6.

Dubowitz V (1996). 41st ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy 8-10 March 1996, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord 6(4)**:295-306.

Dubowitz V (1997). 50th ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy. 28 February 1997 to 2 March 1997, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord 7(8)**:539-47.

Dubowitz V (1999). 68th ENMC international workshop (5th international workshop): On congenital muscular dystrophy, 9-11 April 1999, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord 9(6-7)**:446-54.

Ervasti JM, Campbell KP (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. **Cell 66(6)**:1121-31.

Ervasti JM, Campbell KP (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol 122(4)**:809-23.

Ervasti JM, Campbell KP (1993). Dystrophin and the membrane skeleton. **Curr Opin Cell Biol 5(1)**:82-7.

Ervasti JM, Campbell KP (1993). Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Mol Cell Biol Hum Dis Ser 3**:139-66.

Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol 34(8)**:760-5.

Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocr Rev 17(5)**:481-517.

Francke U, Ochs HD, de Martinville B, Giacalone J, Lindgren V, Distèche C, Pagon RA, Hofker MH, van Ommen GJ, Pearson PL (1985). Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. **Am J Hum Genet 37(2)**:250-267.

Frost SJ, Simpson DJ, Farrel WE (2001) Decreased proliferation and cell cycle arrest in neoplastic rat pituitary cells is associated with transforming growth factor-beta-1-induced expression of p15/INK4B. **Moll Cell Endocrinol May 15;176 (1-2):** 29-37

Gardner-Medwin D (1980). Clinical features and classification of the muscular dystrophies. **Br Med Bull 36(2)**:109-15.

Ghafoor T, Mahmood A, Shams S (2003). Duchenne muscular dystrophy with associated growth hormone deficiency. **J Coll Physicians Surg Pak 13(12)**:722-3.

Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE (1993). GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. **Nat Genet 4(3)**:227-32.

Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. **Physiol Genomics 14(3)**:261-71.

Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA (2004). Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve 30(5)**:645-53.

Góth M, Hubina E, Kovács L, Szabolcs I (2002). Novel pharmacologic therapies in acromegaly. **Orv Hetil 143(19 Suppl)**:1057-62.

Grounds MD (2002) Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-I signaling. **Biogerentology 3:** 19-24.

Guicheney P, Vignier N, Helbling-Leclerc A, Nissinen M, Zhang X, Cruaud C, Lambert JC, Richelme C, Topaloglu H, Merlini L, Barois A, Schwartz K, Tomé FM, Tryggvason K, Fardeau M (1997). Genetics of laminin alpha 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. **Neuromuscul Disord 7(3)**:180-6.

Guicheney P, Vignier N, Zhang X, He Y, Cruaud C, Frey V, Helbling-Leclerc A, Richard P, Estournet B, Merlini L, Topaloglu H, Mora M, Harpey JP, Haenggeli CA, Barois A, Hainque B, Schwartz K, Tomé FM, Fardeau M, Tryggvason K (1998). PCR based mutation screening of the laminin alpha2

chain gene (LAMA2): application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. **J Med Genet 35(3)**:211-7.

Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E (2003) Laminin α2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. **Neuromuscular Disorders 13:** 2007-15.

Halevy O, Hodik V, Mett A (1996). The effects of growth hormone on avian skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. **Gen Comp Endocrinol 101(1)**:43-52.

Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol, 91**: 534-51

Hayashi YK, Ishihara T, Domen K, Hori H, Arahata K (1997) A benign allelic form of laminin alpha 2 chain deficient muscular dystrophy. Lancet Apr 19; 349 (9059): 1147.

Herrington J, Carter-Su C (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends Endocrinol Metab 12(6)**:252-7.

Hillaire D, Leclerc A, Fauré S, Topaloglu H, Chiannilkulchaï N, Guicheney P, Grinas L, Legos P, Philpot J, Evangelista T, et al (1994). Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping. **Hum Mol Genet 3(9)**:1657-61.

Hoffman E P, Brown R H Jr, Kunkel L M (1987). Distrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell 51(6)**:919-928.

Hoffman EP, Dressman D (2001). Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends Pharmacol Sci 22(9)**:465-70.

Hoffman AR, Strasbuurger CJ, Zagar A, Blum WF, Kehely A, Hartman ML (2004) Efficacy and tolerability of an individualized dosing regimen for adult growth hormone replacement therapy in comparison with fixed body weight-based dosing. J Clin Endocrinol Metab Jul; 89 (7): 3224-33.

Hawke TJ, Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol 91(2)**:534-51.

Helbling-Leclerc A, Topaloglu H, Tomé FM, Sewry C, Gyapay G, Naom I, Muntoni F, Dubowitz V, Barois A, Estournet B (1995). Readjusting the localization of merosin (laminin alpha 2-chain) deficient congenital muscular dystrophy locus on chromosome 6q2. **C R Acad Sci III 318(12)**:1245-52.

Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tomé FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, *et al* (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. **Nat Genet 11(2)**:216-8.

Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. (2003) **Cell.May 16;113(4):**483-94.

Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am. May;84-A(5):**822-32.

Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. **Science 216(4551)**:1237-9.

Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J (1987). Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. **Endocr Rev 8(4)**:426-38.

Jawiarczyk A, Kałuzny M, Bolanowski M, Bednarek-Tupikowska G (2008). Additional metabolic effects of adding GH receptor antagonist to long-acting somatostatin analog in patients with active acromegaly. **Neuro Endocrinol Lett 29(4)**:571-6.

JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J (2005) Biologia Celular e Molecular Ed. 8 p 125.

Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H.Scand (2000) Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair **J Med Sci Sports Dec;10(6):**332-7.

Karpati G (2002) Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases Neuropath Press, Basel

Kuang W, Xu H, Vachon PH, Liu L, Loechel F, Wewer UM, Engvall E (1998) Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models. **J Clin Invest** 102: 844-52.

Kennel PF, Fonteneau P, Martin E, Schmidt JM, Azzouz M, Borg J, Guenet JL, Schmalbruch H, Warter JM, Poindron P (1996). Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. **Neurobiol Dis 3(2)**:137-47.

Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. **Proc Natl Acad Sci U S A 82(14)**:4778-4782.

Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001) The Somatomedin Hypothesis. **Endocr Rev 22**: 53-74.

Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **Am J Pathol Mar; 164 (3):** 1007-19.

Lichanska AM, Waters MJ (2008). New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. **Horm Res 69(3)**:138-45. Epub 2008 Jan 8.

Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, Roberts R, Marian AJ. (2001) Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy . **Circulation**. **Feb 13;103(6):**789-91.

Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusis AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG (1993). Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. **Nature 364(6434)**:208-13.

Lynch GS, Rafael JA, Chamberlain JS, Faulkner JA (2000). Contraction-induced injury to single permeabilized muscle fibers from mdx, transgenic mdx, and control mice. **Am J Physiol Cell Physiol 279(4)**:C1290-4.

Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. **Dev Biol 229(1)**:141-62.

Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casilllas F, Ohtsuki M, Wrana JL (1992) TGF-beta receptors. **Mol Reprod Dev. Jun;32 (2):** 99-104.

McNally EM, Pytel P (2007). Muscle diseases: the muscular dystrophies. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis 2**:87-109.

Meier H, Southard JL (1970). Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy-locus. **Life Sci 9(3)**:137-144.

Michelson AM, Russel ES, Harman PJ (1955). Dystrophia muscularis: a hereditary primary myopathy in the house mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A 41(12)**:1079-1084.

Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G,Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD. (2008) Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. **Nat Med. Apr;14(4):**442-7.

Mourkioti F, Rosenthal N (2005). IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. **Trends Immunol 26(10)**:535-42.

MULLER A.F, KOPCHICK JJ, FLYVBJERG A, van der LELY AJ Clinical review 166: Growth Hormone Receptor Antagonists. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 89, n. 4,** p. 1503-1511, 2004.

Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S, Brown SC (2002). Defective glycosylation in muscular dystrophy. **Lancet 360(9343)**:1419-21.

Muntoni F, Bertini E, Bönnemann C, Brockington M, Brown S, Bushby K, Fiszman M, Körner C, Mercuri E, Merlini L, Hewitt J, Quijano-Roy S, Romero N, Squarzoni S, Sewry CA, Straub V, Topaloglu H, Haliloglu G, Voit T, Wewer U, Guicheney P (2002). 98th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD), 7th Workshop of the International Consortium on CMD, 2nd Workshop of the MYO CLUSTER project GENRE. 26-28th October, 2001, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord 12(9)**:889-96.

Muntoni F, Brown S, Sewry C, Patel K (2002). Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. **Neuromuscul Disord 12(5)**:438-46.

Musaro A, Rosenthal N (2002). The role of local insulin-like growth factor-1 isoforms in the pathophysiology of skeletal muscle. **Curr Genomics 3**:149-162

Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome **Nat Genet Mar; 33(3):**407-11.

O'Carroll AM, Lolait SJ, König M, Mahan LC (1993). Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. **Mol Pharmacol 42(6)**:939-46.

Ohlendieck K, Campbell KP (1991). Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. **FEBS Lett 283(2)**:230-4.

Olson EN, Sternberg E, Hu JS, Spizz G, Wilcox C. (1986) Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. **J Cell Biol. Nov;103(5):**1799-805.

Onofre PC (2009). Avaliação do padrão de degeneração e regeneração muscular em diferentes modelos murinos para distrofias musculares progressivas. São Paulo. Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo.

Paisley AN, Trainer P, Drake W (2004). Pegvisomant: a novel pharmacotherapy for the treatment of acromegaly. **Expert Opin Biol Ther 4(3)**:421-5.

Parkinson C, Scarlett JA, Trainer PJ (2003). Pegvisomant in the treatment of acromegaly. **Adv Drug Deliv Rev 55(10)**:1303-14.

Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB (1994). All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. **Biochem Biophys Res Commun 198(2)**:605-12.

Prisk V, Huard J (2003). Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histol. Histopathol.** 18: 1243-56.

Raynor K, O'Carroll AM, Kong H, Yasuda K, Mahan LC, Bell GI, Reisine T (1993). Characterization of cloned somatostatin receptors SSTR4 and SSTR5. **Mol Pharmacol 44(2)**:385-92.

Reichlin S (1983). Somatostatin. **N Engl J Med 309(24)**:1495-501.

Reubi JC, Kvols L, Krenning E, Lamberts SW (1990). Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. **Metabolism 39(9 Suppl 2)**:78-81.

Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE (1990). Effects of human growth hormone in men over 60 years old. **N Engl J Med 323(1)**:1-6.

Ryder-Cook AS, Sicinski P, Thomas K, Davies KE, Worton RG, Barnard EA, Darlison MG, Barnard P J (1988). Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. **EMBO J 7(10)**:3017-21.

Sacco A, Doyonnas R, LaBarge MA, Hammer MM, Kraft P, Blau HM (2005) IGF-I increase bone merrow contribution to adult skeletal and enhances the fusion of myelomonocytic precursors **J Cell Biol Nov 7; 171 (3):** 483-92.

Sadowski CL, Wheeler TT, Wang LH, Sadowski HB (2001). GH regulation of IGF-I and suppressor of cytokine signaling gene expression in C2C12 skeletal muscle cells. **Endocrinology 142(9)**:3890-900.

Seale P, Rudnicki MA (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Dev Biol 218(2)**:115-24.

Segard, H. B., Moulin, S., Boumard, S., Crémiers C. A., Kelly, P. A (2003) Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts.**Cellular Signalling 15:** 615-623.

Serway, R. A., Jewett, Jr. J. W. (2003). ***Physics for Scientists and Engineers.*** 6th Ed. Brooks Cole. ISBN 0-53440-842-7.

Shavlakadze T, White J, Hoh JF, Rosenthal N, Grounds MD (2005). Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. **Mol Ther 10(5)**:829-43.

Schertzer, J.D., Ryall, J.G., Lynch, G.S. Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2006 Sep;291(3):E499-505. Epub 2006 Apr 18.

Schertzer JD, Gehrig SM, Ryall JG, Lynch GS. (2007) Modulation of Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein Interactions Enhances Skeletal Muscle Regeneration and Ameliorates the Dystrophic Pathology in mdx Mice **The Am J of Pathology 171**: 1180-1188.

Shibuya S, Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, Oniki H (2003) Merosin (laminin-2) localization in basal lamina of normal skeletal muscle fibers and changes in plasma membrane of merosin-deficient skeletal muscle fibers. **Med Electron Microsco 36:** 213-20.

Sicinski P, Geng Y, 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(4912)**:1578-80.

Silveira L, Hirabara S M, Alberici L C, Lambertucci R H, Peres C M, Takahashi H K, Pettri A, Alba-Loureiro T, Luchessi A D, Cury-Boaventura M F, Vercesi A E, Curi R (2007). Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. **Cell Physiol Biochem 20(1-4)**:213-26.

Sotiropoulos A, Ohanna M, Kedzia C, Menon RK, Kopchick JJ, Kelly PA, Pende M (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A 103(19)**:7315-20. Epub 2006 May 2.

Squire S, Raymackers JM, Vandebrouck C, Potter A, Tinsley J, Fisher R, Gillis JM, Davies KE (2002) Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. **Hum Mol Genet Dec 15;11 (26):** 3333-44.

Sunada Y, Bernier SM, Utani A, Yamada Y, Campbell KP (1995). Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. **Hum Mol Genet 4(6)**:1055-1061.

Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, Campbell KP (1994). Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. **J Biol Chem 269(19)**:13729-32.

Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. **Nat Genet 9(2)**:184-90.

Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 288: R345-53.

Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE (1996). Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. **Nature 384(6607)**:349-53.

Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, Davies K (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. **Nat Med 4(12)**:1441-4.

Tomé FM, Matsumura K, Chevallay M, Campbell KP, Fardeau M (1994). Expression of dystrophin-associated glycoproteins during human fetal muscle development: a preliminary immunocytochemical study. **Neuromuscul Disord 4(4)**:343-8.

Tomé FM (1999) The Peter Emil Becker Award lecture 1998. The saga of congenital muscular dystrophy. **Neuropediatrics Apr; 30 (2):** 55-65.

Turner HE, Vadivale A, Keenan J, Wass JA (1999). A comparison of lanreotide and octreotide LAR for treatment of acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf) 51(3)**:275-80.

Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PC, Martins PC, Lopes VF, Zilberztajn D, Maia LS, Sell K, Yamamoto LU (2008). Animal models for genetic neuromuscular diseases. **J Mol Neurosci 34(3)**:241-8. Epub 2008 Jan 18.

Vainzof M, Zatz M (2003). Protein defects in neuromuscular diseases. **Braz J Med Biol Res 36(5)**:543-55. Epub 2003 Apr 22.

Vainzof M, Marie SK, Reed UC, Schwartzman JS, Pavanello RC, Passos-Bueno MR, Zatz M (1995). Deficiency of merosin (laminin M or alpha 2) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. **Neuropediatrics 26(6)**:293-7.

Vedsted P, Larsen AH, Madsen K, Sjøgaard G (2003). Muscle performance following fatigue induced by isotonic and quasi-isometric contractions of rat

extensor digitorum longus and soleus muscles in vitro. **Acta Physiol Scand 178(2)**:175-86.

Verellen –Dumoulin CH, Freund M, De Meyer R, Laterre CH, Frederic J, Thompson MW, Markovic VD, Worton RG. (1984). Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. **Hum Genet 67:** 115-19.

Vilquin JT, Vignier N, Tremblay JP, Engvall E, Schwartz K, Fiszman M (2000). Identification of homozygous and heterozygous dy^{2J} mice by PCR. **Neuromuscul Disord 10(1)**:59-62.

Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E (1994) Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin α2 (*Lama2*) gene. **Nature Genetics 8**: 297-302.

Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ (2002) Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. **Ann Neurol 52**: 832-36.

Wass JA, Thorner MO, Morris DV, Rees LH, Mason AS, Jones AE, Besser GM (1977). Long-term treatment of acromegaly with bromocriptine. **Br Med J 1(6065)**:875-8.

Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, Richter EA (1996). Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol 81(4)**:1501-9.

Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. **Cell Dec 11;71(6):** 1003-14.

Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S (1992). Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. **Proc Natl Acad Sci U S A 89(1)**:251-5.

Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M (1994) Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. **Am J Pathol 144**: 221-26.

Yasuda K, Rens-Domiano S, Breder CD, Law SF, Saper CB, Reisine T, Bell GI (1992). Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. **J Biol Chem 267(28)**:20422-8.

Zatz M, Betti RT, Levy JA (1981). Benign Duchenne Muscular Dystrophy in a Patient with Growth Hormone Deficiency. **Am J Med Genet 10(3)**:301-304.

Zatz M, Betti RT (1986). Benign Duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency: a five years follow-up. **Am J Med Genet 24(3)**:567-72.

ZATZ M, RAPAPORT D, VAINZOF M, PAVANELLO RCM, ROCHA JML, BETTI RTB, OTTO PA (1998) Effect of Manzidol and growth hormone levels in patients with Duchenne Muscular Dystrophy. **Am Journal of Medical Genetics, v. 31,** p. 821-833, 1988.

Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR (2000). Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. **Curr Opin Neurol 13(5)**:511-7.

Zatz M, Distrofias Musculares Progressivas. In: CARAKUSHANSKY, G., Ed. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro, Guanabara – Koogan, 2001. p. 245-60.

Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ (1981). Translocation (X;6) in female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localizations of yhe DMD locus. J Med Gen 18 (6): 442-47.

Zhou L, Rafael-Fortney JA, Huang P, Zhao XS, Cheng G, Zhou X, Kaminski HJ, Liu L, Ransohoff RM (2008) Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. **J Neuro Sci Jan 15; 264 (1-2):** 106-11. Epub 2007 Sep 24.

Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AH, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. **Nature 333(6172)**:466-9.