

Paula Cristina Gorgueira Onofre Oliveira

Avaliação do padrão de degeneração e  
regeneração muscular em diferentes modelos  
murinos para distrofias musculares progressivas

São Paulo

2009

Paula Cristina Gorgueira Onofre Oliveira

Avaliação do padrão de degeneração e  
regeneração muscular em diferentes modelos  
murinos para distrofias musculares progressivas

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biociências da Universidade de  
São Paulo, para a obtenção de Título  
de Mestre em Ciências, na Área de  
Genética.

Orientador (a): Prof. Mariz Vainzof

São Paulo

2009

# Ficha Catalográfica

---

Onofre-Oliveira, Paula Cristina Gorgueira  
Avaliação do padrão de degeneração  
e regeneração muscular em diferentes  
modelos murinos para distrofias musculares  
progressivas.

82 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Genética.

1. Distrofias musculares progressivas;  
2. Modelos animais; 3. Expressão gênica; 4.  
Células-tronco. I. Universidade de São  
Paulo. Instituto de Biociências.  
Departamento de Genética e Biologia  
Evolutiva.

## Comissão Julgadora:

---

Prof (a). Dr (a).

---

Prof (a). Dr (a).

---

Prof (a). Dr (a).

---

Prof (a). Dr (a).

---

Prof (a). Dr (a). Mariz Vainzof  
Orientador (a)

## Dedicatória

---

Dedico este trabalho a meus pais,  
que sempre acreditaram nas minhas escolhas;  
Ao meu marido Marcelo,  
que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis;  
A minha grande companheira Belinha,  
pelas tardes de espera e paciência quando eu me tornava ausente;  
A todos meus familiares e amigos,  
porque parte do sucesso deste projeto também é de vocês.

# Agradecimentos

---

Gostaria de agradecer primeiramente à minha grande orientadora e amiga Mariz Vainzof, que sem dúvida tem um papel fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Sem ela, nada disso seria possível.

Quero agradecer também à Dra. Lydia Yamamoto e Marta Canovas, que sempre me ensinaram muito em cada uma das partes deste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos e companheiros de bancada: Poliana, Danielle, Vanessa, Dinorah, André, Thais, Adriano e Camila, que me auxiliaram muito na prática e discussão de cada um dos experimentos; mais recentemente, agradeço a Rebeca e Nabila, que já chegaram me ajudando.

Não posso deixar de agradecer meus amigos dos outros laboratórios: Mari, Nati, Fanga, Bruno, Rafa, Denise, Marcos, Monize, Danilo, Raquel – vocês me trouxeram bons *insights* e momentos divertidos para recordar.

Agradeço também quem já passou pelo projeto e atualmente está em outros lugares: Vica, Pati, Lucas Maia, Karen, Gika, Rafa – vocês também deixaram sua marca para que tudo isso fosse possível.

Um agradecimento especial vai para “minha” aluna de pré-iniciação científica Queren, que me fez aprender muito na prática educativa.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Paulo Otto, que foi de fundamental ajuda na análise estatística dos dados.

Agradeço também todos os meus amigos mais que especiais: Miriam, Kitty, Fer. São vocês que me trouxeram boas idéias para a discussão e me ajudam na parte “difícil” dos momentos de lazer.

Agradeço ao Marcelo, meus pais, meus sogros, meu irmão, minhas cunhadas, meus avós, minhas tias e primos, minhas filhotas Belinha e Tequila – com vocês eu preenchi meu coração e me senti encorajada a buscar novos desafios.

Por fim, agradeço à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Obrigada!

# Índice

---

I.	Introdução	1
II.	Objetivos	19
III.	Material e Métodos	20
IV.	Resultados	28
V.	Discussão	49
VI.	Conclusões	64
VII.	Resumo	65
VIII.	Abstract	66
IX.	Biografia	67
X.	Referências Bibliográficas	68

# Introdução

---

## 1. O músculo normal: caracterização

O tecido muscular, responsável pelos movimentos corporais, é constituído por células de morfologia alongada que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos altamente organizados, responsáveis pela contração muscular. O tecido muscular pode ser dividido em liso, estriado esquelético ou estriado cardíaco, conforme a sua morfologia e função.

Os músculos estriados apresentam uma aparência “listrada” ao serem observados ao microscópio óptico. Esses músculos são formados por feixes de fibras musculares longas, cilíndricas e multinucleadas, com um diâmetro que varia entre 10 e 100 $\mu$ m. Estas fibras são geradas na fusão de precursores chamados mioblastos, formando um sincício de células musculares. A observação por microscopia eletrônica revela que as listras se originam da estrutura em bandas de miofibrilas múltiplas (Voet, 2000), compostas principalmente pelas proteínas actina e miosina, organizadas com mais proteínas para formar a unidade funcional do músculo, o sarcômero (Figura 1). A actina é uma proteína globular bilobada com 375 resíduos que se polimeriza formando uma fibra que se localiza na região central do filamento fino. A miosina consiste de seis cadeias polipeptídicas – duas cadeias pesadas, de 220kD, cuja porção N-terminal, chamada cabeça, possui atividade ATPásica, e dois pares de cadeias leves diferentes, chamadas cadeias leves essenciais e cadeias leves regulatórias, cujo peso varia de 15 a 22kD, dependendo da sua proveniência.

As miofibrilas, de diâmetro de 1 a 2 $\mu$ m, correm longitudinalmente à fibra muscular e apresentam repetição de unidades iguais, os sarcômeros. Cada sarcômero é formado principalmente por filamentos de actina e miosina, dispostos longitudinalmente, organizados numa distribuição simétrica e paralela. Intercaladas com a actina, encontram-se as moléculas de tropomiosina e troponina, que auxiliam na ativação da cascata contrátil pela ligação com cálcio e pela exposição dos sítios de ligação na actina às cabeças de miosina. Esta organização é mantida por diversas outras proteínas, como por exemplo, filamentos de desmina, que ligam as miofibrilas umas as outras (Figura 2).

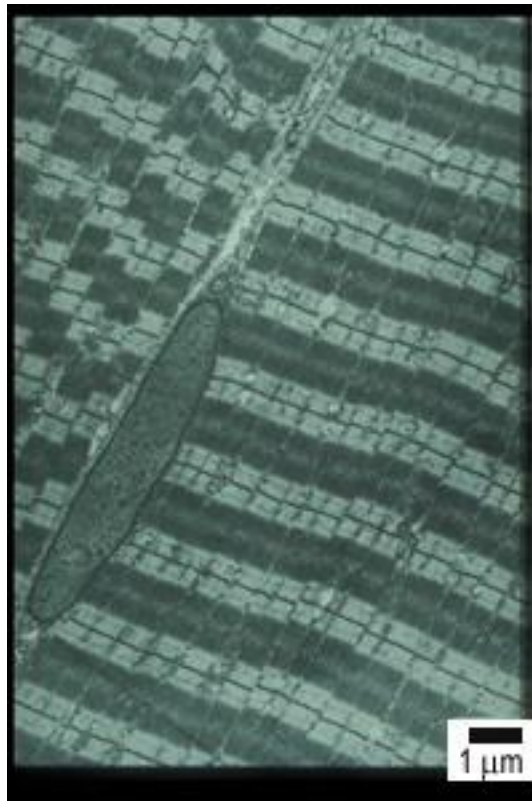


Figura 1: Micrografia eletrônica de músculo estriado esquelético. Os sarcômeros são organizados em estruturas longitudinais chamadas de miofibrilas. Contributor: Michelle Peckham © University of Leeds image courtesy Centre for Bioscience, the Higher Education Academy, ImageBank (<http://www.bioscience.heacademy.ac.uk/imagebank/>)

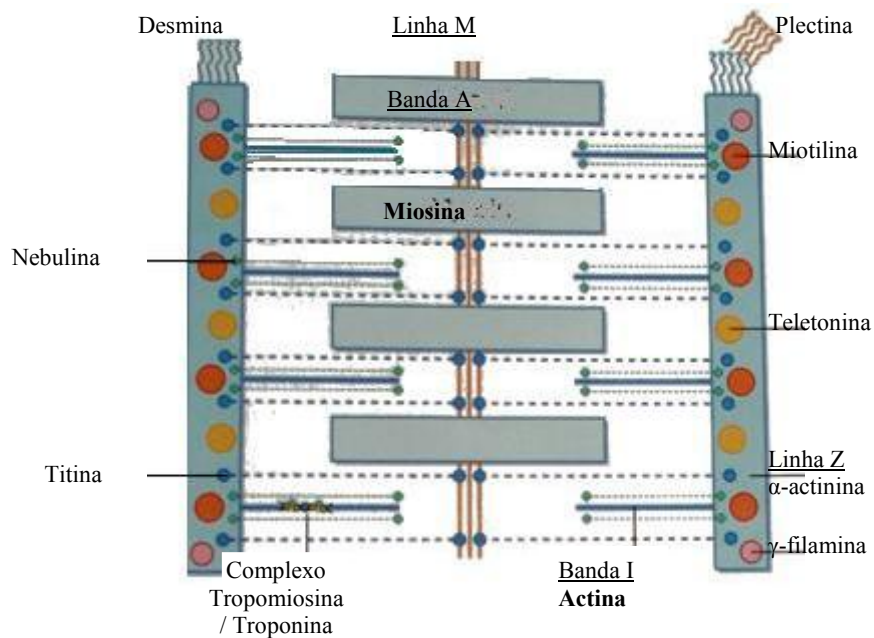


Figura 2: Esquema de estrutura do sarcômero, mostrando as proteínas contráteis e outras proteínas auxiliaadoras na manutenção desta organização. Modificado de (Dubowitz, 2007).



O conjunto de miofibrilas é, por sua vez, preso à membrana plasmática da célula muscular por meio de outras proteínas que têm afinidade pelos miofilamentos e por proteínas da membrana plasmática (Figura 3). A distrofina, proteína de localização sub-sarcolemal, se liga aos filamentos de actina e a um complexo de proteínas integrais da membrana plasmática (complexo distrofina-glicoproteínas associadas - DGC) (Rando, 2001) e acredita-se que, além de ajudar a manter a estabilidade e organização da membrana e do equipamento contrátil, tenha também a função de manter o tráfego de informações através da membrana da célula muscular (Hoffman e Dressman, 2001).

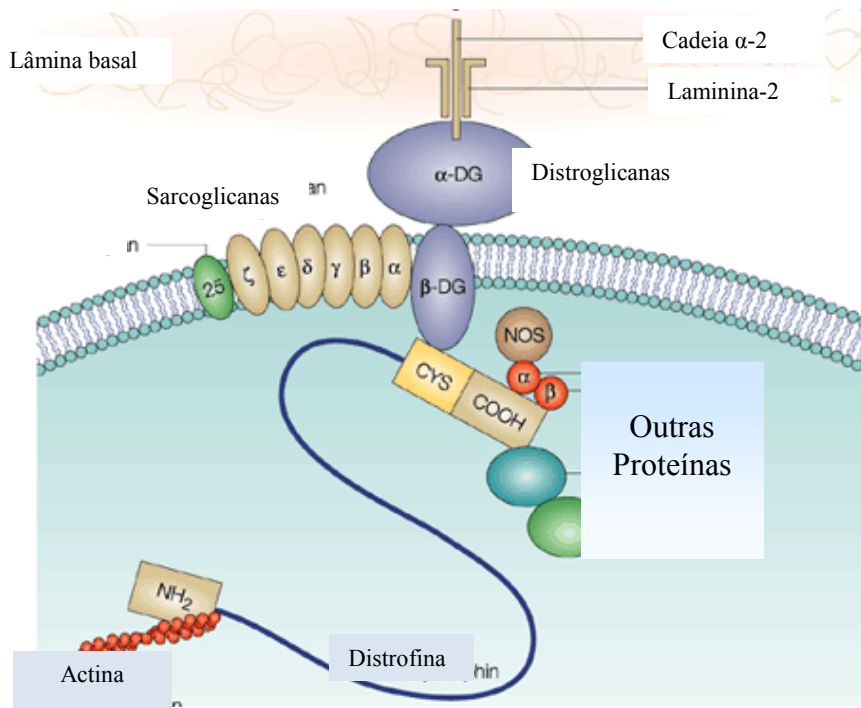


Figura 3: Esquema de organização do complexo distrofina-glicoproteínas associadas, mostrando a ligação com os filamentos de actina pela parte interior da membrana e à lâmina basal pela parte extracelular. Modificado de (Khurana e Davies, 2003).

A formação e organização das miofibrilas no interior das fibras musculares ocorrem em decorrência do processo de diferenciação celular, após a fusão dos mioblastos e formação dos miotubos. Este processo acontece tanto no período de desenvolvimento embrionário como durante o processo de regeneração muscular, através das células-satélite presentes no músculo maduro.

#### a. Desenvolvimento muscular embrionário

No período embrionário, a musculatura é derivada dos somitos, mais precisamente dos miótomos (Figura 4), ou de diferenciações locais de células mesenquimais. As primeiras células miogênicas podem ser encontradas na parte anterior da linha primitiva e nas células mesodérmicas formadas na gastrulação (Krenn, Gorka *et al.*, 1988). Estas células originam a mesoderme paraxial que se transforma depois em somitos.

Quando células mesenquimais são estimuladas a originar células musculares esqueléticas, observa-se um alongamento da sua forma e do núcleo, formando os mioblastos. Vários mioblastos

fundem-se para formarem os miotubos, que começam a sintetizar as proteínas musculares necessárias para sua estrutura e função, constituindo assim a fibra muscular.



Figura 4: Embrião de galinha onde podem ser identificados os somitos. Modificado de Fondazione SanRaffaele del Monte Tabor – Milano (<http://www.sanraffaele.org/52.html?page=4>)

### **b. Regeneração muscular**

No indivíduo adulto existe uma subpopulação de células musculares parcialmente indiferenciadas, mononucleares, localizadas nas periferias dos miotubos maduros, entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares: são as células-satélite, também chamadas de células precursoras miogênicas. Estas células conferem à musculatura uma grande capacidade de se adaptar a demandas como crescimento e injúria. Quando não estimuladas, permanecem num estado quiescente, não proliferativo (Chen e Goldhamer, 2003). Entretanto, em resposta a um estímulo, seja ele uma injúria ou uma demanda aumentada de trabalho, estas células tornam-se ativas, proliferam e começam a expressar marcadores miogênicos, diferenciando-se em mioblastos. Estes podem se fundir às fibras pré-existentes gerando hipertrofia (aumento do tamanho das fibras) ou fusionam-se para formar novas fibras multinucleadas causando hiperplasia (aumento do número de fibras naquela região), em um processo que recapitula os eventos fundamentais do desenvolvimento muscular (Hawke e Garry, 2001).

Esta população de células precursoras musculares pode suportar diversos ciclos de degeneração e regeneração (Charge e Rudnicki, 2004). Na degeneração é possível observar a morte das fibras musculares por apoptose ou necrose. Este evento é marcado pelo rompimento do sarcolema das miofibrilas, refletido por uma elevação do nível sérico de proteínas musculares como a creatina quinase, geralmente restrita ao citoplasma da célula muscular. Assim, em decorrência deste processo, é possível observar a ativação de células mononucleadas, especialmente células inflamatórias e células-satélite, que determinam a indução da regeneração muscular.

A capacidade regenerativa das células-satélite, no entanto, 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, como veremos a seguir. Se o músculo perde a sua capacidade regenerativa ocorre, então, a substituição do tecido muscular por tecido adiposo ou conjuntivo.

A regeneração muscular é, portanto, um processo complexo que requer uma modulação coordenada entre as células-satélite, fatores de crescimento, citocinas, respostas inflamatórias, componentes vasculares e da matriz extracelular (Goetsch, Hawke *et al.*, 2003).

Os fatores de transcrição miogênicos pertencem à família protéica *helix-loop-helix* e têm um papel fundamental na miogênese e na regeneração: as células onde eles não são expressos não se diferenciam em músculo (Seale e Rudnicki, 2000).

### **c. Fatores envolvidos no desenvolvimento, regeneração e degeneração musculares**

Diversos fatores estão implicados no desenvolvimento muscular, e as vias de atuação de cada um deles ainda não são totalmente conhecidas.

Os mais importantes marcadores da determinação da via miogênica são os componentes da família de fatores de transcrição chamados de fatores musculares regulatórios (MRF). As principais proteínas deste grupo são *Myf5*, *MyoD*, *Myf6* (também chamado de MRF4) e miogenina (Brand-Saberi e Christ, 1999). A super-expressão de *MyoD* e *Myf5* levam a diferenciação de variados tipos celulares em músculo (Choi, Costa *et al.*, 1990; Weintraub, 1993) e por isso estas proteínas foram chamadas de fatores de determinação muscular, enquanto que *Myf6* e miogenina estariam atuando num ponto mais abaixo na via miogênica (Brand-Saberi e Christ, 1999).

Quando a inativação do gene do *MyoD* é induzida em camundongos, observa-se atraso no desenvolvimento da musculatura dos membros. Entretanto, quando há inibição do *MyoD* concomitante com inibição do *Myf5*, há ausência total de mioblastos e não há formação de tecido muscular (Muntoni, Brown *et al.*, 2002): os camundongos duplo-nocautes *Myf5/MyoD* não possuem musculatura esquelética porque são incapazes de diferenciar os precursores em mioblastos (Rudnicki, Schnegelsberg *et al.*, 1993). Porém, como os camundongos nocaute para *Myf5* e *MyoD* separadamente possuem musculatura, assumiu-se que estes dois fatores de determinação muscular atuam em vias separadas ou podem compensar a função um do outro (Rudnicki, Braun *et al.*, 1992; Weintraub, 1993; Braun e Arnold, 1996; Wang, Schnegelsberg *et al.*, 1996).

Assim, *Myf5* está estruturalmente relacionada à *MyoD* e também atua auxiliando na proliferação das células-satélite na regeneração muscular (Hawke e Garry, 2001). Não há nenhuma patologia associada a mutações nos genes que codificam *Myf5* e *MyoD*, porém a sua expressão pode estar aumentada em distrofias musculares e em miopatias inflamatórias.

Na regeneração muscular, *MyoD* também funciona como o fator de transcrição miogênico principal que leva ao aumento da expressão de genes ligados a diferenciação celular, exercendo, portanto, um importante papel na fase pós-ativação das células-satélite. Assim, o *MyoD* 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 células-satélite (Hawke e Garry, 2001).

Além disso, as células-satélite quiescentes expressam também RNA mensageiro de *Myf5* (Beauchamp, Heslop *et al.*, 2000; Zammit, Relaix *et al.*, 2006), embora até o presente momento não existem evidências da expressão da proteína por estas células. Células-satélite de camundongo e linhagens celulares miogênicas expressam a proteína *Myf5* na fase proliferativa, e a proteína não foi detectada após diferenciação e fusão em miotubos (Lindon, Montarras *et al.*, 1998; Yablonka-Reuveni, Rudnicki *et al.*, 1999). Assim, em algumas fases do desenvolvimento não foi possível relacionar a expressão gênica de *Myf5* com a produção de sua proteína, o que não permite a total elucidação de seu papel, levantando questões de como este fator está implicado na proliferação dos mioblastos e na renovação das células-satélite que devem permanecer em estado quiescente (Yablonka-Reuveni, Day *et al.*, 2008).

A diferenciação dos mioblastos em fibra muscular também depende de *Myf6* e, particularmente, miogenina (Buckingham, Bajard *et al.*, 2003), que é um fator essencial para a diferenciação de células pluripotentes em músculo. Estudos realizados com culturas de diversos tipos celulares mostram que estes se diferenciam em músculo quando expostos à miogenina. Um experimento realizado com camundongos mostrou que mutações no gene da miogenina causam morte imediatamente após o nascimento e os animais apresentam diminuição muito grande de massa muscular e perda da linha Z do sarcômero (Muntoni, Brown *et al.*, 2002).

Assim, na regeneração, a expressão de *MyoD* é observada durante a proliferação das células-satélite, enquanto que sua diferenciação é marcada pelo início da expressão de miogenina, com um declínio concomitante da expressão de *Myf5*, saída do ciclo celular e subsequente fusão dos mioblastos em miotubos multinucleados (Yablonka-Reuveni, Day *et al.*, 2008).

Outros fatores também estão implicados na degeneração e regeneração muscular. O Fator de Crescimento Transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) é uma superfamília de importantes citocinas regulatórias do crescimento celular (Charge e Rudnicki, 2004). A miostatina (GDF-8) é um dos membros desta superfamília que inibe a proliferação e a diferenciação muscular, pois silencia a ativação dos fatores de transcrição (Hawke e Garry, 2001). Desta forma, ela determina a massa muscular esquelética e atua como regulador negativo do crescimento muscular (Muntoni, Brown *et al.*, 2002). Outro membro desta superfamília é o TGF $\beta$ -1, citocina inflamatória que provavelmente está envolvida no processo de fibrose do músculo distrófico (Gosselin, Williams *et al.*, 2004), visto que, *in vitro*, estimula a síntese de colágeno (Ignatz e Massague, 1986; Grande, Melder *et al.*, 1997) e inibe a degradação deste colágeno (Overall, Wrana *et al.*, 1991; Sharma e Ziyadeh, 1994). Mais do que isso, o TGF $\beta$ -1, que está superexpresso no músculo esquelético distrófico (Bernasconi, Torchiana *et al.*, 1995; Hartel, Granchelli *et al.*, 2001), é expresso também por células inflamatórias, como macrófagos (Robertson, Maley *et al.*, 1993).

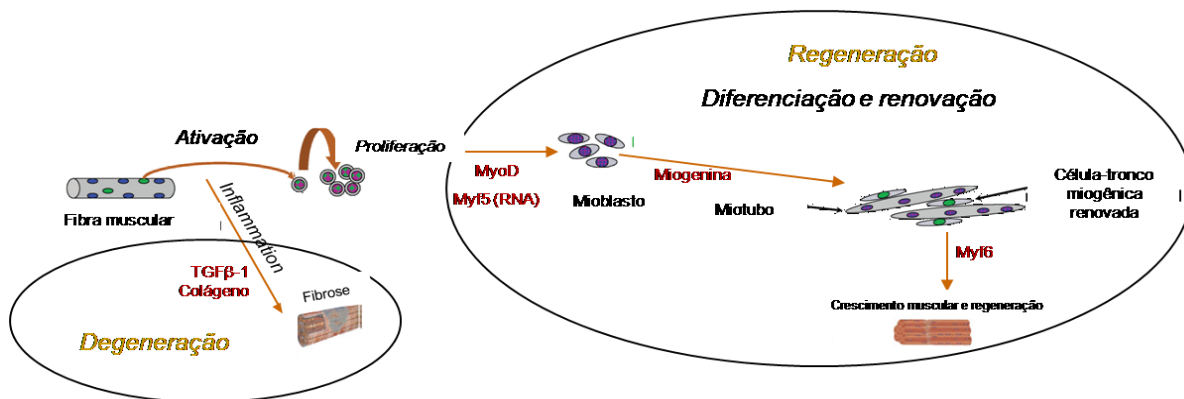


Figura 5: Esquema dos principais fatores envolvidos na degeneração e regeneração musculares. Modificado de (Yablonka-Reuveni, Day *et al.*, 2008).

Muitos outros fatores estão envolvidos com a regulação das células-satélite no músculo esquelético adulto, como Fatores de Crescimento Insulina-*like* I e II (IGF-I e IGF-II), que participam da regulação da regeneração, pois aumentam a proliferação, diferenciação e fusão das células-satélite *in vitro*, provocando aumento da massa muscular e da quantidade de células (Hawke e Garry, 2001; Muntoni, Brown *et al.*, 2002; Charge e Rudnicki, 2004); óxido nítrico, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento derivado de endotélio e testosterona (Hawke e Garry, 2001). Obviamente, a regulação das células-satélite é orquestrada por numerosos fatores coordenados temporalmente e dependentes de concentração adequada durante a regeneração do músculo.

## 2. Distrofias Musculares: mutações e fenótipos

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. A fraqueza muscular se manifesta quando existe um desequilíbrio nos ciclos de degeneração e regeneração, onde falhas nos processos regenerativos levam à infiltração do músculo por tecido conjuntivo, adiposo e inflamatório, processo este visível em estudos histopatológicos.

Dentre as diferentes formas, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum, com uma incidência de um em cada 3500 nascimentos de sexo masculino e cerca de 1/3 dos casos ocorre pelo aparecimento de uma nova mutação na criança. Já a sua forma alélica, Distrofia Muscular de Becker (BMD) é cerca de 10 vezes mais rara. Fenotipicamente nota-se diferença tanto na velocidade de progressão quanto na idade de início dos sintomas (Zatz, 2001). Na DMD os sinais clínicos surgem entre os três e cinco anos de idade, com quedas frequentes, dificuldade de subir escadas, correr e levantar-se do chão. O confinamento em cadeira de rodas se dá na maioria dos casos até os doze anos de idade e os afetados raramente sobrevivem após a terceira década de vida (Kapsa, Kornberg *et al.*,

2003). Já na BMD os sintomas iniciam-se, em geral, na segunda década de vida e a velocidade de progressão é muito variável entre os indivíduos.

O gene responsável pela DMD/BMD localiza-se no braço curto do cromossomo X (Xp21) e é o maior gene humano, com 2.3Mb. O produto do gene é a distrofina (427kD), proteína responsável pela ancoragem do complexo distrofina-glicoproteínas associadas às proteínas do sarcolema da fibra muscular (Figura 6).

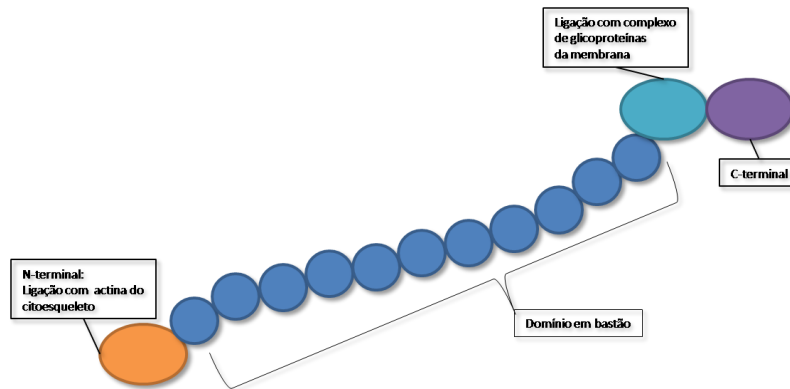


Figura 6: Esquema da proteína distrofina, mostrando seus diferentes domínios de ligação com outras proteínas.

As mutações causadoras de DMD e BMD são deleções em cerca de 60% dos casos, duplicações em 5-6% e mutações de ponto nos casos restantes (Koenig, Beggs *et al.*, 1989). A grande maioria das mutações nos pacientes com DMD resulta na ausência completa da proteína, enquanto a presença de baixas quantidades de distrofina é encontrada em casos de BMD (Nawrotzki, Blake *et al.*, 1996). Existe uma correlação entre o tipo de mutação e o resultado fenotípico. Na BMD a deleção é em fase, o quadro de leitura do RNA mensageiro é mantido e tem-se como resultado uma proteína quantitativamente reduzida ou com deleções internas, porém parcialmente funcional. Já na DMD a deleção cria uma mutação de mudança de quadro de leitura (*frameshift*), e tem-se uma proteína gravemente truncada, rapidamente destruída pela célula. A ausência da distrofina no músculo resulta em uma deficiência secundária nos componentes do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (Ohlendieck e Campbell, 1991) e como consequência as fibras musculares dos pacientes com DMD ficam mais suscetíveis ao estresse mecânico causado pela contração muscular, levando a um processo de degeneração acentuado.

Outra proteína importante cuja deficiência leva a graves doenças neuromusculares é a laminina 2, principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular (Figura 7). A laminina 2 é composta por uma cadeia  $\alpha$  e duas outras cadeias,  $\beta$  e  $\gamma$  e é expressa em vários tipos celulares, entre eles células musculares esqueléticas e cardíacas, células de Schwann, trofoblastos e células de origem mesenquimal (Vilquin, Guerette *et al.*, 1999). Sua ligação ao citoesqueleto subsarcolemal se dá através do grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. O bom funcionamento do complexo seria responsável por um correto mecanismo de contração muscular (Ervasti e Campbell, 1993).

A subunidade  $\alpha 2$  da laminina 2, também chamada de merosina, foi identificada no início dos anos 90 como a responsável pela patogênese de uma forma de distrofia muscular congênita muito grave, CMD1A, causada por mutações no gene *LAMA2* que a codifica (Tome, Evangelista *et al.*, 1994).

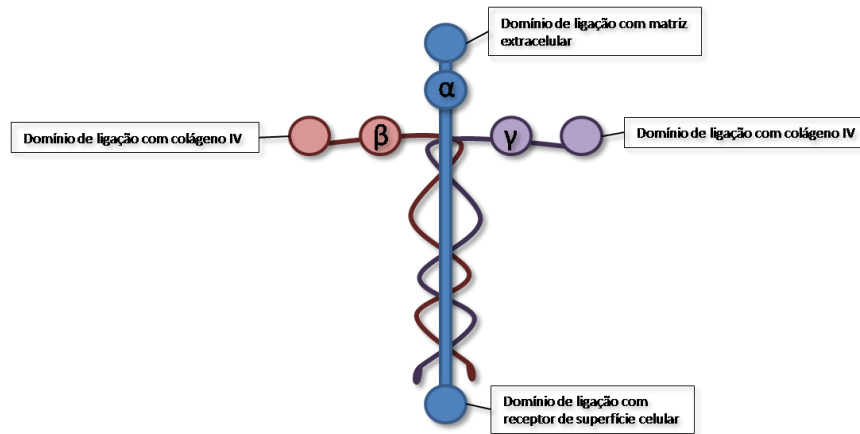


Figura 7: Esquema da proteína laminina, mostrando suas diferentes subunidades e domínios de ligação com outras proteínas.

Cerca de 95% dos pacientes com mutações no gene *LAMA2* apresentam deficiência total da proteína, enquanto que os restantes 5% apresentam deficiências parciais. Clinicamente, o grupo de pacientes laminina-negativos apresenta um fenótipo mais grave e a maioria dos pacientes é incapaz de adquirir marcha independente. A deficiência parcial da proteína tem sido encontrada em pacientes com quadro clínico mais benigno.

O gene *LAMA2* é composto por 260kb organizados em 64 éxons e a parte codificante do RNA mensageiro tem cerca de 9.5kb. O estudo de mutações no gene *LAMA2* mostrou grande heterogeneidade, com presença de deleções e mutações de sentido trocado levando a códon de parada. A mutação mais freqüente, encontrada em cerca de 20% dos pacientes, é uma deleção de 2pb (2096-2097). Mutações de sentido trocado e pequenas deleções que não alteram o quadro de leitura levam à formação de uma proteína truncada e deficiência parcial da merosina no músculo.

Outras formas de distrofias congênitas podem ser causadas por genes envolvidos no processo de glicosilação das proteínas musculares. Uma delas, a CMD1D, é causada por mutações no gene da glicosil-transferase Large. Mutações neste gene, muito grande (mais de 660kb entre 16 éxons e respectivos íntrons) e difícil de ser estudado, foram encontradas em uma paciente que portava a mutação de forma heterozigota composta (Longman, Brockington *et al.*, 2003). A falta de pacientes identificados com mutações neste gene sugere que há semelhança do quadro clínico dos afetados em *LARGE* com outras distrofias congênitas, o que foi constatado quando dois irmãos diagnosticados como Walker-Warburg, outra forma de distrofia muscular congênita com comprometimento cerebral, foram identificados como portadores de deleções em homozigose no gene *LARGE* (van Reeuwijk, Grewal *et al.*, 2007).

Outras formas de distrofia são as do tipo cinturas, que afetam principalmente a região das cinturas pélvica e/ou escapular. Estas formas podem ser de herança autossômica dominante ou recessiva e possuem ampla variabilidade clínica, de suave a grave, e heterogeneidade de locus, com muitos genes diferentes causando quadro clínico bastante semelhante.

As distrofias musculares são, portanto, um conjunto bastante complexo de doenças, com inúmeros genes causadores de diversos quadros clínicos diferentes a serem considerados (Figura 8).

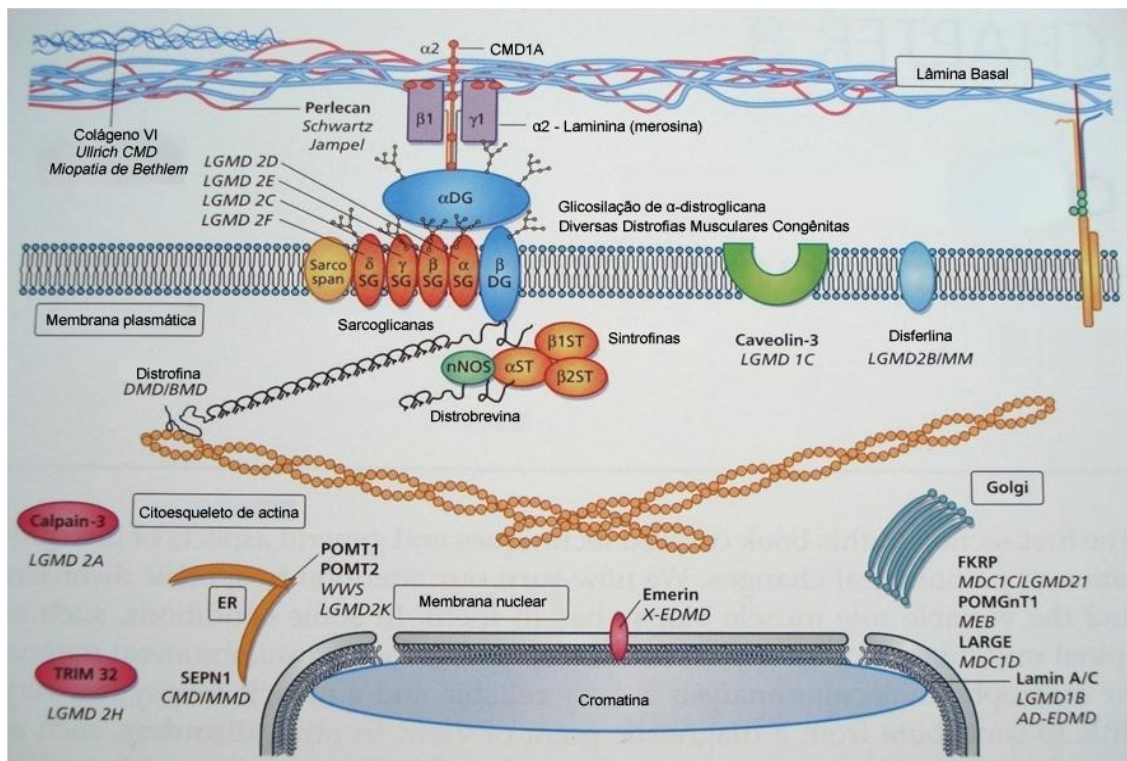


Figura 8: Esquema das diversas proteínas musculares e distrofias associadas, mostrando a enorme variedade de possíveis genes e fenótipos relacionados. Retirado de (Dubowitz, Sewry *et al.*, 2007).

### a. Degeneração Muscular

A degeneração muscular é o processo de perda das características estruturais da musculatura esquelética, como resultado de injúria ou como consequência de mutações nas proteínas componentes da fibra muscular. O desequilíbrio causado por estes fatores leva à instabilidade do sarcolema e danos causados pelo movimento de contração (Alderton e Steinhardt, 2000). Após o dano ao sarcolema, um aumento no influxo de cálcio foi observado (Alderton e Steinhardt, 2000), o que, por sua vez, pode tornar as fibras musculares mais suscetíveis a necrose, uma das principais características patológicas das distrofias musculares (Cohn e Campbell, 2000). Com a necrose ocorre o rompimento da fibra muscular e extravasamento do seu citoplasma, que leva ao grande aumento de algumas proteínas sarcoplasmáticas, como a creatina quinase, no soro de pacientes portadores de distrofia muscular (Cohn e Campbell, 2000).



Quanto ao processo de degeneração muscular, Zanotti e colaboradores (Zanotti, Saredi *et al.*, 2007) procuraram investigar se os componentes da matriz extracelular contribuem para a fibrose observada nas distrofias musculares, principalmente DMD. Foram quantificados transcritos e proteínas em culturas de miotubos de pacientes com DMD e controles. Os autores analisaram *TGFβ-1*, decorina, metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, TIMP 1, 2 e 3, colágeno 1 e 6 e miostatina.

Os autores concluíram que a expressão dos transcritos e proteínas de vários componentes da matriz extracelular estão alterados nas células musculares DMD *in vitro*, indicando que estas células contribuem para o processo patológico, já que a inflamação e degeneração características de DMD *in vivo* estão presumivelmente ausentes em cultura. Também observaram que a miostatina (potente inibidor de ativação de células-satélite e renovação muscular) está aumentada, e que a decorina (ligante e inibidor de *TGFβ-1* e miostatina) estão reduzidas, o que pode ter implicações nas terapias que buscam reduzir a fibrose muscular.

### **b. Modelos animais**

O uso de modelos animais como camundongos, cães e gatos é crucial para o melhor entendimento das doenças genéticas humanas e para a investigação de terapias experimentais (Vainzof, Ayub-Guerrieri *et al.*, 2008). Para se estudar a distrofia muscular do tipo Duchenne, por exemplo, é possível utilizar o modelo *mdx*, linhagem deficiente em distrofina devido a uma mutação de ponto no éxon 23 do gene, que forma um códon de parada prematura (Bulfield, Siller *et al.*, 1984). Como nos pacientes, o músculo de camundongos *mdx* é afetado por degeneração e necrose. Entretanto, o camundongo exibe um quadro clínico mais brando (Pastoret e Sebillé, 1995), sem fraqueza muscular evidente nem redução na expectativa de vida.

Esse camundongo também apresenta um grande número de fibras revertentes, da ordem de 2 a 3%. Estas fibras passam a expressar novamente a distrofina, de forma espontânea. Desta forma, é necessário que outras formas de avaliação do sucesso da terapia testada sejam desenvolvidas, já que a simples verificação da expressão de distrofina no tecido muscular não é suficiente para garantir que esta distrofina venha da terapia e não das fibras revertentes.

Para o defeito na proteína disferlina existe o modelo murino *SJL/J*, que apresenta uma redução na quantidade de disferlina detectada por *western blot* a aproximadamente 15% do valor encontrado nos animais normais. O camundongo *SJL/J* possui uma deleção de 171pb, o que possivelmente leva à instabilidade da proteína formada, o que explicaria a menor quantidade de proteína detectada. Este modelo apresenta discretas alterações histopatológicas e pouco comprometimento muscular quando jovem, que pode se intensificar com o avanço da idade (Bittner, Anderson *et al.*, 1999).

Um modelo atualmente disponível para defeitos de glicosilação é o camundongo *Large<sup>myd</sup>*, portador de uma mutação que causa perda de função num dos genes com função de glicosil-transferase. Estas enzimas têm importante papel na via de glicosilação das proteínas da membrana muscular, responsáveis pela conexão entre o interior celular e a matriz extracelular. No caso de

defeitos de glicosilação todas estas proteínas de membrana ficam instáveis e o músculo apresenta um quadro distrófico. A mutação presente no camundongo *Large<sup>myd</sup>* é uma deleção de três éxons no gene da *Glycosyltransferase-like Large1 (Acetylglucosaminyltransferase-like 1A)*. O camundongo homozigoto afetado possui músculos bastante degenerados na análise histológica e fenótipo de fraqueza muscular significativa. O comprometimento se estende ao coração, sistema nervoso e sistema reprodutivo (Browning, Grewal *et al.*, 2005).

Outros modelos murinos interessantes são os das distrofias musculares congênitas, relacionados com defeitos em proteínas da lâmina basal. Muitas mutações distintas no gene codificante da cadeia  $\alpha 2$  da laminina 2 (*LAMA2*) foram caracterizadas, algumas das quais levam a ausência total da proteína, enquanto outras levam a deficiência parcial (Vilquin, Guerette *et al.*, 1999; Vilquin, Vignier *et al.*, 2000). Em ambos os casos, há presença de uma distrofia muscular com comprometimento muscular variando de grave a extremamente severo. Existem inúmeras linhagens de camundongos com mutações espontâneas no gene *Lama2*, incluindo os tipos *dy/dy* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, identificados em 1955 e 1970, respectivamente. O camundongo *dy/dy* expressa um polipeptídeo de laminina- $\alpha 2$  de tamanho aparentemente normal, porém em quantidade muito pequena e o animal sofre de uma forma bastante grave de distrofia muscular, com fraqueza acentuada e reduzido tempo de vida (Guo, Zhang *et al.*, 2003). A mutação neste camundongo ainda não foi localizada. No caso do camundongo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, foi possível detectar que a mutação no gene *Lama2* ocorre de tal forma que o *splicing* acontece de forma anormal, produzindo uma laminina- $\alpha 2$  onde falta o domínio VI N-terminal (Xu, Wu *et al.*, 1994; Sunada, Bernier *et al.*, 1995). A proteína truncada aparece em quantidade substancial no músculo esquelético do animal e seu quadro clínico é menos grave do que no camundongo *dy/dy* (Guo, Zhang *et al.*, 2003), embora sua expectativa de vida e marcha não se comparem as de um camundongo normal. Pelo fato de apresentar um fenótipo diferencial e grave estes camundongos são bastante importantes no estudo do sucesso de terapias diversificadas, já que um aumento na expectativa de vida, por exemplo, pode constituir um resultado significativo.

Como animal normal doador de células, é possível utilizar outro camundongo, o *eGFP*. O camundongo *eGFP* é um organismo transgênico que expressa um polipeptídeo proveniente da medusa *Aequorea victoria* denominado proteína fluorescente verde (*eGFP*). Esta proteína é bioluminescente sob iluminação adequada e é bastante estável, suportando inúmeros tratamentos e processos químicos (Okabe, Ikawa *et al.*, 1997). Por esta razão, os camundongos transgênicos *eGFP* transformaram-se em uma ferramenta muito útil em experiências de transplante de células, uma vez que todos os seus tecidos emitem fluorescência e permitem a visualização e monitoramento *in vivo* por um processo não invasivo através da observação macroscópica, microscópica ou por citometria de fluxo (Cubitt, Heim *et al.*, 1995).

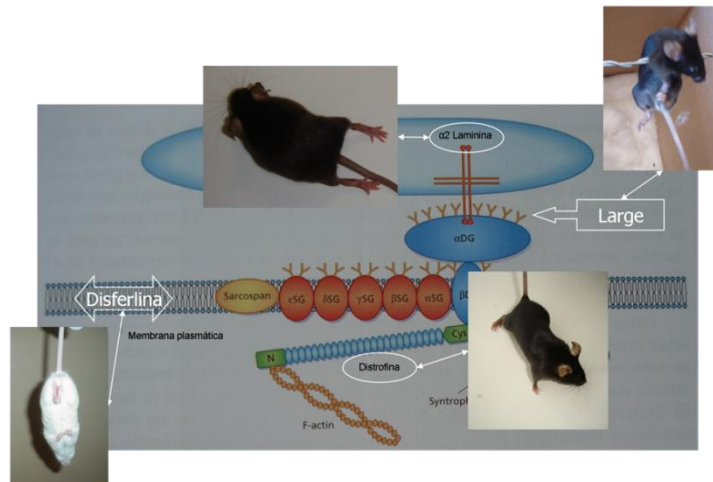


Figura 9: Esquema das diversas proteínas musculares e modelos animais disponíveis, mostrando a variedade de possíveis genes e fenótipos relacionados. Modificado de (Dubowitz, Sewry *et al.*, 2007).

### 3. Terapias

De uma forma geral, as doenças genéticas musculares apresentam quatro grupos de itens seqüenciais que levam à patogênese e ao perfil clínico (Karpati, 2002):

- Defeito no gene e/ou a resultante perturbação de alguns dos mecanismos genéticos subseqüentes.
- Deficiência total ou parcial da proteína correspondente, ou então anormalidade funcional da proteína. Esta proteína pode ser uma molécula estrutural, enzima, receptor de membrana, tradutor de sinal, componente de canal iônico, etc. Pode estar localizada em qualquer organela das fibras musculares.
- Perturbação da fisiologia da célula(s) ou tecido(s) onde a proteína deficiente ou anormal é expressa e desempenha um papel de importância. Os efeitos deletérios causados por essa perturbação podem resultar em morte celular (apoptose ou necrose) ou algumas perturbações não letais, tais como geração de força reduzida, interferência no acoplamento excitação-contracção (ou transmissão neuromuscular), ou funcionamento anormal de canais iônicos.
- As alterações celulares e teciduais patológicas vão resultar em sinais e sintomas clínicos, que podem ser específicos ou não específicos para uma doença em particular.

Os enfoques terapêuticos e preventivos podem ser direcionados para qualquer um dos quatro itens acima. Algumas terapias podem focar mais de um dos itens, como por exemplo, a terapia celular, utilizada como uma ferramenta de transferência gênica mediada por célula ou como repositório do tecido destruído (Karpati, 2002).

#### a. Terapias moleculares

Várias formas de terapias moleculares para as doenças genéticas musculares foram desenvolvidas (Karpati, 2002). A mais comum delas é a transferência gênica. Nesta modalidade

terapêutica, a tentativa é de inserir alelos normais, usualmente a seqüência codificadora (cDNA) nas células ou tecidos nos quais os efeitos deletérios do defeito gênico é máximo. Esta técnica é viável principalmente para doenças recessivas monogênicas, como por exemplo, DMD. Para bons resultados, vários itens devem ser padronizados em experimentos prévios. São eles: determinação do gene a ser transferido, o promotor, o vetor, a rota de administração e a disponibilidade de modelos experimentais nos quais resultados significativos possam ser obtidos (Karpati, 2002). Outras modalidades de terapia molecular incluem o reparo gênico, reparo protéico, reparo da fisiologia anormal da célula e reparo do fenótipo clínico, cada um com suas especificidades.

Muitos pesquisadores concordam que a terapia molecular de transferência gênica é a forma mais eficaz de se obter um resultado definitivo para os pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Apesar do gene da distrofina ser muito grande e tecnicamente ser difícil de se encontrar um veículo adequado para o gene selvagem (Wells, Ferrer *et al.*, 2002), há trabalhos que utilizam minigenes ou microgenes da distrofina que permitem a sua expressão correta em modelos murinos (Yuasa, Ishii *et al.*, 1997; Wang, Li *et al.*, 2000; Fabb, Wells *et al.*, 2002; Roberts, Wells *et al.*, 2002). Outras tentativas utilizam os genes da utrofina (Tinsley, Potter *et al.*, 1996) ou do IGF-1 (Barton, Morris *et al.*, 2002) para tentar restabelecer a função das células musculares ou aumentar a regeneração das fibras. Porém estes estudos ainda levantam algumas questões que acabam por tornar esta modalidade de terapia sem possibilidade de aplicação a curto e médio prazo em humanos. Alguns dos problemas levantados são sobre o melhor vetor para levar o gene ao músculo (viral ou não), a forma de aplicação do vetor (intra-arterial, venosa ou intramuscular) e, principalmente, como impedir a reação imunológica à própria distrofina, considerada pelo organismo do paciente como uma proteína estranha, além da possibilidade de ativação de outros genes, tais como oncogenes (Wells e Wells, 2002).

## **b. Terapias celulares**

Esta modalidade terapêutica pode ser utilizada como terapia de transferência gênica mediada por células normais ou como repositoras das fibras musculares perdidas por fibras normais. No caso da transferência gênica, as células normais carregam o gene não alterado até as células-alvo do organismo possuidor da mutação.

O procedimento básico da terapia celular consiste na injeção local ou por via sistêmica de um grande número de células com potencial miogênico que deverão se direcionar aos músculos danificados aonde irão se fundir entre si ou com as fibras danificadas (Karpati, 2002). É possível injetar mioblastos ou células-tronco de diferentes origens.

As células-tronco são definidas por duas propriedades. Primeiro, elas são células que podem se dividir indefinidamente, produzindo populações idênticas à anterior. Além disso, elas também podem sofrer divisão assimétrica e dar origem a duas linhagens de células, uma idêntica à parental e outra que contém diferentes instruções genéticas e que se caracterizam por uma reduzida capacidade

proliferativa e um potencial de desenvolvimento menor que da célula original. Normalmente, as células-tronco são conhecidas como células progenitoras ou precursoras, comprometidas com a produção de algumas células diferenciadas (Fischbach e Fischbach, 2004).

Logo após a fertilização, o zigoto se divide diversas vezes até formar uma bola compacta de células chamada mórula. Essas células são totipotentes, ou seja, cada uma é capaz de dar origem a todos os tipos de células e tecidos diferenciados, inclusive tecidos extra-embrionários. Conforme a mórula percorre o oviduto, as células continuam a proliferar até formar uma esfera oca chamada blastocisto, com uma massa de células interna. Estas células podem ser manipuladas em laboratório e são fonte de células-tronco embrionárias pluripotentes, ou seja, capazes de se diferenciarem em todos os tipos de células e tecidos, com exceção de tecidos extra-embrionários.

As células-tronco também são encontradas em tecidos não embrionários. Estas são células indiferenciadas intrínsecas a vários tecidos diferenciados do corpo e capazes de manter, gerar e repor células diferenciadas, apesar de não haver evidências de que elas são pluripotentes. Essas células podem ser encontradas em vários tecidos incluindo medula óssea, sistema nervoso central, epitélio, músculo cardíaco e músculo esquelético, entre outros. Estas células são chamadas de células-tronco do adulto, ou adultas, porém apesar do nome deve-se ter em mente que estas células estão presentes em qualquer fase do desenvolvimento do organismo, à exceção do embrião.

Dentre as células-tronco adultas, as células hematopoiéticas são as que estão melhor caracterizadas. Elas, que se originam na medula óssea, são uma contínua fonte de progenitores de leucócitos, plaquetas, monócitos, granulócitos e linfócitos. A plasticidade dessas células, ou seja, sua capacidade em adquirir características de outras linhagens celulares diferentes da hematopoiética as tornam amplamente estudadas, devido ao seu potencial de utilização terapêutica.

Atualmente, é sabido que células mesenquimais aderentes, derivadas do estroma da medula óssea, são multipotentes e podem originar outros tecidos não hematopoiéticos como osso, cartilagem e tecido conjuntivo *in vivo* (Pereira, Halford *et al.*, 1995; Prockop, 1997) e *in vitro* (Pittenger, Mackay *et al.*, 1999; Deans e Moseley, 2000; Minguell, Conget *et al.*, 2000) e que podem ser fonte relevante de células com potencial de formar músculos *in vitro* (Wakitani, Saito *et al.*, 1995). Entretanto, o recrutamento de células mesenquimais no processo miogênico ainda não foi comprovadamente observado *in vivo* (Ferrari, Cusella-De Angelis *et al.*, 1998).

Por este potencial, várias tentativas estão sendo feitas no sentido de implantar células-tronco capazes de restabelecer a função das estruturas que estão prejudicadas nos pacientes.

Um grupo de pesquisadores italianos (Sampaolesi, Blot *et al.*, 2006) descreveu o isolamento de uma subpopulação de células com características mesenquimais, chamadas mesoangioblastos. Estas células foram utilizadas em tratamento de cães distróficos *GRMD*, modelo canino para a distrofia muscular de Duchenne. Quatro cães receberam tratamento autólogo, com células transfectadas com vetor lentiviral expressando o gene da microdistrofina humana; seis cães receberam tratamento

heterólogo, com células retiradas de cães normais e compatíveis quanto ao DLA. Os cães que receberam transplante heterólogo foram imunossuprimidos. Foi observada a presença de distrofina nos músculos dos cães afetados por imunofluorescência e *western blot*. Observou-se uma reconstituição extensa de fibras expressando distrofina e quando os cães foram submetidos a testes de força, observou-se melhora na força de contração e preservação da marcha. O transplante heterólogo mostrou-se mais eficiente que o transplante autólogo com células corrigidas geneticamente. Quatro dos seis cães tratados com transplante heterólogo mostraram melhora. Ao final da imunossupressão, dois dos quatro cães que apresentaram melhora continuaram a caminhar até o final do experimento, enquanto os outros dois rapidamente perderam a capacidade de marcha. Os autores concluíram que estas células-tronco possuem potencial terapêutico em portadores de DMD.

Por outro lado, em trabalho recente foram realizados transplantes de células hematopoiéticas de cães normais em cães afetados por distrofia muscular com deficiência de distrofina. Apesar de utilizarem pares de cães compatíveis (DLA), não foi detectada nenhuma evidência da expressão da distrofina por imunofluorescência e RT-PCR e a análise das células-satélite por microssatélite não revelou contribuições do doador no músculo dos cães afetados transplantados (Kuhr, Lupu *et al.*, 2007).

Pesquisas buscando caracterizar novas fontes de células-tronco adultas, principalmente com características mesenquimais descrevem o uso de células estromais retiradas de sangue menstrual no tratamento de camundongos *mdx*. Os autores conseguiram diferenciação miogênica de células primárias obtidas no primeiro dia do ciclo menstrual (supõe-se que neste período também é eliminado tecido endometrial). Estas células apresentaram marcadores de célula mesenquimal (CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105). As células foram diferenciadas *in vitro* e apresentaram proteínas musculares, analisadas por *western blot*. Esta população de células acima caracterizada foi injetada em camundongos distróficos imunodeficientes e foi detectada a presença de distrofina humana nos animais injetados. Os autores analisaram marcadores nucleares humanos e foi constatado que as células que produziam distrofina possuíam núcleos humanos, o que os levou a conclusão de que estas células do sangue menstrual se fundiam às células pré-existentes (Cui, Uyama *et al.*, 2007).

Deasy e colaboradores (Deasy, Lu *et al.*, 2007) mostraram que células-tronco derivadas de músculo têm capacidade regenerativa dependente do sexo do indivíduo doador das células. O grupo descreveu que células femininas possuem uma maior capacidade regenerativa. Esta diferença pode ser devido à resposta inata relacionada ao sexo na tolerância a estresse.

Gawronska-Kozak e colaboradores (Gawronska-Kozak, Manuel *et al.*, 2007) descreveram o uso de células-tronco derivadas de biópsia de orelha de camundongo. As células modificadas se diferenciaram espontaneamente em células contráteis *in vitro*, inclusive com expressão de RNA de

*MyoD*, miogenina,  $\alpha$ -actinina sarcomérica, entre outros. A facilidade de obtenção das células e capacidade proliferativa podem tornar estas células uma boa fonte para estudos de terapia.

Chan e colaboradores (Chan, Waddington *et al.*, 2007) inovaram ao realizar transplante intra-útero de células-tronco de origem fetal em fetos de camundongos distróficos. Este grupo testou diferentes vias de injeção e avaliou a migração e permanência das células em diversos tecidos. Para distrofias musculares, no entanto, a fusão das células-tronco com as células endógenas foi baixa e não levou à melhora clínica.

Narita e colaboradores (Narita, Yamawaki *et al.*, 2008) estudaram a diferenciação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em células de tecido muscular liso utilizando tratamento com *TGF $\beta$ -1* e ácido ascórbico como indutores de diferenciação. Este trabalho é interessante porque mostra o papel de *TGF $\beta$ -1* em processos não patológicos de diferenciação celular.

Alguns pesquisadores ainda procuram soluções no próprio músculo para as distrofias. Cerletti e colaboradores (Cerletti, Jurga *et al.*, 2008) isolaram uma sub-população de células-satélite que funcionam como células-tronco musculares. Quando localizadas no músculo de camundongo *mdx* estas células contribuíram para a formação das fibras musculares, restaurando a expressão da distrofina e melhorando os sinais histológicos e a função contrátil, inclusive renovando o *pool* de células-satélite. Collins e colaboradores (Collins, Zammit *et al.*, 2007) testaram a capacidade proliferativa e regenerativa das células-satélite na senescência do tecido. Observaram que apenas uma subpopulação destas células tinha a capacidade de se manter viva e proliferar após o envelhecimento muscular.

Um grupo de pesquisadores de nosso centro avaliou a capacidade regenerativa muscular de células-tronco de cordão umbilical. Mostraram que *in vitro* não foi possível diferenciar as células-tronco em miotubos, porém quando estas células marcadas com *eGFP* foram injetadas em camundongos *mdx* foi possível observar sua fusão e expressão de proteínas musculares. Assim, o grupo concluiu que as condições de cultura *in vitro* não foram suficientes para causar a diferenciação, que só foi possível após a exposição das células ao ambiente *in vivo*. (Nunes, Cavacana *et al.*, 2007)

Um segundo trabalho de nosso centro mostrou que células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo retirado em lipoaspiração possuem capacidade de formar miotubos *in vitro*. São capazes também de fundir-se a miotubos pré-existentes. Quando injetadas em camundongos *SJL/J* são capazes de expressar proteínas humanas (Vieira, Brandalise *et al.*, 2008; Vieira, Bueno *et al.*, 2008).

### **c. Terapias farmacológicas**

Um exemplo de terapia farmacológica nas distrofias musculares de Duchenne e Becker é a utilização de corticóides. Utilizados desde o início dos anos 90, há inúmeras evidências que os corticóides podem retardar a evolução da doença, com manutenção da marcha por mais de três anos em relação ao grupo controle (Wong e Christopher, 2002). No entanto a manutenção de corticoterapia prolongada é acompanhada de efeitos colaterais como a catarata, osteoporose e obesidade. Outros

tratamentos paliativos, até recentemente apenas experimentais, têm sido utilizados cada vez mais, como a administração de creatina, coenzima Q10, pentoxifilina, entre outros. No entanto, nenhum destes tratamentos, isolados ou em conjunto, foram capazes de impedir a evolução progressiva da doença.

Recentemente, utilizando o camundongo *mdx* como modelo, foram levantadas algumas evidências de que a distrofina alterada e outros componentes do complexo distroglicano sofrem uma degradação através de vias dependentes de proteossomos nas fibras musculares deficientes em distrofina. Por isso, novas terapias estão sendo testadas utilizando drogas inibidoras de proteossomos em biópsias, como possível alternativa de tratamento para a deficiência primária destas proteínas (Assereto, Stringara *et al.*, 2006).

Uma segunda droga atualmente em análise é o tamoxifeno, cujo efeito está sendo testado no processo distrófico do modelo murino *mdx* em nosso laboratório. O tamoxifeno é um composto não esteróide com ação antiestrogênica sobre o tecido mamário. Há relatos do uso da droga em várias formas de câncer (Tavassoli, Soltaninia *et al.*, 2002), na fibrose retroperitoneal (Al Rabi, Graziani *et al.*, 2002), nos quelóides (Chau, Mancoll *et al.*, 1998) e em outras doenças. Em parte, este uso adicional tem sido relacionado com sua capacidade de impedir fibrose atuando sobre fibroblastos e também alterando os níveis de citocinas. Em diversas situações clínicas se observou aumento (Sartor, Sartor *et al.*, 1995) ou redução (Chau, Mancoll *et al.*, 1998) dos fatores *TGFβ-1* e *-2* com o uso do tamoxifeno.

#### **4. Linhagens celulares estabelecidas: C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>**

Determinação é a capacidade das células ou tecidos elaborarem certo programa de desenvolvimento na ausência de seu ambiente normal, ou seja, independentemente de fatores de diferenciação e desenvolvimento externos ao programa intrínseco da própria célula (Garcia, 2001). A linhagem de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, claramente determinada, é um subclone da linhagem celular murina de mioblastos. Esta linhagem se diferencia rapidamente, formando miotubos contráteis e produzindo as proteínas musculares características.

A linhagem celular C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, pelo seu alto potencial miogênico, é uma excelente ferramenta para o entendimento de processos específicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para se avaliar as vias de injeção nas terapias celulares, por exemplo, é possível marcar as células com a proteína fluorescente verde (*eGFP*) e verificar sua migração através do corpo do animal e se a fusão ocorreu como esperado. É possível, também, avaliar *in vitro* os efeitos da superexpressão ou hipossupressão de proteínas específicas nas vias de diferenciação celular, glicosilação destas proteínas, entre outros. Seu potencial terapêutico já foi descartado, especialmente em virtude de ser carcinogênica (Rando, 1994).



# Objetivos

---

O objetivo do presente projeto consiste em estudar fatores relacionados com as vias de degeneração e regeneração em modelos murinos distróficos com diferentes defeitos nas proteínas musculares, para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, visando terapias.

Para tal, foram estabelecidas três abordagens:

1. Estudo do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de medulas óssea, nos modelos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* (deficiente para a proteína  $\alpha$ 2-laminina) e *Large<sup>myd</sup>* (defeito de glicosilação).
  - Extrair e expandir em cultura células-tronco mesenquimais, retiradas de medula óssea de camundongos *eGFP*
  - Injetar estas células nos modelos estudados, por via sistêmica, com diferentes reforços
  - Rastrear a presença destas células nos camundongos injetados no final do experimento
  - Avaliar uma possível melhora clínica
2. Estudo da expressão relativa dos genes envolvidos nas vias de degeneração: *TGF $\beta$ -1* e pró-colágeno 1 $\alpha$ 2; e regeneração: *MyoD*, *Myf5* e miogenina, nos diferentes modelos murinos para distrofias musculares.
  - Estabelecer através da técnica de PCR em tempo real um sistema de quantificação dos genes em análise, nos modelos murinos *SJL/J*, *mdx*, *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*, comparando com o controle normal *C57Black6*
  - Comparar os achados moleculares com as observações histológicas nos mesmos músculos avaliados
  - Comparar as diferentes linhagens distróficas quanto aos mecanismos estudados
3. Estudo do papel da distrofina e  $\alpha$ 2-laminina na organização do complexo distrofina-glicoproteínas associadas no músculo esquelético, através da produção de um camundongo duplo-mutante deficiente para estas duas proteínas.
  - Através de cruzamentos mendelianos, gerar camundongos portadores das duas mutações
  - Avaliar a viabilidade do camundongo duplo-mutante, através da análise da proporção dos genótipos obtidos
  - Avaliar clínica e histologicamente este novo modelo
  - Avaliar um possível efeito modificador da mutação em *Lama2* em heterozigose no fenótipo do camundongo *mdx*

# Material e Métodos

---

## 1. Camundongos

Todos os animais foram mantidos em gaiolas com água e comida à vontade, em salas com temperatura e iluminação controlada até o momento do sacrifício, realizado por exposição à CO<sub>2</sub>. Os experimentos aqui descritos foram aprovados pela comissão de ética do Instituto de Biociências.

Os animais destinados aos cruzamentos foram mantidos juntos, na proporção de duas fêmeas para cada macho.

Camundongos das diversas linhagens, em diferentes tempos, e de acordo com o objetivo de cada experimento foram sacrificados e dissecados. Foram coletados tecidos para análise histológica, histoquímica, imunohistoquímica, *western blot* e extração de DNA e RNA. Um pequeno fragmento também foi coletado para a implantação de cultura de mioblastos.

### a. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens de camundongos *mdx* (Bulfield, Siller et al., 1984), *B6.WK-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* (Meier e Southard, 1970), *SJL/J* (Weller, Magliato et al., 1997), *Large<sup>myd</sup>* (Grewal e Hewitt, 2002), *eGFP* (transgênico) e *C57Black6* (camundongo normal).

Os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* (000524), *SJL/J* (000686) e *Large<sup>myd</sup>/J* (000226) foram importados do laboratório Jackson ([www.jaxmice.org](http://www.jaxmice.org)). Os animais *eGFP* foram gentilmente cedidos pelo Dr. José Xavier Neto do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor-HC. Os animais *mdx* e *C57Bl6* já eram criados em nosso centro. Todos os camundongos são atualmente mantidos em nosso próprio biotério e nos biotérios do IPEN e da Faculdade de Veterinária da USP (departamento de Patologia).

### i. Genotipagem dos camundongos

Os camundongos tiveram seu DNA da cauda extraído através da incubação com solução de extração e proteinase K, após serem identificados por marcações nas orelhas. No caso da linhagem *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, o DNA extraído foi submetido a um PCR que amplifica um fragmento de 170pb, contendo a região com a mutação. Nesta linhagem a mutação cria um sítio de restrição para a enzima NDE1, portanto após a amplificação por PCR os fragmentos foram digeridos. Caso o animal seja homocigoto normal, não há digestão; caso o animal seja heterocigoto, aparecem três bandas, uma referente ao alelo normal, não-digerido e duas referentes ao alelo alterado, digerido em dois fragmentos; no caso do animal ser afetado, portanto homocigoto para o alelo mutante, aparecem duas bandas, já que todas as moléculas resultantes do PCR são digeridas.

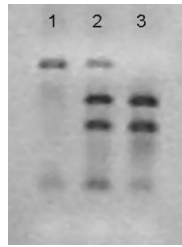


Figura 10: Genotipagem de *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, após digestão. Gel de acrilamida corado com brometo de etídio. 1- camundongo normal; 2- camundongo heterozigoto; 3- camundongo afetado.

## ii. Avaliações funcionais

Os diferentes modelos utilizados no presente projeto apresentam padrão variável de fraqueza muscular, sendo os camundongos *mdx* e *SJL/J* os que apresentam menos fraqueza muscular evidente. Por isso, decidimos estabelecer um protocolo de avaliação funcional da musculatura murina, para tentar caracterizar parâmetros clínicos em cada um dos modelos em uso, baseados em quatro trabalhos (Kramer, Lochmuller *et al.*, 1998; Chiavegatto, Sun *et al.*, 2000; Cryan, Mombereau *et al.*, 2005; Van Meer e Raber, 2005). Pudemos desenvolver alguns equipamentos para realização dos testes e diversos projetos estão em andamento no laboratório para a sua validação.

Os testes consistem de plataforma suspensa, barra suspensa, nado forçado, campo aberto, caminhada e levantamento pela cauda. A seguir, descrição detalhada de cada um deles.

- Plataforma suspensa: Dois retângulos de madeira com 15cm X 10cm, unidos por uma plataforma com 2cm de largura por 50cm de comprimento. A plataforma fica sobre uma base com 50cm de profundidade, forrada com algodão. O camundongo, quando colocado na plataforma, anda até a área mais larga. Neste teste é possível analisar a capacidade de marcha, percepção espacial e o equilíbrio.

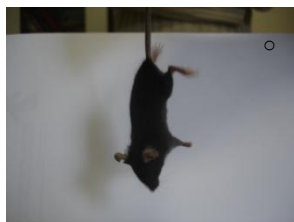


- Barra suspensa: Um arame de 2mm de espessura e 50cm de comprimento, torcido, é colocado na base com 50cm de profundidade, forrada com algodão. O camundongo é testado sempre em três repetições. Em um dos testes, coloca-se o camundongo de frente, seguro apenas pelas patas dianteiras e mede-se o tempo que ele consegue se manter segurando a barra, até o máximo de 1 minuto. Com este teste é possível avaliar principalmente a força e resistência muscular de patas dianteiras, embora possamos também avaliar de forma qualitativa o uso de outros grupamentos musculares como abdominais, uso de cauda, agilidade, entre outros.



- No outro teste utilizando este mesmo equipamento o camundongo é colocado lateralmente, com as quatro patas na barra e mede-se o tempo que ele se mantém seguro, até o máximo de 1 minuto. Com este teste é possível avaliar principalmente a força e resistência muscular das quatro patas juntas, além de equilíbrio / percepção espacial e também, de forma qualitativa, o uso de outros grupamentos musculares, cauda, agilidade.





- Levantamento pela cauda: Neste teste não é necessário nenhum equipamento. O animal é simplesmente levantado pela cauda durante um minuto e seus movimentos são filmados e depois analisados. Neste caso, é possível avaliar qualitativamente a força e mobilidade dos diferentes grupamentos musculares.



- Nado forçado: Um tubo de PVC com 30cm de diâmetro e aproximadamente 60cm de comprimento foi fechado e vedado em um dos lados. O tubo é cheio de água morna e os camundongos são colocados em “nado forçado” já que não há apoio possível para o camundongo (sua cauda não encosta o fundo) e suas únicas opções são nadar ou flutuar. O camundongo fica nadando por 5 minutos e o tempo de repouso (flutuação) é medido. Se o camundongo precisar ser retirado antes do final do tempo total, isto também é registrado (alguns camundongos começam a submergir antes do final do tempo e são retirados). Neste teste é possível avaliar a força muscular. Indiretamente, também é possível avaliar a percepção espacial.

#### **Testes que não fazem parte da bateria padrão de testes:**



- Campo aberto: Consiste de uma base de 1m<sup>2</sup>, quadriculada em áreas de 10cm X 10cm. O camundongo é colocado no centro e conta-se um período de 10 minutos totais. A cada minuto, a posição do camundongo no campo aberto é registrada (borda / centro). Este teste baseia-se na preferência natural dos camundongos pelas proximidades das paredes e avalia a capacidade de percepção espacial e marcha.
- Caminhada: Consiste de duas paredes com 15cm de altura e 50cm de comprimento, separadas por um espaço com aproximadamente 10cm, onde uma faixa de papel é colocada. As patas do camundongo são pintadas com tinta atóxica e o camundongo é colocado para caminhar ou trotar na faixa de papel, de modo que suas pegadas fiquem registradas. Com este teste é possível avaliar o padrão de marcha de cada linhagem.

## **2. Cultura de células**

Foram realizadas culturas de células de diferentes origens, tais como mioblastos primários, células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> e células-tronco mesenquimais de medula óssea.

Todas as células foram cultivadas em frascos de cultura ou placas de petri estéreis contendo meio de cultura *Dulbecco modified Eagle medium* – DMEM ou  $\alpha$ -MEM, com 4 mM de L-Glutamina, ajustado para conter 1.5g/L de bicarbonato de sódio, 4.5g/L de glicose e 1.0mM de piruvato de sódio. A este meio adicionamos também os antibióticos penicilina e estreptomicina a 1%. As células foram incubadas em estufa úmida mantida a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram observadas a cada dois dias em sua fase proliferativa. Nesta fase, quando observado que o frasco possuía aproximadamente 60-70% de confluência as células eram descoladas do frasco com tripsina por 5 minutos (TripLEExpress - Invitrogen), divididas em novos frascos e mantidas com meio de cultura fresco. Se não houvesse tanta confluência o meio de cultura apenas foi trocado.

Uma parte destas células foi congelada em meio DMEM suplementado com 20-30% de soro fetal bovino e mantida em nitrogênio líquido.

#### **a. Cultura de mioblastos**

A cultura primária de mioblastos consiste na proliferação de células musculares mononucleadas, que ainda não expressam a proteína distrofina por estarem parcialmente indiferenciadas (Campion, 1984). Os mioblastos migram de fragmentos de biópsias mantidos em meio de cultura suplementado com 20% de soro fetal bovino. Quando os mioblastos atingem a confluência e se submetidos a condições especiais de crescimento, com o meio de cultura privado de soro fetal bovino e acrescido de 10% de soro de cavalo, estas células entram em processo de diferenciação e se fundem, formando miotubos multinucleados. Nesta fase passam a expressar uma série de proteínas musculares.

#### **b. Cultura de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>**

As células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, disponíveis comercialmente e adquiridas do *Cell Bank* da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.

#### **c. Linhagens de células-tronco murinas**

As células mesenquimais, foram previamente caracterizadas por Danielle Ayub em nosso laboratório quanto aos marcadores de membrana (Ayub-Guerrieri, 2008). Essas células não exibem marcadores CD34 nem CD45 (marcadores hematopoiéticos), e são positivas para os marcadores CD13, CD29 e CD44 (marcadores específicos de célula-tronco e mesenquimal). As células mesenquimais podem ser diretamente isoladas de aspirados de medula óssea baseado em sua habilidade de adesão à superfície da garrafa de cultura. As células foram retiradas do fêmur de camundongos normais *eGFP*. Após 24 horas, o sobrenadante contendo as células hematopoiéticas foi retirado e as células mesenquimais, aderidas, foram mantidas em frascos contendo meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro.

Estas culturas, quando retiradas de camundongos *eGFP*, são naturalmente marcadas e rastreadas por observação em microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou análise da presença do gene *eGFP* por PCR.

#### **d. Transdução das células**

As células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram transduzidas com lentivírus carregando *eGFP*, de forma que a expressão do gene se dá de forma permanente. O vetor já carregando o gene foi gentilmente cedido pelo Dr. Bryan Strauss do InCor. As células foram contadas e plaqueadas. O meio de cultura foi retirado, as

células foram lavadas com PBS e então se adicionou as partículas virais, juntamente com polibreno (substância que auxilia na transdução das células aderentes). A quantidade de vírus adicionado totalizou uma MOI (*Multiplicity of infection* – razão de partículas virais por célula) de 2, dependente da concentração do vírus. As células foram, então, mantidas na estufa num volume de 500µL de meio sem soro, durante 24-48 horas, e após este período as células foram lavadas com PBS e mantidas em meio suplementado normalmente.

Como a transdução não atingiu a totalidade das células, enriquecemos a população de células transduzidas através do plaqueamento diluído em placa de 96 poços (aproximadamente uma célula por poço). Conseguimos, desta forma, uma pequena colônia verde, que originou uma subcultura de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> com grande concentração de células portadoras do gene *eGFP*. Isto foi possível porque esta linhagem celular é transformada e as células se replicam rapidamente e infinitamente.

Estas culturas são marcadas e rastreadas por observação em microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou análise da presença do gene *eGFP* por PCR.

#### **e. Injeção das células em camundongos afetados**

As células foram primeiramente descoladas do frasco de cultura com tripsina. Foram então lavadas com PBS para total remoção do meio de cultura e soro e contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, foram ressuspensas em PBS e imediatamente injetadas nos animais com seringas de insulina de 1mL ou 500µL, através da veia caudal ou de injeção local intramuscular no músculo gastrocnêmio.

### **3. Congelamento e análise das biópsias musculares**

Fragmentos musculares de diferentes músculos foram imediatamente colhidos do camundongo recém-sacrificado e processados para as diversas metodologias.

Para análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica, fragmentos de, em média, 0,5cm<sup>3</sup> foram fixados com TissueTek O.C.T. (Quiagen) em blocos de cortiça, de modo que seu corte apresente disposição transversal das fibras, envoltos por talco para crioproteção e congelados em nitrogênio líquido. Já para a análise por *Western blot* e PCR em tempo real os fragmentos de mesmo tamanho foram diretamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em criotubos.

#### **a. Estudo histopatológico e detecção das proteínas de interesse**

##### **i. Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)**

Secamos as lâminas por aproximadamente uma hora à temperatura ambiente; em seguida, coramos com hematoxilina por 10 minutos e lavamos em água corrente por 10 minutos; coramos com eosina por 3 minutos, e em seguida lavamos novamente em água corrente, até sair todo o corante; fixamos a coloração em ácido acético, desidratamos e montamos as lâminas com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

A coloração pela hematoxilina e pela eosina, corantes universais, permite analisar a morfologia das fibras musculares e dos tecidos adjacentes, podendo-se observar a presença de regeneração/degeneração, presença e distribuição de tecido conjuntivo e adiposo endomisial e perimisial, infiltrado inflamatório, entre outros aspectos. Os núcleos das fibras adquirem uma coloração azulada, as fibras musculares tornam-se róseas e o tecido conjuntivo é corado de rosa claro.

A análise histopatológica foi realizada com orientação da Dra. Helga C. Silva, da UNIFESP, e segundo o livro *Muscle Biopsy* (Dubowitz, Sewry *et al.*, 2007). Os cortes foram observados em microscópio e foram avaliados os seguintes parâmetros: variação no calibre e forma das fibras, aumento de tecido conjuntivo, atrofia, hipertrofia, porcentagem de núcleos internos (após contagem de 100 fibras, quantas possuem núcleos centrais), presença de necrose, presença de fibras basofílicas. Cada uma destas análises foi feita comparativamente com um animal controle e o resultado é qualitativo (com exceção da análise de núcleos centrais).

#### ii. Coloração de Picrossirius

Nesta coloração a lâmina foi retirada do freezer -70°C e colocada imediatamente imersa em Bouin (50mL de formol, 20mL de ácido acético e ácido pícrico qsp. 500mL), durante 20 minutos. A lâmina foi então lavada em água corrente e colocada na solução picrossirius (Sirius red 0,2g e solução aquosa saturada de ácido pícrico qsp. 100mL) de 10 a 30 minutos, de forma com que o corte ficasse totalmente corado de maneira homogênea. A lâmina foi então lavada, desidratada e montada com bálsamo do Canadá. A medição é feita com auxílio de software de imagem associado ao microscópio.

#### iii. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica para detecção das proteínas de interesse foi realizada com marcação simples ou dupla conforme descrito em Vainzof, 1991 (Vainzof, Zubrzycka-Gaarn *et al.*, 1991), com pequenas alterações: O músculo congelado foi cortado (5-8µm) e colocado em lâmina coberta por polilisina. Aproximadamente uma hora antes da reação as lâminas foram retiradas do freezer -70°C e mantidas à temperatura ambiente para secar. Foram então cobertas com PBS e incubadas durante uma hora com anticorpo primário, em concentração a ser determinada em padronizações anteriores. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o segundo anticorpo (soro anti-IgG conjugado com fluoróforo), diluído 1:400, por uma hora. As lâminas são lavadas novamente e montadas com Vectashield (Vector Laboratories Inc.). A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência.

#### iv. Western blotting

A metodologia descrita a seguir foi adaptada do trabalho de Zubrzycka-Gaarn (Zubrzycka-Gaarn, Bulman *et al.*, 1988). O tecido muscular foi pulverizado ou no caso de células em cultura, foram lavadas e ressuspendidas. O material biológico obtido foi então homogeneizado em tampão de extração fervente. Esta amostra preparada foi submetida ao processo de eletroforese, onde uma alíquota de amostra foi misturada na proporção 1:1 de tampão de amostra, submetida à fervura,

aplicada em mini-gel de poliacrilamida e corrida sob tensão de 100V. O gel então foi corado com *Comassie blue* e a banda relativa à proteína pode ser detectada e quantificada. Após a eletroforese, o gel é eletro-transferido para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente 350-450 mA, overnight, à temperatura de 4°C. A membrana foi seca, lavada e submetida à reação com anticorpos primários. Os anticorpos secundários utilizados são ligados à fosfatase alcalina e a reação foi revelada com NBT e BCIP, evidenciando bandas de coloração roxa. Uma amostra de peso molecular padrão é incluída em cada experimento para construção de curva de peso molecular. A banda da proteína é quantificada através de densitometria em fotografias em preto e branco.

#### 4. PCR em tempo real (*Real-Time PCR - Q-PCR*) – Quantificação Relativa

Foram selecionados para este estudo os seguintes genes conforme a sua via de atuação:

- Vias de degeneração: *TGFβ-1* e pró-colágeno 1α2 (Gosselin, Williams *et al.*, 2004)
- Vias de regeneração: *MyoD*, *Myf5*, *Myf6*, miogenina (Chen e Goldhamer, 2003),
- Gene endógeno: GAPDH - necessário para a normalização dos dados obtidos.

Os fragmentos de biópsias congelados foram macerados com uma pistola e, em seguida, passaram pelo protocolo de extração de RNA com Trizol (Invitrogen). Deste RNA quantificado é feito cDNA utilizando-se o protocolo da enzima MMLV (Invitrogen), seguindo-se então para o protocolo de Q-PCR conforme descrito em Gosselin, 2004 (Gosselin, Williams *et al.*, 2004). As amostras de cDNA foram aplicadas em triplicata em placa de 96 poços. A cada amostra foi adicionado o par de primers do gene de interesse e o MasterMix contendo Sybr Green (Applied Biosystems), num volume total de 25µL. Cada placa foi corrida no termociclador para Real-Time 7500 da Applied Biosystems segundo o seguinte programa:

Tabela 1: Programa seguido pelo equipamento de PCR em tempo real.

Perfil de Ciclagem Térmica			
Etapa	Repetições	Temperatura	Tempo
1	1	50.0 °C	2 minutos
2	1	95.0 °C	10 minutos
3	40	95.0 °C	15 segundos
		60.0 °C	1 minuto

Para a quantificação relativa, é necessário que seja feita uma curva-padrão para cada gene estudado, onde será calculada a eficiência daquela reação. Esta curva-padrão determina o limiar (*threshold*), valor arbitrário de sinal de fluorescência para que seja possível a determinação do Ct (ciclo onde é medida a fluorescência em cada reação). O limiar deve estar acima da linha basal de fluorescência e suficientemente baixo para estar na região de crescimento exponencial da região de amplificação de uma curva de amplificação por PCR. O limiar é a linha cuja intersecção com a curva



de amplificação define o Ct para cada reação. Para nossas análises decidimos deixar o programa localizar o melhor limiar em nossa curva padrão, e este valor foi utilizado nas análises posteriores.

O Ct para uma curva de amplificação específica depende de dois fatores: número de cópias inicial da amostra (*template*) e eficiência da amplificação pelo sistema de PCR. Em seguida, o programa calcula o  $\Delta C_t$ , que é a diferença entre a média das triplicatas do Ct de um gene alvo e a média das triplicatas do Ct do gene endógeno:

$$\Delta C_T = C_T(\text{amostra}) - C_T(\text{controle endógeno})$$

Em seguida, o programa calcula o  $\Delta\Delta C_t$ , que é a diferença entre a média dos  $\Delta C_t$  de uma amostra alvo com a média dos  $\Delta C_t$  de uma amostra chamada de calibrador, que será a unidade de expressão:

$$\Delta\Delta C_{T(\text{test sample})} = \text{Média } \Delta C_{T(\text{test sample})} - \text{Média } \Delta C_{T(\text{calibrator sample})}.$$

E este valor é utilizado para calcular o valor da expressão:

$$\text{Valor de expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

O valor final dá a o nível de expressão para cada gene relativo ao nível de expressão na amostra calibradora. O software do equipamento mostra os resultados das quantificações relativas numa escala logarítmica onde cada incremento corresponde a uma diferença de 10 vezes na expressão gênica. Os valores obtidos foram comparados quanto à sua significância estatística com o auxílio do programa Minitab. O teste realizado foi o não-paramétrico de Mann-Whitney.

# Resultados

## 1. Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de medula óssea

### a. Injetadas via sistêmica, nos modelos *Large<sup>myd</sup>* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*

Foram utilizados um total de 12 camundongos distróficos de dois meses de idade, seis da linhagem *Large<sup>myd</sup>* e seis da linhagem *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*. Em cada linhagem, três animais foram injetados com PBS e constituíram o grupo controle, e três animais foram injetados com células-tronco, via endovenosa caudal, constituindo o grupo experimental (Tabela 2).

As células mesenquimais foram retiradas da medula óssea de camundongos normais transgênicos carregando o gene *eGFP* (células MSC-*eGFP*), e as culturas foram expandidas em laboratório até atingir o número de células necessárias para cada experimento. Este número variou nos diferentes reforços, conforme o máximo de células obtidas.

Tabela 2: Animais estudados e número de células injetadas em cada reforço.

		Número de células MSC- <i>eGFP</i> injetadas				
		Tempo	zero	1m	2m	3m
		Idade	2m	~3m	~4m	~5m
Linhagem	Grupos	animais				
<i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	Controle	2J -21	PBS	PBS	PBS	PBS
		2J-26	PBS	PBS	PBS	PBS
		2J-27	PBS	PBS	PBS	PBS
	Injetado	2J-20	1x10 <sup>6</sup>	2.22x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>
		2J-25	1x10 <sup>6</sup>	2.22x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>
		2J-35	1x10 <sup>6</sup>	2.22x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>
<i>Large<sup>myd</sup></i>	Controle	L-09	PBS	PBS	PBS	PBS
		L-10	PBS	PBS	PBS	PBS
		L-14	PBS	PBS	PBS	PBS
	Injetado	L-11	1x10 <sup>6</sup>	2.22x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>
		L-12	1x10 <sup>6</sup>	2.22x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>
		L-13	1x10 <sup>6</sup>	2.22x10 <sup>5</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>7</sup>

Uma semana após a última injeção os animais foram sacrificados e coletamos para análise o fígado e os músculos gastrocnêmio e diafragma.

O experimento foi conduzido em teste cego, tanto na avaliação motora quanto na análise molecular e a identidade dos animais só foi revelada após o final do experimento.

#### i. Avaliação da presença das células injetadas

Não foi identificada a presença das células MSC-*eGFP* injetadas, através da análise da presença do gene *eGFP*, em nenhum dos animais experimentais (Figura 11).

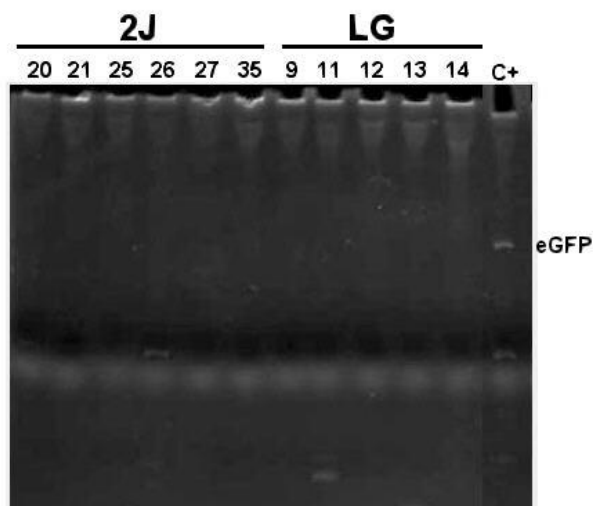


Figura 11: Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio onde foram aplicados produtos de PCR do gene *eGFP*, amplificado em amostras de músculos de camundongos injetados (2J-20, 2J-25, 2J-35, L-11, L-12, L-13), e controles (2J-21, 2J-26, 2J-27, L-09, L-10 e L-14) . C+: controle positivo - DNA extraído das células MSC-*eGFP*.

## ii. Teste de barra (patas dianteiras e quatro patas):

No decorrer do experimento, os animais foram avaliados clinicamente, um dia antes de cada injeção, utilizando-se os testes de barra e teste de nado forçado.

Foi medido o tempo, em segundos, em que cada camundongo permaneceu seguro na barra elevada, em três tentativas sucessivas nas duas posições possíveis (patas dianteiras ou quatro patas apoiadas na barra).

Tabela 3: Teste de força nas patas dianteiras – tempo, em segundos, de sustentação em barra suspensa (média de três avaliações sucessivas).

		Animal	Tempo pós-injeção			
			Zero	1 mês	2 meses	3 meses
<i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	Controles	2J-21	43	21	12	26
		2J-26	19	25	27	24
		2J-27	52	41	50	48
	Injetados	2J-20	19	35	39	31
		2J-25	18	5	40	21
		2J-35	5	45	46	32
<i>Large<sup>myd</sup></i>	Controles	L-09	17	9	8	11
		L-10	6	9	12	9
		L-14	4	8	12	8
	Injetados	L-11	6	19	31	19
		L-12	11	10	1	7
		L-13	4	1	9	5

Tabela 4: Teste de força nas quatro patas – tempo, em segundos, de sustentação em barra suspensa (média de três avaliações sucessivas).

		Animal	Tempo pós-injeção			
			Zero	1 mês	2 meses	3 meses
Lama2 <sup>dy-2J</sup> /J	Controles	2J-21	39	15	60	1
		2J-26	5	19	12	0
		2J-27	5	28	21	4
	Injetados	2J-20	5	2	20	53
		2J-25	26	32	49	2
		2J-35	4	40	20	-
Large <sup>myd</sup>	Controles	L-09	0	0	0	0
		L-10	0	3	7	0
		L-14	0	10	0	0
	Injetados	L-11	0	0	0	0
		L-12	0	0	5	0
		L-13	0	0	0	0

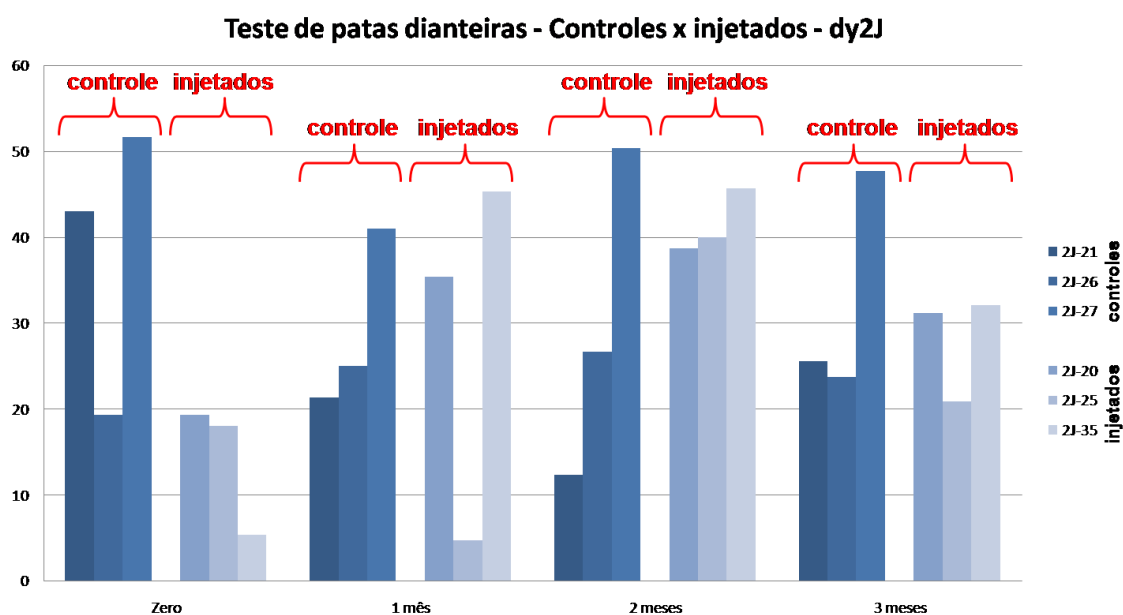


Figura 12: Resultados do teste de barra (patas dianteiras) para os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* injetados com células MSC-*eGFP*. No eixo X estão os tempos dos testes após a primeira injeção e no eixo Y está a média do tempo medido para cada grupo, em segundos.

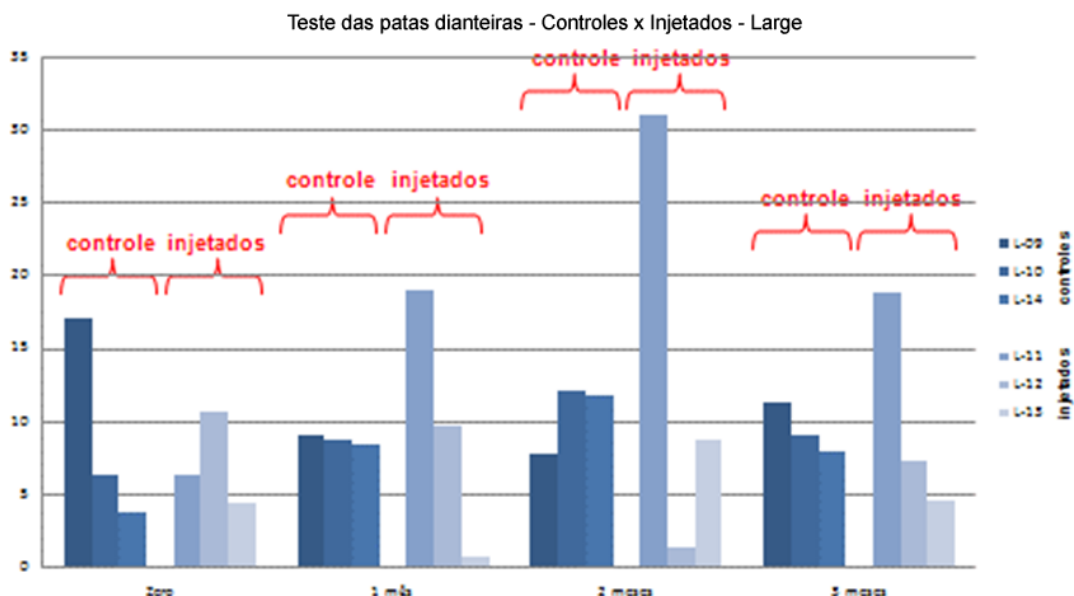


Figura 13: Resultados do teste de barra (patas dianteiras) para os camundongos *Large<sup>myd</sup>* injetados com células MSC-*eGFP*. No eixo X estão os tempos dos testes após a primeira injeção e no eixo Y está a média do tempo medido para cada grupo, em segundos.

Na avaliação funcional, tanto os animais controle quanto os animais injetados apresentaram grande variação de tempo de permanência na barra (Tabela 3 e Tabela 4), dificultando a análise de uma possível melhora clínica. A análise estatística de Mann-Whitney para esta pequena amostra não identificou diferenças entre os grupos.

### iii. Teste de nado forçado:

Foi medido o tempo, em segundos, de nado e de flutuação para cada camundongo, durante o tempo total de cinco minutos. Tanto a linhagem *Large<sup>myd</sup>* quanto a linhagem *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* são capazes de se manter na superfície da água, sem afundar e conseguem completar o teste com alternância de nado e flutuação (Figura 14).

Também neste teste os grupos experimentais e controle apresentaram desempenho semelhante.

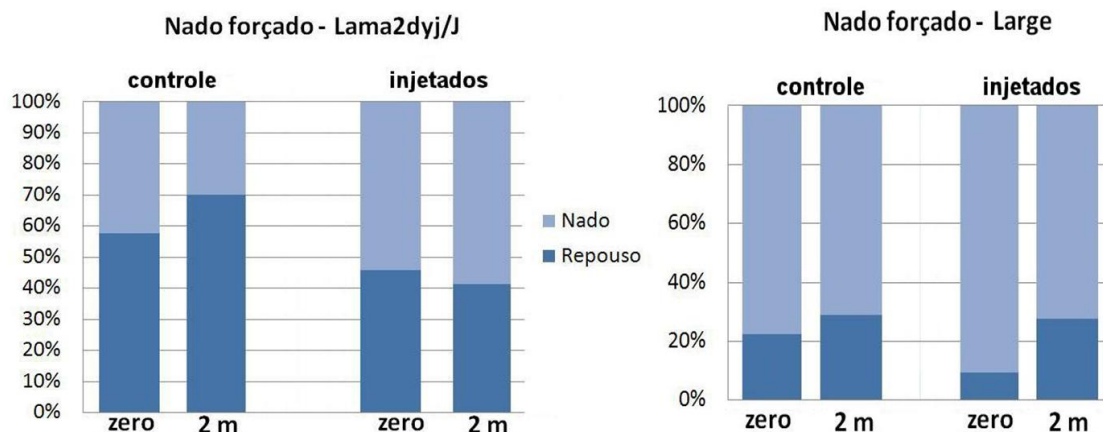


Figura 14: Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>* injetados com células MSC-*eGFP*, no tempo zero e dois meses após a primeira injeção.

### b. Rastreamento das células MSC-*eGFP* em experimento de injeção local de curta duração.

Para verificar o comportamento desta linhagem de células nos modelos murinos avaliados, aproximadamente  $4 \times 10^5$  células MSC-*eGFP* foram injetadas via intramuscular em 3 animais *Large<sup>myd</sup>*. A presença destas células foi avaliada 2 e 10 dias pós injeção, conforme abaixo:

- L-54 - 2 dias pós-injeção
- L-55 - 10 dias pós-injeção
- L-56 - 10 dias pós-injeção

Uma banda muito fraca apareceu em apenas um dos animais (L-55), sugerindo a eliminação destas células em curto período de tempo (**Figura 25**).

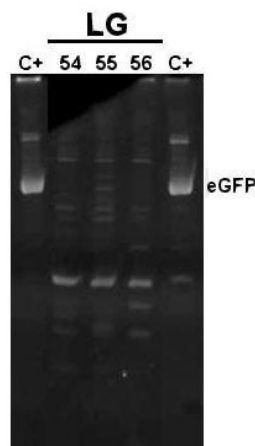


Figura 15: Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio onde foram aplicados produtos de PCR do gene *eGFP* amplificado em amostras de músculo de camundongos *Large<sup>myd</sup>* injetados com células MSC-*eGFP*. L-54 – injeção local e análise após 2 dias; L-55 – injeção local e análise após 19 dias; L-56 – injeção sistêmica e análise após 10 dias. C+: controle positivo - DNA extraído das células MSC-*eGFP*.

### c. Injeção de células da linhagem muscular C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> *eGFP* transduzidas

Para avaliar a capacidade de retenção de células *eGFP* no músculo distrófico, a linhagem celular C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, comprometida com a via de diferenciação muscular, foi transduzida com lentivírus carregando o gene *eGFP*.

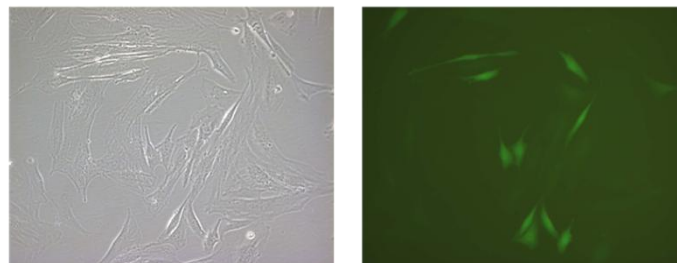


Figura 16: Células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduzidas com lentivírus contendo o gene *eGFP*, após enriquecimento da cultura por separação de subpopulação através de diluição e plaqueamento em placa de 96 poços.

Dois animais da linhagem *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* foram injetados com células *C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-eGFP* via intramuscular (2J-1 e 2J-2). Os animais foram sacrificados dois dias (2J-1) ou sete dias após as injeções (2J-2).

A avaliação da permanência das células *eGFP* no tecido muscular dos animais injetados mostrou a presença destas células somente após 2 dias, confirmando a eliminação de células *eGFP* nestes modelos murinos depois de curto período de tempo.

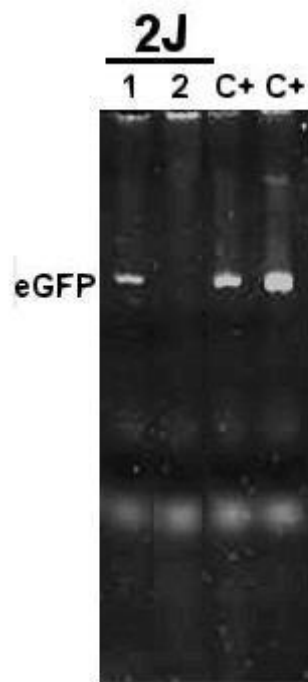


Figura 17: Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio mostrando produtos de PCR do gene *eGFP* amplificado em amostras de músculo de camundongos injetados com células *C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-eGFP*. 1 e 2- Gastrocnêmio de camundongo injetado via intramuscular, após 2 e 7 dias. C+ : controles positivos: DNA de células *C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-eGFP* e DNA extraído de cauda de camundongo transgênico *eGFP*.

## 2. Estudo de expressão gênica – Quantificação relativa

### a. Padronização – elaboração da curva padrão

Para a avaliação da via de degeneração, seguimos os experimentos utilizados por Gosselin e colaboradores (Gosselin, Williams *et al.*, 2004), que avaliaram quantitativamente os transcritos dos genes de *TGFβ-1* e pró-colágeno 1α2 (*PCOL*). Os *primers* da via de regeneração e o controle endógeno GAPDH foram elaborados com auxílio de programas gratuitos disponíveis na internet. As seqüências escolhidas para os *primers* estão discriminadas abaixo.

Tabela 5: Primers da via de degeneração muscular.

Nome	Seqüência <i>Forward</i>	Seqüência <i>Reverse</i>
<b><i>TGFβ-1</i></b>	5'- CCC CAC TGA TAC GCC TGA GT - 3'	5'- AG CCC TGT ATT CCG TCT CCT T - 3'
<b><i>PCOL</i></b>	5'- GAT GGT CAC CCT GGA AAA CC - 3'	5'- CAC GAG CAC CCT GTG GTC C - 3'
<b><i>MyoD</i></b>	5'-TAC AGT GGC GAC TCA GAT GC - 3'	5'- TAG TAG GCG GTG TCG TAG CC - 3'
<b><i>Myf5</i></b>	5'- CTG TCT GGT CCC GAA AGA AC - 3'	5'- GAC GTG ATC CGA TCC ACA ATG - 3'
<b><i>Myf6</i></b>	5'- GGC TGG ATC AGC AAG AGA AG - 3'	5'- CCT GGA ATG ATC CGA AAC AC - 3'
<b><i>Myog</i></b>	5' -CAG TAC ATT GAG CGC CTA CAG - 3'	5'- GGA CCG AAC TCC AGT GCA T - 3'
<b><i>GAPDH</i></b>	5'- AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG - 3'	5'- TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA - 3'

Todos os pares de *primers* passaram por uma padronização prévia para a confirmação de sua especificidade e determinação da concentração ideal a ser utilizada no equipamento de Q-PCR.

Em seguida, iniciamos a coleta das amostras de tecido muscular de camundongo de dois meses de idade. Foram coletadas amostras de músculo gastrocnêmio e diafragma de cinco linhagens diferentes de camundongo: controles *C57Black6* e distróficos *SJL/J*, *mdx*, *Large<sup>myd</sup>* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*. O RNA destas amostras foi extraído e deste RNA foi feita síntese de cDNA. As amostras e sua identificação estão listadas na tabela abaixo.

Tabela 6: Amostras processadas de tecidos murinos.

Linhagem	Identificação do animal	Linhagem	Identificação do animal
<i>C57Black6</i>	PC2-A	<i>MDX</i>	PX9-D
	PC2-B		PX9-E
	PC2-C		PX9-F
	PC2-D		PX9-G
	PC2-F	<i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	PJ2-A
	PC2-G		PJ2-B
	PC2-I		PJ2-C
	PC2-J	<i>SJL/J</i>	PS1-A
	PC2-K		PS1-B
	PC2-L		PS1-C
	PC2-M		PS1-D
	PC2-N	<i>Large<sup>myd</sup></i>	PL1-A
			PL1-B
			PL1-C
	PL1-D		



Iniciamos a confecção da curva padrão necessária para todas as avaliações posteriores. Como os genes estudados são pouco expressos no músculo normal adulto e muito expressos em neonatos e no músculo distrófico, só foi possível conseguir uma curva padrão dentro dos parâmetros esperados quando fizemos um *pool* de cDNAs de camundongos normais e afetados (*mdx*), de 2 meses e neonatos, em igual proporção. O resultado obtido com uma das diluições de cDNA é mostrado na figura abaixo (Figura 18).

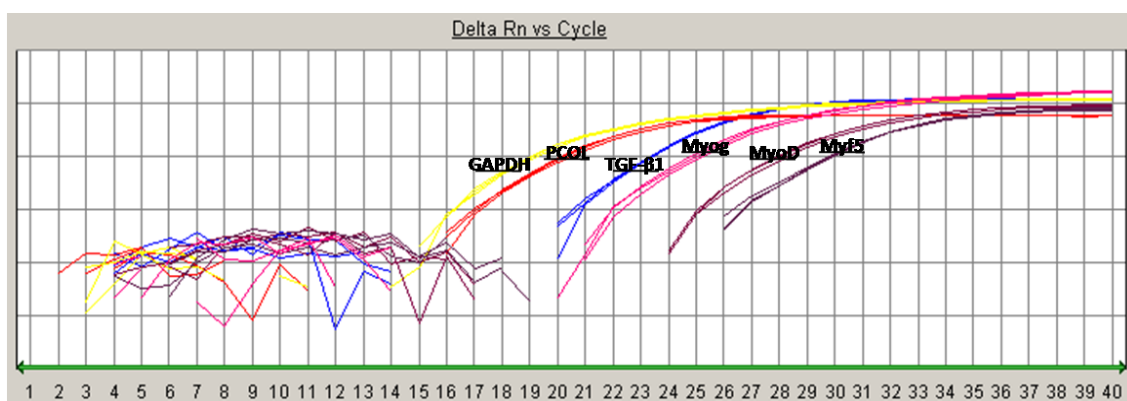


Figura 18: Curvas de amplificação de quantificação absoluta de Q-PCR. No eixo X temos o número de ciclos e no eixo Y temos a fluorescência emitida na amplificação. Cada cor representa um gene estudado, em triplicata. Foram testados seis pares de primers em um *pool* de amostras de *C57Black6* e *mdx* neonatos e com 2 meses de idade.

O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno e os valores ótimos de limiar obtidos foram utilizados nas quantificações seguintes (Tabela 7).

Tabela 7: Valores de limiar padronizados para as quantificações em PCR de tempo real. *Slope*: inclinação da curva de amplificação e respectivo  $R^2$ .

	Limiar	<i>Slope</i>	$R^2$
<b>GAPDH</b>	0.05015	-3.973612	0.995355
<b><i>TGFβ-1</i></b>	0.1013186	-4.289778	0.998542
<b><i>PCOL</i></b>	0.0660729	-4.227662	0.991536
<b><i>MyoD</i></b>	0.0839315	-3.987754	0.961179
<b><i>Myf5</i></b>	0.1058209	-3.203323	0.964212
<b><i>Myog</i></b>	0.0909995	-3.664526	0.985807

### b. Variabilidade individual nos controles

Os valores de expressão dos genes *MyoD*, *Myf5*, miogenina, *TGFβ-1* e pró-colágeno 1 $\alpha$ 2 obtidos na análise do músculo gastrocnêmio de dez animais controle estão apresentados na Tabela 8. Estes valores são calculados em função de um único controle calibrador. Escolhemos para tal o animal PC2-G, pois este possui a menor expressão dos genes *TGFβ-1* e pró-colágeno, como esperado em músculo normal.

Tabela 8: Valores de expressão gênica obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio dos animais controle estudados.

Expressão Gênica - Gastrocnêmio						
C57Black6						
		<i>MyoD</i>	<i>Myf5</i>	<i>Myog</i>	<i>TGFβ-1</i>	<i>PCOL</i>
C57Black6	PC2-B (G)	-0.268411235	-1.148741651	-0.062983893	0.892372907	0.546172368
	PC2-C (G)	-0.332547047	-0.627087997	-0.322393047	0.903035697	0.447158031
	PC2-D (G)	0.053462605	-0.378823718	0.011147361	0.672836454	1.185315458
	PC2-F	0.20167018	0.106870544	0.246005904	0.160168293	0.615318657
	PC2-G	0	0	0	0	0
	PC2-I	0.014100322	-0.27083521	-0.055517328	0.08278537	0.03702788
	PC2-J	0.269746373	-0.199970641	-0.338187314	0.669688708	1.127169614
	PC2-L	0.230193379	-0.305394801	-0.037157319	1.213065962	0.372727941
	PC2-M	0.580924976	-0.15739076	0.152288344	0.390758529	0.276461804
	PC2-N	0.537944959	-0.346787486	0.207365037	0.105510185	0.385963571
	Média	0.128708451	-0.019943225	-0.332816172	0.509022211	0.499331532
D. padrão	0.300612728	0.197088697	0.351464994	0.420293493	0.397873805	
Mediana	0.127566392	-0.288115006	-0.018578659	0.530223618	0.416560801	

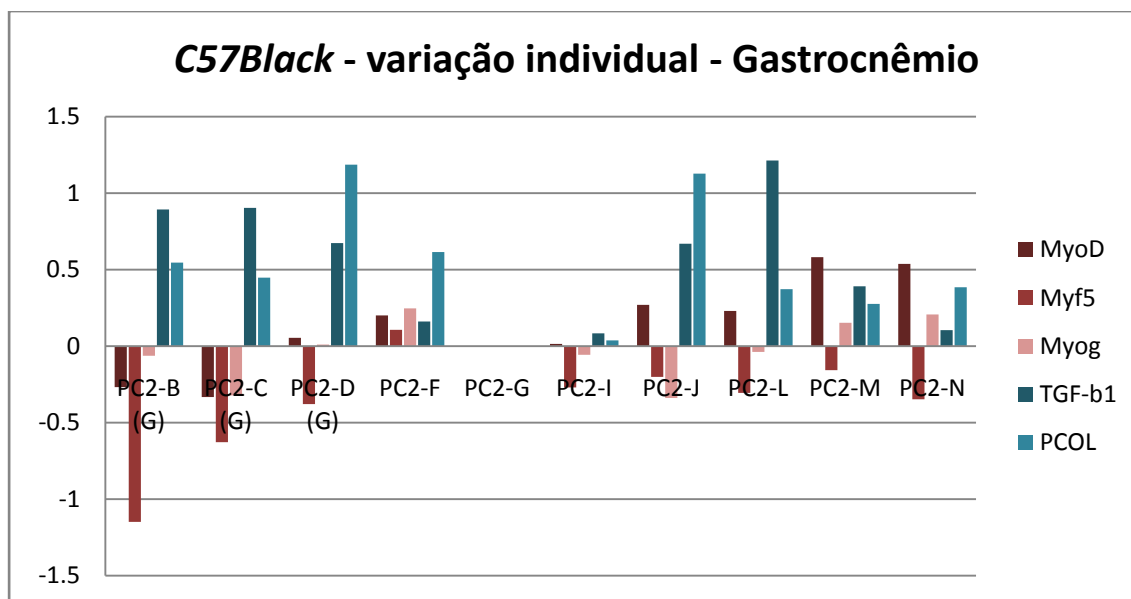


Figura 19: Valores de expressão gênica obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio dos animais controle estudados.

A variação nos níveis de expressão observada nestes animais representa a variabilidade normal da população.

### c. Medições nos animais distróficos

Os valores de expressão obtidos para as amostras de gastrocnêmio dos animais distróficos também foram organizados em tabelas e comparados ao grupo controle com auxílio do teste de Mann-Whitney.

Tabela 9: Valores de expressão gênica obtidos com Q-PCR para os diferentes animais distróficos estudados.

### Expressão Gênica - Gastrocnêmio

#### Distróficos

		<i>MyoD</i>	<i>Myf5</i>	<i>Myog</i>	<i>TGFβ-1</i>	<i>PCOL</i>
<i>SJL/J</i>	PS1-A (G)	-1.4814861	-1.07058	-0.299296	0.660011221	0.800304578
	PS1-B (G)	-	-	-	1.557254492	2.342515452
	PS1-C (G)	-2.2218487	-1.37675	-0.173277	2.200382586	3.665980489
	PS1-D (G)	-1.1611509	-0.78252	0.388634	1.458229798	2.415769381

Média	-1.6214952	-1.07662	-0.02798	1.468969524	2.306142475
D. padrão	0.544033	0.297163	0.3662588	0.631740501	1.173321248
Mediana	-1.4814861	-1.07058	-0.173277	1.507742145	2.379142417

<i>mdx</i>	PX9-D (G)	-0.0856568	-0.09259	1.4478864	1.123328867	1.141010553
	PX9-E (G)	0.61331316	-0.1296	2.3023136	1.759176625	1.749303351
	PX9-F (G)	1.12716961	0.816838	2.0484379	1.44266787	1.988844231
	PX9-G (G)	0.94968269	0.525822	1.8856156	1.323334619	1.811186111

Média	0.65112716	0.280119	1.9210634	1.412126995	1.672586062
D. padrão	0.5354227	0.467338	0.3590399	0.266248403	0.368640415
Mediana	0.78149793	0.216617	1.9670268	1.383001244	1.780244731

<i>Lama2<sup>dy</sup></i> <i>-2/J</i>	PJ2-A (G)	0.60991441	-0.33442	1.2799178	1.377816029	0.032215703
	PJ2-B (G)	1.30200606	0.317227	1.8507504	1.488071036	-0.183096161
	PJ2-C (G)	1.4049192	0.273001	1.6260631	1.879015553	-0.614393726

Média	1.10561322	0.08527	1.5855771	1.581634206	-0.255091395
D. padrão	0.43236069	0.364133	0.2875618	0.263373861	0.329261938
Mediana	1.30200606	0.273001	1.6260631	1.488071036	-0.183096161

<i>Large<sup>myd</sup></i>	PL1-A (G)	-0.950782	-1.82391	-1.065502	-0.222573178	-0.315154638
	PL1-B (G)	-1.7695511	-1.0655	0.4282968	0.690816058	1.274596542
	PL1-C (G)	-0.8827287	-1.02228	0.7646991	0.954483717	1.320416337
	PL1-D (G)	0.36716949	-0.33819	1.2019431	1.642405159	0.485721426

Média	-0.8089731	-1.06247	0.3323593	0.766282939	0.691394917
D. padrão	0.88158401	0.607179	0.9842616	0.771695395	0.772708586
Mediana	-0.9167553	-1.04389	0.5964979	0.822649888	0.880158984

Tabela 10: Valores de probabilidade obtidos com o teste de Mann-Whitney. As células coloridas representam P<0.05.

P - Gastrocnêmio					
Teste M-W	<i>MyoD</i>	<i>Myf5</i>	<i>Myog</i>	<i>TGFβ-1</i>	<i>PCOL</i>
<i>C57Black6</i> x <i>SJL/J</i>	0.01420	0.03460	0.93260	0.04030	0.01330
<i>C57Black6</i> x <i>mdx</i>	0.10390	0.02840	0.00580	0.00890	0.00890
<i>C57Black6</i> x <i>Large<sup>myd</sup></i>	0.10390	0.05620	0.17910	0.43670	0.43670
<i>C57Black6</i> x <i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	0.01420	0.15080	0.01420	0.01420	0.0225

Realizamos a análise da expressão gênica para cada gene individualmente e utilizando a média dos animais de cada uma das linhagens comparativamente.

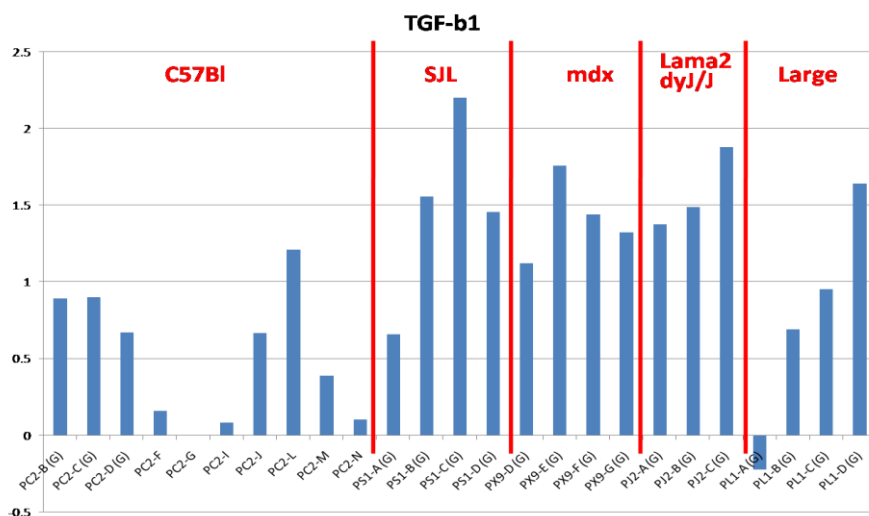


Figura 20: Valores de expressão de *TGFβ-1* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio.

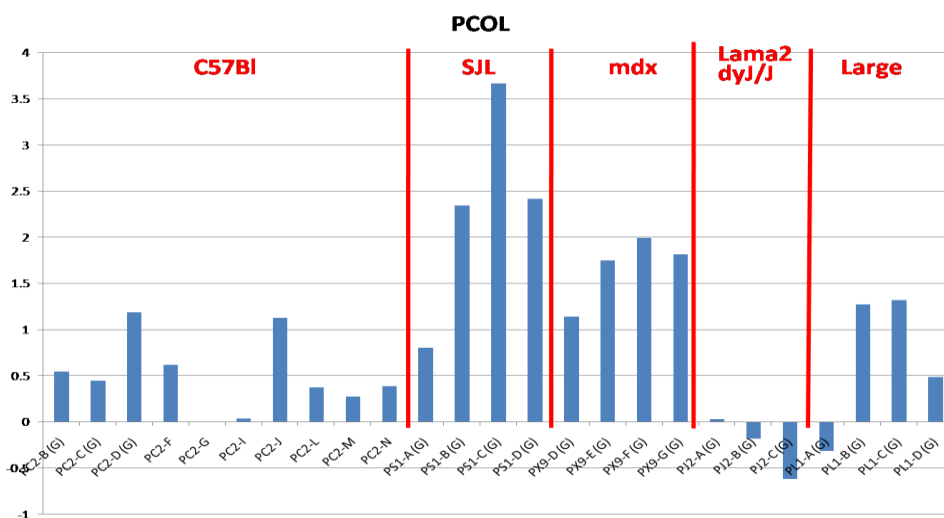


Figura 21: Valores de expressão de pró-colágeno 1α2 obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio.

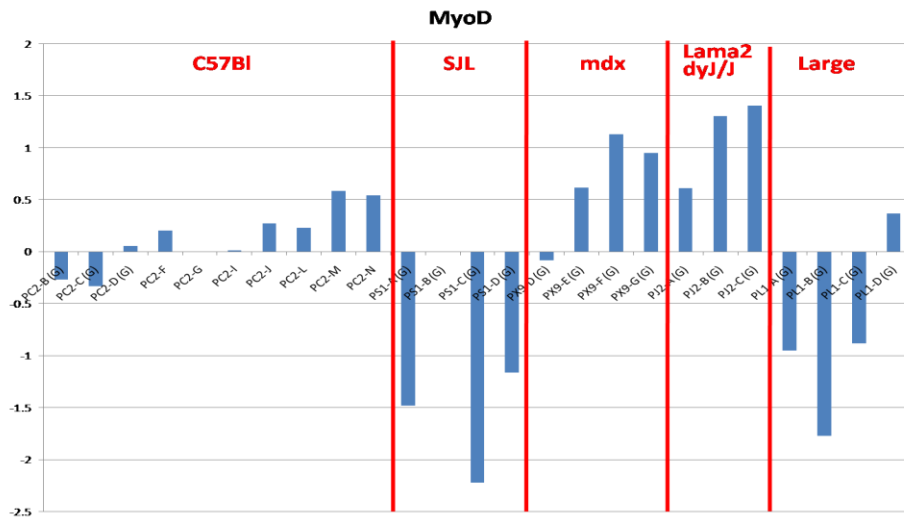


Figura 22: Valores de expressão de *MyoD* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio.

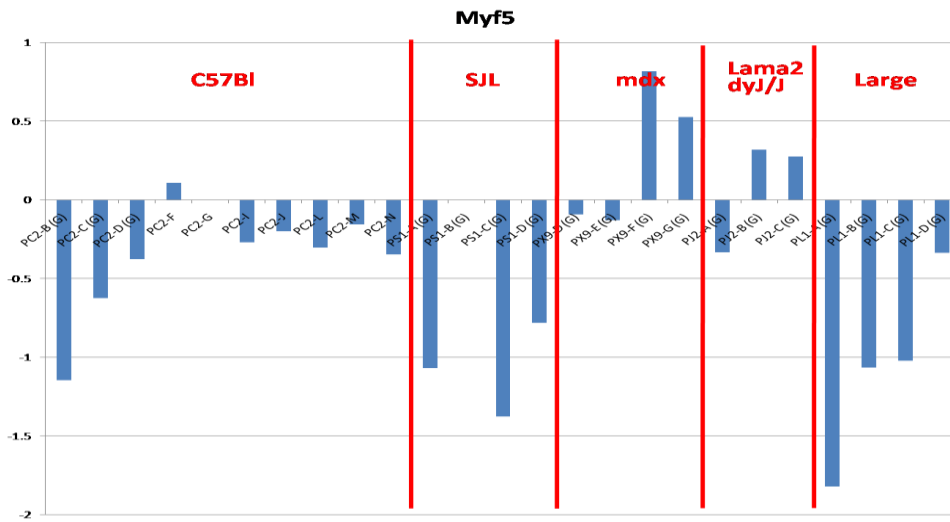


Figura 23: Valores de expressão de *Myf5* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio.

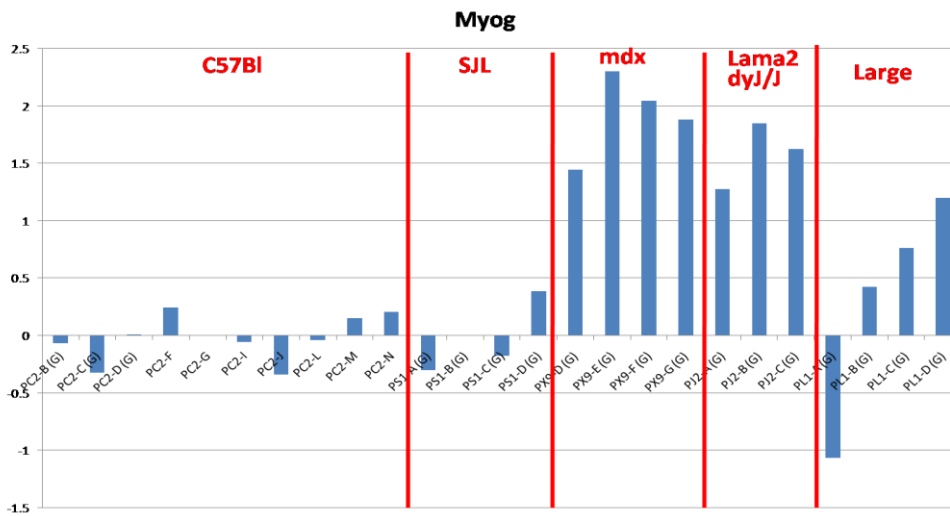


Figura 24: Valores de expressão de miogenina obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio.

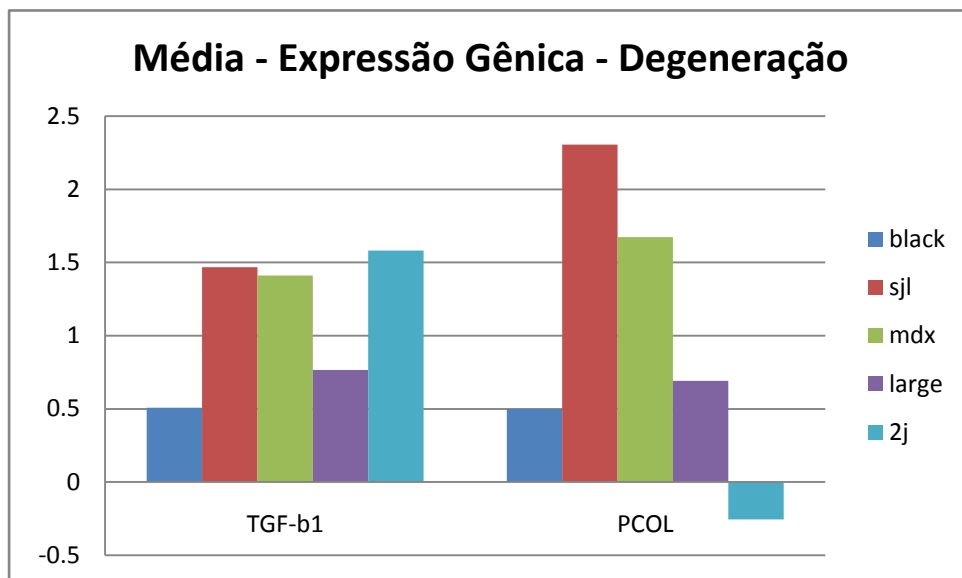


Figura 25: Média de expressão gênica no gastrocnêmio dos camundongos analisados para os genes da via de degeneração: TGF-β1 e pró-colágeno 1α2.

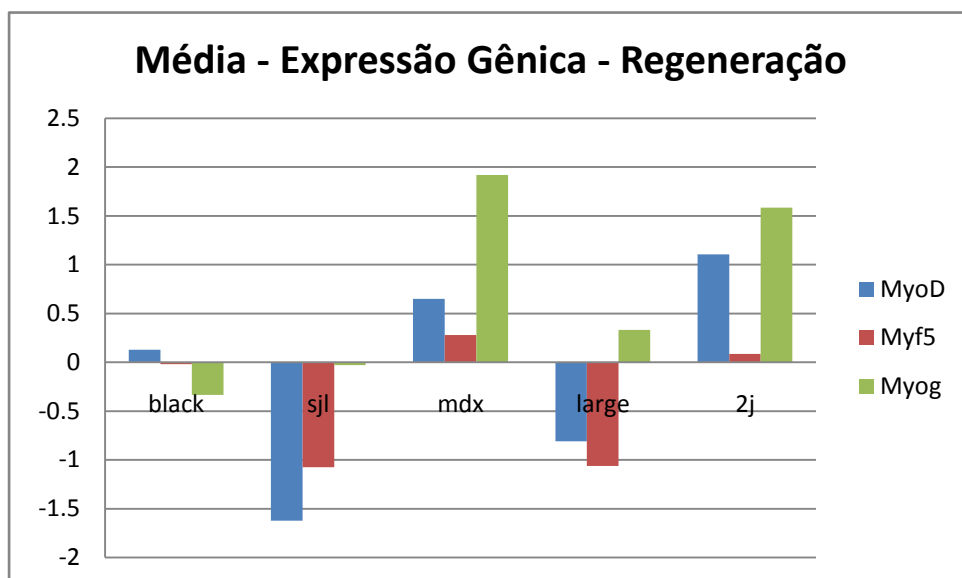


Figura 26: Média de expressão gênica no gastrocnêmio dos camundongos analisados para os genes da via de regeneração: *MyoD*, *Myf5* e miogenina.

Realizamos as mesmas medições para o músculo diafragma de cada um dos animais selecionados nas diferentes linhagens. Comparamos os valores obtidos com o músculo diafragma aos valores obtidos com o gastrocnêmio e a análise estatística dos valores obtidos está descrita na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de probabilidade obtidos com o teste de Mann-Whitney. As células coloridas representam P<0.05.

P - Gastrocnêmio x Diafragma					
Teste M-W	<i>MyoD</i>	<i>Myf5</i>	<i>Myog</i>	<i>TGFβ-1</i>	<i>PCOL</i>
<i>SJL/J</i>	0.0809	1	0.0809	0.0518	0.0518
<i>mdx</i>	0.3123	1	0.8852	0.0304	0.0304
<i>Large<sup>myd</sup></i>	0.4705	0.0606	0.0606	0.1939	0.4705
<i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	0.0809	0.0809	0.0809	0.0809	0.3827

Como o *mdx* foi a única linhagem a apresentar diferença estatisticamente significativa nos valores obtidos em diafragma e gastrocnêmio, realizamos uma análise mais detalhada dos genes da degeneração nesta linhagem, comparando os resultados obtidos com estes dois músculos nos diferentes animais.

Tabela 12: Comparação dos valores de expressão gênica em diafragma e gastrocnêmio de camundongo *mdx*.

	Expressão gênica - <i>mdx</i>			
	Diafragma		Gastrocnêmio	
	TGF-β1	<i>PCOL</i>	TGF-β1	<i>PCOL</i>
PX9-D	0.085291	-0.04191	1.123328867	1.141010553
PX9-E	0.136086	0.61066	1.759176625	1.749303351
PX9-F	0.259116	0.694517	1.44266787	1.988844231
PX9-G	-0.00087	0.497344	1.323334619	1.811186111
Média	0.119906	0.440152	1.412126995	1.672586062
D. padrão	0.108668	0.331378	0.266248403	0.368640415
Mediana	0.110688	0.554002	1.383001244	1.780244731

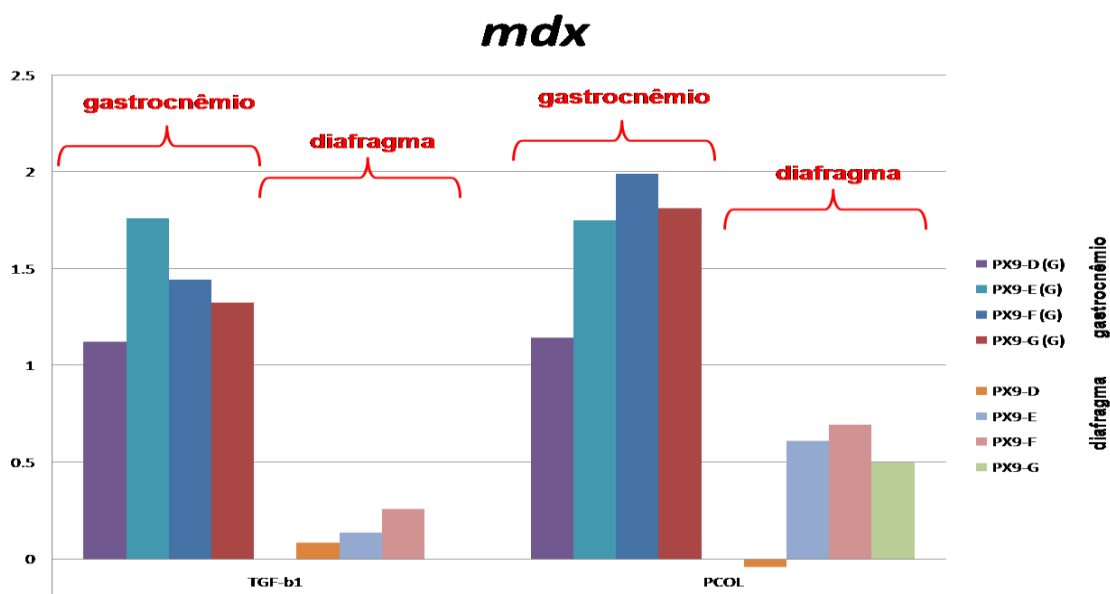


Figura 27: Expressão gênica de diafragma e gastrocnêmio de camundongo *mdx*.

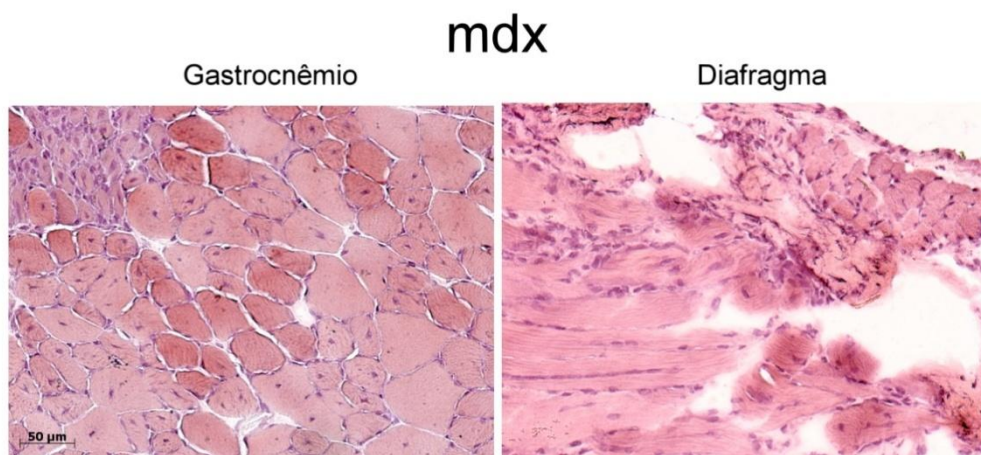


Figura 28: Análise histológica comparativa dos músculos gastrocnêmio e diafragma no camundongo *mdx*, mostrando no diafragma um grau de degeneração e substituição por tecido conjuntivo muito maior do que no gastrocnêmio.

Estes resultados mostram que de uma maneira geral, os genes da degeneração estão mais expressos no gastrocnêmio do que no diafragma, o que confirma a hipótese de uma elevação de expressão destes genes no músculo mais preservado ou nos estágios mais iniciais do processo de degeneração.

### 3. Análise histopatológica dos animais estudados

Para verificar se o resultado obtido na análise de expressão está condizente com a fisiopatologia dos músculos avaliados retiramos amostras de cada um dos grupos estudados para análise em microscopia. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e com picrossirius, para avaliar e quantificar a substituição por tecido conjuntivo (Figura 29).

Cada uma das lâminas foi analisada com base em características histopatológicas que definem o grau de degeneração e regeneração visto no tecido, conforme explicado anteriormente (Dubowitz, Sewry *et al.*, 2007). O resultado desta análise está descrito na Tabela 13.



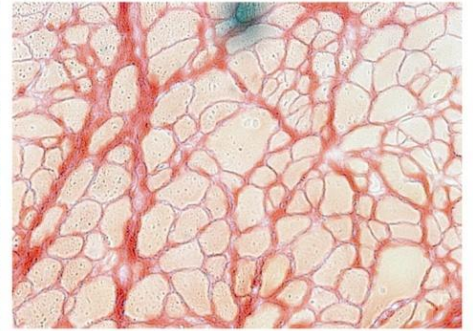
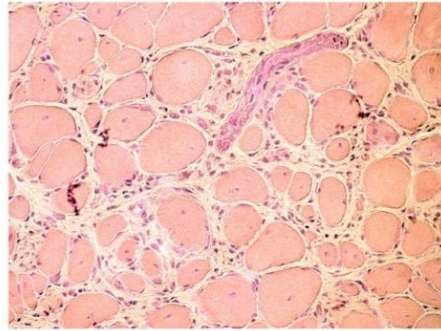
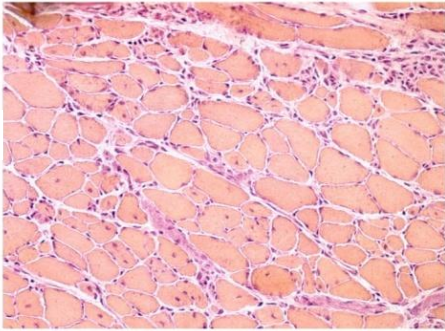
Áreas de regeneração

Áreas de degeneração

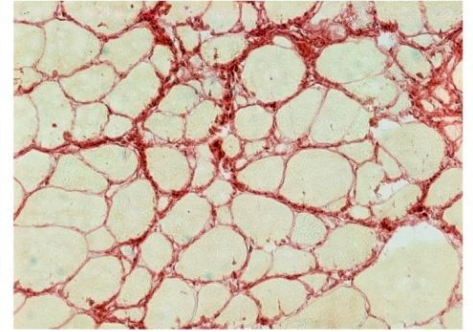
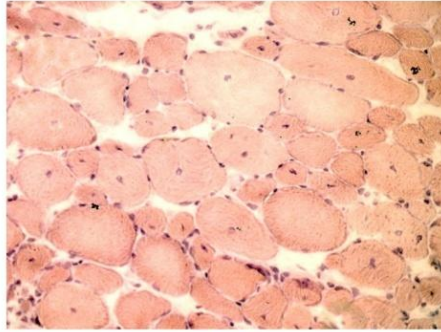
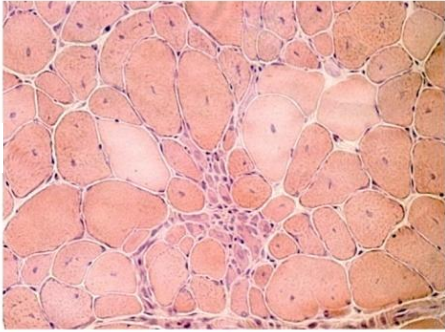
Tecido conjuntivo  
(picrossirius)

ius)

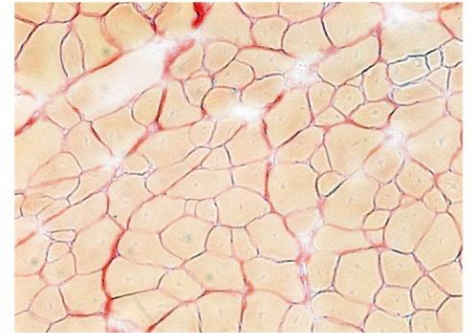
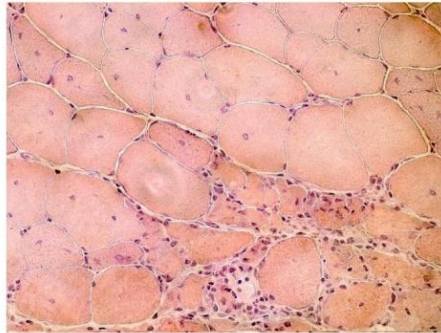
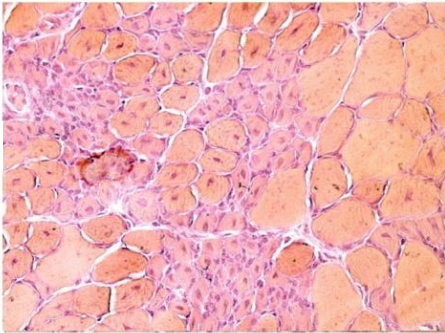
*Lama2<sup>dy-2J/J</sup>*



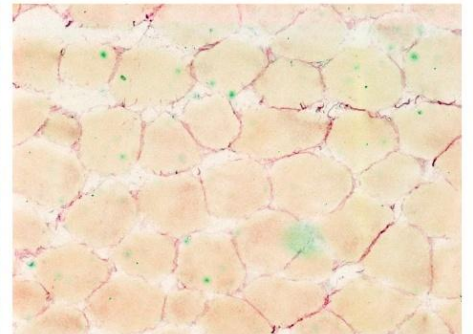
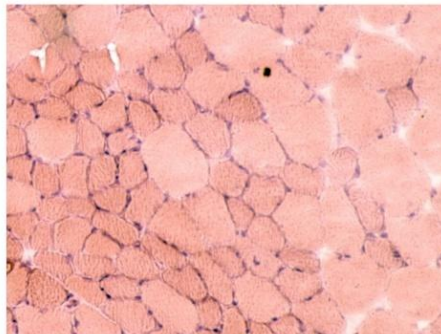
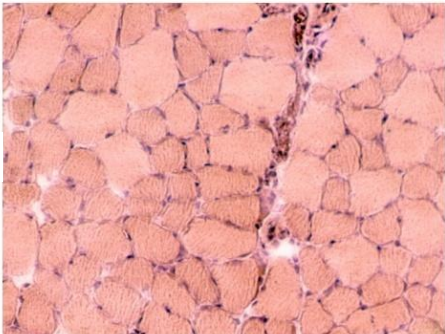
*Large<sup>myd</sup>*



*mdx*



*SJL/J*



*C57Black6*

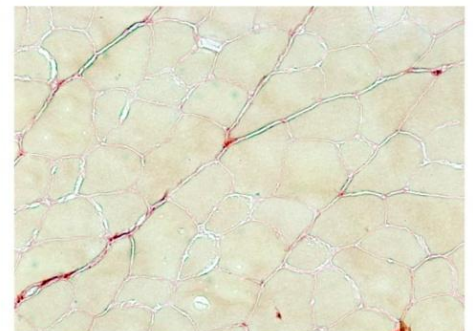
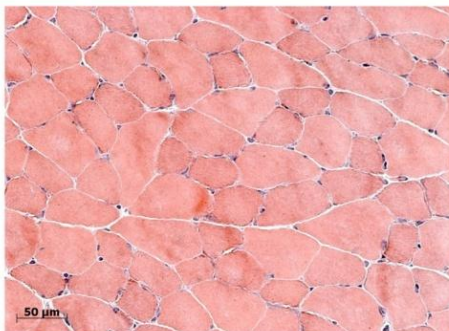


Figura 29: Cortes histológicos de camundongos adultos (2 meses) de diferentes linhagens corados com HE ou picrossirius.

Tabela 13: Análise histopatológica do músculo gastrocnêmio dos animais de dois meses avaliados em Q-PCR.

	Mudanças na forma e calibre das fibras	Aumento de tecido conjuntivo	Atrofia	Hipertrofia	% de fibras centro-nucleadas	Necrose	Fibras basofílicas (regeneração)
<i>C57Black6</i>	+	N	N	+	1	N/O	N/O
<i>SJL/J</i>	+	N	+	+	3	+	N/O
<i>mdx</i>	+++	+	++	++	57	+	+++
<i>Large<sup>myd</sup></i>	+++	++	++	+++	64	+++	++
<i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	+++	++	++	++	34	+++	+++

É possível ver os sinais da degeneração intensa e característica de cada uma das linhagens. No camundongo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* é possível ver grande aumento de tecido conjuntivo endomisial, variação no calibre das fibras, *splitting* e algumas fibras centronucleadas. O camundongo *Large<sup>myd</sup>* apresenta um tecido muscular também bastante degenerado, com presença de grande infiltrado inflamatório, fibras centronucleadas e com variação no calibre. Os dois modelos portadores de distrofias mais benignas, *SJL/J* e *mdx* exibem sinais distróficos mais discretos, com certa variação no calibre das fibras e algumas fibras centronucleadas. Não há a presença de grandes infiltrados como nas outras linhagens.

Além disso, também quantificamos a substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo utilizando quantificação de colágeno por picrossírius. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Quantificação relativa de colágeno por picrossírius no músculo gastrocnêmio dos animais de 2 meses avaliados por Q-PCR e análise histológica.

	Quantificação Relativa
<i>C57Black6</i>	1
<i>SJL/J</i>	0.80
<i>mdx</i>	2.77
<i>Large<sup>myd</sup></i>	3.54
<i>Lama2<sup>dy-2J</sup>/J</i>	3.74

Com esta técnica, é possível confirmar a substituição de tecido muscular por conjuntivo nas linhagens mais gravemente afetadas, *Large<sup>myd</sup>* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*.

#### 4. Criação do camundongo duplo-mutante para DMD e CMD1A

Visando entender melhor a organização do complexo distrofina-glicoproteínas associadas e o possível efeito modificador que alterações em diferentes proteínas podem ter sobre o fenótipo clínico e histopatológico do animal, iniciamos os cruzamentos das linhagens *mdx* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* para verificar: 1) a viabilidade de um animal com mutações em duas proteínas musculares diferentes e 2) no caso deste animal ser viável, avaliar o efeito da deficiência destas duas proteínas no músculo.

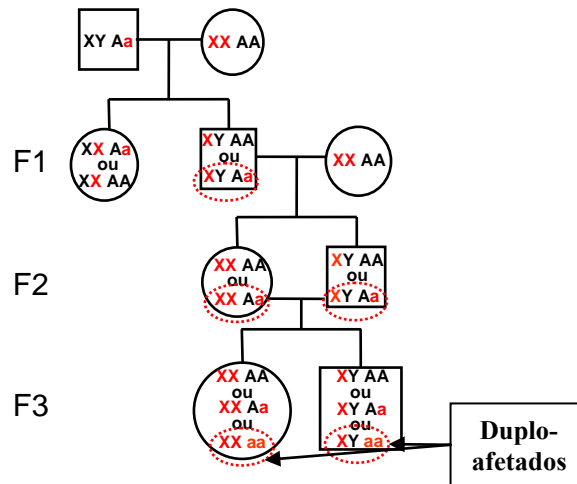


Figura 30: Esquema dos cruzamentos efetuados para a geração do camundongo duplo-mutante *mdx-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*. Os genótipos sinalizados em vermelho representam o alelo portador da mutação. A e a representam os dois alelos de *Lama2*: A- alelo normal *Lama2<sup>dy-2J</sup>+*; a- alelo alterado *Lama2<sup>dy-2J</sup>-*.

Os cruzamentos realizados estão resumidos na Figura 30. Inicialmente cruzamos fêmeas *mdx* com machos heterozigotos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/-*. Dentro da prole F1 foram selecionados os machos (todos *mdx*) heterozigotos para *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* através de genotipagem para este gene. Estes foram retrocruzados com as fêmeas *mdx* obtendo-se assim, em F2, fêmeas e machos *mdx* heterozigotos para *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*.

Estes animais F2 são os parentais que quando cruzados irão originar os camundongos duplo-mutantes.

Em F1 obtivemos 129 animais, sendo 66 machos *mdx*. A genotipagem foi eficaz em 61 deles e identificou 32 heterozigotos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*.

Em F2 obtivemos 34 animais até o momento, sendo 10 machos *mdx* e 24 fêmeas *mdx*. A genotipagem realizada em 22 deles identificou 6 heterozigotos machos e 14 heterozigotas *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/-*.

##### a. Caracterização do duplo-afetado

Até a presente data, a partir da análise de seis ninhadas obtidas em F3, nasceram 44 animais. Entretanto, 12 deles morreram no período peri-natal, antes que fosse possível realizar uma avaliação clínica ou genética. Dos restantes 32 animais avaliados clinicamente e/ou geneticamente,

identificamos 8 animais afetados. A preservação da proporção mendeliana de 25% de afetados comprovou a viabilidade deste modelo.

Dentre os 8 afetados, 4 morreram logo ao nascimento, juntamente com toda a ninhada, como é frequente nas primeiras ninhadas de fêmeas de algumas linhagens distróficas. Quatro animais  $Lama2^{dy-2J}/J$   $-/-$  permaneceram vivos e estão sendo avaliados.

Já é possível perceber que o fenótipo do portador das duas mutações é bastante grave, incluindo um significativo comprometimento dos olhos (Figura 31). A fraqueza muscular aparece de forma precoce, com o comprometimento das patas traseiras evidentes no animal com 1 mês. As alterações oculares, entretanto, já sugerem o fenótipo duplo-mutante desde cerca de 3 semanas de vida.

A expectativa de vida é possivelmente reduzida, visto que o mais velho destes camundongos morreu de forma natural antes de completar três meses de idade.

Os outros três mais novos estão sendo mantidos sob observação para caracterização da história natural deste modelo distrófico.

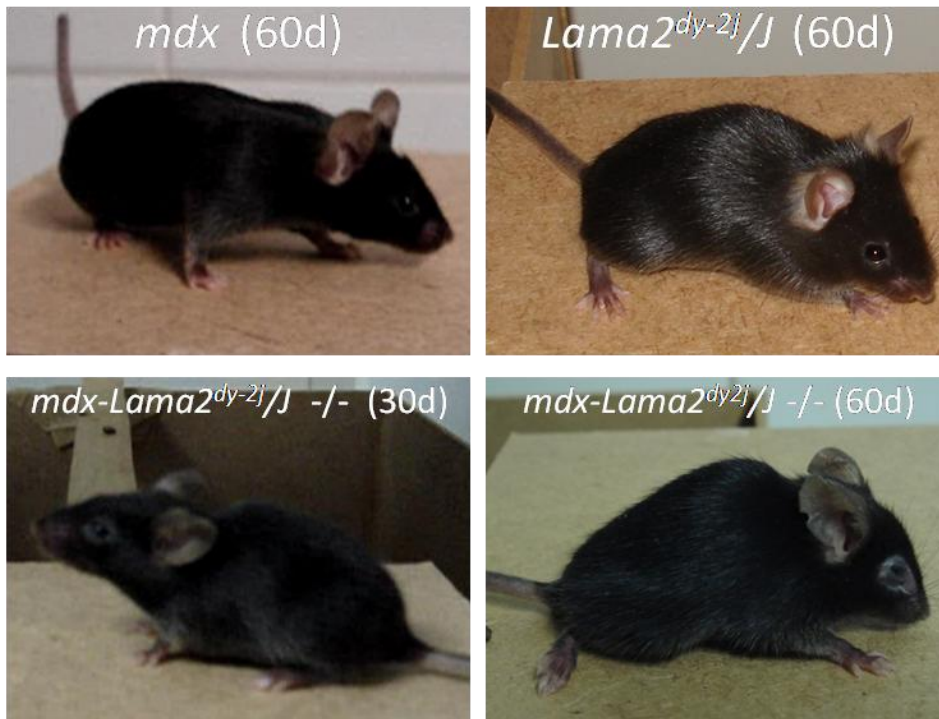


Figura 31: Fenótipo do animal duplo-afetado para  $mdx$  e  $Lama2^{dy-2J}/J$ . Na parte superior, os camundongos controle para cada uma das linhagens e abaixo duas idades dos camundongos afetados de F3.

Nas avaliações funcionais, os camundongos afetados têm demonstrado um desempenho muito abaixo da média obtida tanto pelos camundongos  $mdx$  quanto pelos animais  $Lama2^{dy-2J}/J$ . Os animais conseguem se manter seguros na barra pelas patas dianteiras por no máximo 2 segundos, enquanto que a média para camundongos  $Lama2^{dy-2J}/J$  de mesma idade é de 25 segundos. Estas avaliações ainda estão em andamento.

## b. Efeito da mutação de *Lama2* em heterozigose no *mdx*

Para avaliar um possível efeito modificador de uma redução na quantidade da proteína  $\alpha 2$ -laminina (genótipo heterozigoto para *Lama2*) no fenótipo *mdx*, utilizamos os camundongos machos *mdx*, portadores da mutação em *Lama2* (*mdx-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/-*), para uma análise funcional. Como controle, utilizamos os camundongos irmãos *mdx* sem a mutação em *Lama2* (*Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/+*). Os camundongos foram avaliados clinicamente através dos testes de barra em intervalos regulares (30, 60, 90, 120 e 180 dias) e acompanhados para verificar possíveis alterações comportamentais e físicas.

Nas avaliações funcionais, as curvas observadas para os animais heterozigotos *mdx-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/-* foram muito semelhantes às dos animais controle *mdx-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/+* (Figura 32 e Figura 33). Realizamos, então, análise histopatológica e imunohistoquímica para verificar o efeito da expressão de 50% de proteína  $\alpha 2$ -laminina alterada no músculo.

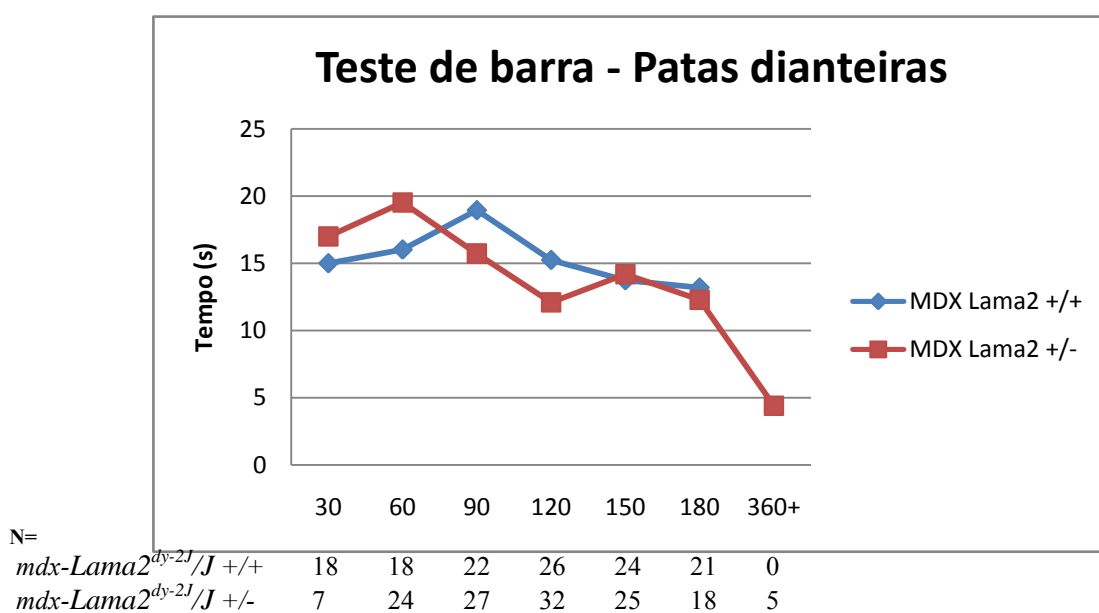


Figura 32: Avaliação funcional de camundongos *mdx* heterozigotos para a mutação em *Lama2* no teste da barra com patas dianteiras. O N representa quantos animais de cada idade foram avaliados.

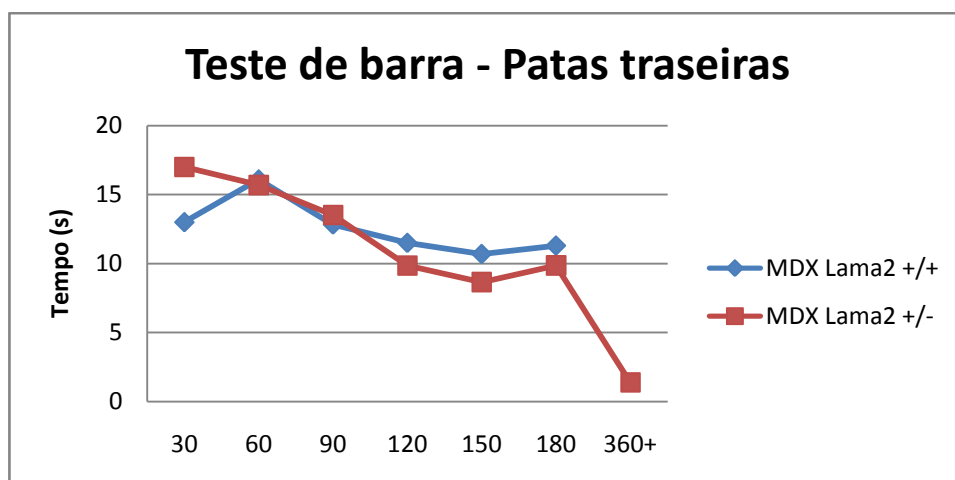


Figura 33: Avaliação funcional de camundongos *mdx* heterozigotos para a mutação em *Lama2* no teste da barra com 4 patas. Foram avaliados a mesma quantidade de animais do teste anterior.

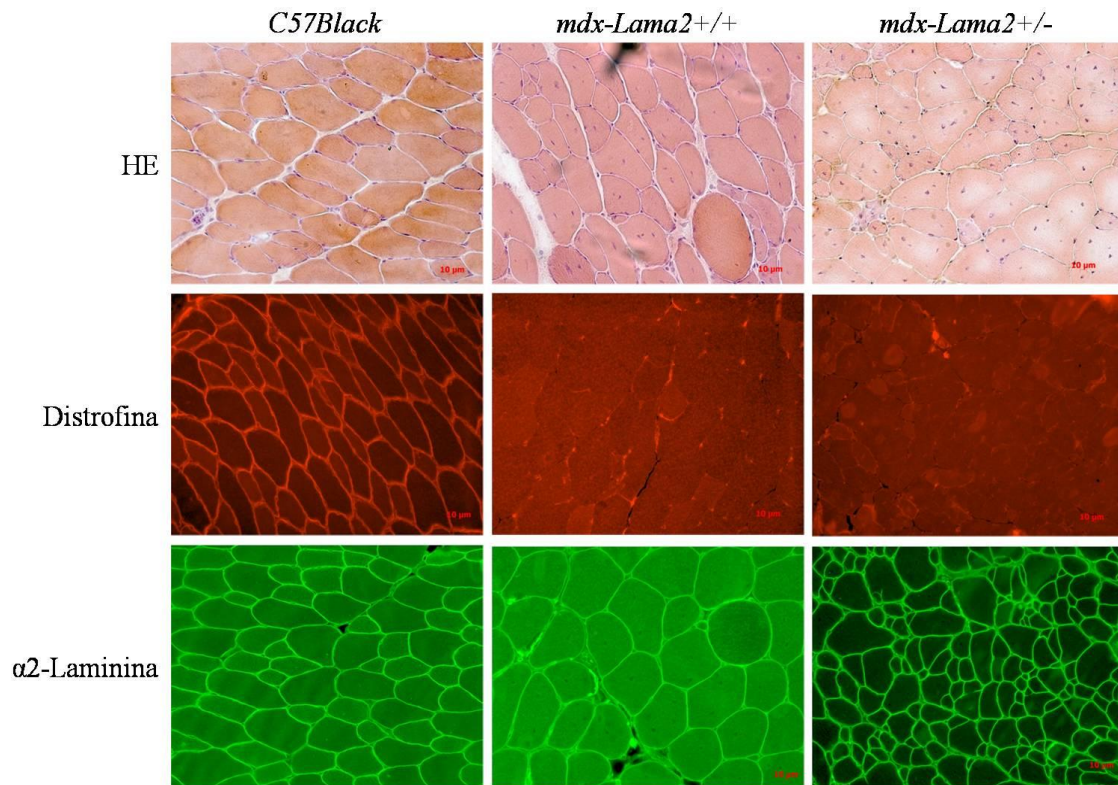


Figura 34: Histologia e imunofluorescência para análise de alterações no camundongo *mdx* heterozigoto para *Lama2*. As reações de imunofluorescência foram feitas com anticorpo policlonal de coelho (distrofina) ou monoclonal de rato (laminina).

O músculo do camundongo heterozigoto *mdx-Lama2*<sup>dy-2J/J</sup> +/- apresenta características semelhantes ao músculo do camundongo *mdx-Lama2*<sup>dy-2J/J</sup> +/+, como, por exemplo, fibras com núcleos centrais em grande quantidade e algumas fibras basofílicas em regeneração. Através da imunohistoquímica não foi possível notar a redução na quantidade de  $\alpha 2$ -laminina nos animais heterozigotos *mdx-Lama2*<sup>dy-2J/J</sup> +/-.

## Discussão

---

A promessa do potencial terapêutico de células tronco para regenerar o músculo distrófico abriu grandes avenidas de pesquisas no mundo todo, visando identificar o tipo celular mais acessível e de melhor potencial miogênico. Em 1998 surgiu a primeira tentativa de se utilizar a linhagem de células mesenquimais de medula óssea para reparar este tipo de lesão. Um grupo de pesquisadores conseguiu isolar esta população de células a partir de medula óssea de animais normais, marcá-las com LacZ, injetá-las em camundongos imunodeficientes e rastreá-las fusionadas às fibras musculares do animal injetado (Ferrari, Cusella-De Angelis *et al.*, 1998). A facilidade de coleta e manipulação em laboratório destas células levou a um grande interesse em seu estudo para futuras aplicações em pacientes. Prosseguindo estas pesquisas, utilizando agora animais distróficos, este mesmo grupo injetou células de medula óssea de camundongos normais *C57Black* em animais *mdx* imunocompetentes, porém não conseguiram identificar a localização a longo termo das células injetadas nem expressão considerável da proteína distrofina (Ferrari e Mavilio, 2002). Outro estudo confirmou que camundongos *mdx* que receberam transplante de medula óssea de camundongos normais *eGFP*, não expressaram distrofina e não apresentaram melhora funcional (Hagiwara, Ohsawa *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro*, entretanto, mostraram a capacidade de diferenciação e fusão das células mesenquimais de medula (MSC) humanas em cultura, mostrando que estas células se fundiram tanto com mioblastos normais como com os de pacientes com distrofia muscular de Duchenne, originando fibras musculares que expressavam distrofina (Goncalves, de Vries *et al.*, 2006). Além disso, a capacidade de fusão e diferenciação destas células *in vitro* pode ser muito melhorada após diversas modificações genéticas para corrigir ausência de distrofina e fazê-las expressar fatores miogênicos específicos, aumentando o seu tropismo e capacidade de integração aos mioblastos em diferenciação (Goncalves, Swildens *et al.*, 2008).

Portanto, o potencial de fusão e diferenciação das células MSC *in vitro* foi comprovado por diferentes abordagens, mas permanecem questões a serem resolvidas quando ao comportamento destas células quando injetadas *in vivo*.

Desta forma, optamos por utilizar estas células-tronco mesenquimais de medula óssea, extraídas de camundongos normais que expressam a proteína *eGFP* como marcador. Estas células foram injetadas por via sistêmica em diferentes modelos murinos para doenças neuromusculares, com padrão de degeneração muscular significativo. O objetivo principal consistiu em verificar se estas células receberiam estímulos para se direcionar ao músculo afetado, se repovoariam este músculo com

mioblastos expressando proteínas normais, uma vez fundidas às fibras em degeneração, e se reconstituíam o músculo lesionado dos animais distróficos.

Os estudos em modelos animais envolvem diversos aspectos a serem considerados. Cada uma das linhagens possui características próprias que facilitam ou dificultam sua manutenção, manejo e reprodução. Três das linhagens utilizadas no presente estudo (*SJL/J*, *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*) foram introduzidas em nosso biotério recentemente. Com isto, os experimentos correram em paralelo à sua implantação e padronização de manejo, genotipagem e análise.

Os animais *mdx* são mantidos em homozigose. As fêmeas com mutações nos dois alelos foram geradas em laboratório através de cruzamentos específicos e os afetados de ambos os sexos são capazes de se reproduzir. No entanto, já está descrita uma redução na fertilidade desta linhagem (<http://jaxmice.jax.org/strain/001801.html>). Muito frequentemente são formados casais que não procriam, sem motivo aparente. Estes animais são também extremamente sensíveis a mudanças de temperatura e outras alterações no ambiente, o que os leva a uma parada na produção de novas ninhadas, principalmente no inverno.

Os animais *SJL/J* também são mantidos em homozigose. O problema no seu manejo é a agressividade dos machos, que após certa idade param de se reproduzir e começam a agredir as fêmeas, chegando até mesmo a matá-las, o que torna necessária a formação de novos casais periodicamente (Page e Glenner, 1972).

As linhagens *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*, por sua vez, são dóceis e pouco sensíveis a mudanças de temperatura e outras alterações ambientais, porém são mantidas em heterozigose pois os afetados não se reproduzem. Os casais de heterozigotos têm, portanto, ninhadas com aproximadamente ¼ de afetados. Assim, a obtenção de grupos experimentais grandes, com muitos animais afetados da mesma idade se torna difícil. Na linhagem *Large<sup>myd</sup>* existe a vantagem da produção de ninhadas grandes, de em média 8 filhotes, o que torna possível a obtenção de um grupo experimental maior.

Desta forma, os experimentos foram planejados utilizando-se o máximo de animais de mesma idade e linhagem que foi possível de se obter na época da análise.

## **1. Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de medula óssea nos modelos murinos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*.**

### **Linhagens utilizadas, via de injeção e quantidade de células.**

Diversas linhas de pesquisa vêm tentando novas terapias para as distrofias musculares. O princípio da terapia celular postula que o músculo danificado atrairia e mobilizaria as células-tronco injetadas para a área lesionada, e estimularia de alguma forma a sua diferenciação em células musculares normais, que passariam a expressar as proteínas deficientes no músculo distrófico, resultando na regeneração de fibras musculares funcionais (Ferrari, Cusella-De Angelis *et al.*, 1998).



Estudos realizados no modelo clássico de distrofia, o camundongo *mdx*, têm mostrado que alguns tipos celulares são mantidos no músculo injetado (Berry, Liu *et al.*, 2007; Liu, Yan *et al.*, 2007), enquanto outros são eliminados (Dell'Agnola, Wang *et al.*, 2004). Entretanto, como este animal não possui fraqueza muscular evidente, não é possível avaliar qualquer possível benefício funcional resultante. Além disso, estudo realizado no camundongo *dy/dy*, outro modelo murino para a distrofia muscular congênita 1A, com significativa fraqueza muscular e deficiência total para a proteína  $\alpha 2$ -laminina, mostrou que quando estes animais foram injetados com células MSC passaram a expressar a proteína ausente e apresentaram melhora na expectativa de vida, taxa de crescimento, força muscular e função respiratória (Hagiwara, Ohsawa *et al.*, 2006).

Optamos, por isso, iniciar os experimentos com injeções de células-tronco em camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>* porque estas linhagens possuem um padrão de degeneração significativo no músculo, associado a um fenótipo de fraqueza evidente, o que permite uma análise funcional de possível melhora clínica (<http://jaxmice.jax.org/strain/000524.html> e <http://jaxmice.jax.org/strain/000226.html>).

O experimento foi conduzido em teste cego e o pesquisador responsável não sabia a identidade dos animais que recebiam as injeções de PBS ou de células-tronco nem o status do animal durante a avaliação funcional, evitando-se desta forma qualquer distorção nas avaliações. A identidade de cada animal só foi revelada após o término de todo o experimento, eutanásia dos animais, coleta e análise dos resultados.

A via de injeção escolhida foi a via sistêmica porque é a mais compatível com terapias em humanos, já que permite a distribuição destas células por todo o organismo. Isto é extremamente importante no caso das distrofias musculares, que acometem toda a musculatura esquelética, incluindo o músculo diafragma e a musculatura cardíaca (Dubowitz, 1975). Diversos trabalhos comprovaram a capacidade de “*homing*”, ou direcionamento das células imaturas para o tecido alvo lesionado, quando injetadas por via sistêmica. Estudo realizado em células-tronco derivadas de músculo mostrou que estas expressavam algumas moléculas sinalizadoras que são importantes para o correto direcionamento e integração destas células ao tecido muscular (Torrente, Camirand *et al.*, 2003). Foi também comprovado que outro tipo de células-tronco, os mesoangioblastos, quando injetados por via arterial, conseguiram atravessar os capilares, se direcionar aos músculos e restaurar a expressão da proteína distrofina em cães modelo para a distrofia muscular de Duchenne (Sampaolesi, Blot *et al.*, 2006). Análises realizadas especificamente utilizando-se células-tronco mesenquimais de medula óssea marcadas com (3H)TdR, um marcador radioativo, mostraram que estas células também apresentaram a capacidade de migrar dos vasos para o tecido muscular quando injetadas via sistêmica em camundongos *mdx* induzidos a imunodeficiência por irradiação (Feng, Lu *et al.*, 2008).

A opção por reforços sistemáticos se baseou em trabalho anterior do grupo que mostrou que injeções subsequentes de células-tronco podem aumentar as chances de sucesso de seu direcionamento e manutenção no músculo de animais injetados por via sistêmica (Vieira, Bueno *et al.*, 2008). No

presente experimento decidimos injetar o máximo de células-tronco, com reforços periódicos, com o intuito de maximizar os efeitos destas células (Kerkis, Ambrosio *et al.*, 2008). Na proximidade da data da injeção os camundongos doadores foram sacrificados e suas células extraídas e ampliadas em cultura. Assim, apesar de o número de animais doadores e condições de cultura serem sempre os mesmos, o número total de células obtidas variou. O total de células foi contado e dividido entre os animais igualmente, de forma que apesar dos reforços terem sido com um número de células variável, cada um dos animais recebeu exatamente a mesma quantidade de células em cada uma das injeções.

O experimento foi conduzido por três meses, para que as células tivessem o tempo hábil de se integrar ao tecido lesionado, se diferenciar e expressar a proteína que está defeituosa no animal estudado, levando à regeneração muscular (Lee, Paik *et al.*, 2004). Com a morte de um dos animais *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* no momento da quarta injeção verificamos que este tempo seria realmente o ideal para finalizar o experimento e analisar os resultados, evitando a perda de mais animais da amostra, visto que possivelmente estes animais foram ficando mais sensíveis pelo estresse causado pelas injeções constantes.

#### **Avaliação da presença das células injetadas**

Para avaliar qualquer benefício proveniente da terapia celular são necessários parâmetros para avaliar a presença ou não da proteína repostada ou medidas que indiquem a presença das células injetadas no organismo receptor.

No modelo *mdx*, com deficiência total da proteína distrofina, esta proteína pode ser rastreada em testes terapêuticos (Torrente, Tremblay *et al.*, 2001; Payne, Oshima *et al.*, 2005). Porém, nos modelos estudados neste projeto, não é possível rastrear a proteína defeituosa, pois a mutação que cada um deles possui leva à redução quantitativa nos níveis protéicos e não à sua ausência, dificultando sua detecção pelas técnicas habituais. Assim, não seria possível confirmar a presença e integração das células injetadas ao tecido em estudo através das proteínas-alvo Large e  $\alpha 2$ -laminina. Como as células injetadas carregam o gene *eGFP* integrado em seu genoma, a presença desta proteína poderia ser utilizada como marcador (Motohashi, Uezumi *et al.*, 2008).

Uma análise histológica preliminar de cortes musculares dos animais injetados com células *eGFP* utilizando filtro específico para detecção desta proteína não permitiu a identificação de fibras musculares com fluorescência verde, que poderiam comprovar a integração e diferenciação das células MSC-*eGFP*. Também não foram identificadas células isoladas expressando *eGFP*. A análise, entretanto, foi muito dificultada porque o músculo exibe naturalmente uma auto-fluorescência verde, mascarando os resultados (Brazelton e Blau, 2005). Além disso, a proteína *eGFP* é muito solúvel e facilmente removida de cortes histológicos, o que requer cuidados especiais para sua preservação no tecido a ser analisado (Brazelton e Blau, 2005).

A análise por DNA rastreando o gene *eGFP* permite por sua vez verificar a presença do núcleo transplantado independente do grau de diferenciação das células, da variação na expressão ou dificuldades metodológicas para a detecção da proteína fluorescente.

Como ponto de partida para a análise dos resultados do primeiro experimento, rastreamos a presença ou não das células injetadas pela amplificação de um segmento do gene *eGFP* que elas carregam. Esperávamos que mesmo diferenciadas e especializadas, os núcleos *eGFP* positivos poderiam ainda ser identificados no tecido muscular dos animais injetados (Chretien, Dreyfus *et al.*, 2005; Li, Kimura *et al.*, 2006; Auda-Boucher, Rouaud *et al.*, 2007).

Como resultado, não identificamos uma banda do gene *eGFP* no músculo esquelético de nenhum dos animais estudados, sugerindo a ausência destas células no tecido muscular dos animais injetados. Estas células também não foram identificadas no fígado destes animais. Portanto, as células introduzidas por via sistêmica aparentemente não foram direcionadas para o músculo lesionado ou, alternativamente, foram eliminadas pelo mesmo. Avaliações periódicas da presença destas células no decorrer do experimento poderiam elucidar este ponto. Entretanto, a análise só pode ser realizada no final do experimento porque uma biópsia exploratória em estágios intermediários poderia alterar o estado do músculo, introduzindo mais variáveis para o direcionamento destas células para às regiões lesadas, além de interferir nos testes funcionais, visto que os animais seriam submetidos a uma pequena cirurgia.

Para tentar elucidar o destino destas células quando injetadas nos modelos murinos *Lama2<sup>dy-2J/J</sup>* e *Large<sup>myd</sup>*, desenhamos posteriormente os experimentos de injeções locais com avaliação após menores períodos de tempo.

### **Rastreamento das células MSC-*eGFP* em experimento de injeção local de curta duração**

Este experimento visava avaliar o tempo de permanência das células MSC quando injetadas localmente no músculo receptor, após curtos períodos de tempo. Dos três animais injetados e avaliados após 2 e 10 dias, foi somente possível verificar a presença destas células em um deles e após 10 dias da injeção. A não identificação da presença das células após 2 dias em um dos animais e 10 dias no outro sugere que a aceitação do transplante varia individualmente. Este resultado foi surpreendente, e alerta para a variabilidade individual na receptividade destas células no músculo distrófico *Large<sup>myd</sup>*.

Além disso, como estas células já foram descritas como não-imunogênicas (Prockop, 1997), esperávamos que elas permanecessem no músculo injetado por um período maior de tempo. Por outro lado, como o processo degenerativo do músculo distrófico expressa e atrai uma variabilidade grande de citocinas e moléculas sinalizadoras inflamatórias, poderia constituir um ambiente hostil para estas células, prejudicando o seu desenvolvimento e diferenciação e levando a sua morte. Além disso, nos estágios mais avançados da doença, o músculo exhibe graus variados de esclerose e densidade reduzida de capilares, o que dificulta a migração das células injetadas (Gargioli, Coletta *et al.*, 2008). De fato,

um trabalho recente mostrou que fibroblastos modificados de tendão expressando fatores angiogênicos e metaloproteinases foram capazes de restaurar a rede vascular e reduzir a deposição de colágeno, permitindo terapia celular eficiente no camundongo distrófico, mesmo em idades avançadas (Gargioli, Coletta *et al.*, 2008). Assim, qualquer terapia celular para o músculo degenerado deverá levar em conta procedimentos adicionais para melhorar a receptividade das células transplantadas.

### **Injeção de células da linhagem muscular C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduzidas com *eGFP***

A utilização de células expressando *eGFP* tem crescido muito em experimentos de transplante celular. Diversos trabalhos utilizaram células-tronco transformadas expressando *eGFP* que depois foram no localizadas no tecido receptor através de sua fluorescência verde (Goncalves, de Vries *et al.*, 2006; Li, Kimura *et al.*, 2006; Quenneville, Chapdelaine *et al.*, 2007). Em muitos dos trabalhos, os animais injetados, tanto *C57Black* como *mdx*, eram previamente irradiados (Chretien, Dreyfus *et al.*, 2005). Portanto, estes primeiros estudos não sugeriam uma aparente rejeição às células exógenas em função da expressão do *eGFP*.

Por outro lado, trabalhos mais recentes têm levantado a possibilidade de rejeição destas células em função da presença do *eGFP* (Stripecke, Carmen Villacres *et al.*, 1999; Gambotto, Dworacki *et al.*, 2000; Re, Srinivasan *et al.*, 2004; Bubnic, Nagy *et al.*, 2005).

O efeito do *eGFP* é ainda bastante controverso. Segundo Agbulut e colaboradores o *eGFP* interage com sítios de actina, inibindo a interação entre esta proteína e a miosina e interferindo assim na contração muscular (Agbulut, Huet *et al.*, 2007). Outro grupo, entretanto, verificou que esta proteína não consegue impedir a interação actina-miosina *in vitro* (Resnicow, Hooft *et al.*, 2008).

Decidimos testar a hipótese da rejeição pelo músculo distrófico de células expressando *eGFP* utilizando as células de linhagem miogênica C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transfectadas com vetor expressando *eGFP*.

As células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> já foram utilizadas em tentativas terapêuticas, comprovando a sua capacidade de permanência e diferenciação no músculo hospedeiro. Entretanto, atualmente sua utilização para terapias foi descartada, porque estas células são transformadas e resultam na formação de tumores no organismo receptor (Hortelano, Wang *et al.*, 2001). Mas, por causa desta característica, elas continuam sendo um bom marcador para este experimento, uma vez que não deveriam ser eliminadas do organismo injetado.

O fato de não termos encontrado as células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-*eGFP* 7 dias após a injeção sugere que o organismo está rejeitando as células quando estas expressam o gene *eGFP* exógeno (Wang, Mukherjee *et al.*, 2002).

Atualmente, já se sabe que peptídeos derivados da proteína *eGFP* podem induzir a resposta imune (Stripecke, Carmen Villacres *et al.*, 1999; Re, Srinivasan *et al.*, 2004). Estudos *in vivo* verificaram a imunogenicidade de células marcadas com *eGFP* após o transplante em animais imunocompetentes, comprovando o fato de que essas células eram perdidas após a sua infusão.

(Stripecke, Carmen Villacres *et al.*, 1999; Gambotto, Dworacki *et al.*, 2000; Rosenzweig, Connole *et al.*, 2001; Bubnic, Nagy *et al.*, 2005). Assim, a proteína *eGFP* presente em células injetadas pode estar ativando o sistema imune do animal e fazendo com que estas células sejam rapidamente eliminadas.

Em resumo, os experimentos de injeção de células-tronco em modelos murinos para distrofias musculares não resultaram no sucesso que esperávamos. As células não puderam ser localizadas após períodos superiores a 10 dias da injeção, e os reforços sucessivos não melhoraram o seu direcionamento e nem ajudaram a preservá-las nos animais injetados. Portanto, não seria esperado um efeito terapêutico, uma vez que as células não permaneceram tempo suficiente no tecido para possibilitar a restauração do músculo degenerado e a conseqüente melhora no fenótipo do animal. O grau de degeneração do tecido tratado também não influenciou na permanência das células, pois os afetados por distrofias mais graves como *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>* também rejeitaram as células injetadas conforme já foi observado em camundongos portadores de distrofias mais benignas como o *mdx* (Ayub-Guerrieri, 2008). Seria importante estabelecer o papel da proteína *eGFP* como marcador, pois seu possível efeito nocivo pode causar a eliminação das células que expressam esta proteína. Alternativamente, torna-se necessária a busca de outros marcadores para rastrear as células injetadas, a fim de validar sua presença nos tecidos injetados e analisar com mais segurança seu potencial de uso terapêutico.

Desta forma, continuamos a acreditar que as células MSC possuem um potencial terapêutico que precisa ser mais bem explorado em estudos aliados a imunossuppressores e outras drogas que facilitem o seu direcionamento e permanência no músculo afetado.

### **Testes funcionais nas linhagens *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>***

Como os testes funcionais já tinham sido realizados ao longo do experimento e apesar da ausência de identificação das células injetadas, seguimos com a análise destas avaliações embora sem considerar uma possível atuação benéfica delas no músculo, para verificar a variabilidade natural de cada linhagem submetida e este tipo de tratamento,

#### **Teste de barra (patas dianteiras e quatro patas)**

O teste de permanência na barra através das patas dianteiras avalia basicamente a força e a resistência destes membros. O teste na barra utilizando as quatro patas, por sua vez, além da força muscular também avalia outros parâmetros tais como equilíbrio, capacidade de utilizar a cauda para se manter preso e utilização de movimento de rotação do corpo para atingir a barra (Kramer, Lochmuller *et al.*, 1998; Chiavegatto, Sun *et al.*, 2000).

Apesar de diferenças no padrão de fraqueza muscular, tanto os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* como *Large<sup>myd</sup>* conseguem permanecer seguros na barra pelas patas dianteiras por um tempo maior do que pelas quatro patas. (Tabela 3 e Tabela 4).

O camundongo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* apresenta uma atrofia e enrijecimento evidente dos membros posteriores com a progressão da doença. O camundongo *Large<sup>myd</sup>* apresenta uma fraqueza generalizada, abrangendo as quatro patas, o rabo e musculatura da coluna, desenvolvendo escoliose.

Na avaliação os membros anteriores, os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* conseguem permanecer na barra mais tempo do que os camundongos *Large<sup>myd</sup>* (Figura 12 e Figura 13). Isso porque a grande maioria dos animais *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* exibem um bom senso de equilíbrio, se erguendo e posicionando na barra através de apoio no tórax, permanecendo nesta posição típica por tempos mais longos. Provavelmente esta posição exige menos força muscular para ser mantida, conforme podemos observar na Figura 35.



Figura 35: Animal *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* na posição típica de equilíbrio na barra suspensa – patas dianteiras, apoiando o tórax e utilizando a cauda para se equilibrar.

Já os animais *Large<sup>myd</sup>*, apesar de não perderem o movimento de membros dianteiros nem traseiros, se mantêm seguros na barra por tempos mais curtos do que os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*. Isto pode sugerir que essa linhagem não possui a mesma agilidade e capacidade de utilização de outros músculos do corpo para tal.

No teste de avaliação dos quatro membros, os camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* conseguem utilizar a mesma habilidade para se manter seguros na barra. Eles podem realizar um movimento de rotação do corpo, que os coloca na posição descrita para os membros anteriores. Neste caso, permanecem por períodos maiores de tempo seguros na barra (20 a 60 segundos). Se o movimento de rotação não é feito com sucesso, estes animais não conseguem se segurar e caem após 1 a 5 segundos. Os resultados obtidos no tempo zero, 1 mês e 2 meses sugerem que o movimento pode ser aprendido e repetido, assegurando a manutenção do animal na barra. Já com 3 meses, o aumento da fraqueza pode contribuir com um menor sucesso na manobra (Tabela 4).

Já os animais *Large<sup>myd</sup>* praticamente não conseguem se segurar na barra utilizando as quatro patas, caindo na maior parte das vezes imediatamente ao serem colocados na posição ou raramente após no máximo 10 segundos.

#### **Teste de nado forçado**

Este teste avalia não só a força muscular, mas também outras características tais como percepção espacial e ansiedade/depressão (Meer, 2005, Raghavendra, 2000).

Foi possível observar que nos animais *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* a relação nado/repouso é menor do que nos camundongos *Large<sup>myd</sup>*. O camundongo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* flutua por mais tempo e o repouso pela flutuação pode refletir, nestes animais, a sua capacidade de percepção espacial, identificando que não há saída da piscina. Já os animais *Large<sup>myd</sup>* apresentaram baixa percepção espacial, uma vez que permanecem a maior parte do período nadando. A baixa percepção espacial pode estar relacionada com a presença de alterações neurológicas no camundongo *Large<sup>myd</sup>*, pois diversas alterações cerebrais e retardo mental são encontradas em pacientes humanos com doenças neuromusculares associadas a defeitos de glicosilação (Muntoni, Brockington *et al.*, 2002). Nos pacientes portadores de mutações em *LAMA2* não há comprometimento cognitivo (Tome, Evangelista *et al.*, 1994).

De maneira geral, os testes utilizados apresentaram claras diferenças entre as linhagens *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*, refletindo os diferentes mecanismos patofisiológicos envolvidos. Mais do que isso, a grande variação observada entre os animais dentro da própria linhagem e idade reflete a variabilidade individual que existe nestas distrofias animais, à semelhança das formas humanas (Sewry, Taylor *et al.*, 1996; Mercuri, Cini *et al.*, 2003; Mercuri, Bushby *et al.*, 2005; Mercuri, Topaloglu *et al.*, 2006). Portanto, é fundamental que novos tratamentos com avaliação funcional dos efeitos terapêuticos levem em conta esta variabilidade natural.

## **2. Estudo de expressão gênica na degeneração e regeneração**

### **Padronização – elaboração da curva padrão**

A padronização dos experimentos de quantificação relativa foi bastante complicada pela variação nos níveis de expressão dos genes estudados. Iniciamos os testes e padronizações pelos genes *TGFβ-1* e pró-colágeno 1α2 (*PCOL*) da via de degeneração e, como controle endógeno, repetindo os experimentos de Gosselin e cols, utilizamos inicialmente o gene de peptidil-prolil-isomerase A (PPIA) (Gosselin, Williams *et al.*, 2004). Em nossos estudos preliminares a expressão do gene PPIA apresentou grande variabilidade de expressão no tecido muscular das diferentes linhagens de camundongos avaliados. Desta forma, sua utilização como gene endógeno normalizador foi descartada, pois para esta função precisaríamos obter valores constantes de expressão, independentemente da linhagem do camundongo ou de sua idade (Schmittgen e Zakrajsek, 2000).

Passamos então a selecionar novos genes endógenos, mais apropriados para o nosso estudo. Para tal, alguns parâmetros foram importantes, tais como avaliar a correlação entre o nível de transcrição dos genes-alvo e do gene endógeno e verificar se o gene endógeno é constantemente transcrito em todos os tipos celulares e tecidos. Além disso, sua expressão não pode ser regulada por influências externas ou internas (Radonic, Thulke *et al.*, 2004).

Após um extenso levantamento bibliográfico, selecionamos os genes que apresentavam maior estabilidade de expressão nos diferentes tecidos e experimentos. Os genes a seguir seriam os mais apropriados, por apresentar as seguintes características: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

(GAPDH) - cuja expressão no músculo é inalterada quando este é submetido a exercício (Jemiolo e Trappe, 2004); beta-2-microglobulina (B2M) – que apresentou expressão estável em cultura de fibroblastos (Schmittgen e Zakrajsek, 2000); polipeptídeo A de polimerase (RNA) II (DNA-*directed*) (RPII) – cuja expressão foi detectada em vários tecidos e com variação pequena de transcrição nos tecidos analisados (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002); e glicose-6-fosfato desidrogenase 2 (G6PDH), que juntamente com RPII não tem sua expressão regulada por ativação gênica decorrente de estimulação mitogênica *in vitro* (Schmittgen e Zakrajsek, 2000). Após avaliação da expressão destes quatro genes por PCR em tempo real, verificamos que o gene GAPDH apresentou a menor variação nos diferentes modelos e músculos analisados, e este gene foi escolhido como controle endógeno para os nossos experimentos posteriores.

A baixa expressão dos genes da via de regeneração em animais adultos dificultou a análise de sua curva padrão, determinada pelo próprio equipamento (7500 Applied Biosystems) através da quantificação das diluições seriadas de cDNA proveniente destes tecidos. Para viabilizar esta padronização, a análise foi repetida em um *pool* de amostras de cDNA, obtida pela mistura de amostras de músculos de animais neonatos e de 2 meses de idade, das linhagens *C57Black* e *mdx* em igual proporção. Estas amostras foram escolhidas porque deveriam apresentar expressão dos genes da degeneração nos animais distróficos mais velhos e dos genes da regeneração nos animais neonatos distróficos ou não, visto que os genes da regeneração são os mesmos envolvidos no desenvolvimento muscular normal (Wagers e Conboy, 2005). Utilizando este *pool* de amostras foi possível obter curvas padrão para todos os genes estudados.

### **Variabilidade individual nos controles**

Pudemos observar que a variabilidade individual nos genes estudados é bastante significativa. Camundongos controle normais, sem lesão muscular, deveriam expressar níveis insignificantes dos genes de degeneração e regeneração. Entretanto, verificamos que a expressão dos diversos genes ocorria de forma bem variável nos diferentes animais normais. O programa que analisa os níveis de expressão de cada gene utiliza um único controle normal para definir a unidade desta quantificação. Como este controle deve ser selecionado e indicado pelo pesquisador, optamos por fixar como calibrador o animal controle com menor expressão de *TGF $\beta$ -1*, porque não é esperado que este gene seja expresso em músculo normal, uma vez que está intimamente ligado com o aparecimento de fibrose no tecido (Gosselin, Williams *et al.*, 2004; Cohn, van Erp *et al.*, 2007). No entanto, a expressão de *TGF $\beta$ -1* nos diferentes controles não foi totalmente negativa, e baixos níveis de expressão puderam ser identificadas nestes diferentes animais normais, o que pode sugerir níveis basais de expressão envolvidos em outras vias de controle de ciclo celular (Li, McFarland *et al.*, 2008a; Li, McFarland *et al.*, 2008b).



Considerando-se então este animal controle com o menor nível de expressão de *TGFβ-1* como calibrador para toda a amostra de controles normais, observamos que enquanto os genes da via de degeneração apresentam variabilidade normal positiva, os genes da via de regeneração oscilaram entre valores positivos e negativos.

### **Avaliação da expressão dos genes em estudo nos animais distróficos**

Para cada linhagem de camundongos distróficos, foram avaliados quatro animais. Como este número é pequeno e a distribuição não foi normal, utilizamos teste estatístico não-paramétrico para comparar os diferentes grupos.

A análise da gene *TGFβ-1* mostrou que, com exceção da linhagem *Large<sup>myd</sup>*, sua expressão nos animais distróficos foi significativamente maior que nos controles, como já foi descrito para o modelo *mdx* (Li, McFarland *et al.*, 2008b; Yablonka-Reuveni, Day *et al.*, 2008). Já a expressão do gene *PCOL* se mostrou significativamente elevada somente nos modelos *mdx* e *SJL/J*, que são animais mais brandamente afetados. O modelo *Large<sup>myd</sup>* apresentou valores positivos, porém não estatisticamente significantes. Já o grupo dos camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* apresentou uma redução nos níveis de expressão de *PCOL*, apesar do padrão de degeneração intenso observado na análise histológica.

Complementando estas observações, a quantificação do colágeno pela coloração de picrossirius mostrou maior quantidade de tecido conjuntivo nos animais mais afetados *Large<sup>myd</sup>* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e menor infiltração nos animais com distrofias mais benignas *SJL/J* e *mdx* (Figura 29). Estes resultados reforçam a hipótese de que aos 2 meses de idade o processo degenerativo nos animais com distrofias mais graves já está em fase mais avançada, com maior perda muscular e substituição das fibras degeneradas por tecido conjuntivo.

Esta relação inversa de expressão de genes da cascata de degeneração com o grau de afecção do músculo também foi observada quando comparamos 2 músculos diferentes do camundongo *mdx*. O músculo gastrocnêmio mostrou alta expressão dos genes *TGFβ-1* e *PCOL* enquanto o diafragma apresentou uma redução na expressão destes dois genes. Como no *mdx* o padrão de degeneração do músculo diafragma é muito maior do que o do gastrocnêmio (Ghedini, Viel *et al.*, 2008), este resultado corrobora a hipótese de que os genes da cascata de degeneração são mais expressos nos estágios iniciais do processo ou nos músculos mais preservados.

Em conjunto, estes resultados sugerem que enquanto o gene *TGFβ-1* é ativado pelo processo distrófico em qualquer grau de degeneração, a ativação da expressão do gene *PCOL* ocorre nos estágios iniciais deste processo. Assim, na via de degeneração, os animais distróficos exibem um aumento de expressão de *TGFβ-1*, citocina que sinaliza para a substituição tecidual e ativação da cascata inflamatória (Gosselin, Williams *et al.*, 2004), que induz à expressão de *PCOL* (Li, Foster *et al.*, 2004).

A análise dos genes da cascata de regeneração mostrou grande variabilidade nos níveis de expressão dos diferentes modelos murinos. Considerando-se que estes genes são expressos pelas células-satélite do músculo, responsáveis pela regeneração deste tecido, o perfil de expressão observado pode refletir como estas células estão atuando nos respectivos músculos degenerados (Wagers e Conboy, 2005; Yablonka-Reuveni, Day *et al.*, 2008). Alta expressão dos genes *MyoD* e *Myf5* refletem o comprometimento e proliferação das células-satélite, quando ativadas para iniciar o processo de regeneração. A miogenina é um importante indutor de diferenciação muscular, levando à fusão de mioblastos para a formação de miotubos diferenciados.

De um modo geral, a expressão de miogenina detectada em nos modelos murinos *mdx*, *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>* foi compatível com a presença de grupos de pequenas fibras com características regenerativas, observadas na análise histológica nestes modelos.

Os valores baixos de expressão de *MyoD* e *Myf5* observados nos animais *SJL/J* sugerem que as células-satélite presentes nestes músculos estão quiescentes. A falta de expressão da miogenina confirma este resultado, pois não houve estímulo para a diferenciação destas células. Este resultado é compatível com o padrão histopatológico observado neste modelo, onde o músculo é muito preservado, sem evidências significativas de degeneração e conseqüente ativação da regeneração.

Já nos animais *mdx* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* observamos aumento na expressão dos genes *MyoD* e *Myf5*, refletindo a ativação das células-satélite para a sua proliferação. Também foi observado aumento na expressão da miogenina, compatível com o estímulo para a diferenciação destas células. Nestes dois modelos, portanto, o processo degenerativo levou, de forma esperada, ao estímulo da cascata regenerativa.

Uma regeneração muito ativa já é bem descrita no modelo *mdx*. O músculo destes animais exhibe após a 3ª ou 4ª semana de vida uma elevação muito grande no número de fibras centronucleadas, que são consideradas fibras recém regeneradas. (DiMario, Uzman *et al.*, 1991). Os nossos resultados no modelo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* mostram que este padrão de degeneração seguida por um processo de regeneração também ocorre neste camundongo.

No camundongo *Large<sup>myd</sup>*, que apresenta um padrão histopatológico muito semelhante ao camundongo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, observamos uma baixa expressão dos genes *MyoD* e *Myf5*, sugerindo baixa atividade proliferativa das células-satélite nestes animais (Yablonka-Reuveni, Day *et al.*, 2008). Se os estímulos promovidos pelas fibras em degeneração atuam de forma similar na ativação da regeneração nos diferentes modelos distróficos, os resultados observados no modelo *Large<sup>myd</sup>* podem sugerir uma falha na ativação e/ou capacidade de proliferação destas células neste modelo murino com defeito de glicosilação. De fato, estudos realizados em camundongo nocaute condicional para a expressão da proteína  $\alpha$ -dístroglicana ( $\alpha$ -DG) mostraram que quando este gene é silenciado leva ao surgimento de um processo degenerativo muscular decorrente da deficiência desta proteína. Entretanto, curiosamente, estes músculos foram regenerados de forma muito rápida e eficaz, o que levou a uma

análise mais detalhada das células-satélite destes animais. Verificou-se que a proteína  $\alpha$ -DG se manteve funcional e, com isso, estas células mantiveram boa capacidade proliferativa e regenerativa, reparando o músculo lesionado. Estes resultados levaram os autores à sugestão de que um mecanismo de glicosilação da  $\alpha$ -DG funcional constitui importante requisito para o bom funcionamento e renovação das células-satélite (Cohn, Henry *et al.*, 2002).

O balanço entre a capacidade degenerativa e regenerativa do músculo constitui ponto importante do processo distrófico onde as células-satélite desempenham um papel fundamental. Nossos resultados sugerem que há diferenças na expressão dos genes da via de degeneração dependendo do grau de afecção do músculo, pois o gene *TGF $\beta$ -1* foi expresso no músculo distrófico independentemente do grau de comprometimento do tecido, enquanto o gene *PCOL* parece ser ativado nos estágios iniciais deste processo. A cascata de degeneração de cada via patofisiológica atuou de forma diversa na ativação da regeneração, com diferenças na indução da proliferação das células-satélite, mas sem alterações no estímulo à diferenciação. Defeitos em proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DGC) podem, portanto, levar também a alterações específicas na capacidade de proliferação destas células, o que pode resultar no processo de regeneração deficiente nos modelos envolvidos. Assim, a disfunção na população de células-satélite pode representar um mecanismo importante na patogênese da distrofia muscular.

### **3. Criação do camundongo duplo-mutante para DMD e CMD-1A**

A importância da organização e preservação de complexos de proteínas musculares associadas à membrana já foi evidenciado através do efeito devastador que mutações nos respectivos genes causam, levando a diferentes quadros de distrofias musculares (Ervasti e Campbell, 1993; Durbeej, Henry *et al.*, 1998; Cohn e Campbell, 2000). Neste sentido, diversos estudos vêm sendo realizados para ampliar os conhecimentos acerca da interação entre as proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DGC), tanto em pacientes como em modelos animais que mimetizam doenças humanas (Vainzof, Ayub-Guerrieri *et al.*, 2008). Alguns destes estudos avaliam o efeito de mutações em duas proteínas diferentes, para melhor entendimento do mecanismo envolvido na patogênese das doenças causadas por cada uma delas. Mutações no gene da utrofina, por exemplo, foram introduzidas na linhagem *mdx* com deficiência de distrofina, para verificar o efeito da deficiência destas proteínas no fenótipo deste camundongo. Isto porque a utrofina é muito semelhante à distrofina, e se expressa na membrana das fibras musculares somente nos estágios iniciais de desenvolvimento muscular. O camundongo *mdx*-utrofina<sup>-/-</sup> apresenta fenótipo muito mais grave que o *mdx* comprovando a importância da presença da utrofina para o correto desenvolvimento do músculo. Atualmente este modelo é utilizado em estudos de quantificação de expressão gênica, ensaios terapêuticos, entre outros (Janssen, Hiranandani *et al.*, 2005; Baker, Kearney *et al.*, 2006; Kawano, Ishizaki *et al.*, 2008; Zhou, Rafael-Fortney *et al.*, 2008).

A criação do camundongo *mdx-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* -/- visou melhor avaliar o efeito da deficiência concomitante das proteínas distrofina e  $\alpha$ 2-laminina. Estas duas proteínas se localizam nos pólos opostos do DGC, com a distrofina ligando o complexo à maquinaria contrátil, no interior da fibra muscular, enquanto a  $\alpha$ 2-laminina completa esta ancoragem, através de sua ligação na matriz extracelular (Durbeej e Campbell, 2002). Pacientes com deficiência de distrofina não apresentam deficiência secundária de  $\alpha$ 2-laminina (Rampoldi, Meola *et al.*, 1986), apesar de ocorrer a deficiência secundária do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (Ervasti e Campbell, 1993; Rando, 2001; Durbeej e Campbell, 2002), e pacientes com deficiência total de  $\alpha$ 2-laminina não apresentam redução secundária nos níveis de distrofina nem nas outras proteínas do DGC (ter Laak, Leyten *et al.*, 1998) e seu quadro clínico é grave, causado pelo rompimento da matriz extracelular (Tome, Evangelista *et al.*, 1994). Desta forma, embora estas duas proteínas participem da ancoragem do complexo DGC na membrana da fibra muscular, a interação entre elas ainda não está totalmente elucidada.

Os cruzamentos de camundongos *mdx* e heterozigotos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* foram desenhados de forma a obter duplo-mutantes em F3. As avaliações e genotipagem das ninhadas de cada cruzamento possibilitaram a comprovação de que este animal duplo-mutante é viável, pois o numero de animais afetados se manteve dentro da proporção mendeliana esperada de 25%.

Ate a presente data, obtivemos quatro animais vivos para acompanhamento fenotípico e estabelecimento da história natural deste novo modelo. O início dos sinais clínicos é claramente mais precoce do que nos modelos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *mdx*, e a fraqueza muscular é mais generalizada e evidente neste modelo. O típico comprometimento das patas traseiras do modelo *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* já é evidente neste o animal com 1 mês de idade. Diferentemente dos modelos *mdx* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, este duplo-mutante apresenta alterações oculares, que podem ser facilmente identificadas desde 3 semanas de vida, antes mesmo da manifestação da fraqueza muscular (Figura 31). Este fenótipo auxilia na identificação dos animais duplo-mutantes antes mesmo da finalização da genotipagem,

Pacientes com CMD1A - deficientes para  $\alpha$ 2-laminina e pacientes com DMD não apresentam geralmente alterações oculares evidentes. Estas alterações, associadas a déficit de função neurológica e acometimento dos olhos e músculos da face são mais frequentes em distrofias musculares congênitas com defeitos na via de glicosilação da proteína  $\alpha$ -dystroglicana (Leyten, Gabreels *et al.*, 1992; Laverda, Battaglia *et al.*, 1993). É possível, portanto, que a deficiência concomitante da distrofina e da  $\alpha$ 2-laminina levem a um desequilíbrio do DGC, e à conseqüente falta da  $\alpha$ -dystroglicana, resultando no fenótipo ocular observado.

Estudos complementares de proteínas musculares serão ainda realizados neste novo modelo para verificar a presença ou não das demais proteínas do DGC e sua relação com o padrão de degeneração/regeneração muscular.

### **Efeito da mutação de *Lama2* em heterozigose no *mdx***

Nas diversas formas de distrofias humanas, observa-se uma grande variabilidade no quadro clínico dos pacientes. Pacientes portadores de mutações no mesmo gene, ou mesmo da mesma mutação podem apresentar quadro clínico muito diferente. Isto também é observado em diversos pacientes de uma mesma família. Portanto, existe uma busca por genes modificadores que poderiam explicar esta variabilidade.

Em nossos cruzamentos para a obtenção do camundongo duplo-mutante distrofina- $\alpha$ 2-laminina obtivemos diversos animais *mdx*, heterozigotos para *Lama2*. Decidimos verificar se nestes animais a expressão de 50% de proteína  $\alpha$ 2-laminina poderia interferir no fenótipo do *mdx*. A avaliação funcional mostrou que não há diferenças no padrão de fraqueza muscular destes animais. Uma análise protéica preliminar mostrou expressão aparentemente normal da  $\alpha$ 2-laminina nas fibras musculares do animal *mdx-Lama2<sup>dy-2J</sup>/J +/-*. Estes resultados sugerem que possivelmente não ocorre redução significativa desta proteína.

Portanto, uma redução na expressão da  $\alpha$ 2-laminina não parece exercer efeito modificador no fenótipo do modelo *mdx*.

## Conclusões

---

**Estudo do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de medulas óssea nos modelos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* (deficiente para a proteína  $\alpha 2$ -laminina) e *Large<sup>myd</sup>* (defeito de glicosilação).**

- Células-tronco mesenquimais de medula, expressando a proteína *eGFP*, injetadas por via sistêmica em camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>* não foram localizadas posteriormente no músculo dos animais testados.
- Testes complementares mostraram que células MSC e C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> expressando *eGFP* permanecem por curtos períodos de tempo no tecido injetado, sugerindo que estas são eliminadas no músculo distrófico em virtude da expressão permanente de *eGFP*.
- Análise funcional realizada nestes animais mostrou uma grande heterogeneidade de resposta nos diversos testes aplicados, compatível com a variabilidade clínica também observada em pacientes humanos.

**Estudo da expressão relativa dos genes envolvidos nas vias de degeneração: *TGF $\beta$ -1* e pró-colágeno *1 $\alpha$ 2*; e regeneração: *MyoD*, *Myf5* e miogenina, nos diferentes modelos murinos para distrofias musculares**

- O gene *TGF $\beta$ -1* é ativado pelo processo distrófico em qualquer grau de degeneração, enquanto a ativação da expressão do gene *PCOL* possivelmente ocorre nos estágios iniciais deste processo.
- Cada mecanismo patofisiológico atuou de forma diversa na ativação da regeneração, com diferenças na indução da proliferação das células-satélite, mas sem alterações no estímulo à diferenciação.
- A disfunção na população de células-satélite pode representar um mecanismo importante na patogênese das distrofias musculares.

**Estudo do papel da distrofina e  $\alpha 2$ -laminina na organização do complexo distrofina-glicoproteínas associadas no músculo esquelético, através da produção de um camundongo duplo-mutante deficiente para estas duas proteínas.**

- O modelo murino duplo-mutante para as proteínas distrofina e  $\alpha 2$ -laminina foi gerado a partir de cruzamentos das linhagens *mdx* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, com a proporção mendeliana esperada.
- Este animal é viável, e está apresentando fraqueza muscular mais acentuada que os modelos parentais.
- Estudos complementares de proteínas musculares serão ainda realizados neste novo modelo para verificar a presença ou não das demais proteínas do DGC e sua relação com o padrão de degeneração/regeneração muscular.

## Resumo

---

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. A fraqueza muscular se manifesta quanto existe um desequilíbrio entre os ciclos de degeneração e regeneração, com subsequente substituição por tecido conjuntivo e adiposo das fibras musculares eliminadas. Diversos fatores estão implicados nestes processos, e as vias de atuação de cada um deles ainda não são totalmente conhecidas. Os mais importantes marcadores da via miogênica são os fatores Myf5, MyoD, Myf6 e miogenina. Os marcadores da degeneração, por sua vez, são o TGF $\beta$ -1, citocina inflamatória provavelmente envolvida no processo de fibrose do músculo distrófico, e o aumento da expressão do próprio colágeno, componente da matriz extracelular.

O objetivo do presente projeto consistiu em estudar os fatores relacionados com as vias de degeneração e regeneração em modelos murinos distróficos com diferentes defeitos nas proteínas musculares, para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, visando terapias. Para tal, foram estabelecidas três abordagens: 1-) Estudar o potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de medulas óssea, nos modelos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* (deficiente para a proteína  $\alpha$ 2-laminina) e *Large<sup>myd</sup>* (defeito de glicosilação); 2-) Estudar a expressão relativa dos genes envolvidos nas vias de degeneração e regeneração nos diferentes modelos murinos para distrofias musculares; 3-) Estudar o papel da distrofina e  $\alpha$ 2-laminina na organização do complexo distrofina-glicoproteínas associadas no músculo esquelético, através da produção de um camundongo duplo-mutante deficiente para estas duas proteínas.

Na primeira abordagem, células-tronco mesenquimais de medula, expressando a proteína *eGFP*, foram injetadas por via sistêmica em camundongos *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*, mas não foram localizadas posteriormente no músculo dos animais testados. Testes complementares mostraram que células MSC e C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> expressando *eGFP* permanecem por curtos períodos de tempo no tecido injetado, sugerindo que são eliminadas do músculo distrófico em virtude da expressão permanente de *eGFP*. Análise funcional realizada nestes animais mostrou uma grande heterogeneidade de resposta nos diversos testes aplicados, compatível com a variabilidade clínica também observada em pacientes humanos.

Na segunda abordagem, analisamos a expressão dos genes da cascata de degeneração e regeneração nos modelos distróficos *mdx*, *SJL/J*, *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* e *Large<sup>myd</sup>*, e correlacionamos estes resultados com o padrão histopatológico de cada modelo. Os resultados observados sugerem que o gene *TGF $\beta$ -1* é ativado pelo processo distrófico em qualquer grau de degeneração, enquanto a ativação da expressão do gene *PCOL* possivelmente ocorre nos estágios iniciais deste processo. Observou-se também que cada mecanismo patofisiológico atuou de forma diversa na ativação da regeneração, com diferenças na indução da proliferação das células-satélite, mas sem alterações no estímulo à diferenciação. Assim, a disfunção na população de células-satélite pode representar um mecanismo importante na patogênese das distrofias musculares.

Na terceira abordagem, um modelo murino duplo-mutante para as proteínas distrofina e  $\alpha$ 2-laminina foi gerado a partir de cruzamentos das linhagens *mdx* e *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J*, com a proporção mendeliana esperada, sendo, portanto, viável. O animal duplo-afetado está apresentando fraqueza muscular mais acentuada que os modelos parentais. Estudos complementares de proteínas musculares serão ainda realizados neste novo modelo para verificar a presença ou não das demais proteínas do DGC e sua relação com o padrão de degeneração/regeneração muscular.

# Abstract

---

## Study of degeneration and regeneration pathways, in mice models for muscular dystrophies

The muscular dystrophies are a heterogeneous group of genetic diseases characterized by progressive and irreversible degeneration of skeletal muscles. Muscle weakness is the consequence of an imbalance between successive cycles of degeneration and regeneration, with further replacement of the degraded muscle fibers by adipose and connective tissues. Several factors are involved these processes and the respective functional pathways are still not well known. *Myf5*, *MyoD*, *Myf6* and myogenin are important factors responsible for the myogenesis and regeneration in the muscle. One important marker for the degeneration is TGF $\beta$ -1, which is an inflammatory cytokine with a possible role in the stimulation of fibrosis in the dystrophic muscle through the activation of genes related to the expression of collagen.

The main objective of this project was to study the factors involved in the degeneration and regeneration pathways, in mice models for muscular dystrophies, carrying different defects in muscle proteins, to better understand the involved pathophysiological mechanisms, aiming future therapies.

This was done through three strategies:

1-) The study of the therapeutic potential of transplantation of bone marrow mesenchymal-*eGFP* transformed stem cells, in *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* ( $\alpha$ 2 laminin deficient mice) and *Large<sup>myd</sup>* (mice with defect in the glycosilation of  $\alpha$ -DG) ;

2-) The analyses of the relative expression of genes involved in regeneration and degeneration, in different mice models for muscular dystrophies;

3-) The study of the roles of dystrophin and  $\alpha$ 2-laminin proteins in the organization of the dystrophin-glycoprotein complex in muscle sarcolemma through the generation of a new mouse model, double-mutant for these two proteins.

In the first approach, bone marrow mesenchymal stem cells expressing eGFP protein were intravenously injected in *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* and *Large<sup>myd</sup>* mice, but these cells were not localized in the muscle of the tested animals after 3 months of experiment. Complementary studies showed that MSC and C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells expressing *eGFP*, when directly injected in the muscle of these models, were retained for only a few days, suggesting a rejection against cells expressing *eGFP* in the dystrophic muscle. Functional analysis showed a high variability among the tested mice, which is similar to the significant clinical variability observed in human patients with muscular dystrophies.

In the second approach we quantified the expression of genes involved in degeneration and regeneration pathways in the dystrophic models *mdx*, *SJL/J*, *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* and *Large<sup>myd</sup>*, and correlated these data with muscle histopathological pattern of each model. The result suggests that TGF $\beta$ -1 gene is activated in the dystrophic process in all the stages of degeneration while the activation of the expression of the *PCOL* gene possibly occurs in earliest stages of this process. We also observed that each physiopathological mechanism acted differently in the activation of regeneration, with differences in the induction of proliferation of satellite cells, but with no alterations in stimulation to differentiation. Dysfunction of satellite cells can therefore be an important additional mechanism of pathogenesis in the dystrophic muscle.

In the third approach we generated a new dystrophic mouse model, carrying two simultaneous deficiencies of the proteins dystrophin and  $\alpha$ 2-laminin, by crossing *mdx* and *Lama2<sup>dy-2J</sup>/J* strains. In the offspring, the proportion of affected double-mutant mice was within the expected mendelian proportion, showing therefore, the viability of these defects with life. Only 4 alive animals were obtained up to the present date, and they are being followed for clinical characterization. The phenotype of this double-mutant mouse is very severe, presenting significant weakness, starting earlier and progressing faster than the parental strains. When more affected animals will be available, additional protein studies will be done to verify the effect of these two deficiencies in the organization of the DGC complex and its effect on the cascades of muscle degeneration and regeneration.



# Biografia

---

## Formação acadêmica

- 2001 – 2005 - Graduação em Ciências Biológicas. Bacharelado e Licenciatura. - Universidade de São Paulo.
- 1997 – 1998 - Normal pós-médio (formação de professores). - Centro de Estudos Educacionais Vera Cruz, CEVEC

## Produção bibliográfica

### *Artigos completos publicados em periódicos*

- Vainzof, Mariz; Ayub-Guerrieri, Danielle; Onofre, Paula C. G.; Martins, Poliana C. M.; Lopes, Vanessa F.; Zilberztajn, Dinorah; Maia, Lucas S.; Sell, Karen; Yamamoto, Lydía U. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, p. 241-248, 2008.

### *Resumos publicados em anais de congressos*

- ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G.; Martins, P. C. M.; Lopes, V. F.; Ayub-Guerrieri, D.; Vainzof, M. Gene expression in muscle degeneration and regeneration pathways, in different mice models for muscular dystrophies.. In: 58th Annual Meeting, 2008, Philadelphia. The American Society of Human Genetics Abstracts. Rockville Pike, Bethesda : The American Society of Human Genetics, 2008. v. 1. p. 204-204.
- ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G.; Lopes, V. F.; Martins, P. C. M.; Ayub-Guerrieri, D.; Mori, C. M. C.; Vainzof, M. Caracterização do camundongo duplo-mutante para distrofia muscular de Duchenne (*mdx*) e distrofia muscular congênita 1A (*dy2j/dy2j*).. In: VI Congresso Paulista de Neurologia, 2007, Guarujá. Neurologia em Destaque. São Paulo : Associação Paulista de Medicina, 2007. p. 597-598.
- ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G.. Produção e purificação de receptores de morte recombinantes, padronizados em ensaios de apoptose. In: 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2003, Ribeirão Preto. Resumo do 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo : Sonopress Rimo Ind. e Com. Fonográfica LTDA., 2003.
- ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G.; da Silva, Ulisses R.; Weinlich, R.; Brumatti, G. Produção e purificação de Anexina V recombinante, padronizada em ensaios de apoptose. In: 10º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2002, Ribeirão Preto. 2002 SIICUSP - 10º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo : Sonopress Rimo Ind. e Com. Fonográfica LTDA., 2002.

### *Participação em eventos*

- 58th Annual Meeting - The American Society of Human Genetics: Gene expression in muscle degeneration and regeneration pathways, in different mice models for muscular dystrophies.. 2008.
- VI Congresso Paulista de Neurologia: Caracterização do camundongo duplo-mutante para distrofia muscular de Duchenne (*mdx*) e distrofia muscular congênita 1A (*dy2j/dy2j*). 2007.
- II Seminário Latino-Americano de Tecnologia de Cultivos Celulares. 2006. (Seminário).
- Simpósio de Células-Tronco Adultas e Embrionárias. 2006. (Simpósio).
- Curso de Treinamento no Uso de Animais de Experimentação. 2006. (Curso).
- 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. 2003. (Simpósio).
- 10º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. 2002. (Simpósio).
- II Congresso Latino-Americano e III Congresso Brasileiro do Bem-Estar Animal. 2000. (Congresso).
- 2º Encontro: Alternativas e éticas sobre o uso de animais para fins didáticos. 2000. (Encontro).

### *Outras Atividades*

- Professora de Biologia do programa Pró-Universitário (Curso preparatório para vestibular). Participação nos encontros de capacitação geral e específica, elaboração do plano de atividades a ser desenvolvido junto aos alunos da rede pública durante o projeto, elaboração de relatórios parciais e finais, acompanhamento e avaliação dos alunos, criação de situações de ensino-aprendizado.

## Referências Bibliográficas

---

- Agbulut, O., Huet, A., *et al.* (2007). "Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin." J Biol Chem **282**(14): 10465-71.
- Al Rabi, N., Graziani, R., *et al.* (2002). "Clinical and radiological evolution of a case of idiopathic retroperitoneal fibrosis treated with Tamoxifen." Scand J Urol Nephrol **36**(5): 391-2.
- Alderton, J. M. e Steinhardt, R. A. (2000). "How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes." Trends Cardiovasc Med **10**(6): 268-72.
- Assereto, S., Stringara, S., *et al.* (2006). "Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment." Am J Physiol Cell Physiol **290**(2): C577-82.
- Auda-Boucher, G., Rouaud, T., *et al.* (2007). "Fetal muscle-derived cells can repair dystrophic muscles in mdx mice." Exp Cell Res **313**(5): 997-1007.
- Ayub-Guerrieri, D. (2008). Estudo do potencial miogênico das células tronco mesenquimais e embrionárias no modelo murino da Distrofia Muscular de Duchenne. Genética e Biologia Evolutiva. São Paulo, Universidade de São Paulo. **Mestrado**: 114.
- Baker, P. E., Kearney, J. A., *et al.* (2006). "Analysis of gene expression differences between utrophin/dystrophin-deficient vs mdx skeletal muscles reveals a specific upregulation of slow muscle genes in limb muscles." Neurogenetics **7**(2): 81-91.
- Barton, E. R., Morris, L., *et al.* (2002). "Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice." J Cell Biol **157**(1): 137-48.
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., *et al.* (2000). "Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells." J Cell Biol **151**(6): 1221-34.
- Bernasconi, P., Torchiana, E., *et al.* (1995). "Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine." J Clin Invest **96**(2): 1137-44.
- Berry, S. E., Liu, J., *et al.* (2007). "Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx/utrn<sup>-/-</sup> mouse model for Duchenne muscular dystrophy." Regen Med **2**(3): 275-88.
- Bittner, R. E., Anderson, L. V., *et al.* (1999). "Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B." Nat Genet **23**(2): 141-2.
- Brand-Saberi, B. e Christ, B. (1999). "Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates." Cell Tissue Res **296**(1): 199-212.
- Braun, T. e Arnold, H. H. (1996). "Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages." Embo J **15**(2): 310-18.
- Brazelton, T. R. e Blau, H. M. (2005). "Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo." Stem Cells **23**(9): 1251-65.
- Browning, C. A., Grewal, P. K., *et al.* (2005). "A rapid PCR method for genotyping the Large(myd) mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **15**(5): 331-5.

- Bubnic, S. J., Nagy, A., *et al.* (2005). "Donor hematopoietic cells from transgenic mice that express GFP are immunogenic in immunocompetent recipients." Hematology **10**(4): 289-95.
- Buckingham, M., Bajard, L., *et al.* (2003). "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." J Anat **202**(1): 59-68.
- Bulfield, G., Siller, W. G., *et al.* (1984). "X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(4): 1189-92.
- Campion, D. R. (1984). "The muscle satellite cell: a review." Int Rev Cytol **87**: 225-51.
- Cerletti, M., Jurga, S., *et al.* (2008). "Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles." Cell **134**(1): 37-47.
- Chan, J., Waddington, S. N., *et al.* (2007). "Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse." Stem Cells **25**(4): 875-84.
- Charge, S. B. e Rudnicki, M. A. (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." Physiol Rev **84**(1): 209-38.
- Chau, D., Mancoll, J. S., *et al.* (1998). "Tamoxifen downregulates TGF-beta production in keloid fibroblasts." Ann Plast Surg **40**(5): 490-3.
- Chen, J. C. e Goldhamer, D. J. (2003). "Skeletal muscle stem cells." Reprod Biol Endocrinol **1**: 101.
- Chiavegatto, S., Sun, J., *et al.* (2000). "A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice." Exp Neurol **166**(2): 227-34.
- Choi, J., Costa, M. L., *et al.* (1990). "MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 7988-92.
- Chretien, F., Dreyfus, P. A., *et al.* (2005). "In vivo fusion of circulating fluorescent cells with dystrophin-deficient myofibers results in extensive sarcoplasmic fluorescence expression but limited dystrophin sarcolemmal expression." Am J Pathol **166**(6): 1741-8.
- Cohn, R. D. e Campbell, K. P. (2000). "Molecular basis of muscular dystrophies." Muscle Nerve **23**(10): 1456-71.
- Cohn, R. D., Henry, M. D., *et al.* (2002). "Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration." Cell **110**(5): 639-48.
- Cohn, R. D., van Erp, C., *et al.* (2007). "Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states." Nat Med **13**(2): 204-10.
- Collins, C. A., Zammit, P. S., *et al.* (2007). "A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging." Stem Cells **25**(4): 885-94.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., *et al.* (2005). "The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice." Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 571-625.
- Cubitt, A. B., Heim, R., *et al.* (1995). "Understanding, improving and using green fluorescent proteins." Trends Biochem Sci **20**(11): 448-55.
- Cui, C. H., Uyama, T., *et al.* (2007). "Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation." Mol Biol Cell **18**(5): 1586-94.

- Deans, R. J. e Moseley, A. B. (2000). "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses." Exp Hematol **28**(8): 875-84.
- Deasy, B. M., Lu, A., *et al.* (2007). "A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency." J Cell Biol **177**(1): 73-86.
- Dell'Agnola, C., Wang, Z., *et al.* (2004). "Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs." Blood **104**(13): 4311-8.
- DiMario, J. X., Uzman, A., *et al.* (1991). "Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle." Dev Biol **148**(1): 314-21.
- Dubowitz, V. (1975). "Neuromuscular disorders in childhood. Old dogmas, new concepts." Arch Dis Child **50**(5): 335-46.
- Dubowitz, V., Sewry, C. A., *et al.* (2007). Muscle biopsy : a practical approach. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Durbeej, M. e Campbell, K. P. (2002). "Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models." Curr Opin Genet Dev **12**(3): 349-61.
- Durbeej, M., Henry, M. D., *et al.* (1998). "Dystroglycan in development and disease." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 594-601.
- Ervasti, J. M. e Campbell, K. P. (1993). "A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin." J Cell Biol **122**(4): 809-23.
- Fabb, S. A., Wells, D. J., *et al.* (2002). "Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice." Hum Mol Genet **11**(7): 733-41.
- Feng, S. W., Lu, X. L., *et al.* (2008). "Dynamic distribution of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and change of pathology after infusing into mdx mice." Cytotherapy **10**(3): 254-64.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., *et al.* (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." Science **279**(5356): 1528-30.
- Ferrari, G. e Mavilio, F. (2002). "Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy?" Neuromuscul Disord **12 Suppl 1**: S7-10.
- Fischbach, G. D. e Fischbach, R. L. (2004). "Stem cells: science, policy, and ethics." J Clin Invest **114**(10): 1364-70.
- Gambotto, A., Dworacki, G., *et al.* (2000). "Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope." Gene Ther **7**(23): 2036-40.
- Garcia, S., García, C. (2001). Embriologia. Porto Alegre, Artmed.
- Gargioli, C., Coletta, M., *et al.* (2008). "PIGF-MMP-9-expressing cells restore microcirculation and efficacy of cell therapy in aged dystrophic muscle." Nat Med **14**(9): 973-8.
- Gawronska-Kozak, B., Manuel, J. A., *et al.* (2007). "Ear mesenchymal stem cells (EMSC) can differentiate into spontaneously contracting muscle cells." J Cell Biochem **102**(1): 122-35.
- Ghedini, P. C., Viel, T. A., *et al.* (2008). "Increased expression of acetylcholine receptors in the diaphragm muscle of MDX mice." Muscle Nerve **38**(6): 1585-94.
- Goetsch, S. C., Hawke, T. J., *et al.* (2003). "Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration." Physiol Genomics **14**(3): 261-71.

- Goncalves, M. A., de Vries, A. A., *et al.* (2006). "Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion." *Hum Mol Genet* **15**(2): 213-21.
- Goncalves, M. A., Swildens, J., *et al.* (2008). "Genetic complementation of human muscle cells via directed stem cell fusion." *Mol Ther* **16**(4): 741-8.
- Gosselin, L. E., Williams, J. E., *et al.* (2004). "Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle." *Muscle Nerve* **30**(5): 645-53.
- Grande, J. P., Melder, D. C., *et al.* (1997). "Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV." *J Lab Clin Med* **130**(5): 476-86.
- Grewal, P. K. e Hewitt, J. E. (2002). "Mutation of Large, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy." *Biochim Biophys Acta* **1573**(3): 216-24.
- Guo, L. T., Zhang, X. U., *et al.* (2003). "Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice." *Neuromuscul Disord* **13**(3): 207-15.
- Hagiwara, H., Ohsawa, Y., *et al.* (2006). "Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy." *FEBS Lett* **580**(18): 4463-8.
- Hartel, J. V., Granchelli, J. A., *et al.* (2001). "Impact of prednisone on TGF-beta1 and collagen in diaphragm muscle from mdx mice." *Muscle Nerve* **24**(3): 428-32.
- Hawke, T. J. e Garry, D. J. (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol* **91**(2): 534-51.
- Hoffman, E. P. e Dressman, D. (2001). "Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy." *Trends Pharmacol Sci* **22**(9): 465-70.
- Hortelano, G., Wang, L., *et al.* (2001). "Sustained and therapeutic delivery of factor IX in nude haemophilia B mice by encapsulated C2C12 myoblasts: concurrent tumorigenesis." *Haemophilia* **7**(2): 207-14.
- Ignatz, R. A. e Massague, J. (1986). "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix." *J Biol Chem* **261**(9): 4337-45.
- Janssen, P. M., Hiranandani, N., *et al.* (2005). "Utrophin deficiency worsens cardiac contractile dysfunction present in dystrophin-deficient mdx mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(6): H2373-8.
- Jemiolo, B. e Trappe, S. (2004). "Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise." *Biochem Biophys Res Commun* **320**(3): 1043-50.
- Kapsa, R., Kornberg, A. J., *et al.* (2003). "Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy." *Lancet Neurol* **2**(5): 299-310.
- Karpati, G. G., R.; Molnar, M. (2002). The principles of therapies and prevention based on cellular and molecular mechanisms of muscle disease. *Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases*. Basel, ISN Neuropath Press.
- Kawano, R., Ishizaki, M., *et al.* (2008). "Transduction of full-length dystrophin to multiple skeletal muscles improves motor performance and life span in utrophin/dystrophin double knockout mice." *Mol Ther* **16**(5): 825-31.
- Kerkis, I., Ambrosio, C. E., *et al.* (2008). "Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?" *J Transl Med* **6**: 35.

- Khurana, T. S. e Davies, K. E. (2003). "Pharmacological strategies for muscular dystrophy." Nat Rev Drug Discov **2**(5): 379-90.
- Koenig, M., Beggs, A. H., *et al.* (1989). "The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion." Am J Hum Genet **45**(4): 498-506.
- Kramer, R., Lochmuller, H., *et al.* (1998). "Myotonic ADR-MDX mutant mice show less severe muscular dystrophy than MDX mice." Neuromuscul Disord **8**(8): 542-50.
- Krenn, V., Gorka, P., *et al.* (1988). "On the origin of cells determined to form skeletal muscle in avian embryos." Anat Embryol (Berl) **179**(1): 49-54.
- Kuhr, C. S., Lupu, M., *et al.* (2007). "Hematopoietic cell transplantation directly into dystrophic muscle fails to reconstitute satellite cells and myofibers." Biol Blood Marrow Transplant **13**(8): 886-8.
- Laverda, A. M., Battaglia, M. A., *et al.* (1993). "Congenital muscular dystrophy, brain and eye abnormalities: one or more clinical entities?" Childs Nerv Syst **9**(2): 84-7.
- Lee, J. Y., Paik, S. Y., *et al.* (2004). "Long term effects of muscle-derived stem cells on leak point pressure and closing pressure in rats with transected pudendal nerves." Mol Cells **18**(3): 309-13.
- Leyten, Q. H., Gabreels, F. J., *et al.* (1992). "Congenital muscular dystrophy with eye and brain malformations in six Dutch patients." Neuropediatrics **23**(6): 316-20.
- Li, S., Kimura, E., *et al.* (2006). "A highly functional mini-dystrophin/GFP fusion gene for cell and gene therapy studies of Duchenne muscular dystrophy." Hum Mol Genet **15**(10): 1610-22.
- Li, X., McFarland, D. C., *et al.* (2008a). "Effect of Smad3-mediated transforming growth factor-beta1 signaling on satellite cell proliferation and differentiation in chickens." Poult Sci **87**(9): 1823-33.
- Li, X., McFarland, D. C., *et al.* (2008b). "Extracellular matrix proteoglycan decorin-mediated myogenic satellite cell responsiveness to transforming growth factor-beta1 during cell proliferation and differentiation Decorin and transforming growth factor-beta1 in satellite cells." Domest Anim Endocrinol **35**(3): 263-73.
- Li, Y., Foster, W., *et al.* (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 **164**(3): 1007-19.
- Lindon, C., Montarras, D., *et al.* (1998). "Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts." J Cell Biol **140**(1): 111-8.
- Liu, Y., Yan, X., *et al.* (2007). "Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice." Stem Cells Dev **16**(5): 695-706.
- Longman, C., Brockington, M., *et al.* (2003). "Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan." Hum Mol Genet **12**(21): 2853-61.
- Meier, H. e Southard, J. L. (1970). "Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy-locus." Life Sci **9**(3): 137-44.
- Mercuri, E., Bushby, K., *et al.* (2005). "Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures." Neuromuscul Disord **15**(2): 164-71.
- Mercuri, E., Cini, C., *et al.* (2003). "Muscle magnetic resonance imaging in patients with congenital muscular dystrophy and Ullrich phenotype." Neuromuscul Disord **13**(7-8): 554-8.

- Mercuri, E., Topaloglu, H., *et al.* (2006). "Spectrum of brain changes in patients with congenital muscular dystrophy and FKRP gene mutations." Arch Neurol **63**(2): 251-7.
- Minguell, J. J., Conget, P., *et al.* (2000). "Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells." Braz J Med Biol Res **33**(8): 881-7.
- Motohashi, N., Uezumi, A., *et al.* (2008). "Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts." Am J Pathol **173**(3): 781-91.
- Muntoni, F., Brockington, M., *et al.* (2002). "Defective glycosylation in muscular dystrophy." Lancet **360**(9343): 1419-21.
- Muntoni, F., Brown, S., *et al.* (2002). "Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders." Neuromuscul Disord **12**(5): 438-46.
- Narita, Y., Yamawaki, A., *et al.* (2008). "Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage." Cell Tissue Res.
- Nawrotzki, R., Blake, D. J., *et al.* (1996). "The genetic basis of neuromuscular disorders." Trends Genet **12**(8): 294-8.
- Nunes, V. A., Cavacana, N., *et al.* (2007). "Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin in vitro only after exposure to in vivo muscle environment." Biol Cell **99**(4): 185-96.
- Ohlendieck, K. e Campbell, K. P. (1991). "Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice." J Cell Biol **115**(6): 1685-94.
- Okabe, M., Ikawa, M., *et al.* (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." FEBS Lett **407**(3): 313-9.
- Overall, C. M., Wrana, J. L., *et al.* (1991). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression." J Biol Chem **266**(21): 14064-71.
- Page, D. L. e Glenner, G. G. (1972). "Social interaction and wounding in the genesis of "spontaneous" murine amyloidosis." Am J Pathol **67**(3): 555-67.
- Pastoret, C. e Seville, A. (1995). "mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age." J Neurol Sci **129**(2): 97-105.
- Payne, T. R., Oshima, H., *et al.* (2005). "Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells." Gene Ther **12**(16): 1264-74.
- Pereira, R. F., Halford, K. W., *et al.* (1995). "Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4857-61.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., *et al.* (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.
- Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., *et al.* (2007). "Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models." Mol Ther **15**(2): 431-8.

- Radonic, A., Thulke, S., *et al.* (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun **313**(4): 856-62.
- Rampoldi, E., Meola, G., *et al.* (1986). "A comparative analysis of collagen III, IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy biopsies and cell cultures." Eur J Cell Biol **42**(1): 27-34.
- Rando, T. A. (2001). "The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies." Muscle Nerve **24**(12): 1575-94.
- Re, F., Srinivasan, R., *et al.* (2004). "Green fluorescent protein expression in dendritic cells enhances their immunogenicity and elicits specific cytotoxic T-cell responses in humans." Exp Hematol **32**(2): 210-7.
- Resnicow, D. I., Hooft, A. M., *et al.* (2008). "GFP fails to inhibit actin-myosin interactions in vitro." Nat Methods **5**(3): 212-3; author reply 213-4.
- Roberts, M. L., Wells, D. J., *et al.* (2002). "Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in mdx mouse muscle." Hum Mol Genet **11**(15): 1719-30.
- Robertson, T. A., Maley, M. A., *et al.* (1993). "The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis." Exp Cell Res **207**(2): 321-31.
- Rosenzweig, M., Connoles, M., *et al.* (2001). "Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells." Blood **97**(7): 1951-9.
- Rudnicki, M. A., Braun, T., *et al.* (1992). "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." Cell **71**(3): 383-90.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., *et al.* (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." Cell **75**(7): 1351-9.
- Sampaolesi, M., Blot, S., *et al.* (2006). "Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs." Nature **444**(7119): 574-9.
- Sartor, B. M., Sartor, O., *et al.* (1995). "Analogous tamoxifen and estrogen effects on transforming growth factor-betas 1 and 2 in the rat uterus." Reprod Toxicol **9**(3): 225-31.
- Schmittgen, T. D. e Zakrajsek, B. A. (2000). "Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR." J Biochem Biophys Methods **46**(1-2): 69-81.
- Seale, P. e Rudnicki, M. A. (2000). "A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells." Dev Biol **218**(2): 115-24.
- Sewry, C. A., Taylor, J., *et al.* (1996). "Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **6**(6): 467-74.
- Sharma, K. e Ziyadeh, F. N. (1994). "The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases." Am J Physiol **266**(6 Pt 2): F829-42.
- Stripecke, R., Carmen Villacres, M., *et al.* (1999). "Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy." Gene Ther **6**(7): 1305-12.
- Sunada, Y., Bernier, S. M., *et al.* (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): 1055-61.



- Tavassoli, M., Soltaninia, J., *et al.* (2002). "Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1." Carcinogenesis **23**(10): 1569-75.
- ter Laak, H. J., Leyten, Q. H., *et al.* (1998). "Laminin-alpha2 (merosin), beta-dystroglycan, alpha-sarcoglycan (adhalin), and dystrophin expression in congenital muscular dystrophies: an immunohistochemical study." Clin Neurol Neurosurg **100**(1): 5-10.
- Tinsley, J. M., Potter, A. C., *et al.* (1996). "Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene." Nature **384**(6607): 349-53.
- Tome, F. M., Evangelista, T., *et al.* (1994). "Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency." C R Acad Sci III **317**(4): 351-7.
- Torrente, Y., Tremblay, J. P., *et al.* (2001). "Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)/Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice." J Cell Biol **152**(2): 335-48.
- Vainzof, M., Ayub-Guerrieri, D., *et al.* (2008). "Animal models for genetic neuromuscular diseases." J Mol Neurosci **34**(3): 241-8.
- Vainzof, M., Zubrzycka-Gaarn, E. E., *et al.* (1991). "Immunofluorescence dystrophin study in Duchenne dystrophy through the concomitant use of two antibodies directed against the carboxy-terminal and the amino-terminal region of the protein." J Neurol Sci **101**(2): 141-7.
- Van Meer, P. e Raber, J. (2005). "Mouse behavioural analysis in systems biology." Biochem J **389**(Pt 3): 593-610.
- van Reeuwijk, J., Grewal, P. K., *et al.* (2007). "Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome." Hum Genet **121**(6): 685-90.
- Vandesompele, J., De Preter, K., *et al.* (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Vieira, N. M., Brandalise, V., *et al.* (2008). "Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro." Biol Cell **100**(4): 231-41.
- Vieira, N. M., Bueno, C. R., Jr., *et al.* (2008). "Sj1 Dystrophic Mice Express A Significant Amount Of Human Muscle Proteins Following Systemic Delivery Of Human Adipose-Derived Stromal Cells Without Immunosuppression." Stem Cells.
- Vilquin, J. T., Guerette, B., *et al.* (1999). "Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles." Gene Ther **6**(5): 792-800.
- Vilquin, J. T., Vignier, N., *et al.* (2000). "Identification of homozygous and heterozygous dy2J mice by PCR." Neuromuscul Disord **10**(1): 59-62.
- Voet, D. V., J.; Pratt, C. (2000). Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre, Artes Médicas.
- Wagers, A. J. e Conboy, I. M. (2005). "Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis." Cell **122**(5): 659-67.
- Wakitani, S., Saito, T., *et al.* (1995). "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." Muscle Nerve **18**(12): 1417-26.
- Wang, B., Li, J., *et al.* (2000). "Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13714-9.
- Wang, Y., Mukherjee, S., *et al.* (2002). "Herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated gene transfer to muscle." Hum Gene Ther **13**(2): 261-73.

- Wang, Y., Schlegelsberg, P. N., *et al.* (1996). "Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin." Nature **379**(6568): 823-5.
- Weintraub, H. (1993). "The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds." Cell **75**(7): 1241-4.
- Weller, A. H., Magliato, S. A., *et al.* (1997). "Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss." Muscle Nerve **20**(1): 72-82.
- Wells, D. J., Ferrer, A., *et al.* (2002). "Immunological hurdles in the path to gene therapy for Duchenne muscular dystrophy." Expert Rev Mol Med **4**(23): 1-23.
- Wells, D. J. e Wells, K. E. (2002). "Gene transfer studies in animals: what do they really tell us about the prospects for gene therapy in DMD?" Neuromuscul Disord **12 Suppl 1**: S11-22.
- Wong, B. L. e Christopher, C. (2002). "Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal." J Child Neurol **17**(3): 183-90.
- Xu, H., Wu, X. R., *et al.* (1994). "Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene." Nat Genet **8**(3): 297-302.
- Yablonka-Reuveni, Z., Day, K., *et al.* (2008). "Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells." J Anim Sci **86**(14 Suppl): E207-16.
- Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M. A., *et al.* (1999). "The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD." Dev Biol **210**(2): 440-55.
- Zammit, P. S., Relaix, F., *et al.* (2006). "Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1824-32.
- Zanotti, S., Saredi, S., *et al.* (2007). "Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes." Matrix Biol **26**(8): 615-24.
- Zatz, M. (2001). Distrofias musculares Progressivas. Doenças Genéticas em pediatria. G. Carakushansky. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Zhou, L., Rafael-Fortney, J. A., *et al.* (2008). "Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice." J Neurol Sci **264**(1-2): 106-11.
- Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., *et al.* (1988). "The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle." Nature **333**(6172): 466-9.