

THAIS BORGES LESSA

Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma do mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57Bl10 com diferentes idades

São Paulo

2016

THAIS BORGES LESSA

Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma do mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57Bl10 com diferentes idades

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3272 FMVZ	<p>Lessa, Thais Borges Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma do mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57B110 com diferentes idades / Thais Borges Lessa. -- 2016. 105 f. il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.</p> <p>1. Distrofia muscular. 2. Função muscular. 3. mdx/utrn^{+/-}. 4. Utrofina. I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do diafragma de MDX em diferentes idades”, protocolado sob o nº 3044/2013, utilizando 80 (oitenta) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Comparative study of contractility and the passive properties of the MDX diaphragm in different ages”, protocol number 3044/2013, utilizing 80 (eighty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LESSA, Thais Borges

Título: Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma do mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57B110 com diferentes idades

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Helena Borges, Carlos Eduardo Martins Fontes, Luiz Antônio Lessa e Maria Helena Casemiro Borges, muito obrigada por todo carinho, amor, suporte e paciência.

Ao meu orientador Prof. Carlos Eduardo Ambrósio pela oportunidade de fazer meu mestrado e doutorado. Sou muito grata por toda sua paciência, dedicação e ensinamentos. Sem esta oportunidade minha vida jamais seria transformada e o meu sonho de ser o que eu sou hoje, jamais seria concretizado. Muito além de uma realização profissional, estes anos para mim, foi uma realização pessoal. Muito obrigada por fazer parte de todas essas etapas, certamente eu jamais esquecerei. Espero sempre podermos trabalhar em parcerias num futuro bem próximo.

Ao Prof. Dongsheng Duan e ao Dr. Chady Hakim, muito obrigada pela oportunidade de trabalhar e a desenvolver esta pesquisa em seu laboratório. Obrigada pelos ensinamentos e paciência. Certamente eu não tenho palavras para descrever minha gratidão por vocês.

À Prof. Maria Angélica Miglino, muito obrigada por ter aberto as portas deste departamento. Sou muito grata por tudo isso que me concedeu.

Aos Professores David Feder, muito obrigada por sempre me apoiar e dar suporte a todas as pesquisas por mim propostas.

À Fapesp e a Capes, muito obrigada por me oferecerem suporte durante este doutorado. Sem o apoio destas fundações a realização deste trabalho seria impossível. Mais uma vez obrigada por exercer este papel fundamental nesta pesquisa.

RESUMO

LESSA, T. B. **Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma do mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57Bl10 com diferentes idades.** [Comparative study of the active and passive properties in mdx/utrn^{+/-} and mdx with different ages]. 2016. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma importante e severa doença músculo degenerativa causada pela mutação do gene da distrofina. Na ausência da distrofina, o sarcolema das células torna-se vulnerável devido a danos induzidos por ciclos contínuos de degeneração e regeneração. Consequentemente, a força muscular diminui e as miofibras são substituídas por tecido fibrótico. Dentre os músculos esqueléticos afetados, o diafragma, destaca-se por ser o principal músculo respiratório acometido na DMD. Similarmente a DMD humana, o modelo mdx, apesar de exibir um fenótipo suave, este apresenta um severo acometimento no músculo diafragma, assim como observado em nosso estudo prévio, aqui descritos. Entretanto, este é considerado um modelo pobre, porque ele não consegue reproduzir, o fenótipo severo observado nos pacientes. O camundongo mdx/utrn^{+/-} (dystrophin-null heterozygous utrophin mice) com haploinsuficiência da utrofina, tem sido hipotetizado como um modelo com um fenótipo intermediário, ganhando popularidade nos laboratórios. Porém, infelizmente, até os dias de hoje, não existem evidências fisiológicas e funcionais suficientes que justifiquem a escolha deste modelo para as terapias experimentais. Portanto, neste estudo objetivou-se esclarecer a real contribuição do camundongo mdx/utrn^{+/-} para as terapias experimentais. Para testar esta hipótese, elegeu-se analisar a morfologia e a função muscular do músculo diafragma do mdx e mdx/utrn^{+/-} com 2 e 6 meses de idade. Para elucidar a morfopatologia do diafragma foi utilizado microscopia de luz e análises de imunohistoquímica. A função muscular do diafragma foi analisada através da avaliação das propriedades contráteis e passivas. A forma de como executar a função muscular do diafragma foi atualizada através da criação de dois clips, os quais permitiram avaliar o músculo de forma segura. A adaptação de um novo protocolo de avaliação da função muscular mostrou-se eficaz e capaz de ser utilizada para avaliar as propriedades contráteis e passivas. Aos 2 meses de idade, as colorações de Hematoxilina e eosina, Tricômio de Masson e Alizarina vermelha revelaram que o mdx/utrn⁺ apresentou maior quantidade de infiltrado inflamatório, tecido conectivo e áreas de calcificação do que o mdx. Já aos 6 meses de idade, não houve diferença morfológica entre o mdx e o mdx/utrn^{+/-}. Na análise de imunohistoquímica para eMyHC (miosina embrionária de cadeia pesada eMyHC), não foi

observada diferença entre o mdx e o mdx/utrn+/- aos 2 e 6 meses de idade. Entretanto, os resultados obtidos em ambas as idades, demonstraram a presença de regeneração muscular. Na marcação da proteína distrofina e utrofina, as células inflamatórias e os tipos de fibras musculares também foram detectados por imunohistoquímicas. A marcação da proteína distrofina, mostrou-se ausente no mdx e mdx/utrn+/- com 2 e 6 meses de idade. A marcação da proteína utrofina mostrou-se mais evidente no mdx do que no mdx/utrn+/-, evidenciando a haploinsuficiência nos mdx/utrn+/- . Macrófagos foram encontrados em maior quantidade no camundongo mdx/utrn+/- com 2 e 6 meses do que no mdx, mostrando que o processo de inflamação encontrou-se aumentado nos mdx/utrn+/- . Neutrófilos encontraram-se aumentados no mdx/utrn+/- com 2 meses, evidenciando a fase aguda da inflamação. Entretanto nos animais de 6 meses, quantidades semelhantes de neutrófilos foram detectadas no mdx/utrn+/- e mdx. Fibras marcadas pelas isoformas MyHC- I, IIa e IIx foram detectadas em maior porcentagem no BL10 do que no mdx e mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade, demonstrando que a diminuição destas, no mdx e mdx/utrn+/- pode colaborar para a diminuição da força nestes animais. Aos 6 meses, porcentagem similares de MyHC- I foram detectadas no BL10, mdx e mdx/utrn+/- . MyHC-IIa não foram encontradas nos animais de 6 meses. MyHC-IIx encontraram-se em maior porcentagem no BL10 do que no mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade. Baixa porcentagem de isoformas de MyHC- I/IIa foram detectadas no mdx e mdx/utrn+/- aos 2 e 6 meses de idade e encontraram-se ausentes no BL10 de mesma idade. Fibras marcadas pela isoformas MyHC-IIa/IIx apresentaram-se aumentadas no mdx e mdx/utrn+/- aos 2 e 6 meses, podendo este aumento auxiliar na manutenção da força muscular. MyHC-IIx-IIb foram detectadas em maior porcentagem no mdx, reduzidas no BL10 e ausentes no mdx/utrn+/- com 2 meses de idade. Estas não foram identificadas nos animais de 6 meses. As propriedades contráteis do camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade apresentaram-se mais comprometidas do que no mdx. P_t (contração isométrica máxima), sP_t (força específica de P_t), P_o (Força tetânica máxima) e sP_o (força específica de P_o) exibiram-se mais afetadas no mdx/utrn+/- do que no mdx. Porém aos 6 meses de idade não houve diferença significativa de força entre o mdx/utrn+/- e o mdx. As propriedades passivas do mdx/utrn+/- com 2 meses apresentou mais acometida do que no mdx. Entretanto, aos 6 meses, esta propriedade não se diferenciou entre o mdx/utrn+/- e o mdx. Em suma, conclui-se que o mdx/utrn+/- representa um modelo superior ao mdx com 2 meses de idade, uma vez que este apresentou morfologia, propriedades contráteis e passiva mais comprometidas do que no mdx. Aos 6 meses as propriedades contráteis e passivas e morfológicas do camundongo

mdx/utrn+/- não se diferenciou do mdx. Sugerimos que o uso do mdx/utrn+/- com 2 meses de idade pode potencializar os testes pré-clínicos.

Palavras chave: Distrofia muscular. Função muscular. mdx/utrn+/- . Utrofina.

ABSTRACT

LESSA, T. B. **Comparative study of the active and passive properties in mdx/utrn^{+/-} and mdx with different ages.** [Estudo comparativo da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma do mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57Bl10 com diferentes idades]. 2016. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an important and severe muscle wasting disease caused by a dystrophin mutation. In the absence of dystrophin, sarcolemma becomes vulnerable to damage due a damage caused by continuous cycles of degeneration-regeneration. Consequently, the muscle force reduces and the myofibers are replaced by fibrotic tissue. Between the skeletal muscles, the diaphragm is main affected muscle in DMD. Similarly, to a human DMD, despite the mdx model exhibit a milder phenotype, he presents the diaphragm muscle severely affected, as it was observed in our previous study, here described. However, it is also considered a poor model because it cannot reproduce the severe dystrophic phenotype seen in patients. An utrophin heterozygous utrophin mice (mdx/utrn^{+/-}), has been hypothesized as an intermediate model and they are gaining popularity in many laboratories. However unfortunately there is currently, no physiological enough evidence to justify the choice of this model for experimental therapies. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the real contribution of the mdx/utrn^{+/-} for the experimental therapies. To test this hypothesis, we evaluated the diaphragm muscle morphology and muscle function of the mdx and mdx/utrn^{+/-} with 2 and 6 months. To elucidate the diaphragm morphology, we used light microscopy techniques and immunostaining analysis. Muscle function was evaluated through the active and passive properties. The clamps allowed to safe evaluate the diaphragm function. The update of the new protocol was efficient and able to evaluate the active and passive properties. At 2 months, the Hematoxylin and eosin, Masson Thrichome, Alisarine red, revealed that the mdx/utrn⁺ showed more inflammatory infiltrate, connective tissue and more areas with calcification than mdx model. At 6 months, there was no significant differences between mdx and mdx/utrn⁺. In the immunohistochemical analysis for eMyHC (embryonic myosin heavy chain), there was no difference between mdx and mdx/utrn^{+/-} at 2 and 6 months. However, the results obtained in both ages, showed muscle regeneration Marking for dystrophin and utrophin protein, inflammatory cells and fiber type were also detected by immunohistochemistry. Marking for dystrophin was absent in mdx and mdx/utrn^{+/-} with 2 and 6 months. Marking for utrophin protein was more evident in mdx than in mdx/utrn^{+/-} mice, evidencing the utrophin haploinsufficiency in mdx/utrn^{+/-}. Macrophages

were increased in *mdx/utrn+/-* than in *mdx* mice with 2 and 6 months, showing an inflammation. Neutrophils were increased in *mdx/utrn+/-* at 2 month-old, evidencing the acute phase of inflammation. However, at 6 months similar amounts of neutrophil were detected in *mdx* and *mdx/utrn+/-*. Fibers marked by MyHC-I, Iia and Iix were detected in a higher percentage in BL10 than in *mdx* and *mdx/utrn+/-* at 2 months, showing that this change could collaborate with force decrease in these animals. At 6 months, similar percentage of MyHC-I was detected in BL10, *mdx* and *mdx/utrn+/-*. MyHC-Iia animals were not found at 6 months. Higher percentage of MyHC-Iix was found in BL10 than in *mdx* and *mdx/utrn+/-* with 6 months. Low percentage of MyHC-I/IIa was detected in *mdx* and *mdx/utrn+/-* at 2 and 6 months and it was absent in BL10 in the same age. Fibers marked by MyHC-IIa/Iix isoforms were increased in *mdx* and *mdx/utrn+/-* with 2 and 6 months. These changes could help to maintain the muscle force. MyHC-Iix-IIb was detected in higher percentage in *mdx*, reduced the BL10 and it was absent in *mdx/utrn+/-* with 2 months. MyHC-Iix-IIb was not identified in the animals with 6 months. Contractile properties in *mdx/utrn+/-* at 2 months were more affected than in *mdx* mice. P_t (maximal twitch force), sP_t (specific twitch force), P_o (maximal tetanic force) and sP_o (specific tetanic force) showed more severely affected in *mdx/utrn+/-* than in *mdx* mice. At 6 months there were no significant difference in P_t , sP_t , P_o and sP_o between *mdx/utrn+/-* and *mdx* mice. Passive properties of *mdx/utrn+/-* with 2 months presented more affected than the in *mdx* mice. However, at 6 months, this property did not differ between *mdx/utrn+/-* and *mdx* mice. In summary, we concluded that the *mdx/utrn+/-* at 2 month represent a superior model than the *mdx* with matched-age, since they presented morphology and contractile and passive properties more compromised than *mdx* mice. At 6 months, the *mdx/utrn+/-*-contractile and the passive properties and morphology did not differ from the *mdx* mice age-matched. We suggest that the use of *mdx/utrn+/-* with 2 months-old would represent would represent a better model to test the potential of the therapies than *mdx* mice.

Key words: *mdx/utrn+/-*. Muscular dystrophy. Muscle function. Utrophin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	17
2.2	PROPRIEDADES CONTRÁTEIS DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS	19
2.3	MÚSCULO DIAFRAGMA	20
2.4	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	23
2.5	MODELOS MURINO DA DMD – MDX E MDX/UTRN ^{+/-}	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
4	MATERIAL E MÉTODO	32
4.1	MATERIAIS.....	32
4.2	MÉTODOS.....	33
4.2.1	Metodologia destinada do estudo prévio	34
4.2.2	Metodologia para a criação dos clips e desenvolvimento do protocolo de avaliação da função muscular do m. diafragma	35
4.2.3	Análise morfológica e funcional do diafragma dos camundongos C57bl10, mdx e mdx/utrn^{+/-} com idade de 2 e 6 meses de idade.	38
4.2.4	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	ESTUDO PRÉVIO	42
5.2	CRIAÇÃO DOS CLIPS E DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO MÚSCULO FUNCIONAL DO DIAFRAGMA	54

5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MÚSCULO FUNCIONAL DO M. DIAFRAGMA DOS CAMUNDONGOS C57BL10, MDX E MDX/UTRN+/- COM 2 E 6 MESES DE IDADE.....	66
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma das formas de miopatias hereditárias mais devastadoras de evolução rápida e grave com incidência de 1 em 3,600-6,000 meninos nascidos. (JORDE, 2004; NAKAMURA; TAKEDA, 2011). É uma doença genética de caráter recessivo ligado ao cromossomo X, produzido por uma mutação do gene que codifica a proteína 427 kDA chamada de distrofina, localizada no braço curto do cromossomo X, no locus Xp21 (CAROMANO, 1999). Dentre os músculos afetados na DMD, o diafragma destaca-se, visto que a insuficiência respiratória tardia e/ou cardíaca é considerada a principal causa “*mortis*”.

A proteína distrofina corresponde por cerca de apenas 0,002% da massa proteica da célula muscular estriada, localiza-se na superfície intracelular do sarcolema e se associa a várias glicoproteínas integrais da membrana, formando o complexo glicoproteína-distrofina (CDG) (BERNE, 2004). Esta, é composta por quatro domínios, o domínio do terminal C, o domínio da haste ou central, o domínio rico em cisteína e o domínio terminal N. A principal função celular do CDG é realizar uma ponte entre o citoesqueleto com a matriz extra-celular e proteger o sarcolema das lesões mecânicas geradas durante a contração muscular (LESSA et al., 2012; YANG et al., 2012).

Dentre os modelos animais de estudo da DMD, o camundongo mdx (X chromosome-linked muscular dystrophy, mdx) de mutação espontânea da DMD, é o modelo amplamente utilizado em diversos estudos, permitindo um delineamento até mesmo de uma metodologia padrão, com a finalidade de facilitar a interpretação e comparação de dados publicados para possível aplicação em pacientes (WILLMANN et al., 2012).

No mdx a deficiência da proteína distrofina ocorre devido a uma mutação no ponto do exon 23 do gene, que forma um códon com parada prematura (SICINSKI et al., 1989). Apesar dos seus defeitos genéticos se assemelharem com a DMD humana, sua performance funcional e sua expectativa de vida é próxima do normal, ou seja, estes animais apresentam um fenótipo suave (SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; VAN PUTTEN, 2011).

Histologicamente, os músculos do camundongo mdx não apresentam alteração imediatamente após o nascimento. Nestes animais a fraqueza muscular e a necrose, inicia-se

após o desmame, durante a 3 semana de vida, atingindo picos de fraqueza e necrose nos músculos dos membros por volta de 8-16 semanas. Após este período, estas alterações retrocedem espontaneamente, pelo aumento da capacidade regenerativa. Entretanto, no músculo diafragma, o processo de degeneração permanece progressivo, assemelhando-se a DMD humana (CARNWATH et al., 1986; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008). Diante este contexto, observa-se que o camundongo mdx apresenta a capacidade de compensar a falta da distrofina. Tal capacidade de compensar a distrofina é atribuída por muitos autores pela compensação endógena da utrofina (DECONICK et al., 1997; ZHOU et al., 2008).

A utrofina é uma proteína localizada no sarcolema das fibras musculares esqueléticas durante o desenvolvimento da vida fetal, e após o nascimento, ela é substituída pela distrofina. Após a substituição da utrofina pela distrofina, a proteína utrofina, passa a localizar-se somente nas junções neuromusculares e miotendíneas (LAW et al., 1995). Entretanto, altos níveis de utrofina são encontrados no sarcolema de miofibras regeneradas no músculo esquelético de camundongos mdx adulto. Acredita-se que o aumento da expressão da utrofina no músculo esquelético do mdx, tem ação restauradora nas proteínas do complexo distrofina, protegendo o fenótipo da distrofia muscular de maneira dose-dependente. No entanto, a compensação funcional provida pela utrofina no mdx é incompleta, não sendo suficiente para impedir que a sintomatologia da DMD desapareça nestes animais (ZHOU et al., 2008).

Em adição, a expressão da utrofina também pode ser observada no coração, no cérebro e em tecidos não musculares que apresentam a falta da distrofina (PONS et al., 1994; ZHOU et al., 2008).

Em contraste com o mdx, o camundongo com duplo knockout (dco), distrofina e utrofina (dco, double Knockout mice, mdx/utrn^{-/-}), apresenta sinais clínicos mais próximos da DMD quando comparados com o mdx. O dco apresenta com idade precoce, severa distrofia muscular, fraqueza muscular, cifose, contratura articular, retardo no crescimento e morte prematura por volta de 10 semanas de vida, o que torna este modelo, um animal de difícil obtenção e de se manter (DECONICK et al., 1997; Zhou et al., 2008). Em relação ao músculo diafragma do dco, Deconick et al. (1997), relatou que aos 6 dias de idade, pode-se observar grandes áreas de fibrose e com 2 semanas, observa-se, um grande número de fibras nucleadas centralmente, demonstrando que a regeneração muscular está ocorrendo. Durante a 8 semana de idade, o músculo diafragma do dco apresenta variação no diâmetro das fibras musculares, núcleo central e fibrose.

Se compararmos o camundongo mdx e o dko, notamos que as diferenças celulares mais dramáticas observadas entre esses dois modelos são em relação a fibras musculares de contração rápida e lenta. O dko apresenta maior quantidade de fibras de contração rápida. A ausência de fibras de contração lenta no músculo diafragma do dko podem ser responsáveis por contribuir para a morbidade desses animais, uma vez que, mecanismos que necessitam de uma atividade contínua como a respiração, ficam inteiramente dependentes da atividade das fibras de contração rápida (DECONICK et al., 1997). Ainda em relação ao dko, Zhou et al. (2008) relatou, que o número de fibras necrosadas, a percentagem de novas fibras regeneradas e a fibrose endomisial, presente no mdx e dko é similar na 10 semana de idade. Após esta idade, normalmente, o camundongo dko morre. A morte precoce no dko, faz com que este modelo não represente um animal ideal para se testar terapias (ZHOU et al., 2008).

Fazendo uma ponte entre o moderado (mdx) e o severo (dko), o camundongo mdx com haploinsuficiência da utrofina (mdx/utrn^{+/-}, dystrophin-null utrophin heterozygous mice) é descrito como um modelo que transpõe os obstáculos dos extremos (moderado e o severo) sendo relatado como um camundongo que apresenta um fenótipo intermediário, fornecendo, portanto, mais vantagens do que o mdx e o dko.

O camundongo mdx/utrn^{+/-} pode sobreviver mais que o dko e pode desenvolver uma maior e severa inflamação e fibrose quando comparados com o camundongo mdx. Aos 3 e 6 meses de idade, a inflamação do músculo diafragma do mdx/utrn^{+/-} apresenta-se mais severa do que no mdx (de respectiva idade) mostrando uma grande área ocupada por células inflamatórias (ZHOU et al., 2008; HUANG et al., 2011). De acordo com Zhou et al. (2008), o camundongo mdx/utrn^{+/-} pode sobreviver até 1 ano de idade, otimizando, portanto, o uso deste modelo para testes terapêuticos. Em adição estes animais são de fácil obtenção, manutenção e não apresentam morte precoce, como o dko. Entretanto, não existem evidências fisiológicas e funcionais suficientes que justifiquem a escolha deste modelo para as terapias experimentais.

Uma vez que as terapias experimentais na DMD, mesmo que distintas entre si, almejam um objetivo em comum, a melhora da função muscular e a busca de modelos animais que mais se aproximem da realidade humana, representa parte indispensável e de grande importância para avaliar estudos clínicos. Atualmente, os principais músculos murino utilizados na avaliação muscular são: o extensor longo dos dedos, o tibial anterior e o

diafragma. Entretanto, a avaliação do músculo diafragma encontra-se até os dias de hoje, pobremente explorada e com falhas.

Portanto, primeiramente neste trabalho, foi realizado a atualização da técnica de avaliação da função do músculo diafragma. Após, procedeu-se a avaliação e comparação da morfologia e das propriedades contráteis e passivas do músculo diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/-, objetivando elucidar as características morfofuncionais do mdx/utrn+/-.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

As fibras musculares são as células musculares que constituem os músculos. Estas apresentam-se alongadas, multinucleadas e seu diâmetro varia de 5 a 100 μ m. Durante o desenvolvimento, estas células são formadas pela fusão de células progenitoras mononucleadas, chamada de mioblastos (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008)

Histologicamente a fibra muscular é envolvida por uma camada de tecido conjuntivo denominada de endomísio e o conjunto de fibras organizadas, os fascículos, é envolvido pelo perimísio. Estas fibras por sua vez, se agrupam como um todo e formam o músculo, que é envolvido pelo epimísio (NISHIMURA; HATTORI; TAKASHI, 1994).

No endomísio pode-se observar 3 tipos de estruturas de colágeno, o do tipo I, composto por uma densa rede de fibras colágenas onduladas na superfície da fibra muscular; o colágeno do tipo II, composto por feixes de fibras colágenas localizadas transversalmente entre as fibras musculares e miofibrilas, e o colágeno do tipo III localizado adjacente aos vasos sanguíneos. O perimísio é composto por várias camadas de lâminas onduladas de fibras colágenas e o epimísio é formado por 2 camadas, uma interna com grande quantidade de fibras colágenas apresentando um padrão ondulado a fibra muscular e outra camada externa composta por lâminas onduladas formadas por feixes de fibras colágenas disposta transversalmente ao eixo da fibra muscular (NISHIMURA; HATTORI; TAKASHI, 1994; VASILEV; ANDREEV; KUHNEL, 1995).

A membrana que envolve a fibra muscular é chamada de sarcolema e o citoplasma especializado é chamado de sarcoplasma. O sarcoplasma dessas células, possuem uma série de núcleos e mitocôndrias, assim como numerosas miofibrilas filiformes que se encontram alinhadas paralelamente. Estas miofibrilas contem 2 tipos de filamentos de proteínas, cujo arranjo produz o padrão estriado característico (HILL, 1970; POLLARD; EARNSHAW, 2006; HALL, 2009). A unidade básica de organização da miofibrila é o sarcômero. Esta é uma estrutura compartimentalizada entre duas linhas Z (da palavra alemã, *Zwischenscheibe* que significa “entre disco”), que é a unidade básica estrutural da fibra muscular. Este por sua vez é dividido ao meio por uma linha M (da palavra alemã *Mittelscheibe*, que significa “no

meio” ou “intermediária”). As faixas A (recebe este nome, pois a luz polarizada é anisotrópica quando passa nessa região), contém filamentos grossos e rugosos de miosina, cada um dos quais é envolto por 6 filamentos finos de actina. As faixas I são compostas por apenas filamentos finos de actina. Estes filamentos presentes nas faixas A e I são mantidos no lugar através da fixação nas linhas Z, que se aderem ao sarcolema. No centro das faixas A, localizam-se a zona H, que comporta apenas os filamentos grossos de miosina (HILL, 1970; HALL, 2009).

A organização dos filamentos de miosina e actina no sarcômero arranja-se na matriz de forma hexagonal e observa-se que cada filamento fino é cercado por 3 filamentos grossos e cada filamento grosso é cercado por 6 filamentos finos, garantindo assim, que cada cabeça de miosina esteja sempre próxima de um filamento de actina. Intercalados com a actina, localizam-se as moléculas de troponina e tropomiosina, que auxiliam na organização e na ativação da cascata contrátil através da ligação com o cálcio e pela exposição dos sítios de ligação da actina às cabeças de miosinas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Localizados abaixo da membrana sarcoplasmática, encontram-se o retículo sarcoplasmático. Esta é uma organela intracelular de armazenagem que forma uma rede ao redor das miofibrilas, responsável durante o relaxamento muscular por captar íons de cálcio (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008). Perpendicularmente ao eixo longitudinal da fibra muscular, localizam-se os túbulos T, que são estruturas formadas por invaginações periódicas do sarcolema. Estes túbulos T formam junções com a rede de retículo sarcoplasmático, são preenchidos pelo líquido extracelular e são importantes pois permitem que a membrana plasmática eletricamente excitável da fibra muscular conduza a despolarização do potencial de ação para o interior da célula (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008; TABEBORDBAR et al., 2015 (no prelo)¹).

¹ TABEBORDBAR, M.; ZHU, K.; CHENG, J. K.; CHEW, W. L.; WIDRICK, J. J.; YAN, W. X.; MAESNER, C.; WU, E. Y.; XIAO, R.; RAN, F. A.; CONG, L.; ZHANG, F.; VANDENBERGHE, L. H.; CHURCH, G. M.; WAGERS, A. J. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, pii: aad5177, 2015. (no prelo)

2.2 PROPRIEDADES CONTRÁTEIS DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS

As propriedades biomecânicas do músculo advêm de uma associação entre as células musculares e o tecido conjuntivo. O músculo é considerado o componente contrátil ativo e o tecido conjuntivo, como elemento passivo. O perimísio é considerado o maior componente elástico em paralelo às fibras musculares e as alterações no perimísio e no endomísio tem sido relacionada às alterações nas propriedades mecânicas (BORG; CAULFIELD, 1980).

Os músculos esqueléticos possuem 4 propriedades funcionais: a extensibilidade, elasticidade, irritabilidade e a capacidade de desenvolver tensão (HALL, 2009). Considera-se extensibilidade a capacidade de o tecido ser estirado ou aumentar de comprimento, enquanto que a elasticidade é a capacidade do músculo retornar ao comprimento normal após um estiramento. Dessa forma o músculo retorna ao seu comprimento de repouso e proporciona suavidade na transmissão de tensão do músculo para a estrutura óssea. Tal comportamento elástico do músculo é descrito como um processo que consiste em 2 componentes principais: o componente elástico paralelo e o componente elástico em série (HILL, 1970; HALL, 2009).

O componente elástico paralelo é fornecido pelas membranas musculares, que oferece resistência ao músculo quando ele é estirado passivamente, e o componente elástico em série, é aquele localizado nos tendões e atua como “molas”, armazenando energia. Este recebe este nome devido ao alinhamento das membranas e dos tendões com as fibras musculares, que proporcionam o componente contrátil. Ambos os componentes, o elástico em paralelo e o elástico em série, possuem uma propriedade viscosa (HILL, 1970; HALL, 2009).

Denomina-se propriedade viscosa do músculo, aquela que permite ao músculo se alongar e encurtar de maneira tempo-dependente. Quando um músculo se alonga e mantido por um tempo, ele se alonga de forma progressiva, de modo que após o alongamento ele retorna ao seu estado inicial de forma progressiva e não imediatamente. Portanto, o músculo diminui seu comprimento de maneira gradual, denominando-se este evento de resposta viscoelástica (HILL, 1970; HALL, 2009). E por último, a irritabilidade e capacidade de desenvolver tensão.

A irritabilidade é a capacidade de um músculo de responder a estímulos. Este por sua vez quando ativado por um estímulo, desenvolve uma tensão, ou seja, a contração (HILL, 1970; HALL, 2009). A contração muscular é gerada pelo deslizamento dos filamentos finos de actina sobre os filamentos grossos de miosina, causado pela força do motor de miosina

com o consumo de combustível de adenosina trifosfato (ATP). A velocidade é alcançada pela ligação de muitos sarcômeros em série e a força é determinada pelo número de sarcômeros que se contraem em paralelo. Sendo assim a força tetânica máxima é quando uma fibra é ativada repetidas vezes para que seu nível de tensão máxima seja mantido durante um período de tempo. A tensão presente durante a tetania pode ser até 4 vezes maior que a tensão máxima durante uma única contração. Portanto quando a tetania é prolongada, a fadiga causa um declínio gradual no nível de tensão produzida (SAXTON; DONNELLY, 1996).

2.3 MÚSCULO DIAFRAGMA

Desde a antiguidade filósofos da Grécia demonstravam um grande interesse em investigar quais eram os músculos responsáveis pela respiração. Entretanto mesmo com esse entusiasmo, os escritos dos primórdios do diafragma foram perdidos e muito da sua história foi relatada por seguidores dos cientistas, fato que gera dados imprecisos (DERENNE et al., 1994).

A história da fisiologia do diafragma foi intimamente ligada ao desenvolvimento da zoologia, anatomia comparada, fisiologia experimental, medicina, física e filosofia, durante o império Romano, com o progresso destas disciplinas. Os gregos, nesta época conseguiram alcançar uma compreensão surpreendente sobre a mecânica respiratória (DERENNE et al., 1994). Contudo, antes mesmo dos gregos antigos, outras civilizações já haviam reconhecido que a respiração era um processo vital, porém foram os gregos que fizeram os primeiros registros sobre o diafragma. Aristóteles foi o primeiro a vincular a respiração a um órgão específico. Ele descreveu que o coração, transmitia um calor inato para os pulmões capaz de gerar forças suficientes para expandir o tórax e resfriar o corpo através do *pneuma* (respiração). Aristóteles tinha uma visão cardiocêntrica, e acreditava que durante o relaxamento cardíaco, o ar entrava nos pulmões, e quando se contraía o ar saía. Segundo a teoria de Aristóteles, o músculo diafragma não apresentava papel nenhum na respiração, ele apenas tinha a função de separar a cavidade torácica da cavidade abdominal (HARRIS, 1973; DERENNE et al., 1994; FURLEY; WILKIE, 1984).

Após este período, ocorreu o rompimento do Império de Alexandre e a transferência do centro de cultura para Alexandria, onde a Medicina teve um notável progresso através de dissecação de animais e de seres humanos. Na mesma época Herophilus and Erasistratus (340 AC) introduziram duas novas ideias, a primeira em que o sistema nervoso é o centro ligado a nervos que se conectam aos órgãos e a segunda, sobre a geração de força pelos músculos (DERENNE et al., 1994). O princípio se baseava que para evitar um aparecimento de um espaço vazio entre o pulmão e a parede torácica, o tórax se distende, introduzindo o ar para dentro do tórax (FURLEY; WILKIE, 1984).

De acordo com Herophilus o ciclo respiratório é composto dos seguintes componentes: a expansão do tórax e dos pulmões, a contração dos pulmões e do tórax promovendo a entrada e saída de ar (DERENNE et al., 1994).

No Ocidente, o médico grego Cláudio Galeno (131-120 AD), relatou que a ação do diafragma permitia a abertura das costelas inferiores e que existiam movimentos expiratórios extraordinários. Vesálio (1514-1564) também defendeu a hipótese de Galeno, admitindo o papel do diafragma na abertura das costelas inferiores e adicionando a ideia de que durante a inspiração o músculo diafragma sobe e na expiração desce. Colombo (1593) relatou que o músculo diafragma permitia a inspiração, quando este se abaixa, porém, seu tempo contrátil ocorre na subida. Mais tarde Magendie (1833) retomou a opinião de Cláudio Galeno, até que Duchenne de Boulogne (1867) determinou o papel do diafragma na respiração e a importância da massa visceral na biomecânica diafragmática esclarecendo a função do diafragma na respiração (DERENNE et al., 1994; SHOUCARD, 1989).

Embriologicamente, diafragma é originário do mesoblasto, aparecendo a partir da terceira semana. Este é considerado um septo musculotendinoso e se forma a partir de quatro componentes embrionários: o *septum transversum*, as membranas pleuroperitoneais, o mesentério dorsal do esôfago e as paredes laterais do corpo. O *septum transversum* ou centro tendíneo, é o primórdio do tendão central do diafragma. Este, cresce dorsalmente da parede ventro-lateral do corpo, formando uma estrutura semicircular que separa o coração do fígado. Inicialmente ele está localizado inferiormente a cavidade pericárdica e não separa totalmente a cavidade abdominal. Durante a quarta semana, após a cabeça se dobrar ventralmente, o septo transversal se expande e se funde com o mesênquima ventral do esôfago e com as membranas pleuroperitoneais. As membranas pleuroperitoneais, por sua vez, se fundem com o mesentério dorsal do esôfago e com o septo transversal formando o diafragma primitivo.

Após esta fusão, o mesentério dorsal do esôfago irá constituir a porção mediana do diafragma denominada pilares diafragmáticos. A partir da nona até a décima segunda semana, os pulmões e as cavidades pleurais aumentam de tamanho dentro das paredes laterais do corpo e durante este processo ocorre uma divisão em duas camadas: uma externa que irá formar a parede abdominal definitiva e outra interna que contribuirá para a formação das porções periféricas do diafragma. Conforme ocorre a extensão adicional das cavidades pleurais em desenvolvimento para dentro das paredes do corpo, formam-se os recessos diafragmáticos direito e esquerdo que estabelecerão a configuração do seu formato de cúpula, característico do diafragma. A partir do desenvolvimento das cavidades pleurais no mesênquima se origina uma invaginação de mioblastos que partem do terceiro, quarto e quinto metâmeros cervicais e formam a porção muscular do diafragma innervada pelo nervo frênico (SHOUCHARD, 1989; MOORE; PERSAUD, 2004).

Durante a vida fetal os pulmões estão cheios de líquido e não participam das trocas gasosas. Sendo assim, para garantir uma transição eficaz durante o nascimento da vida fetal para a vida extra-uterina, o sistema respiratório sofre alterações importantes que envolvem a remoção de líquidos nas vias aéreas, dos alvéolos e a formação de uma capacidade residual funcional (BLAND, 1980; OLVER; WALTERS; CANNATA et al., 2011). Estas alterações promovem o aumento do fluxo sanguíneo pulmonar, a diminuição da pressão intra pleural, complacência pulmonar e fechamento funcional em partes do canal arterial, pelo aumento da oxigenação do sangue (RUDOLPH, 1985; CROSSLEY et al., 2009; CANNATA et al., 2011).

Para que estas alterações aconteçam são necessárias contrações musculares dependente quase que inteiramente do músculo diafragma, que por sua vez, tem que se adaptar às alterações da parede torácica e da conformidade dos pulmões, que estão cheios de líquido. Tal alteração faz com que aumente a pressão trans-diafragmática para garantir que esta, seja suficiente para insuflar os pulmões durante o nascimento e manter uma respiração regular. Dessa forma, as fibras musculares do diafragma são ativadas com o intuito de expulsar o líquido presente nos pulmões e estimular a função respiratória de inspiração e expiração, bem como manter a pressão negativa dentro da cavidade torácica (GUSLITS et al., 1987; MANTILLA; SIECK, 2008; CANNATA et al., 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre o impacto do nascimento em si sobre as propriedades de ativação das fibras dentro do diafragma.

Anatomicamente o músculo diafragma apresenta formato de cúpula, com uma superfície convexa dirigida para o abdômen e uma face côncava dirigida para a cavidade torácica, separando a cavidade abdominal da cavidade torácica. (GETTY, 1986; DYCE et al., 1987). Este consiste em uma porção costal, que se origina do processo xifoide e das articulações costoverbrais da 8^a a 12^a costela e uma porção crural, originada na superfície ventral das primeiras três ou quatro vértebras lombares e que se estendem em direção ao centro tendíneo do diafragma.

Durante a contração do diafragma a cúpula é puxada caudalmente, aumentando, deste modo a caixa torácica. O centro tendíneo empurra as vísceras abdominais, elevando a pressão intra-abdominal, deslocando para fora, a parede do abdome e as costelas caudais. Assim, o alargamento do tórax gera uma pressão negativa, necessária para fazer com que o ar entre nos pulmões durante a inspiração (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

Entretanto, o diafragma não apresenta somente função na respiração. Segundo fisiologistas gastrointestinais este músculo tem um importante valor no controle do refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago. Adicionalmente, tais fisiologistas relatam que as atividades do diafragma podem divergir durante determinados eventos, como deglutição e vômitos, mostrando que o músculo diafragma apresenta duas funções fisiológicas, a respiratória e a gastrointestinal (PICKERING; JONES, 2002).

2.4 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Algumas doenças musculares são resultantes de mutações nos genes codificadores de proteínas musculares sarcolemicas, sarcoméricas, e citosólicas, gerando um processo de degeneração muscular progressiva e conseqüentemente perda progressiva da capacidade motora (BERGMAN et al., 2002; VAINZOF et al., 2008). Dentre os músculos afetados nas distrofias musculares, o diafragma acaba tomando destaque, visto que a insuficiência respiratória tardia observada em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (DMB) e distrofia cintura-membros é considerada a principal causa “*mortis*”. Nas distrofias fascio-escápulo-umeral e na miopatia congênita de Ulrich, a insuficiência respiratória ocorre mais precocemente, causando morte das fibras musculares

mais rapidamente (GOZAL, 2000; POLLA et al., 2004). Em humanos a mutação no gene da distrofina pode causar 2 fenótipos clínicos que se diferem na idade em que o paciente perde sua capacidade de deambulação, como ocorre na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e Distrofia Muscular de Becker (DMB). Na DMD os meninos se tornam cadeirantes antes dos 14 anos de idade, enquanto que nos pacientes com DMB se tornam cadeirantes acima dos 16 anos (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1998; PRIOR; BRIDGEMAN, 2005; KORNEGAY et al., 2012). Nestes pacientes, a hipertrofia muscular é atribuída à deposição de gordura e tecido conjuntivo, sendo chamada, portanto de pseudohipertrofia. Entretanto alguns estudos de imagens têm demonstrado a hipertrofia de verdade em alguns indivíduos (CROS et al., 1989; KORNEGAY et al., 2012).

Segundo Bergman et al. (2002), distrofia muscular é um termo amplamente utilizado para se referir a qualquer doença primária dos músculos esqueléticos, que resultam em degeneração progressiva, regeneração limitada e fibrose das fibras musculares.

Atualmente, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é descrita como uma das formas de miopatias hereditárias mais devastadoras de evolução rápida e grave com incidência de 1 em cada 3,600-6,000 meninos nascidos (SPENCER; TIDBALL, 2001; JORDE, 2004; NAKAMURA; TAKEDA, 2011). É uma doença genética de caráter recessivo ligado ao cromossomo X, produzido por uma mutação do gene que codifica a proteína 427 kDa chamada de distrofina, localizada no braço curto do cromossomo X, no locus Xp21. Apesar de apresentar caráter recessivo, acometendo indivíduos do sexo masculino, quando incide no sexo feminino, as mulheres tornam-se portadoras desenvolvendo a doença em duas circunstâncias: em casos de Síndrome de Turner (45X) e nos casos onde os dois genes herdados forem afetados (CAROMANO, 1999).

O gene da distrofina contém 79 exons, cerca de 2.4 milhões de bases e codifica aproximadamente 1.4-Kb de cDNA (DNA complementar). Este corresponde por cerca de apenas 0,002% da massa protéica da célula muscular estriada, e está localizada na superfície intracelular do sarcolema e se associa a várias glicoproteínas integrais da membrana, formando o complexo glicoproteína-distrofina -CDG (BERNE, 2004).

O comprimento total da proteína distrofina apresenta quatro domínios. O domínio do terminal N que se liga a γ -actina. O domínio em forma de haste ou central é constituído de 24 repetitivos domínios do tipo espectrina e 4 dobradiças intervindo. As repetições de 1-3 têm

sido sugeridas como parte da repetição que interage com a bicamada lipídica da membrana. As repetições de 11-15 forma o segundo domínio de ligação com a actina; as repetições 16 e 17 que contém óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e as repetições de 20-23 que interage com os microtúbulos. As 4 dobradiças são sugeridas como provedoras de flexibilidade para a distrofina. O domínio rico em cisteína e parte do segmento das 4 dobradiças ligam-se a proteína transmembrana glicoproteína-distroglicana que interage com a laminina no meio extracelular (MEC), mediando, a interação proteína-proteína. O domínio do terminal C interage com a distrobrevina e sintrofina. Através destas interações, a distrofina liga a matrix extracelular com o citoesqueleto, provendo estabilidade mecânica para as células musculares durante a contração muscular (VAINZOF, 1996; MICHELE; CAMPBELL, 2003; LESSA et al., 2012; PASSAMANO et al., 2012; YANG et al., 2012; DUAN, 2015).

O diagnóstico da DMD inicialmente se baseia na clínica sugestiva, seguido da dosagem de creatina quinase (CK) no sangue. Após confirmado a elevação da CK, faz-se o exame do DNA (ácido desoxirribonucleico) pelo MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). Nos casos em que não for encontrado uma mutação, faz-se o sequenciamento genético. Em casos excepcionais, quando o exame do DNA não é possível, faz-se a biópsia muscular (DIAMENT; CYPEL, 1996).

Os sintomas normalmente são observados com dois anos de idade, porém os pais só percebem perto dos cinco anos, quando a criança começa a ter dificuldades de subir ou descer escadas e apresentar quedas (ARAÚJO et al., 2004). Isto acontece devido à fraqueza muscular inicialmente em cintura pélvica e posteriormente na cintura escapular. A fraqueza muscular inicial leva a criança a ter imperfeições na marcha, no correr, brincar, sentar e levantar e progressivamente leva a criança a cadeira de rodas. Por volta dos 20 a 30 anos de idade, dependendo dos recursos ventilatórios utilizados, os pacientes vão a óbito devido ao comprometimento da musculatura respiratória, responsável por 80% da causa *mortis* de pacientes portadores de DMD, devido à insuficiência respiratória sobreposta a um quadro infeccioso e/ou insuficiência cardíaca (CAROMANO, 1999; KORNEGAY et al., 1999; STROBER, 2006). Até o momento não existe um tratamento para bloquear ou reverter o processo da DMD (CAROMANO, 1999; STROBER, 2006).

A deformidade estrutural mais severa que acomete o paciente com DMD é o desvio lateral do tronco, a escoliose, que geralmente é associada a uma rotação de tronco. A escoliose é a principal responsável pela diminuição drástica das funções pulmonares. Estudos

relatam que quanto maior for o comprometimento da escoliose, maior será a redução da capacidade vital, demonstrando que o aumento de 10 graus da curvatura da coluna implica em diminuição de 4% da capacidade vital (CAROMANO, 1999).

Com a fraqueza da musculatura respiratória, esses pacientes são incapazes de gerar pressões respiratórias (P_Imax, pressão inspiratória máxima e P_Emax, pressão expiratória máxima) e o seu pico de fluxo expiratório se mostra diminuído. O conjunto desses fatores leva os pacientes com DMD ao óbito precoce (SCHILZ, 2000).

A redução da complacência pulmonar e da mobilidade da caixa torácica observada nos pacientes faz com que se aumente a carga mecânica sustentada a cada movimento respiratório, pela musculatura já enfraquecida. A principal falência dos músculos envolvidos na respiração é a do diafragma. Uma vez que esta musculatura está enfraquecida, há o aparecimento de hipercapnia, hipoventilação pulmonar, hipoxemia (secundária a hipercapnia) e conseqüentemente clearance de secreções (ARAÚJO et al., 2004). O uso de forças mecânicas que atuam no corpo ou por pressões intermitentes nas vias aéreas tem ajudado a musculatura inspiratória e expiratória. Dentre eles podemos citar o Negative Pressure Body Ventilators (NPBVs) e o Bilevel Positive Pressure Airway (BIPAP), equipamentos que tem melhorado a qualidade de vida dos pacientes, porém não impede a progressão da falência respiratória.

A insuficiência respiratória progressiva também pode ocorrer durante o rápido movimento dos olhos (REM – rapid eye movement) que ocorre durante o sono, devido a fraqueza dos músculos dilatadores das vias aéreas superiores, que aumenta a resistência das vias aéreas causando hipoventilação (POLAT et al., 2012). Quatro estágios são descritos: fase 1 ocorre distúrbio respiratório, sem hipercapnia; fase 2, distúrbio respiratório do sono com hipercapnia; fase 3 ocorre hipercapnia durante o sono REM e não REM e fase 4 ocorre hipercapnia diurna, nestes pacientes a sobrevida é inferior a 12 meses, quando estes não utilizam suporte respiratório (VIANELLO et al., 1994; SIMONDS et al., 1998).

2.5 MODELOS MURINO DA DMD – MDX E MDX/UTRN^{+/-}

Segundo, Duclos et al. (1998), o camundongo mdx, foi descrito pela primeira vez em 1984. Entretanto este foi descoberto pela primeira vez em 1980, na colônia de animais de linhagem C57BL/10ScSn. Sua identificação foi observada, devido ao nível elevado de creatina kinase (CK) (BULFIELD et al., 1984).

No mdx a deficiência da proteína distrofina ocorre devido a uma mutação no ponto do exon 23 do gene, que forma um códon com parada prematura (SICINSKI et al., 1989). Apesar deste modelo ser deficiente da proteína distrofina e de seus defeitos genéticos se assemelharem a DMD humana, estes animais apresentam um fenótipo suave da DMD. Se compararmos a expectativa de vida do camundongo mdx e em humanos com DMD, observamos que no mdx a expectativa de vida é reduzida em aproximadamente 25%, enquanto que em humanos é reduzida aproximadamente em 75% (CHAMBERLAIN et al., 2007; McGREEVY et al., 2015).

Morfologicamente, os músculos do camundongo mdx não apresentam alteração imediatamente após o nascimento (aproximadamente durante as 2 primeiras semanas de vida). Nestes animais as alterações morfológicas e a fraqueza muscular, inicia-se após o desmame, durante a 3 semana de vida, atingindo picos de fraqueza e necrose nos músculos dos membros por volta de 8-16 semanas. Subsequentemente, grande parte dos músculos esqueléticos no camundongo mdx entram numa fase relativamente estável e iniciam uma considerável regeneração muscular. Nesta fase, os músculos dos membros do camundongo mdx apresentam hipertrofia e somente o músculo diafragma apresenta deterioração progressiva (CARNWATH et al., 1986; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; McGREEVY et al., 2015). No mdx a deterioração progressiva no músculo diafragma evolui assim como em humanos afetados pela DMD (McGREEVY et al., 2015). Entretanto, somente aos 15 meses de idade pode-se observar um fenótipo severo no mdx, com a presença de escoliose e morte por falência cardíaca e ou respiratória (HAKIM et al., 2011; McGREEVY et al., 2015).

A considerável regeneração muscular observada no camundongo mdx, explica em partes, o motivo pelo qual seu fenótipo é descrito como suave. Neste contexto, duas abordagens têm sido utilizadas para reduzir a regeneração muscular no mdx: a eliminação do MyoD, um regulador miogênico que irá gerar o MyoD/mdx (MEGENEY et al., 1996) e a

redução do comprimento dos telômeros no camundongo deficiente em distrofina que irá gerar através da linhagem mdx_{4cv} o camundongo mTR/mdx (MOURKIOTI et al., 2013)

Na tentativa de variar o fenótipo do modelo mdx e obter um modelo severamente afetado, diferentes linhagens genéticas foram utilizadas para cruzar com o mdx. Dentre elas o camundongo albino, BALB/c, C3H, C57BL/6, DBA/2, a linhagem FVB e diversas linhagens imuno-deficientes. Dentre os camundongos mdx gerados destas linhagens genéticas, o DBA/2 mdx se destaca por apresentar maior fibrose e menor capacidade regenerativa (McGREEVY et al., 2015). Entretanto segundo o The Jackson Laboratory a linhagem de DBA/2 apresenta dificuldade de se reproduzir, além de carregar mutação em uma variedade de genes, que causam geralmente, anormalidades na região dos olhos e também pode ocasionar a perda da audição.

Camundongos apresentando 4 variantes químicas (chemical variant cv) também são descritos. Originalmente gerados da linhagem C57BL/6 com o uso de ENU (mutagen N-ethyl-N-nitrosourea - ENU), estes animais são classificados em 4 linhagens: o mdx_{2cv}, mdx_{3cv}, mdx_{4cv} e o mdx_{5cv}. Apesar destes animais apresentarem diferentes mutações pontuais. Entretanto, eles pouco se diferem do tradicional mdx (IM et al., 1996; SPENCER; TIDBALL, 2001; NAKAMURA; TAKEDA, 2011; McGREEVY et al., 2015).

O fenótipo suave observado no camundongo mdx também conduziram os cientistas a sugerirem que a melhora regenerativa no mdx pode ser atribuída a uma propriedade espécie-específica do músculo ou devido a sobre-regulação de mecanismos compensatórios. A humanização do camundongo mdx, ou a eliminação genética dos mecanismos compensatórios, gerou outros modelos murino com deficiência da proteína distrofina que recapitulam o fenótipo distrófico da DMD humana (McGREEVY et al., 2015). Em relação a humanização do mdx, a eliminação do gene que codifica hidroxilase do ácido citidina-monofosfato-N-acetilneuramínico (Cmah - cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase), resultou no camundongo Cmah-mdx que apresenta um fenótipo mais severo da distrofia, semelhante a DMD humana (CHANDRASEKHARAN et al., 2010).

No que diz respeito a mecanismos compensatórios, duas proteínas se destacam por apresentar a mesma função que a distrofina e por sua expressão ser sobre regulada no camundongo mdx: a α 7-integrina e a utrofina. A eliminação genética da α 7-integrina e a utrofina gera respectivamente, o camundongo com duplo knockout (double-knockout – dko)

integrina/distrofina e utrofina/distrofina que apresentam sinais clínicos mais próximos da DMD quando comparados com o mdx. O dko apresenta com idade precoce, severa distrofia muscular, fraqueza muscular, cifose, contratura articular, retardo no crescimento e morte prematura por volta de 10 semanas de vida, o que torna este modelo um animal de difícil obtenção e de se manter (DECONICK et al., 1997; ZHOU et al., 2008; MCGREEVY et al., 2015). Em relação ao músculo diafragma do dko, Deconick et al. (1997), relatou que aos 6 dias de idade, pode-se observar grandes áreas de fibrose e com 2 semanas, observa-se, um grande número de fibras nucleadas centralmente, demonstrando que a regeneração muscular está ocorrendo. Durante a 8 semana de idade, o músculo diafragma do dko apresenta variação no diâmetro das fibras musculares, núcleo central e fibrose.

Se compararmos o camundongo mdx e o dko, notamos que as diferenças celulares mais dramáticas observadas entre esses dois modelos são em relação a fibras musculares de contração rápida e lenta. A ausência de fibras de contração lenta no músculo diafragma do dko podem ser responsáveis por contribuir para a morbidade desses animais, uma vez que, mecanismos que necessitam de uma atividade contínua como a respiração, ficam inteiramente dependentes da atividade das fibras de contração rápida (DECONICK et al., 1997). Anos mais tarde, Zhou et al. (2008) relatou, que o número de fibras necrosadas, a percentagem de novas fibras regeneradas e a fibrose endomisial, entre o mdx e dko é similar na 10 semana de idade e após esta idade, normalmente, o camundongo dko morre. Desta forma, o camundongo dko não representa o modelo ideal para se testar terapias (ZHOU et al., 2008), adicionando o fato que nestes animais é reduzido o tempo que se tem para avaliar o potencial dos efeitos terapêuticos.

Atualmente, estudos recentes sugerem que o mdx heterozigoto para utrofina (mdx com haploinsuficiência para utrofina, mdx/utrn^{+/-}) representa um camundongo intermediário entre o suave mdx e o severo dko (DECONICK et al., 1997; ZHOU et al., 2008; RAFAEL-FORTNEY et al., 2011; VAN PUTTEN et al., 2012).

A utrofina é uma proteína localizada no sarcolema das fibras musculares esqueléticas durante o desenvolvimento da vida fetal, e, após o nascimento, ela é substituída pela distrofina. Após a substituição da utrofina pela distrofina, esta passa a localizar-se somente nas junções neuromusculares e miotendíneas (LAW et al., 1995; GONZALEZ et al., 2015). Entretanto, altos níveis de utrofina são encontrados no sarcolema de miofibras regeneradas no músculo esquelético do camundongo mdx adulto. Acredita-se que o aumento da expressão da

utrofina no músculo esquelético do mdx, tem ação restauradora nas proteínas do complexo distrofina, protegendo o fenótipo da distrofia muscular de maneira dose-dependente. No entanto, a compensação funcional provida pela utrofina no mdx é incompleta, não sendo suficiente para impedir que a sintomatologia da DMD desapareça nestes animais. Sendo assim o fenótipo do camundongo mdx é descrito como suave, provavelmente devido a compensação endógena da utrofina (ZHOU et al., 2008).

Em adição, a expressão da utrofina também pode ser observada no coração, no cérebro e em tecidos não musculares que apresentam a falta da distrofina (PONS et al., 1994; ZHOU et al., 2008).

O camundongo mdx/utrn+/- pode sobreviver mais que o dko e pode desenvolver uma maior e severa inflamação e fibrose quando comparados com o camundongo mdx, apresentando, portanto, vantagens em terapias para a melhora da função muscular. Aos 3 e 6 meses de idade, a inflamação do músculo diafragma do mdx/utrn+/- apresenta-se mais severa do que no mdx (de respectiva idade) mostrando uma grande área ocupada por células inflamatórias (ZHOU et al., 2008; HUANG et al., 2011). De acordo com Zhou et al. (2008), o camundongo mdx/utrn+/- pode sobreviver até 1 ano de idade, otimizando este modelo para testes terapêuticos, além do fato destes animais serem de fácil obtenção, manutenção e de não apresentarem morte precoce tal como o dko.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi analisar e comparar a morfofisiopatologia geral do músculo diafragma do modelo mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com idade de 2 e 6 meses, do sexo masculino, e, atualizar e avaliar as propriedades ativas e passivas do músculo diafragma nestes modelos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Projetar e confeccionar dois clips para a avaliação músculo funcional do diafragma murino;
- 2- Desenvolver protocolo de avaliação das propriedades contráteis e passivas do músculo diafragma murino;
- 3- Analisar os aspectos morfológicos gerais do músculo diafragma dos camundongos mdx e mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com 2 e 6 meses de idade;
- 4- Identificar e qualificar os tipos de fibras musculares do diafragma entre os animais de linhagem mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com 2 e 6 meses de idade;
- 5- Verificar a diferença qualitativa da marcação da proteína distrofina e utrofina no músculo diafragma dos camundongos mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com 2 e 6 meses de idade;
- 6- Comparar e avaliar a variabilidade das propriedades contráteis e passivas entre os animais de linhagem mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com 2 e 6 meses de idade;

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética desta mesma Faculdade, protocolo número, 3044/2013 e pela Universidade de Missouri, Columbia-MO – Estados Unidos, protocolo número, 6980. Este experimento está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil e da Universidade de Missouri, Columbia-MO, Estados Unidos.

4.1 MATERIAIS

Os animais utilizados neste experimento foram obtidos após aprovação do Comitê de Ética desta mesma Universidade e da Universidade de Missouri, Columbia – MO, EUA. Os mesmos foram divididos em 3 grupos:

Grupo 1: animais utilizados para um estudo prévio;

Grupo 2: animais utilizados para a criação dos clips e desenvolvimento da metodologia;

Grupo 3: animais utilizados para a análise músculo funcional e morfológica do diafragma.

Em todos os grupos citados acima, os animais utilizados foram do sexo masculino.

Para o estudo morfológico prévio deste trabalho, foram utilizados 20 camundongos *mdx* e 20 camundongos da linhagem C57BL10, sendo estes distribuídos em 4 subgrupos denominados A, B, C e D.

Subgrupo A: composto por 05 *mdx* e 05 camundongos C57BL10, de 1 mês de idade;

Subgrupo B: composto por 05 *mdx* e 05 camundongos C57BL10 de 6 meses de idades;

Subgrupo C: composto por 05 *mdx* e 05 camundongos C57BL10 de 12 meses de idade;

Subgrupo D: composto por 05 *mdx* e 05 camundongos C57BL10 de 18 meses de idade.

Para a criação dos clips e desenvolvimento da metodologia, foram utilizados 213 camundongos. Estes animais apresentavam diferentes linhagens (*mdx3cv*, *mdx4cv*, *mdx*, *mdx/utrn+/-*, C57BL6, Balb/C e C57BL10ScSnJ) e idades que variavam de 1 a 28 semanas.

Destes 213 animais utilizados, para o desenvolvimento da metodologia (protocolo de avaliação das propriedades contráteis e passivas) foram usados:

- 1- Para o teste de amplitude de força: 05 camundongos C57BL6 e 03 *mdx*, com 7 meses e meio de idade, machos;
- 2- Para o teste de alongamento passivo: 17 camundongos C57BL10 e 15 camundongos *mdx*, com 4 meses de idade, machos.

O restante dos animais (173 animais) fora usado para treinamento de microdissecação do músculo diafragma e fixação do fragmento do diafragma nos clips.

Para a avaliação músculo funcional e morfológica do diafragma dos camundongos *mdx*, *mdx/utrn+/-* e C57BL10 foram utilizados: 10 *mdx*, 10 *mdx/utrn+/-* e 10 C57BL10 de 2 meses de idade e 10 *mdx*, 10 *mdx/utrn+/-* e 10 C57BL10 de 6 meses de idade, todos machos. Em relação a idade dos animais deste grupo, elegeram-se a idade de 2 e 6 meses de idade, uma vez que a expectativa de vida do *mdx/utrn+/-* reduz em 50% após os 8 meses de idade (CHUN; O'BRIEN; BERRY, 2012).

4.2 MÉTODOS

A metodologia empregada no músculo diafragma foi dividida em 3 partes: a primeira parte destinada ao estudo prévio; a segunda parte destinada a criação dos clips e desenvolvimento do protocolo de avaliação da função muscular do m. diafragma, e a terceira e última parte, destinada a análise morfológica e funcional do diafragma dos camundongos C57BL10, *mdx* e *mdx/utrn+/-* com idade de 2 e 6 meses de idade.

4.2.1 Metodologia destinada ao estudo prévio

A metodologia aplicada no estudo prévio foi dividida em Análise Histológica e de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Para todos os animais utilizados no estudo prévio, os fragmentos musculares (4mm de largura) foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4% durante um período superior a 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol (70% a 100%) e colocados em xilol para diafanização. Utilizou-se procedimento convencional, para inclusão em Paraplast® (Leica/Germany), confeccionando-se blocos retangulares com base de 3x4 cm. Realizar-se-ão cortes de 5µm em micrótomo (Leica RM 2065) para obtenção das lâminas, e posteriormente foram desparafinizados em estufa a 60°C por 2 horas.

Foram utilizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina para análise estrutural e das características histopatológicas do músculo distrófico; e a coloração de Tricômio de Masson para visualização de fibras colágenas. As lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, utilizando-se o software Zeiss® KS 400.

Para a realização da microscopia eletrônica de transmissão, as pequenas amostras de músculo diafragma, pós-fixadas em solução de Karnovsky modificada foram lavadas em tampão fosfato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (osmium tetroxide 4% w/w solution in water, Polyscience®, Inc. USA), *overnight*. Posteriormente lavados em solução salina e imersos em acetato de uranila (Polyscience®, Inc. USA) *overnight*. Em seguida, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 a 100%), permanecendo por 1 hora, sob agitação na mistura de 3:1 de acetona e resina (Araldite resin®, grade 502, Polyscience, Inc. USA + DDSA, Polyscience®, Inc. USA + DMP-30, Polyscience®, Inc. USA), mais 1 hora na mistura de 1:1 de acetona e resina e por mais 1 hora na resina pura. Os fragmentos foram colocados em moldes contendo resina pura e submetidos a cortes ultrafinos com cerca de 60 nanômetros, contrastados pelo acetato de uranila 2% (Polyscience®, Inc. USA) em água destilada (5 minutos) e pelo citrato de chumbo 0,5% (Polyscience®, Inc. USA) em água destilada (10 minutos). A observação ultraestrutural e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D - Phillips®).

4.2.2 Metodologia para a criação dos clips e desenvolvimento do protocolo de avaliação da função muscular do m. diafragma

Para o desenvolvimento e criação dos clips utilizados na avaliação das propriedades contráteis e passivas do m. diafragma murino, foi previamente realizado um levantamento bibliográfico e estudo dos artigos consultados neste trabalho, observou-se que os autores utilizaram a técnica de sutura para a análise músculo-funcional do diafragma.

Na técnica de sutura observa-se durante a análise músculo funcional, que a força produzida durante a contração incide em maior intensidade na região mediana/central do fragmento e não na sua totalidade. Isso ocorre pelo fato de que a sutura feita no centro tendíneo com o objetivo de fixar o músculo no equipamento, não permite que a totalidade das fibras musculares permaneçam arranjadas paralelamente, não preservando o comprimento ótimo (L_0) das mesmas. O L_0 das fibras musculares é o comprimento ao qual a fibra muscular desenvolve sua tensão isométrica máxima. Dessa forma, o desalinhamento das fibras resulta em dados errôneos de L_0 e valores inconsistentes de tensão isométrica máxima.

Além da distribuição desigual da força durante a análise de contratilidade, a técnica de sutura empregada até os dias de hoje, não fornece segurança para o fragmento durante a avaliação. Riscos como, fratura do arco costal e rompimento do centro tendíneo podem ocorrer durante a execução da análise, acarretando na perda do fragmento a ser analisado e, por conseguinte, perda de “n” no experimento em questão.

Diante as lacunas observadas na técnica de sutura, neste trabalho, atualizamos a metodologia de avaliação do músculo diafragma. Para a atualização, foram desenvolvidos dois clips (projetados e adequado por todos os colaboradores deste projeto) capazes de corrigir as falhas anteriormente descritas. A criação dos clips tem como finalidade combinar 4 benefícios: ajustar a anatomia e direcionamento das fibras musculares do diafragma durante a avaliação; proteger o músculo de danos por rompimento do centro tendíneo e fratura do arco costal; proteger o músculo diafragma do estiramento excessivo durante a fixação do fragmento no equipamento e otimizar o tempo de colocação do fragmento no equipamento.

Após a criação dos clips, e início do desenvolvimento do protocolo de avaliação, foi realizado um treinamento de coleta do m. diafragma. Nesta etapa deste trabalho, foi realizado

um treinamento para coleta do músculo diafragma, com a finalidade de otimizar o tempo entre a coleta do músculo e a microdissecação e fixação do fragmento nos clips. Estabeleceu-se o tempo máximo de 10 minutos para a execução desta etapa, evitando assim danos nas fibras musculares.

Foram usados 173 camundongos de diferentes linhagens (mdx_{3cv} , mdx_{4cv} , mdx , $mdx/utrn+/-$, Balb/C e C57BL10ScSnJ) com idades que variaram de 1 a 28 semanas.

Durante toda esta pesquisa o treinamento de microdissecação manteve-se constante para garantir a consistência dos dados.

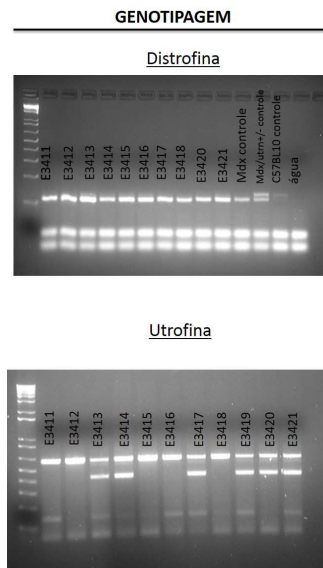
Uma vez estabelecido o protocolo de avaliação, elaborou-se um plano de reprodução dos camundongos $mdx/utrn+/-$ para expandir a colônia de animais existentes do Prof. Dongsheng Duan, Universidade de Missouri, Columbia- MO, Estados Unidos. Dois diferentes planos de reprodução foram adotados. O primeiro usando fêmea $mdx/utrn+/-$ com macho mdx e o segundo usando fêmea e macho $mdx/utrn+/-$.

Os animais reproduzidos foram divididos em grupos de acordo com a linhagem do animal. Grupo A, contendo camundongos mdx e grupo B contendo camundongos $mdx/utrn+/-$. Ambos os grupos foram alojados em gaiolas-padrão de tamanho pequeno de acordo com a linhagem e idade, com livre acesso a comida e água. Tubos de plástico foram adicionados para o enriquecimento ambiental.

Com exceção do dko , todos os animais reproduzidos neste plano foram utilizados neste experimento.

A genotipagem dos animais reproduzidos foi realizada após a 3 semanas de nascimento. O DNA foi obtido da cauda do animal e processados por PCR de acordo com protocolo descrito por Shin et al. (2011), conforme resultado demonstrado na **Figura 1**. Ambas as análises, para distrofina e utrofina foram realizadas.

Figura 1 - Genotipagem dos camundongos utilizados neste trabalho



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Resultado da Genotipagem dos camundongos (distrofina e utrofina). Os números indicados pela letra E na imagem, representam a identificação auricular dos animais.

O desenvolvimento do protocolo de avaliação das propriedades contráteis e passiva do músculo diafragma murino foi realizado no equipamento 1200 A in vitro System Mouse. Para o desenvolvimento da metodologia de avaliação, foram necessárias algumas adaptações do protocolo desenvolvido por Hakim, Li e Duan (2011) e Hakim e Duan (2012). As adaptações procederam-se, com o teste de amplitude de força e com a determinação da velocidade da taxa de estiramento a ser utilizada durante o teste de alongamento passivo. O objetivo do teste de amplitude de força foi identificar com qual intensidade o músculo diafragma iria desempenhar maior força absoluta. Os parâmetros de caracterização experimental foram levados em consideração (peso corporal, comprimento óptimo, área de secção transversal (CSA: cross sectional área), força específica de uma única contração (sP_t), força tetânica específica (sP_o), frequência de força específica nas intensidades de 50, 80, 100, 120, 150 e 200 Hz, 10 ciclos de contração excêntrica). A força absoluta foi mensurada nas seguintes amplitudes: 100, 300, 600, 700, 800, 900 e 1000 μ Amp.

Para o teste de alongamento passivo, foram testadas as velocidades de 20 e 30 mm/seg. O protocolo utilizado para a realização deste teste está de acordo com o descrito por Hakim, Grange e Duan (2011) e Hakim e Duan (2012).

4.2.3 Análise morfológica e funcional do diafragma dos camundongos C57BL10, mdx e mdx/utrn+/- com idade de 2 e 6 meses de idade

Para a análise morfológica do m. diafragma foram utilizadas técnicas de microscopia de luz e imunohistoquímicas.

Para o desenvolvimento da microscopia de luz, em todos os grupos estudados, 2 fragmentos musculares de 5 mm de largura foram coletados de cada animal. Um fragmento foi congelado em nitrogênio líquido e o outro fragmento colocado em meio de OCT (optimal cutting temperature) e congelado em freezer -80 °C para posterior realização de corte histológico com o uso de criostato. Para a realização da análise histopatológica geral do músculo distrófico, 3 colorações foram utilizadas: Hematoxilina-Eosina para análise estrutural e das características histopatológicas do músculo distrófico, Tricômio de Masson para visualização de fibras colágenas e a coloração de Alizarina com o uso do corante vermelho para a identificação de áreas de calcificação muscular. As lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, utilizando-se o software Zeiss® KS 400.

Em adição, todos os fragmentos musculares utilizados para a avaliação do teste de propriedades contráteis, foram congelados em OCT e os fragmentos utilizados no teste de propriedades passivas foram congelados em nitrogênio.

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para as seguintes detecções:

- Células inflamatória (macrófagos e neutrófilos);
- Expressão de Distrofina e Utrofina;
- Tipos de fibras musculares e de miofibras embrionárias;

Para a detecção de células inflamatórias, a infiltração de macrófago e neutrófilos foi confirmada por imuno coloração com anticorpo específico para macrófago e neutrófilo (mouse) nas respectivas diluições: 1:200 para macrófagos e 1:800 para neutrófilos (Caltalog Laboratories, Burlingame, CA).

A marcação da distrofina foi detectada usando 7 anticorpos específicos para distrofina (2 policlonais e 5 monoclonal). O domínio do terminal-N foi detectado com o anticorpo policlonal (1:600, rabbit – doadas gentilmente pelo Dr. Jeffrey Chamberlain da Universidade de Washington). A marcação da proteína utrofina foi examinada com o anticorpo monoclonal contrário ao domínio do terminal N da utrofina (1:20; Vector Laboratories).

Os tipos de fibras musculares foram analisados através da marcação de 3 MHyC isoformas: anti-MyHC_{lenta} (1:5, Sigma), anti-MyHC_{2A} (1:10, Sigma) e anti-MyHC_{2B} (1:10, Sigma). Laminina (1:200, Sigma) foi utilizada como co-coloração. A regeneração muscular foi investigada através da identificação das miosinas embrionárias de cadeia pesada (Embryonic myosin heavy chain - eMHC) (1:250, Department of Biological Sciences, University of Iowa). Laminina (1:200, Sigma) foi utilizada como co-coloração. Todas as imuno colorações foram quantificadas e obtidas de imagens digitalizadas através do software Image J.

Ambas imuno quantificações, foram determinadas dividindo a área de coloração positiva pela área total de transecção de todo fragmento de músculo analisado. Todas as imuno colorações foram quantificadas e obtidas de imagens digitalizadas através do software Image J. As quantificações foram determinadas dividindo a área de coloração positiva pela área total de transecção de todo fragmento muscular analisado.

Para a análise músculo-funcional (propriedades contráteis e passivas) do m. diafragma, a força isométrica e as propriedades viscosas foram avaliadas.

A avaliação da força isométrica do DIA iniciou-se após os camundongos serem eutanasiados. A eutanásia dos animais procedeu-se após sedação profunda realizada com uma injeção intraperitoneal de 2.5 µL/g de coquetel anestésico. Após a anestesia, os animais foram mortos com deslocamento cervical. O DIA foi então gentilmente removido junto com os arcos costais adjacentes e colocado em um prato confeccionado com Sylgard (DOYLE et al., 2009) contendo solução ringer oxigenada (95% O₂ - 5% CO₂) (HAKIM; LI; DUAN, 2011; HAKIM; WASSALA; DUAN, 2013). Um fragmento medindo 4 mm foi cortado da parte medial da face costal do hemidiafragma esquerdo. O fragmento do DIA foi fixado com o uso de dois clips. Um clip foi posicionado no arco costal adjacente a inserção do DIA e o outro foi posicionado no tendão central. O músculo foi verticalmente montado e submergido em um recipiente de vidro aquecido a 30°C contendo solução ringer oxigenada com 95% O₂ e 5%

CO2 (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canada). O comprimento óptimo (L_o) do DIA foi determinado durante a mensuração da força de contração isométrica máxima (P_t). Após a determinação do L_o , 10 minutos foram dados ao fragmento muscular para equilibrar as fibras musculares antes de se iniciar a avaliação da função muscular. No DIA, o arranjo paralelo das fibras resulta no comprimento óptimo das fibras que é igual a L_o (LYNCH et al., 1997). A força absoluta (P_t), o tempo de atingir o pico de tensão (TPT) e o tempo de $\frac{1}{2}$ relaxamento ($\frac{1}{2}RT$) foram registrados. A força tetânica máxima (P_o) foi obtida depois que a relação de frequência de força (FF) foi determinada. Para a determinação da FF o DIA foi estimulado na frequência de 50, 80, 100, 120, 150 3 200 Hz a uma velocidade de 300 ms. Durante cada contração tetânica, 1 minuto de repouso foi dado ao músculo. Assim como descrito por Lynch et al. (1997), neste trabalho, a força tetânica máxima do DIA foi obtida na FF de 100-120 Hz. A força específica de P_t e P_o (sP_t e sP_o) foi obtida, dividindo o valor da força absoluta pela área de transecção transversal (cross-sectional area - CSA), uma vez que a largura e a espessura do DIA podem variar entre os animais quando o cirurgião realiza a excisão do músculo (LYNCH et al., 1997). A CSA foi calculada de acordo com a seguinte equação: (massa muscular em mg) / [(comprimento óptimo em mm) x (densidade do músculo esquelético nos mamíferos em $1,06 \text{ mg/mm}^3$)] (LYNCH et al., 1997). A contração excêntrica foi determinada depois que a sP_o foi mensurada, assim como previamente descrito por Li, Yue e Duan (2008) e Hakim, Li e Duan (2008). Antes de submeter o DIA a 10 ciclos de contração excêntrica, o músculo permaneceu em repouso por 10 minutos. A taxa máxima e mínima (dF/dt_{\max} and dF/dt_{\min}) de desenvolvimento de força derivada na curva de tempo foi calculada. Após terminado o experimento, o fragmento de DIA foi aparado do tendão central e do arco costal, e o peso do fragmento foi mensurado numa balança de precisão. O fragmento muscular usado para os ensaios de força isométrica e o restante do DIA foram coletados em OCT (optimal cutting temperature), congelado em nitrogênio líquido resfriado em 2-metil butano para análise morfológica.

As propriedades viscosas do diafragma foram mensuradas de acordo com Hakim, Grange e Duan (2011). Resumidamente, o diafragma foi exposto a um protocolo de 6 etapas de estiramento, sem o uso de estimulação elétrica. Em cada etapa de estiramento, foi incrementado 10% do comprimento óptimo (L_o) a uma velocidade de 2cm/sec. A propriedade viscosa foi determinada através da mensuração da taxa de estresse-relaxamento (SRR) enquanto a m. diafragma foi alongado e mantido a 110% do seu L_o (HAKIM; GRANGE; DUAN, 2011). SRR foi calculado através da equação $[(\text{estresse}_1 - \text{estresse}_2)/(\text{tempo}_2 -$

tempo₁)] usando os seguintes períodos de tempo: pico de 0.1 s a pós pico (pp), 0.1 a 0.2 s pp, 0.2 a 0.5 s pp, 0.5 a 1 s pp e 1 a 1.5 s pp. No final do experimento, o peso do fragmento do diafragma foi determinado e após o mesmo foi congelado em nitrogênio líquido para análise de quantificação de hidroxiprolina.

4.2.4 Análise estatística

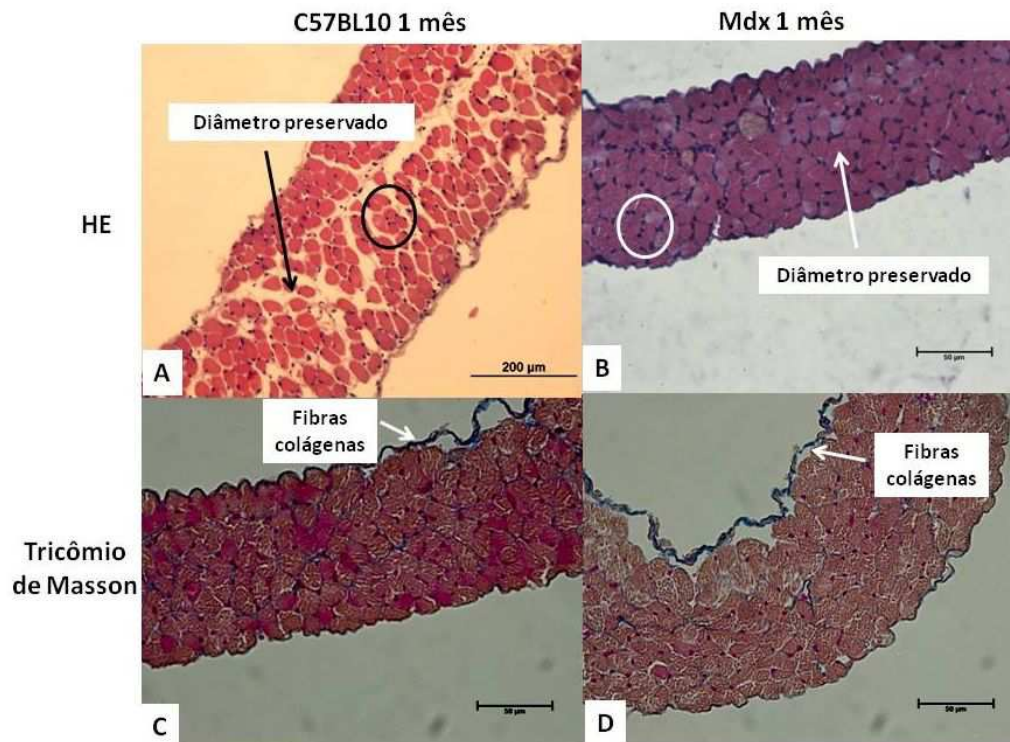
A análise estatística de ANOVA (One-way analysis of variance), seguida pela análise de LSD (Least significant difference) foi utilizada para a realização da análise estatística. O software da IBM SPSS (IBM Corporation, Armonk, New York) foi utilizado para a análise. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados obtidos demonstrarão a variabilidade como medida de desvio padrão e as respostas variarão de acordo com os diferentes fatores. As variações heterogênicas foram consideradas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO PRÉVIO

Sob microscopia de luz do músculo diafragma dos animais do grupo A (mdx e C57BL10 de 1 mês de idade), observamos que tanto os camundongos C57BL10 como os mdx apresentaram na coloração de hematoxilina-eosina, morfologia muscular normal, com núcleo basal e diâmetro das fibras musculares preservado (**Figura 2A e 2B**). Na coloração de Tricômio de Masson, para a identificação de fibras colágenas, observamos que, ambos os animais do grupo A (mdx e C57BL10), não apresentaram aumento na quantidade das fibras colágenas, sendo estas, presentes somente no epimísio, na cor azul (**Figura 2C e 2D**). Tais resultados de ambas as colorações sugerem que não há alteração evidente entre os camundongos mdx e C57BL10 com 1 mês de idade e que estes apresentam morfologia muscular normal (BANKS, 1998; MARQUES, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 2 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo A (mdx e C57BL10 de 1 mês de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina e Tricômio de Masson, aumento 20x

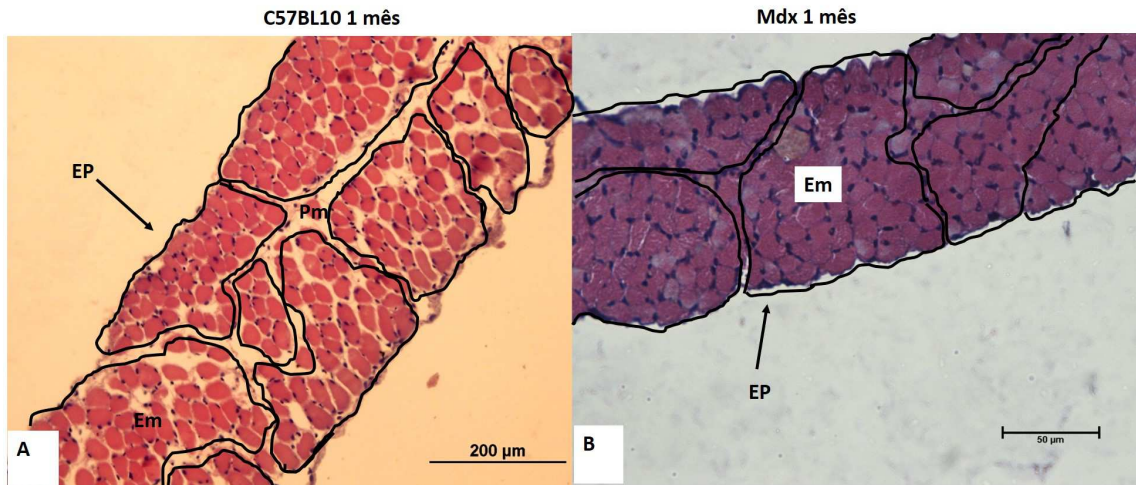


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Fotomicrografia **2A**, camundongo C57BL10 e **2B**, camundongo mdx (Hematoxilina e eosina), círculo indicando núcleo basal e seta mostrando o diâmetro da fibra muscular. **2C**, C57BL10 e **2D**, mdx (Tricômio de Masson), setas indicando a presença de fibras colágenas.

Em relação a organização estrutural do músculo diafragma dos animais do grupo A (mdx e C57BL10 de 1 mês de idade), observamos que tanto nos camundongos mdx como nos C57BL10, podemos identificar os fascículos musculares e suas estruturas, como o epimísio, endomísio e perimísio (**Figura 3A e 3B**), assim como descrito por Nishimura, Hattori e Takashi (1994) e Vasilev, Andreev e Kuhnel (1995). Tais aspectos observados, são característicos da organização estrutural de um músculo normal. Portanto podemos sugerir que nos animais do grupo A, tanto o componente contrátil, quanto o passivo e elástico do músculo diafragma estão preservados (BORG; CAULFIELD, 1980; HALL, 2009).

Figura 3 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo A (mdx e C57BL10 com 1 mês de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina, aumento 20x



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

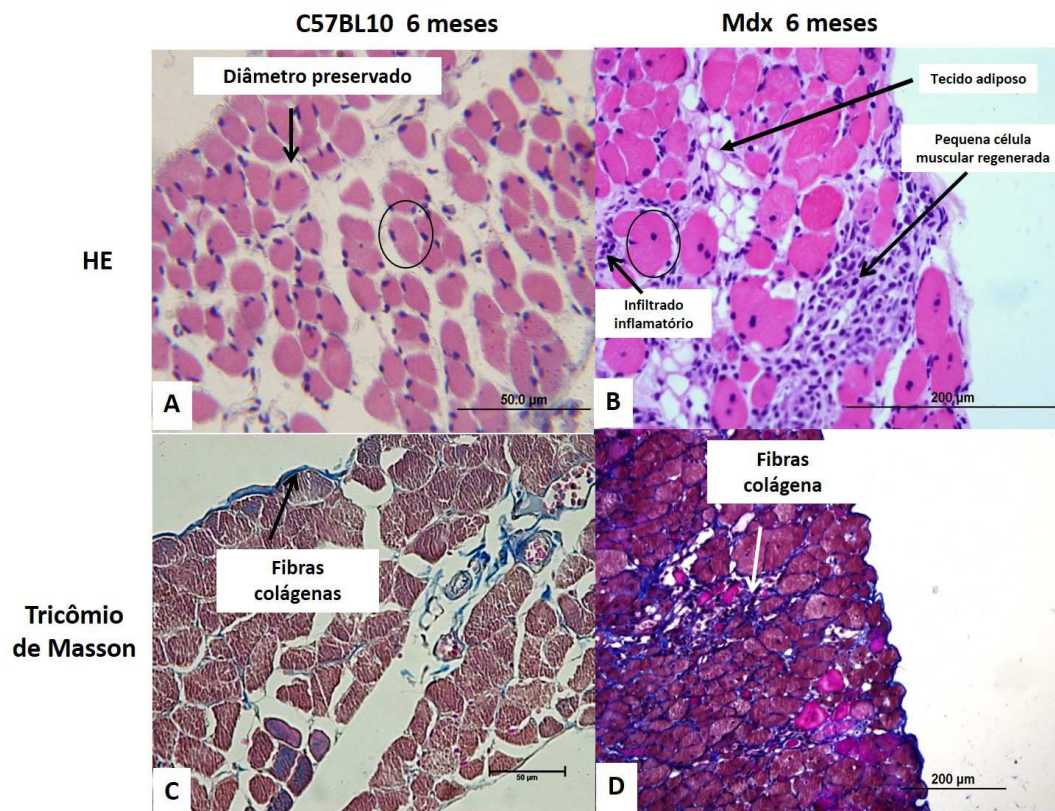
Legenda: Fotomicrografia 3A, camundongo C57BL10 e 3B, camundongo mdx. Observa-se o epimísio (EP), o perimísio (Pm) e o endomísio (Em).

Nos animais do grupo B (mdx e C57BL10 de 6 meses de idade), observamos que os camundongos C57BL10 apresentaram na coloração de hematoxilina-eosina, morfologia muscular normal, com núcleo basal e diâmetro de fibras musculares preservado (**Figura 4A**). Entretanto os camundongos mdx (**Figura 4B**) apresentaram núcleos centrais e basais, diâmetro de fibras musculares alterados (fibras hipertróficas e atroficas) e presença de infiltrado inflamatório perimisial. Entretanto podemos notar na **Figura 4B** a presença de tecido adiposo e a presença de pequenas e novas células musculares no meio do infiltrado inflamatório, indicando que apesar de reduzida, a capacidade de regeneração está presente nestes animais. Estas alterações no camundongo mdx, são características da idade do animal, uma vez que aos 6 meses de idade, o músculo do mdx sofreu picos de fraqueza e necrose muscular decorrente dos ciclos de degeneração e regeneração. Tal alteração sugere o comprometimento dos elementos contráteis do músculo diafragma analisados neste trabalho (CARNWATH et al., 1986; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; HALL, 2009; WILMANN et al., 2011).

Na coloração de Tricômio de Masson, para a identificação de fibras colágenas, notamos que os camundongos C57BL10 (**Figura 4C**) não apresentaram aumento na quantidade das fibras colágenas, entretanto os camundongos mdx apresentaram aumento na quantidade das fibras colágenas (**Figura 4D**). O aumento da quantidade das fibras colágenas,

no mdx ocorre devido a degeneração progressiva e regeneração limitada das fibras musculares, que leva o aparecimento de fibrose muscular e por consequente acometimento do aparato contrátil do músculo (CARNWATH et al., 1986; BERGMAN et al., 2012; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; YANG et al., 2012).

Figura 4 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo B (mdx e C57BL10 com 6 meses de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina e Tricômio de Masson, aumento 20x



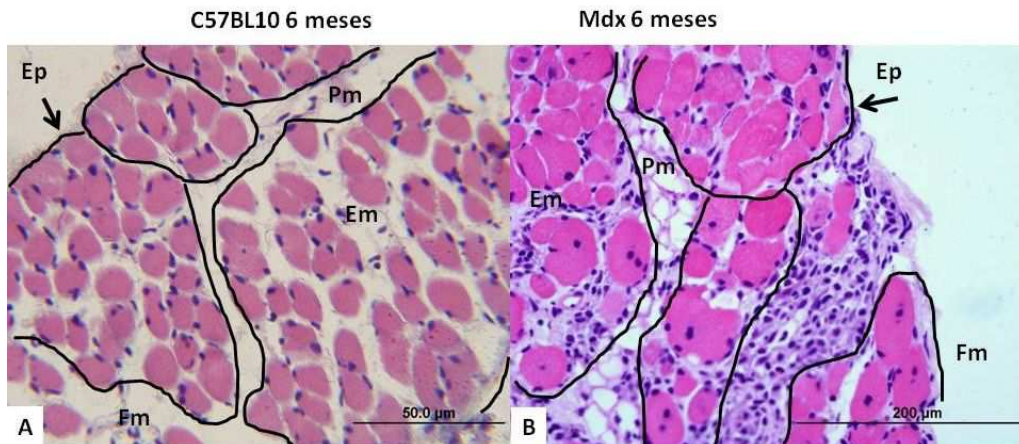
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Fotomicrografia **4A**, camundongo C57BL10 e **4B**, camundongo mdx (Hematoxilina e eosina). **4A**, círculo indicando núcleo basal e seta mostrando o diâmetro da fibra. **4B**, círculo indicando núcleo central, seta indicando o tecido adiposo e a presença de infiltrado inflamatório perimisial. **4C**, C57BL10 e **4D**, mdx (Tricômio de Masson), setas indicando a presença de fibras colágenas.

Em relação a análise estrutural do músculo diafragma dos animais do grupo B (mdx e C57BL10 de 6 meses de idade) observamos que mesmo havendo a presença de infiltrado inflamatório perimisial nos camundongos mdx ainda é possível identificar os fascículos musculares, o perimísio, endomísio e o epimísio (**Figura 5A e 5B**). Dessa forma podemos sugerir que o componente passivo e elástico do músculo diafragma do mdx, encontra-se na análise histológica, visualmente preservado nos animais estudados (BORG; CAULFIELD,

1980; SAXTON; DONNELLY, 1996; HALL, 2009). Entretanto, não podemos afirmar que existe funcionalidade das estruturas visualizadas, uma vez que o componente contrátil, encontra-se comprometido.

Figura 5 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo B (mdx e C57BL10 com 6 meses de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina, aumento 20x



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

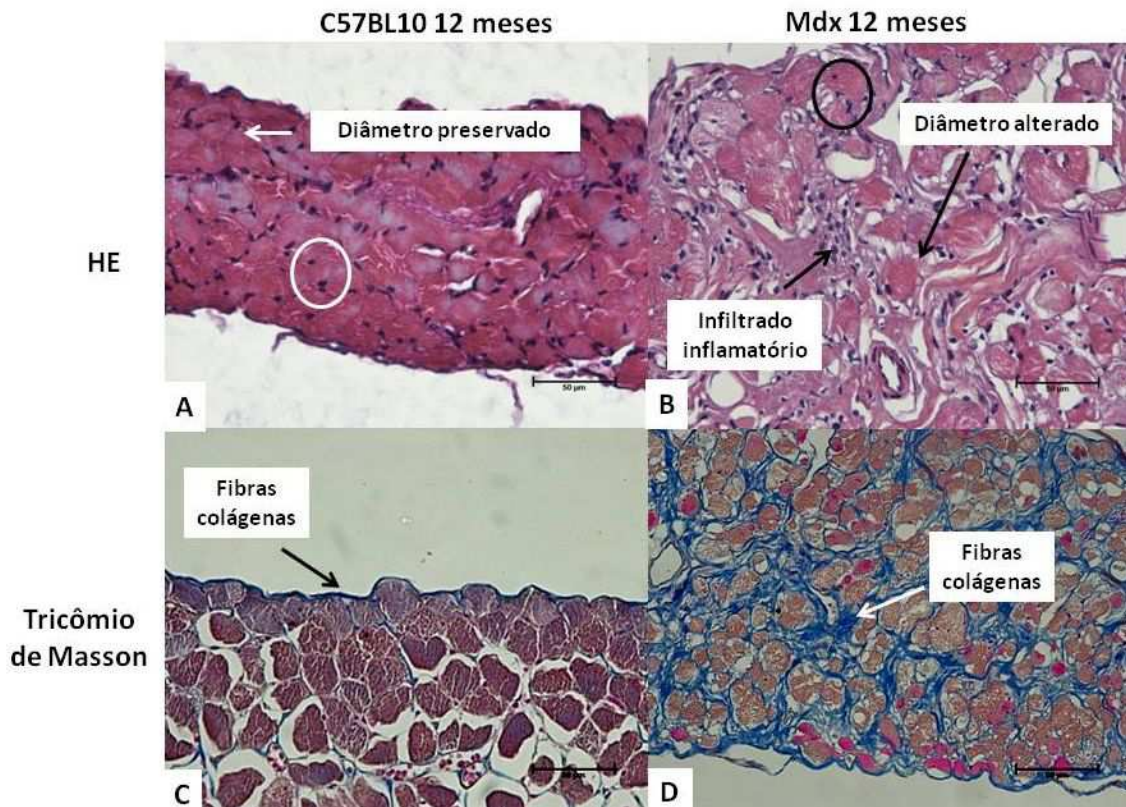
Legenda: Fotomicrografia **5A**, camundongo C57BL10 e **5B**, camundongo mdx. Observa-se o epimísio (**Ep**), o perimísio (**Pm**) e o endomísio (**Em**).

Nos animais do grupo C (mdx e C57BL10 de 12 meses de idade), podemos observar que os camundongos C57BL10 apresentaram na coloração de hematoxilina-eosina, morfologia muscular normal, com núcleo basal e diâmetro de fibras musculares preservado (**Figura 6A**). Entretanto os camundongos mdx (**Figura 6B**) apresentaram núcleo central, diâmetro das fibras musculares alterados (fibras hipertróficas e atróficas) e severa presença de infiltrado inflamatório perimisial. Estas alterações vão de encontro com as descritas por Willmann et al. (2011) que relata q o diafragma, é um músculo de rápido acometimento. Segundo Willmann et al. (2011), no diafragma do mdx, após o período de pico de inflamação, as alterações não retrocedem espontaneamente, favorecendo o uso deste modelo para uma avaliação final de resultados do ponto de vista morfológico, bioquímico e funcional.

Na coloração de Tricômio de Masson, para a identificação de fibras colágenas, notamos que os camundongos C57BL10 (**Figura 6C**) não apresentaram aumento significativo na quantidade das fibras colágenas, entretanto os camundongos mdx apresentaram um severo aumento na quantidade das fibras colágenas (**Figura 6D**). Este resultado vai de encontro com a progressão da doença no músculo diafragma do mdx. Nestes animais as alterações

musculares decorrentes da distrofia muscular, não retrocedem espontaneamente após picos de 8-16 semanas, como em alguns grupos musculares do mdx (DUCLOS et al., 1998; WILLMANN et al., 2011).

Figura 6 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo C (mdx e C57BL10 de 12 meses de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina e Tricômio de Masson, aumento 20x



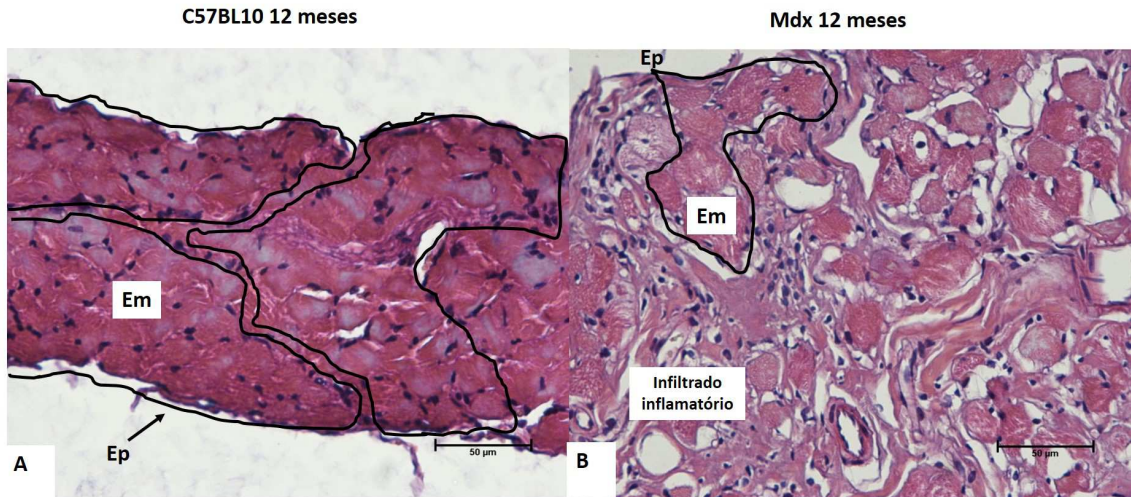
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Fotomicrografia **6A**, camundongo C57BL10 e **6B**, camundongo mdx (Hematoxilina e eosina). **6A**, círculo indicando núcleo basal e seta mostrando o diâmetro da fibra. **6B**, círculo indicando núcleo central, seta indicando o tecido adiposo e a presença de infiltrado inflamatório perimisial. **6C**, C57BL10 e **6D**, mdx (Tricômio de Masson), setas indicando a presença de fibras colágenas.

Em relação a análise estrutural do músculo diafragma dos animais do grupo C (mdx e C57BL10 de 12 meses de idade) observamos nos animais controles, C57BL10, um tecido mais organizado, podendo-se identificar o epimísio e endomísio (**Figura 7A**). Entretanto nos camundongos mdx (**Figura 7B**), notamos com dificuldade os fascículos musculares, o endomísio e o epimísio. Neste grupo podemos observar que o camundongo mdx, apresenta morfologia muscular diferente do camundongo C57BL10 e que tanto o componente contrátil como o componente passivo e elástico do músculo encontra-se comprometido, podendo afetar

gravemente a funcionalidade do diafragma (BORG; CAULFIELD, 1980; SAXTON; DONNELLY, 1996; LYNCH et al., 2001; HALL, 2009).

Figura 7 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo C (mdx e C57BL10 de 12 meses de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina, aumento 20x



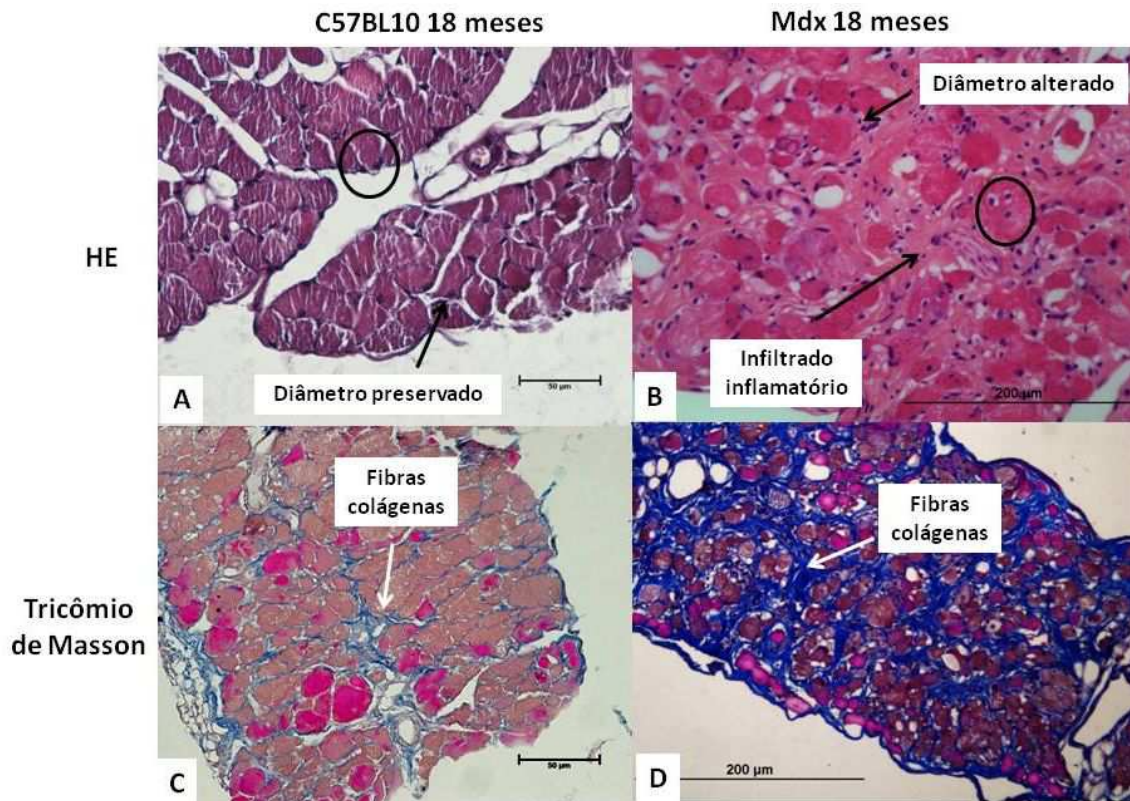
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Fotomicrografia 7A, camundongo C57BL10 e 7B, camundongo mdx. Observa-se o epimísio (Ep), o endomísio (Em) e a presença de infiltrado inflamatório na imagem 7B.

Nos animais do grupo D (mdx e C57BL10 de 18 meses de idade), observamos que os camundongos C57BL10 apresentaram na coloração de hematoxilina-eosina, morfologia muscular normal, com núcleo basal e diâmetro de fibras musculares preservado (Figura 8A). Entretanto os camundongos mdx (Figura 8B) apresentaram núcleos central, diâmetro das fibras musculares alterados (fibras hipertróficas e atroficas) e severa presença de infiltrado inflamatório perimisial assim como os camundongos mdx de 12 meses de idade, onde observamos um severo comprometimento do aparato contrátil. (BORG; CAULFIELD, 1980; SAXTON; DONNELLY, 1996; LYNCH et al., 2001; HALL, 2009).

Na coloração de Tricômio de Masson, para a identificação de fibras colágenas, notamos que os camundongos C57BL10 (Figura 8C) não apresentaram aumento na quantidade das fibras colágenas, entretanto os camundongos mdx apresentaram um severo aumento na quantidade das fibras colágenas (Figura 8D), evidenciando áreas de fibrose e mostrando que as alterações musculares decorrentes da distrofia muscular, não retrocedem espontaneamente, no diafragma do mdx (DUCLOS et al., 1998; WILLMANN et al., 2011).

Figura 8 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo D (mdx e C57BL10 de 18 meses de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina e Tricômio de Masson, aumento 20x

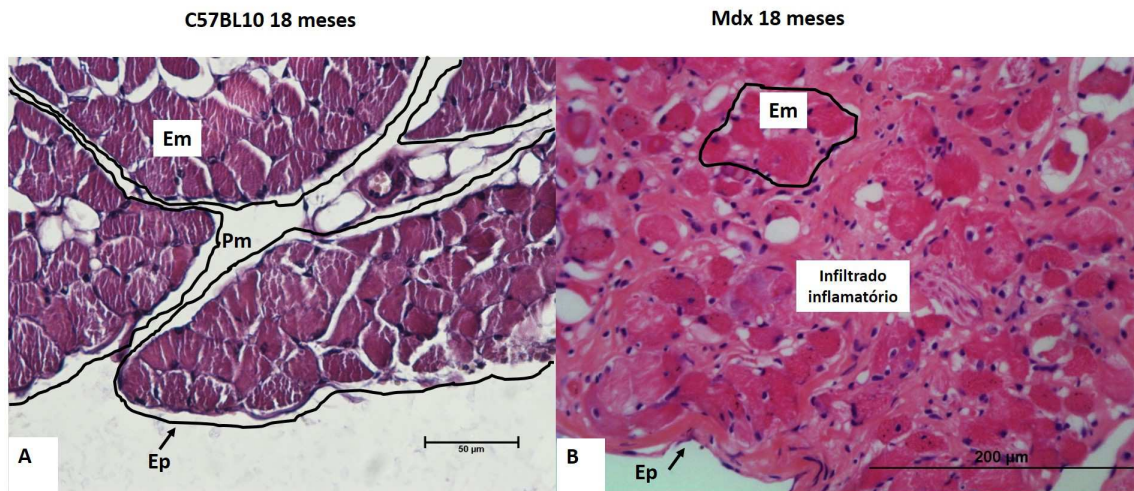


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Fotomicrografia **8A**, camundongo C57BL10 e **8B**, camundongo mdx (Hematoxilina e eosina). **6A**, círculo indicando núcleo basal e seta mostrando o diâmetro da fibra. **8B**, círculo indicando núcleo central, seta indicando o diâmetro da fibra e a presença de infiltrado inflamatório perimisial. **8C**, C57BL10 e **8D**, mdx (Tricômio de Masson), setas indicando a presença de fibras colágenas.

Em relação a organização estrutural do músculo diafragma dos animais do grupo D (mdx e C57BL10 de 18 meses de idade), observamos que nos animais controle C57BL10 (**Figura 9A**) é possível identificar os fascículos musculares, o epimísio, endomísio e perimísio. Entretanto nos camundongos mdx (**Figura 9B**) conseguimos somente identificar na lâmina histológica um fascículo muscular, devido a presença de grande quantidade de infiltrado perimisial, fato esse que reforça o grave acometimento do componente contrátil, passivo e elástico do diafragma (BORG; CAULFIELD, 1980; SAXTON; DONNELLY, 1996; LYNCH et al., 2001; HALL, 2009).

Figura 9 - Fotomicrografia dos camundongos do grupo D (mdx e C57BL10 de 18 meses de idade) na coloração de Hematoxilina- Eosina, aumento 20x

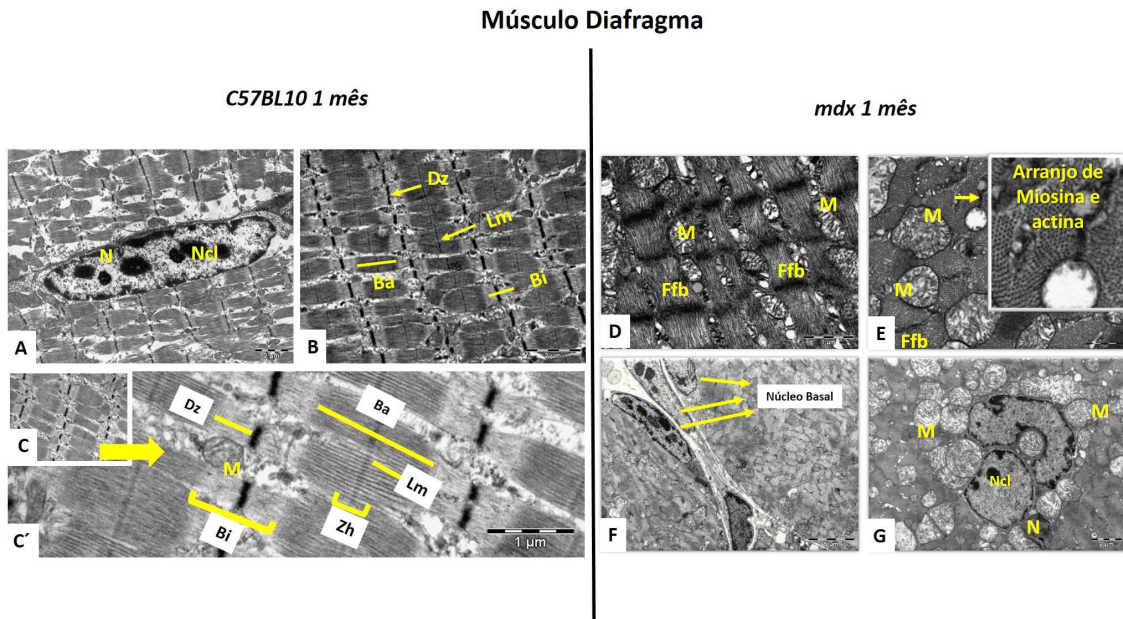


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Fotomicrografia **9A**, camundongo C57BL10 e **9B**, camundongo mdx. Observa-se o epimísio (**Ep**), o perimísio (**Pm**), o endomísio (**Em**) e a presença de infiltrado inflamatório na imagem **9B**.

Na análise de MET dos animais do Grupo A (mdx e C57BL10 de 1 mês de idade), observamos que tanto os camundongos mdx como os camundongos C57BL10 apresentaram morfologia muscular sem alteração aparente e que estes apresentam-se, conforme descrito por Hill (1970) e Hall (2009). Morfologicamente podemos observar os núcleos (N) basais, os nucléolos (Ncl), as fibras musculares (Ffb) dispostas paralelamente e organizadas, e as mitocôndrias (M) com contornos regulares (**Figura 10**). Estruturalmente, observamos que os componentes do sarcômero, em ambas as linhagens, apresentaram-se preservados, conforme descrito por (BORG; CAULFIELD, 1980; HALL, 2009). Identificou-se com clareza o disco Z (Dz), a linha M (Lm), a banda A (Ba) e I (Bi) e zona H (Zh) (**Figura 10**).

Figura 10 - Eletromicrografia do músculo diafragma do camundongo C57BL10 e mdx com 1 mês de idade, aumento 7.000 X



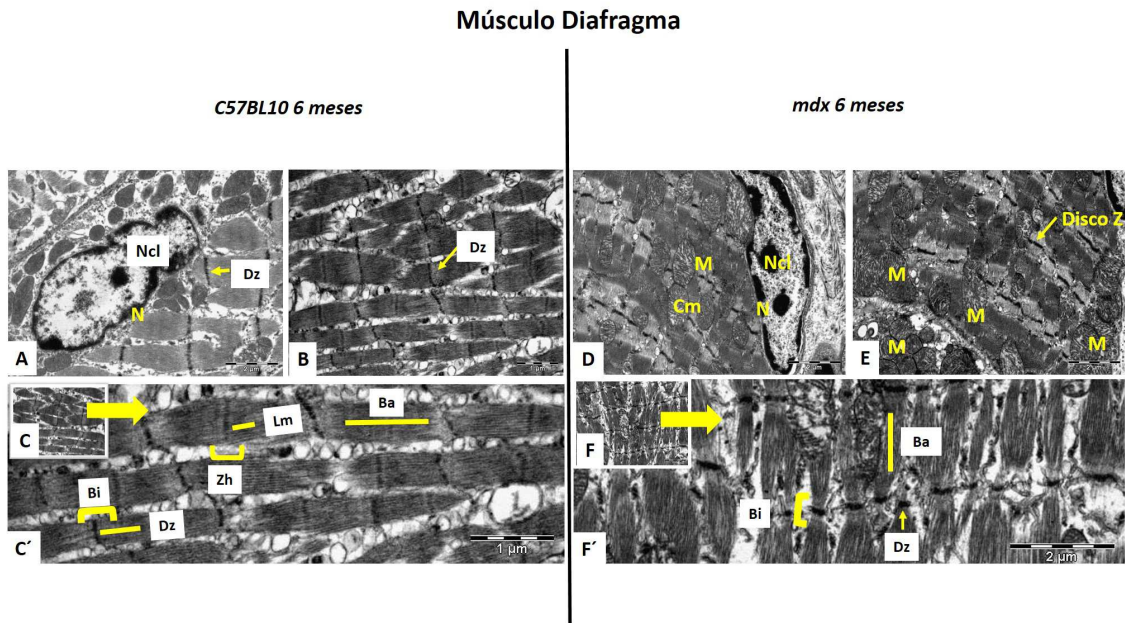
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: 10A, B, C e C' camundongo C57BL10 e 10D, E, F e G camundongo mdx. Observa-se o núcleo (N) basal em ambas as linhagens de animais, o nucléolo (Ncl), as mitocôndrias (M), as fibras musculares (Ffb), a Banda A (Ba) e I (Bi), a zona H (Zh), linha M (Lm) e os discos Z (Dz) (10C' ampliação da imagem 10C).

Nos animais do Grupo B (mdx e C57BL10 de 6 meses de idade), observamos que os camundongos mdx apresentaram núcleo (N) central, diferente dos camundongos C57BL10 que apresentaram núcleo (N) basal. Tal alteração nos camundongos mdx está de acordo com a progressão da distrofia muscular, onde podemos observar a centralização dos núcleos das células musculares devido aos ciclos de degeneração e regeneração muscular (SPENCER; TIDBALL, 2001; JORDE, 2004; NAKAMURA; TAKEDA, 2011). Assim como nos camundongos C57BL10, os mdx apresentaram os nucléolos (Ncl) e as mitocôndrias (M) com contornos regulares, podendo-se observar a crista mitocondrial (Cm) (**Figura 11**). Em relação a organização das fibras musculares (Ffb), podemos observar tanto nos camundongos mdx como nos camundongos C57BL10, que as fibras musculares se apresentam hipotróficas e com arranjos desalinhados. Estruturalmente, podemos identificar em ambas as linhagens de animais deste grupo, os componentes do sarcômero, como o disco Z (Dz), a linha M (Lm), a banda A (Ba) e I (Bi) e zona H (Zh) (**Figura 11**). Entretanto, observamos o estreitamento do sarcômero nos animais mdx na região de disco Z, linha M e banda I. Este achado nos sugere

que o aparato contrátil nestes animais se encontra alterado, uma vez que a região de banda I são compostas de filamentos finos de actina (BORG; CAULFIELD, 1980; HALL, 2009).

Figura 11 - Eletromicrografia do músculo diafragma do camundongo C57BL10 e mdx com 6 mês de idade, aumento 7.000 X



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

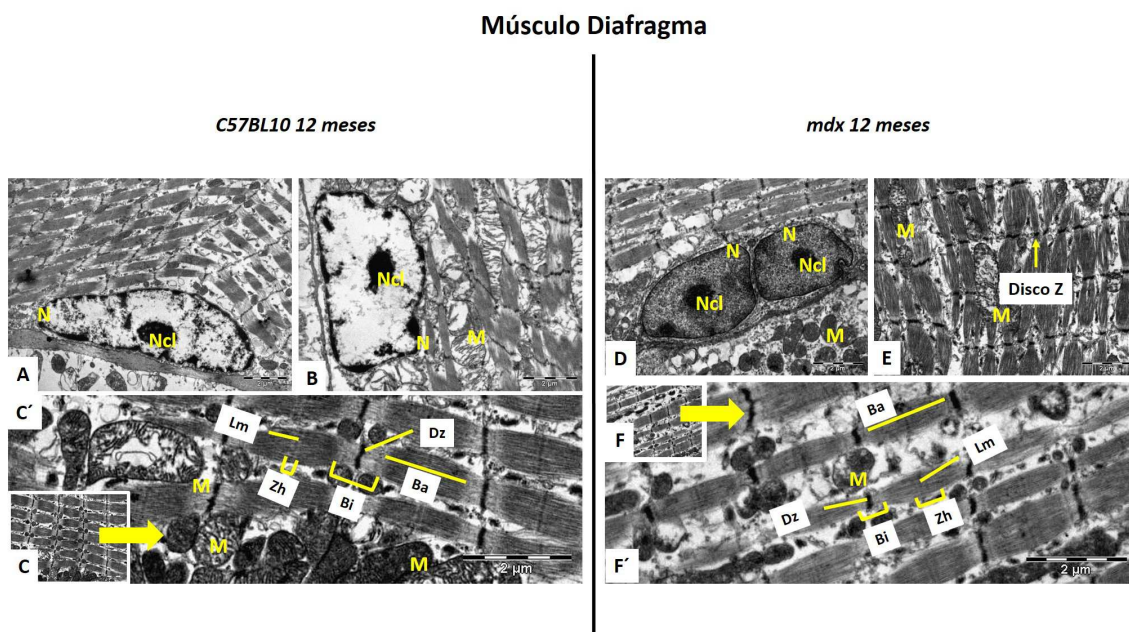
Legenda: 11A, B, C e C' camundongo C57BL10 e 11D, E, F e F' camundongo mdx. Observa-se o núcleo (N) basal nos camundongos C57BL10 e central nos camundongos mdx. Nota-se em ambas as linhagens o nucléolo (Ncl), as mitocôndrias (M), a crista mitocondrial (Cm), as fibras musculares (Ffb) hipotróficas, a Banda A (Ba) e I (Bi), zona H (Zh), linha M (Lm) e os discos Z (Dz) (11C' e 11F' ampliação da imagem 11C e 11F, respectivamente).

Nos animais do Grupo C (mdx e C57BL10 de 12 meses de idade), observamos que os camundongos mdx apresentaram núcleo (N) central, diferente dos camundongos C57BL10 que apresentaram núcleo (N) basal, assim como os camundongos mdx de 6 meses de idade. Este achado evidencia, assim como descrito por Willmann et al. (2011), que apesar do fenótipo suave relatado nos camundongos mdx, o músculo diafragma apresenta ciclos de degeneração contínuo e regeneração limitada assim como na DMD humana.

Em relação a organização das fibras musculares (Ffb), observamos o estreitamento das fibras musculares (Ffb) nas duas linhagens de animais estudados deste grupo. Assim como nos camundongos C57BL10, os camundongos mdx apresentaram os nucléolos (Ncl) e as mitocôndrias (M) com contornos regulares. Os componentes do sarcômero, como o disco Z

(Dz), a linha M (Lm), a banda A (Ba) e I (Bi) e zona H (Zh), podem ser observados em ambas as linhagens de animais deste grupo, entretanto, notamos um estreitamento acentuado da fibra muscular (Ffb) e na região de banda I (Bi) nos camundongos mdx. Estes achados estão de acordo com a progressão da distrofia muscular e nos sugere o comprometimento do aparato contrátil do camundongo mdx (BORG; CAULFIELD, 1980; HALL, 2009) (**Figura 12**).

Figura 12 - Eletromicrografia do músculo diafragma do camundongo C57BL10 e mdx com 12 mês de idade, aumento 7.000 X



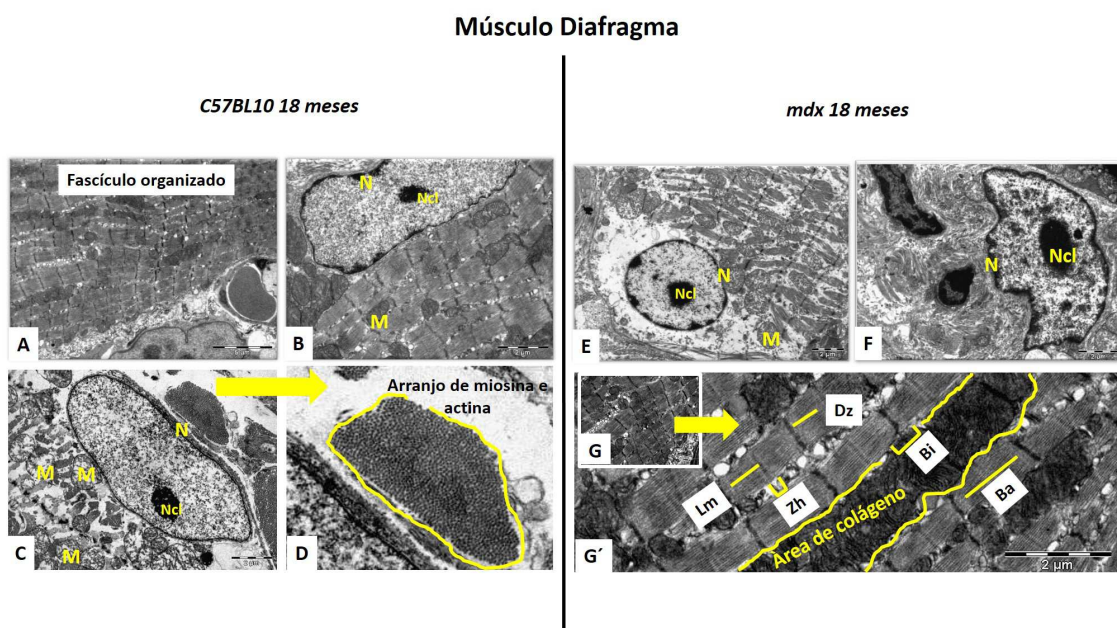
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: 12A, B, C e C' camundongo C57BL10 e 12D, E, F e F' camundongo mdx. Observa-se o núcleo (N) basal nos camundongos C57BL10 e central nos camundongos mdx. Nota-se em ambas as linhagens o nucléolo (Ncl), as mitocôndrias (M), as fibras musculares (Ffb) hipotróficas (acentuadas no mdx), a Banda A (Ba) e I (Bi), zona H (Zh), linha M (Lm) e os discos Z (Dz) (12C' e 12F' ampliação da imagem 12C e 12F, respectivamente).

Nos animais do Grupo D (mdx e C57BL10 de 18 meses de idade), observamos que, os camundongos mdx apresentaram núcleo (N) central, diferente dos camundongos C57BL10 que apresentaram núcleo (N) basal. Em relação a organização das fibras musculares (Ffb), observamos que o estreitamento das fibras musculares (Ffb) continuam presentes nas duas linhagens, entretanto notamos nos camundongos mdx, grandes áreas de colágeno, entre as fibras musculares (Ffb). Estas alterações observadas no camundongo mdx são semelhantes às alterações observadas nos mdx com 12 meses de idade, onde observamos a progressão da distrofia muscular e o comprometimento do aparato contrátil (BORG; CAULFIELD, 1980;

HALL, 2009). Assim como nos camundongos C57BL10, os camundongos mdx apresentaram os nucléolos (Ncl) e as mitocôndrias (M) com contornos regulares. Os componentes do sarcômero, como o disco Z (Dz), a linha M (Lm), a banda A (Ba) e I (Bi) e zona H (Zh), apresentaram-se com áreas de estreitamento da Banda I (Bi). Tal achado sugere q o funcionamento do aparato contrátil está comprometido uma vez que a região de banda I (Bi) contém filamentos finos de actina (BORG; CAULFIELD, 1980; HALL, 2009) (**Figura 13**).

Figura 13 - Eletromicrografia do músculo diafragma do camundongo C57BL10 e mdx com 18 mês de idade, aumento 7.000 X



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: 13A, B, C e D camundongo C57BL10 e 13E, F, G e G' camundongo mdx. Observa-se o núcleo (N) basal nos camundongos C57BL10 e central nos camundongos mdx. Nota-se em ambas as linhagens o nucléolo (Ncl), as mitocôndrias (M), as fibras musculares (Ffb) hipotróficas com a presença de grandes áreas de colágeno no mdx, a Banda A (Ba) e I (Bi), zona H (Zh), linha M (Lm) e os discos Z (Dz) (13G' ampliação da imagem 13G).

5.2 CRIAÇÃO DOS CLIPS E DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO MÚSCULO FUNCIONAL DO DIAFRAGMA

Para a criação de uma nova metodologia de se avaliar a função muscular do diafragma murino, projetou-se dois clips capazes de fixar o fragmento do músculo diafragma. O projeto visou criar uma fixação por completo de ambas as extremidades (costelas e centro tendíneo) do fragmento do músculo diafragma.

Os clips foram projetados para fixar 1 fragmento de 4 mm de largura. Optou-se por utilizar o material plástico para a confecção do mesmo, com o objetivo de produzir dois clips de material leve. A escolha da largura do fragmento do músculo diafragma foi eleita de acordo com a média de largura usada por autores que utilizaram a técnica de sutura para a avaliação músculo funcional do diafragma (LYNCH et al., 1997; DECONINCK et al., 1998; AUSTIN et al., 2000; ROSSI et al., 2001; GREGOREVIC et al., 2002; LAW, 2004; MATECKI; GUIBINGA, PETROF, 2004; BARTON, et al., 2005; HARCOURT et al., 2005; MATECKI et al., 2005; VIOSIN et al., 2005; HINKLE et al., 2007; GEHRIG et al., 2008; STUPKA et al., 2008; BARTON et al., 2010; BEASTROM et al., 2011; BISH et al., 2011; PETERSON et al., 2011; GEHRIG et al., 2012; PAULY et al., 2012; SERRA et al., 2012; SELSBY et al., 2013; SMITH, BARTON; 2014). O projeto dos clips de acordo com as normas da Universidade de Missouri – Columbia, MO, Estados Unidos, encontra-se em sigilo aguardando a publicação do mesmo, para futura divulgação.

Para o treinamento da coleta do músculo diafragma os animais foram anestesiados profundamente com uma associação de 25mg/mL de Ketamina, 2,5mg/mL de Xilazina e 0,5 mg/mL de Acepromazina dissolvida em 0,9% de NaCl, (dosagem: 2,5 µl/g por peso corporal) para que não apresentassem nenhum estímulo tátil, conforme descrito no TREAT- NMD, Neuromuscular Network,” Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro”, versão revisada no dia 9 de março, 2013, por Gordon Lynch. Após os seguintes passos foram realizados:

- 1- Primeiramente o peso corporal dos animais foi aferido em balança de precisão;
- 2- Higienização do corpo do animal utilizando álcool 70%;
- 3- Posicionamento do animal em decúbito dorsal para a mensuração (através de paquímetro digital) da largura da caixa torácica. Para esta medida tomou-se como referência o corpo do esterno;
- 4- Posicionamento do animal em decúbito lateral direito ou esquerdo para a mensuração (através de paquímetro digital) da altura da caixa torácica. Para esta medida tomou-se como referência o corpo do esterno. (Neste experimento elegeu-se o decúbito direito como uma posição referencial das medidas, com a finalidade de padronizar a metodologia. Entretanto não há diferença previamente observada com a mensuração em decúbito lateral esquerdo);

- 5- Fixação dos membros superiores do animal em um prato confeccionado de Sylgard (DOYLE et al., 2009);
- 6- Com o uso de uma tesoura e uma pinça, realizou-se uma incisão no sentido caudo cranial (acompanhando a linha alba) na pele do animal, do abdômen inferior até a primeira costela. Após, a pele do animal das regiões torácica e abdominal foram rebatidas;
- 7- Acesso a cavidade abdominal: realizar o acesso com uma incisão longitudinal no músculo reto abdominal removendo-o;
- 8- Remover o fígado e estômago do animal;
- 9- Abertura da caixa torácica: com o uso de uma tesoura, realizar uma incisão no 5 espaço intercostal para a abertura da caixa torácica;
- 10- Remoção do coração e pulmão do animal;
- 11- Remoção do músculo diafragma do animal;

A microdissecação detalhada do músculo diafragma não é reportada pelo TREAT-NMD, Neuromuscular Network,” Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro”, versão revisada no dia 9 de março, 2013, por Gordon Lynch.

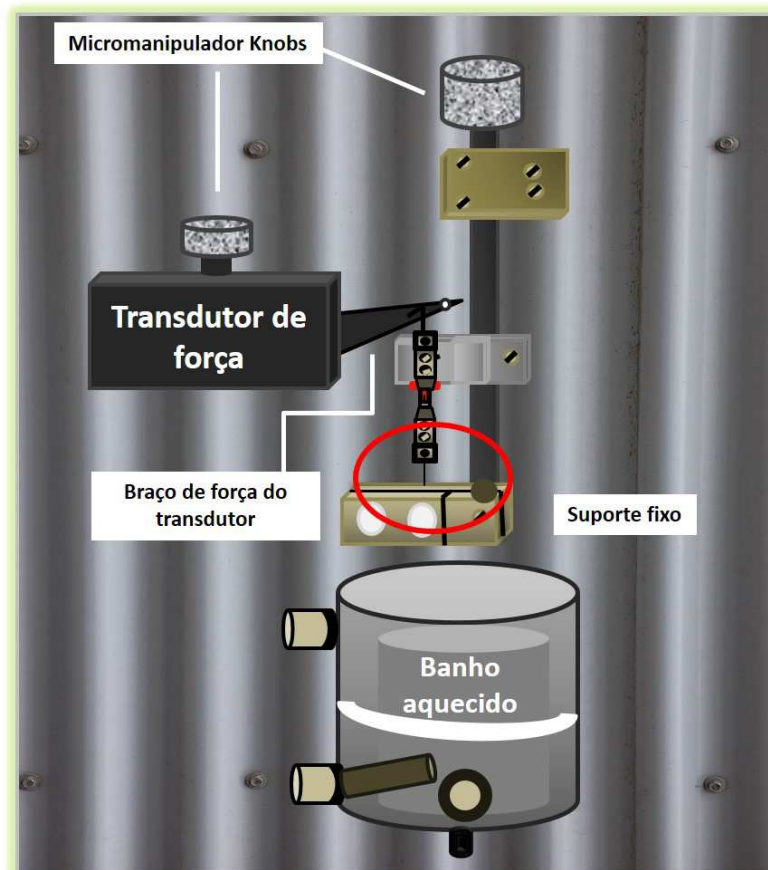
Após o músculo diafragma ser gentilmente dissecado, este foi colocado em Solução Ringer oxigenada conforme descrito pelo TREAT- NMD, Neuromuscular Network,” Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro” a 24-25°C e microdissecado com auxílio do Microscópio Trinocular da marca Nikon, modelo SMZ 800.

Após o músculo diafragma ser colocado em Solução Ringer oxigenada, este foi gentilmente alongado e fixado na sua posição anatômica em um prato com silicone – Sylgard, confeccionado no laboratório. Para a confecção deste prato, foi adicionado 4-7 mm de silicone na placa de petri, conforme protocolo descrito por Doyle et al. (2009). A microdissecação iniciou-se com o rebatimento parcial das costelas, para que somente restasse um arco costal fixado ao músculo diafragma. O excesso de tecido conjuntivo presente na superfície do músculo diafragma também foi gentilmente retirado, uma vez que a sua presença, dificulta a posterior fixação do músculo para as análises músculo-funcionais. Foi coletado 1 fragmento de 4mm de cada animal utilizado, localizado no lado esquerdo do m. diafragma. O tamanho

do fragmento está de acordo com o reportado por TREAT- NMD, Neuromuscular Network,” Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro”.

Ao término da coleta do fragmento do músculo diafragma, as costelas e o tendão central foram fixados nos clips em um prato de Sylgard e fixados no equipamento 1200 A in vitro System Mouse por um gancho de aço na parte superior (clip fixado na costela) e um fio de sutura na parte inferior (clip fixado no centro tendíneo), conforme ilustrado na **Figura 14** e submergido em um banho fechado aquecido a 30°C contendo Solução Buffer oxigenada (95% O₂ and 5% CO₂).

Figura 14 - Esquema representativo da localização do fragmento do m. diafragma, do tamanho utilizado e da fixação do fragmento no equipamento



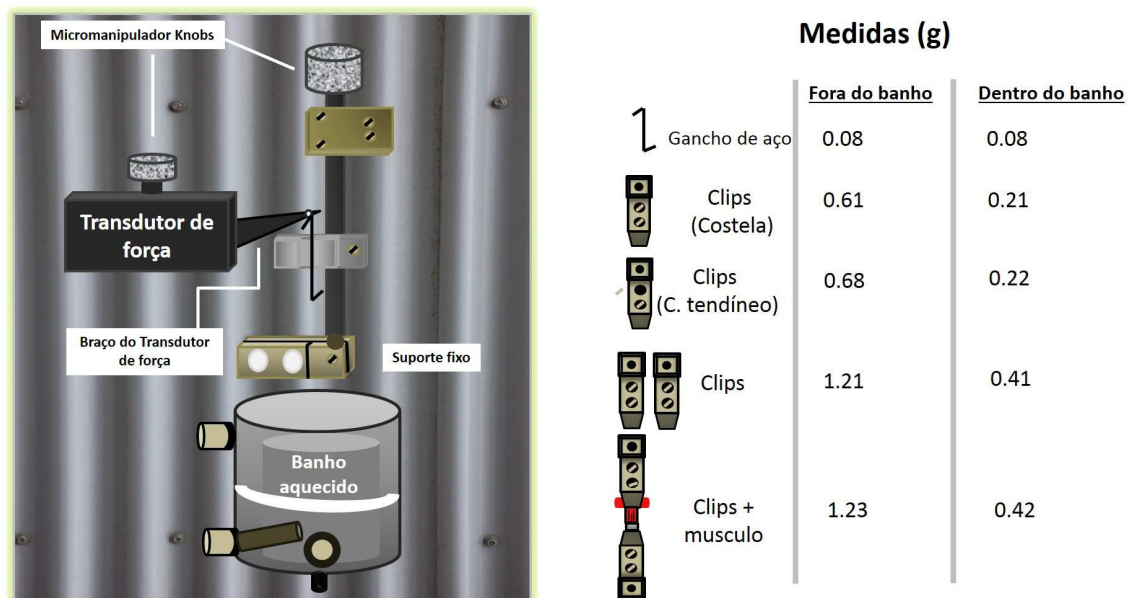
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Observar como os clips e o fragmento do músculo diafragma se posicionam no equipamento.

Entretanto, se observarmos o clip localizado na parte inferior (clip fixado no centro tendíneo), notamos que este pode exercer força de tração no fragmento do músculo diafragma tanto quando este estiver fora ou dentro do banho aquecido e causar excesso de estiramento

no músculo e subsequente lesão muscular. Diante a possibilidade de o peso dos clips influenciar e prejudicar a análise da função muscular do diafragma, realizou-se mensurações do peso de todos os componentes que poderiam alterar os resultados das análises (**Figura 15**). Esta mensuração foi realizada no próprio equipamento 1200 A in vitro System Mouse, através do peso informado pelo transdutor de força.

Figura 15 - Esquema representativo do peso do material utilizado para a avaliação do m. diafragma com os respectivos valores em gramas do material utilizado



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Observar as estruturas utilizadas na avaliação da função muscular do diafragma e relacioná-las com o respectivo peso.

Conforme os dados acima, podemos observar que o clip inferior pode exercer uma força de estiramento sobre o músculo diafragma de 1,23g fora e 0,42g dentro do banho aquecido. Observa-se que quando o clip está submerso em solução salina, a densidade da solução Ringer Buffer, não é suficiente para realizar a flutuação por completo do clip inferior, não isentando dessa forma, possíveis lesões no músculo.

Diante a necessidade de ausentar qualquer tipo de força que possa estirar e lesionar o m. diafragma, projetamos um novo suporte fixo, capaz de fixar o clip inferior e assim impedir possíveis danos no m. diafragma. O projeto do suporte fixo, de acordo com as normas da

Universidade de Missouri – Columbia, MO, Estados Unidos, encontra-se em sigilo, aguardando a publicação do mesmo para futura divulgação.

Para o desenvolvimento da metodologia de avaliação da função muscular do m. diafragma, utilizou-se o Equipamento 1200 A in vitro System Mouse. Os testes funcionais executados foram destinados a determinar os parâmetros a serem adotados na metodologia.

O teste de amplitude de força foi desenvolvido para ajustar o valor da amplitude de força a ser utilizada no equipamento. Este parâmetro não é um dado relatado nos artigos consultados e nem pelo TREAT- NMD, Neuromuscular Network, "Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro", edição revisada no dia 9 de março de 2013, por Gordon Lynch. O objetivo deste teste foi identificar com qual intensidade de amplitude de força, o músculo diafragma iria desempenhar com maior eficácia sua força absoluta. Para tal foram utilizados 5 camundongos C57BL6 e 3 mdx, ambos de 7 meses e meio de idade. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso corporal, comprimento ótimo, área de secção transversal (cross-sectional area, CSA), força específica de P_t (sP_t), força específica de P_o (sP_o), frequência de força (FF) nas intensidades de 50, 80, 100, 120, 150 e 200 Hz, 10 ciclos de contração excêntrica (Ecc) e a força absoluta nas seguintes amplitudes: 100, 300, 600, 700, 800, 900 e 1000 μ Amp (**Gráfico 1**). Os parâmetros descritos abaixo, estão de acordo com o TREAT- NMD, Neuromuscular Network, "Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro", com exceção do teste de amplitude de força que não é relatado pelos autores.

Peso corporal: após os animais serem eutanasiados, estes foram colocados em balança de precisão e o peso corporal foi aferido em gramas (g).

Área de secção transversal (CSA): massa muscular (mg)/ L_f (mm) x densidade muscular (1.06 mg/mm^3) = _____ mm^2 .

L_f = comprimento da fibra muscular. No caso do músculo diafragma, devido seu arranjo paralelo das fibras, $L_f = L_o$ (comprimento ótimo da fibra)

Densidade muscular: nos mamíferos, 1.06 mg/mm^3 .

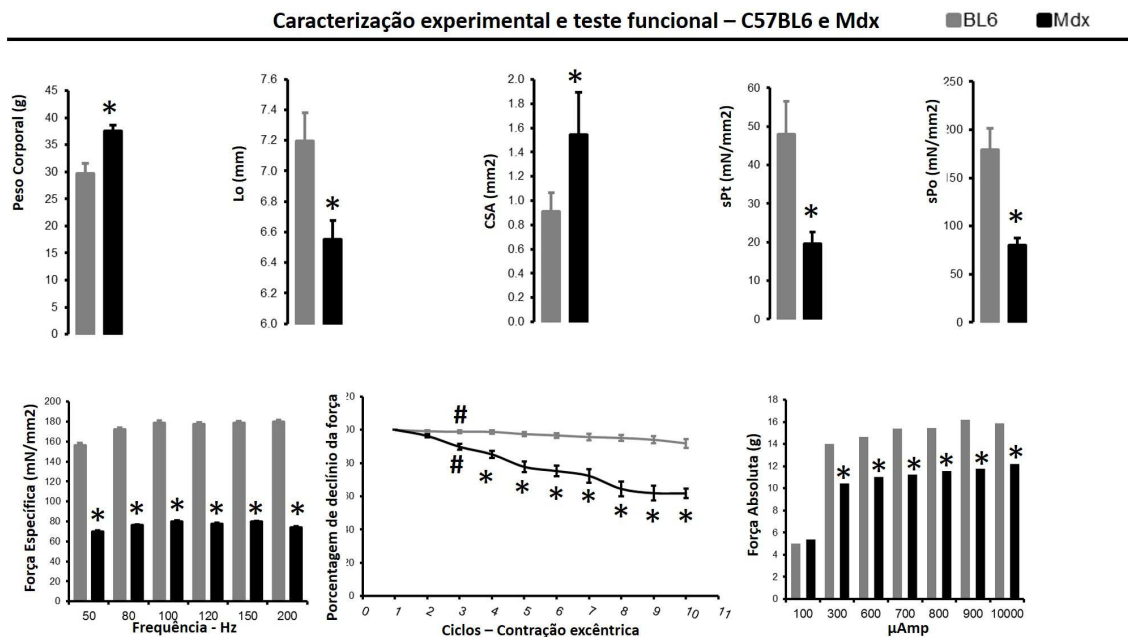
Força absoluta específica (sP_t): esta foi determinada estimulando o músculo a uma frequência de 1 Hz. A força absoluta específica de uma única contração foi obtida através da normalização do valor da força (P_t) com o valor da área de secção transversal (CSA –cross-sectional area).

Força tetânica específica (sP₀): A força tetânica específica foi determinada estimulando o músculo em sua supramáxima voltagem, usando uma frequência de 150 Hz para se atingir o plateau. A força específica foi obtida através da normalização do valor da força (P₀) com o valor da área de secção transversal (CSA –cross-sectional area).

Frequência de força (FF): a força do m. diafragma foi testada nas intensidades de 50, 80, 100, 120, 150 e 200 Hz com o objetivo de eleger qual frequência de estimulação produz o plateau.

Teste de Amplitude: foram testadas as seguintes amplitudes: 100, 300, 600, 700, 800, 900 e 1000 μ Amp com o objetivo de determinar com que amplitude o m. diafragma melhor desempenha sua força absoluta. As mesmas foram ajustadas manualmente no equipamento.

Gráfico 1 - Comparação dos dados de caracterização experimental e teste de amplitude de força entre o camundongo C57BL6 e mdx de 7 meses e ½ de idade



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: *fragmento do músculo diafragma do camundongo mdx significativamente diferente do camundongo C57BL6, # ponto início do declínio da contração excêntrica entre mdx e BL6.

Em relação a caracterização experimental dos animais (peso corporal, comprimento óptimo do m. diafragma e CSA) (**Gráfico 1**), observamos que os camundongos mdx apresentaram uma diferença significativa no peso corporal quando comparados aos animais C57BL6. Este dado é uma informação esperada, uma vez que o camundongo mdx com 7 meses e ½ de idade, apresenta severa fibrose muscular (CARNWATH et al., 1986; SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; VAN

PUTTEN et al., 2011). Sugerimos que a presença de fibrose, aumenta o peso da massa corporal do camundongo mdx.

Em relação ao comprimento ótimo da fibra muscular do diafragma, observamos que no camundongo mdx o comprimento ótimo encontra-se reduzido. Sugerimos que esta redução ocorre devido a presença de fibrose, que diminui as áreas de sobreposição dos miofilamentos finos sobre os miofilamentos grossos, impedindo, portanto, que este músculo se alongue como nos animais controles, C57BL6 (**Gráfico 1**). Entretanto, mesmo os camundongos mdx apresentando comprimento ótimo significativamente reduzido, estes apresentam uma área de transecção transversal (CSA) aumentada. Este dado foi observado por outros autores, e sugere-se que ocorre devido a presença de fibrose muscular que aumenta a espessura e peso do músculo (CARNWATH et al., 1986; SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; WILMANN et al., 2011; VAN PUTTEN et al., 2011).

Na análise da força específica de uma única contração e da força tetânica específica, observamos que ambas estão significativamente reduzidas no camundongo mdx quando comparados com os animais de linhagem C57BL6 (**Gráfico 1**). Este resultado é um dado esperado, uma vez que a musculatura do camundongo mdx nesta idade é caracterizada por severa degeneração das fibras musculares e por conseguinte perda da força muscular (ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; VAN PUTTEN et al., 2011).

Na análise da relação força-frequência produzida em diferentes variações (50, 80, 100, 120, 150 e 200 Hz), que todas as frequências analisadas produziram uma variação significativa entre os camundongos mdx e C57BL6. Entretanto, somente nas frequências de 80, 100, 120, 150 Hz pode-se observar valores semelhantes. Tal resultado indica que entre nas frequências de 80, 100, 120 e 150 Hz, a fibra muscular do diafragma (mdx, C57BL6) consegue ser estimulada rapidamente, gerando uma suave contração capaz de ser sustentada em sua força máxima, ou seja, atingindo o plateau (**Gráfico 1**). Estas frequências testadas foram estipuladas de acordo com as intensidades descritas no TREAT- NMD, Neuromuscular Network, "Measuring isometric force of isolated mouse muscle in vitro", edição revisada no dia 9 de março/2013 por Gordon Lynch. Neste presente estudo não houve variação na relação força-frequência nas intensidades de 10 e 30 Hz.

Na análise de porcentagem do declínio da força durante 10 ciclos de contração excêntrica (Ecc), observamos que no 3 Ecc ocorre o primeiro ponto de declínio da contração excêntrica entre o camundongo mdx e o C57BL6. A partir deste ponto, todos os demais ciclos analisados do camundongo mdx, diferiram significativamente do camundongo C57BL6, demonstrando que os camundongos mdx apresentam o músculo diafragma mais suscetível a fadiga (**Gráfico 1**). Este dado está de acordo com as descrições observadas no camundongo mdx e com a progressão da distrofia muscular (CAROMANO, 1999; KORNEGAY et al., 1999; LYNCH et al., 2001; GOSSELIN et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004; STROBER, 2006).

No teste de amplitude, observamos que a força absoluta obtida em 100 μ Amp, além de gerar uma reduzida força absoluta no músculo diafragma, esta não apresentou diferença significativa entre o camundongo mdx como no C57BL6. Entretanto nas amplitudes de 300, 600, 700, 800, 900 e 1000 μ Amp notamos respectivamente, um aumento crescente da força absoluta. Porém este aumento não é significativo entre animais de mesma linhagem e amplitudes diferentes. Comparando os camundongos C57BL6 com os mdx, podemos notar que existe uma diferença significativa.

Neste teste podemos sugerir, que para a avaliação do músculo diafragma poderíamos utilizar a amplitude máxima gerada pelo equipamento de 1000 μ Amp. Porém, optamos por utilizar a amplitude de 900 μ Amp, uma vez que, observamos no **Gráfico 1**, uma linha de plateau entre 700, 800 e 900 μ Amp.

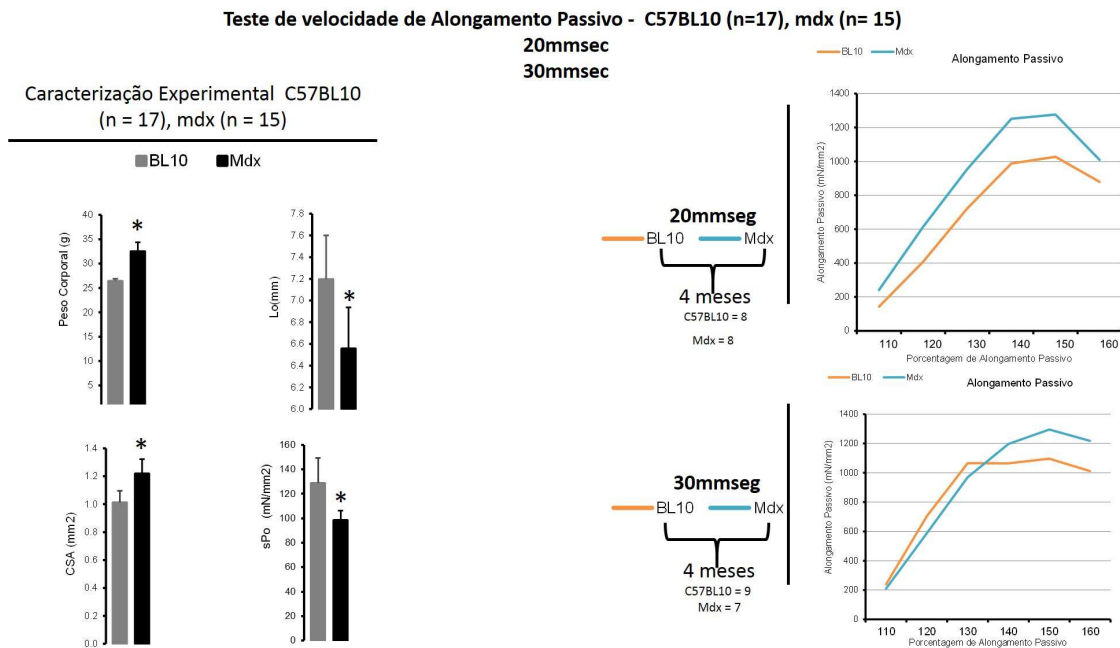
Através do teste de amplitude, conseguimos definir o melhor valor de amplitude, a ser utilizada para avaliação funcional do músculo diafragma e conseguimos afirmar que o uso do clips nos permitiu obter dados consistentes, uma vez que nossos resultados se assemelham, porém não se igualam, com os resultados obtidos por outros autores que analisaram a função muscular do diafragma, entretanto pela técnica de sutura (LYNCH et al., 1997; DECONINCK et al., 1998; AUSTIN et al., 2000; ROSSI et al., 2001; GREGOREVIC et al., 2002; LAW, 2004; MATECKI; GUIBINGA, PETROF, 2004; BARTON, et al., 2005; HARCOURT et al., 2005; MATECKI et al., 2005; VIOSIN et al., 2005; HINKLE et al., 2007; GEHRIG et al., 2008; STUPKA et al., 2008; BARTON et al., 2010; BEASTROM et al., 2011; BISH et al., 2011; PETERSON et al., 2011; GEHRIG et al., 2012; PAULY et al., 2012; SERRA et al., 2012; SELSBY et al., 2013; SMITH, BARTON; 2014). Nossos resultados, quando comparados com os resultados obtidos pelos demais autores, muitas vezes apresentaram

valores numéricos superiores, fato esse que fortalece nossa hipótese de que a técnica de sutura não consegue exercer de forma eficaz, uma força equalizada em todo o fragmento do músculo diafragma.

Após a determinação da amplitude de força, iniciou-se o segundo teste para estabelecer com que velocidade de alongamento passivo, poderíamos melhor avaliar a capacidade de estiramento do músculo diafragma. Foram utilizados 17 camundongos C57BL10 e 15 camundongos mdx, todos de 4 meses de idade. Para iniciar o teste, o músculo diafragma foi ajustado em seu comprimento ótimo e submetido a 6 etapas de estiramento. A cada etapa de estiramento foi incrementado 10% do seu comprimento ótimo (110%, 120%, 130%, 140%, 150% e 160%) e as velocidades de 20 e 30 mm/seg foram testadas. Para testar as velocidades estes animais foram subdivididos em 2 grupos: grupo A- Teste de 20 mm/seg, composto de 8 camundongos C57BL10 e 8 camundongos mdx e grupo B – Teste de 30 mm/seg, composto de 9 camundongos C57BL10 e 7 camundongos mdx (**Gráfico 2**).

O teste de alongamento passivo no músculo diafragma, até o presente momento, é uma avaliação que não foi executada pelos autores que realizaram ensaios da função muscular no diafragma murino. Acreditamos, que a técnica de sutura dificulta este tipo de ensaio, uma vez que, quando o músculo diafragma é submetido a etapas de estiramento, este, pode sofrer danos decorrentes do fio da sutura usado para a fixação do fragmento. Estes danos podem variar de fratura do arco costal a um rompimento do centro tendíneo. Entretanto com os clips desenvolvidos neste trabalho, nós conseguimos proteger estas estruturas de danos e realizar o ensaio da avaliação das propriedades passivas do músculo diafragma murino.

Gráfico 2 - Comparação dos dados de caracterização experimental e teste de velocidade de alongamento passivo entre o camundongo C57BL10 e mdx de 4 meses de idade



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: *fragmento do músculo diafragma do camundongo mdx significamente diferente do camundongo C57BL10.

Na análise da caracterização experimental dos camundongos C57BL10 e mdx de 4 meses de idade (**Gráfico 2**), notamos que os camundongos mdx apresentaram peso corporal significativamente maior que os camundongos C57BL10. Esta informação nos sugere, que aos 4 meses de idade a presença de fibrose pode alterar o peso corporal desses animais, diferenciando-os dos camundongos C57BL10, que não são afetados pela distrofia muscular (CARNWATH et al., 1986; SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; VAN PUTTEN et al., 2011; WILMANN et al., 2011). O aparecimento da fibrose nestes animais está de acordo com descrição da distrofia muscular no camundongo mdx (DUCLOS et al., 1998; LYNCH et al., 2001; GOSSELIN et al., 2003). Assim como na caracterização experimental do teste de amplitude, o comprimento óptimo da fibra muscular do diafragma do camundongo mdx, mostrou-se de tamanho reduzido, devido a possibilidade da fibrose diminuir as áreas de sobreposição dos miofilamentos finos sobre os miofilamentos grossos, impedindo que o músculo se alongue como nos animais controle. O mesmo ocorre com a área de transecção transversal (CSA). Esta, nos camundongos mdx apresenta-se significamente aumentada, possivelmente, devido ao aumento da espessura e peso do músculo diafragma, gerado pela presença de fibrose (CARNWATH et al., 1986;

SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008 WILMANN et al., 2011; VAN PUTTEN et al., 2011).

Comparando a força tetânica específica dos camundongos C57BL10 com as dos camundongos mdx, observamos que os camundongos mdx apresentaram uma redução significativa da força muscular, indicando que a força máxima para sustentar uma suave contração é menor no mdx. A redução da força tetânica específica no mdx, ocorre devido a fraqueza muscular progressiva, causada pelos ciclos de degeneração progressiva e regeneração limitada. Dessa forma, poucas unidades contráteis atuam na produção de força, e, conseqüentemente a força máxima para sustentar uma suave contração, apresenta-se reduzida (ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2008; VAN PUTTEN et al., 2011). A fadiga, observada no modelo mdx, também pode ser considerada a causa do declínio/diminuição do nível de tensão produzida para a tetania (SAXTON; DONNELLY, 1996; LYNCH et al., 2001; GOSSELIN et al., 2003; NAKAMURA, TAKEDA, 2011).

Em relação às velocidades testadas para o alongamento passivo (**Gráfico 2**), observamos que quando utilizamos 20 mm/seg, o músculo diafragma do camundongo mdx, no decorrer das 6 etapas, produziu maior força do que o músculo diafragma dos camundongos C57BL10. No mdx, o pico de força para realizar o alongamento passivo ocorreu na 5 etapa e após esta etapa, observou-se o declínio acentuado da força, devido a ruptura do centro tendíneo. Sugerimos que o aumento da força produzida pelo camundongo mdx durante o alongamento passivo, se dá devido a fibrose, que diminui a capacidade de extensibilidade do músculo. Dessa forma para o músculo diafragma superar a resistência das membranas musculares comprometidas pela fibrose, este necessitou produzir uma maior força para se alongar. A importância do componente em série paralelo fornecido pelas membranas musculares durante o alongamento passivo é relatado por Hill (1970) e Hall (2009).

No camundongo C57BL10, o alongamento passivo foi realizado uma menor produção de força (**Gráfico 2**). Sugerimos que este fato ocorre, por estes animais não apresentam áreas de fibrose tais como no camundongo mdx. Dessa forma os camundongos C57BL10 apresentam as áreas de sobreposição de miofilamentos finos e grossos e seu componente elástico paralelo fornecido pelas membranas musculares preservado, permitindo que o músculo se alongue além do seu comprimento ótimo com uma menor força (HILL, 1970; HALL, 2009).

Assim como nos camundongos mdx, nos camundongos C57BL10, após a 5 etapa de alongamento passivo, o músculo diafragma se rompe no centro tendíneo.

Na velocidade de 30mm/seg, observamos que até a 3 etapa de alongamento passivo, tanto o camundongo mdx como o camundongo C57BL10 apresentaram valores de força semelhantes, e, após esta etapa houve um aumento significativo de força nos camundongos mdx, enquanto que nos camundongos C57BL10, a força se manteve constante até a 5 etapa. Após esta etapa, assim como no teste de velocidade de 20 mm/seg, em ambas linhagens, ocorreu o declínio acentuado da força, devido a ruptura do centro tendíneo (**Gráfico 2**).

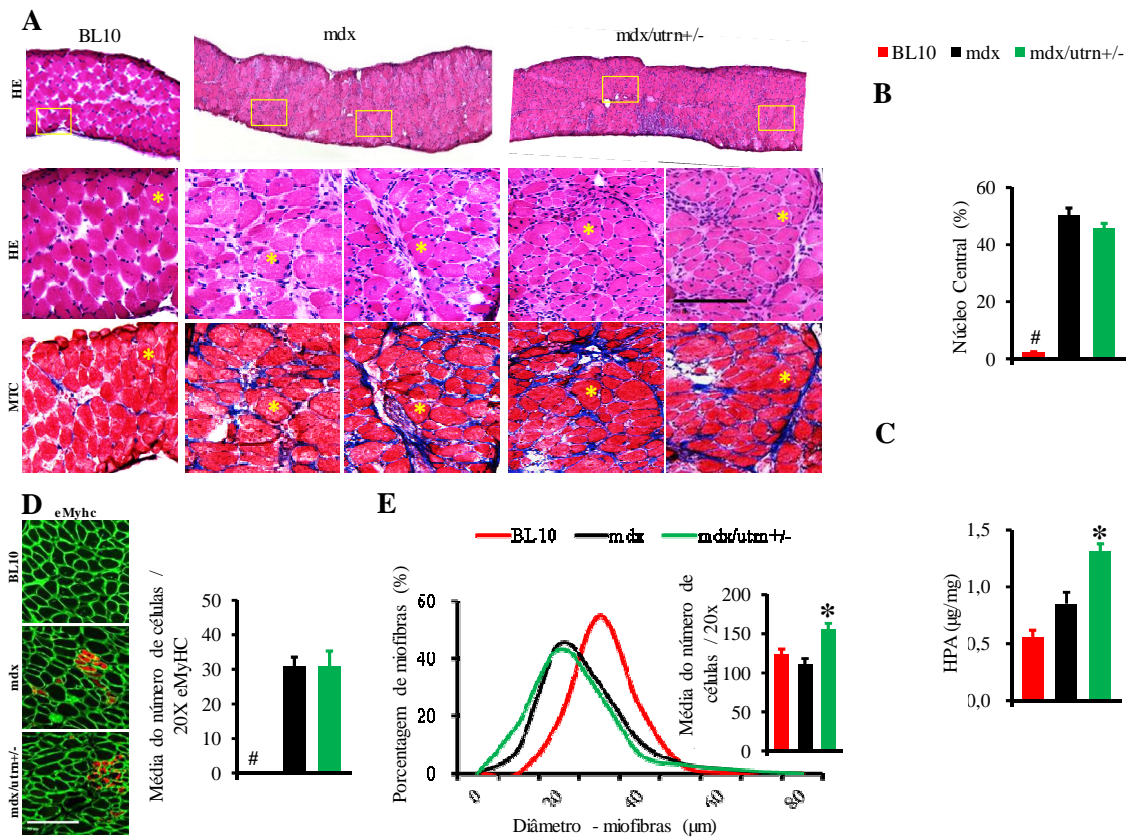
Analisando as duas velocidades testadas, podemos constatar que a velocidade de 30 mm/seg não é adequada para a avaliação músculo funcional do diafragma, pois não conseguimos analisar com eficácia a força máxima gerada pelo músculo diafragma a cada incremento de 10% do seu comprimento óptimo durante as 6 etapas de alongamento passivo. Este fato pode ser comprovado e visualizado no **Gráfico 2**, na análise da velocidade de 30 mm/seg, onde observa-se a linha da curva do camundongo mdx, muito próxima da linha de curva do camundongo C57BL10. Estas linhas quando juntas, dificulta a análise individual de cada etapa de estiramento. Portanto elegeu-se a velocidade de 20 mm/seg para se realizar o alongamento passivo.

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MÚSCULO FUNCIONAL DO M. DIAFRAGMA DOS CAMUNDONGOS C57BL10, MDX E MDX/UTRN+/- COM 2 E 6 MESES DE IDADE

Na análise morfológica geral do m. diafragma dos camundongos C57BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade, observou-se que o músculo diafragma do camundongo mdx/utrn+/- apresentou as características clássicas da distrofia muscular, mais severamente comprometida do que o camundongo mdx (**Figura 16A**). Comparando o hemidiafragma das 3 linhagens de animais estudadas, BL10 mdx e mdx/utrn+/-, na coloração de HE, facilmente conseguimos identificar que o camundongo mdx/utrn+/- exibiu a face costal do m. diafragma com mais áreas afetadas pela distrofia muscular do que o mdx (**Figura 16A**). Ao contrário do camundongo BL10, que apresentou 2,14% de fibras nucleadas centralmente, o m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- e mdx apresentaram respectivamente, 45,76% e 50,44% de fibras nucleadas centralmente (**Figura 16A e 16B**). Os valores observados nos camundongos

mdx/utrn+/- e mdx não são estatisticamente diferentes. Na coloração de Tricômio de Masson, observamos que tanto o camundongo mdx quanto o mdx/utrn+/- apresentam maior distribuição de tecido conectivo que o camundongo BL10. Estas áreas são demonstradas pela presença de fibras colágenas coradas pela cor azul (**Figura 16A**). Assim como previamente descrito por Hakim, Grange e Duan (2011), a quantidade de fibrose presente no músculo é evidentemente ligada a rigidez muscular, um dos sinais clínicos mais importantes na DMD. Consistentemente com os achados morfológicos, a quantidade de hidroxiprolina observada no m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- apresentou-se significativamente elevada quando comparada com o mdx (**Figura 16C**). Miofibras embrionárias foram observadas no m. diafragma tanto no camundongo mdx/utrn+/- quanto no mdx. Não foi observado a presença de miofibras embrionárias no m. diafragma do camundongo BL10. A média de número de miofibras embrionárias não foi significamente diferente entre o camundongo mdx/utrn+/- e mdx (30,86 e 30,93, respectivamente) (**Figura 16D**). Comparando o diâmetro das miofibras, os camundongos mdx/utrn+/- e mdx exibiram menor diâmetro de miofibras do que os camundongos BL10 (**Figura 16E**). Entretanto o mdx/utrn+/- apresentou um aumento no número de miofibras e maior porcentagem de miofibras de menor diâmetro do que o camundongo mdx (**Figura 16E**).

Figura 16 - Morfologia comparativa do m. diafragma do BL10, mdx e mdx/utrn^{+/-} com 2 meses de idade

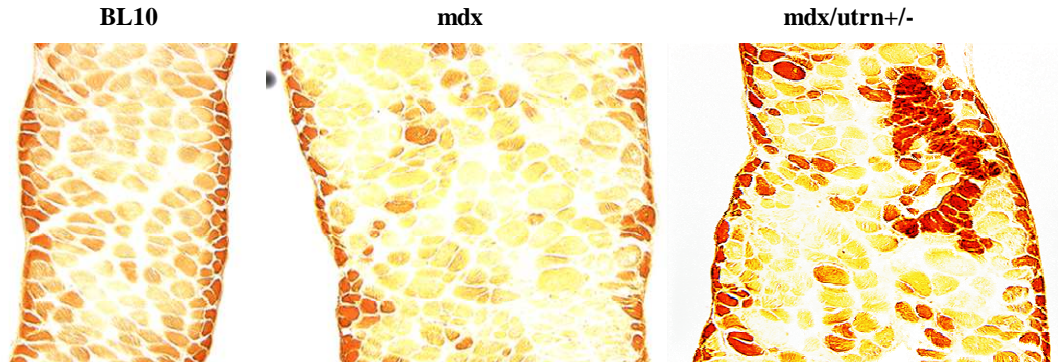


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Mdx com haploinsuficiência da utrofina (mdx/utrn^{+/-}) apresenta m. diafragma severamente afetado. **A.** Fotomicrografia das colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricômio de Masson (TM), músculo diafragma do C57BL10 (BL10, normal), mdx e mdx/utrn^{+/-}. O quadrado na imagem “A” identifica a área que foi analisada em maior aumento, abaixo. * identifica a mesma célula localizada na coloração de HE e TM. **B.** Porcentagem de células nucleadas centralmente. **C.** Conteúdo de hidroxiprolina. **D.** Fotomicrografia de imunofluorescência de cadeia pesada de miosina embrionária (eMyHC) e média no número de células por campo, no aumento de 20X. **E.** Diâmetro das miofibras, BL10, mdx e mdx/utrn^{+/-} e média do número de fibras por campo, aumento de 20X. fragmento do músculo diafragma do camundongo mdx significativamente diferente do camundongo C57BL10.

Na coloração de Alizarina vermelha (ARS – Alizarine Red Staining), observou-se que camundongo mdx/utrn^{+/-} apresentou mais áreas de calcificação do que o camundongo mdx e BL10 (**Figura 17**).

Figura 17 - Músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx, mdx/utrn+/- com 2 meses de idade na coloração de Alizarina Vermelha (ARS – Alizarine Red Staining)

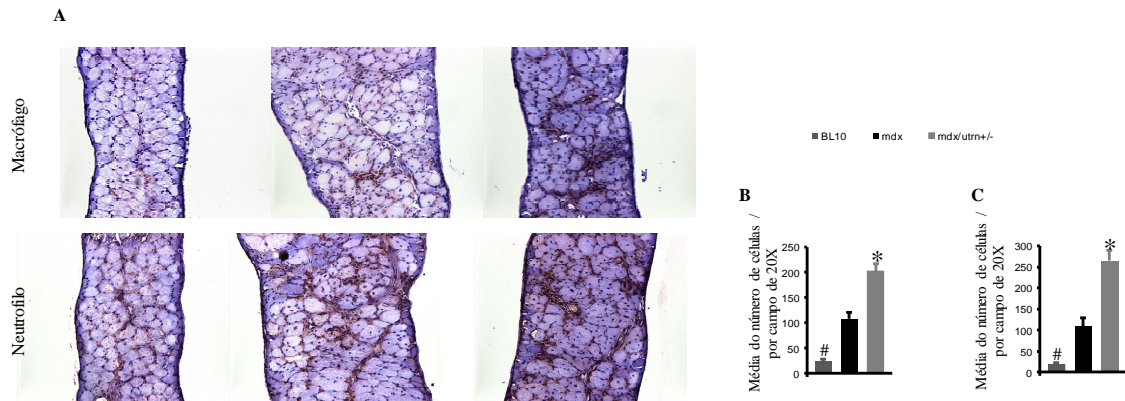


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Mdx com haploinsuficiência da utrofina (mdx/utrn+/-) apresenta m. diafragma com maior área de calcificação.

Consistentemente com a fase inicial da inflamação muscular, a média do número de células inflamatórias, macrófago e neutrófilos, mostrou-se significativamente aumentada nos camundongos mdx (macrófago = 106,73 e neutrófilo = 107,40) e mdx/utrn+/- (macrófago = 202,13 e neutrófilo = 263,93) comparada com o BL10 (macrófago = 24,21 e neutrófilo = 18,93) (**Figura 18A, 18B e 18C**). Entretanto, a média do número de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) no m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- mostrou-se estatisticamente elevado comparados com o BL10 e mdx (**Figura 18B e 18C**).

Figura 18 - Análise de células inflamatórias, macrófagos e neutrófilos no músculo diafragma do camundongo BL10, mdx e mdx/utrn com 2 meses de idade

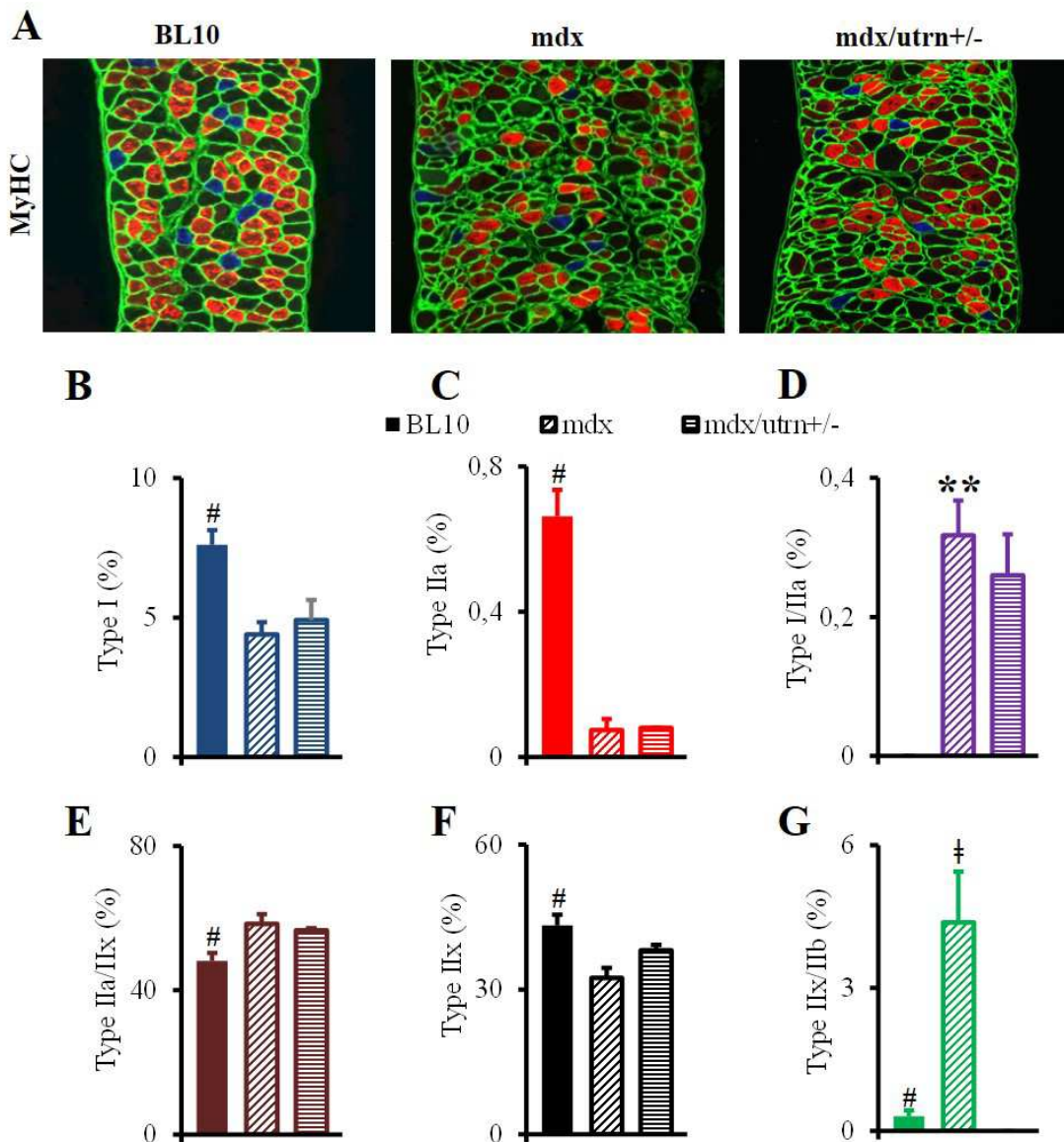


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Fotomicrografia do imunohistoquímicas para detecção de macrófago e neutrófilo, aumento 20x. B. Média do número de macrófagos por campo de 20x. C. Média do número de neutrófilos por campo de 20x .

Na análise dos tipos de fibras musculares no m. diafragma dos camundongos C57BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade observou-se que o camundongo BL10 exibiu significativo aumento nas fibras marcando isoformas de MyHC-IIx (43,25%), MyHC-I (7,61%), MyHC-IIa (0,66%) quando comparadas com do mdx/utrn+/- (MyHC-IIx = 38,09%, MyHC-I = 4,91% e MyHC-IIa = 0,08%) e com o mdx (MyHC-IIx = 32,42%, MyHC-I = 4,40% e MyHC-IIa = 0,07%) (**Figura 19A, 19B e 19F**). Entretanto, a porcentagem de fibras marcando as isoformas MyHC-IIa/IIx (48,16%) no camundongo BL10, exibiu-se significativamente reduzida em relação aos camundongos mdx/utrn+/- (56,66%) and mdx (58,41%) (**Figura 19A e 19E**). Poucas fibras marcando MyHC-IIx/IIb foram encontradas somente nos camundongos BL10 (0,31%) e no mdx (4,38%) (**Figura 19A e 19G**). A quantidade das fibras marcando a isoforma MyHC-IIx/IIb mostrou-se significativamente elevada do que no camundongo BL10 e mdx/utrn+/- (**Figura 19A e 19G**). Fibras marcando a isoforma MyHC-I/IIa somente foram encontradas no mdx/utrn+/- (0,26%) e no mdx (0,32%) e este valor encontrado não é estatisticamente significativo (**Figura 19A e 19D**).

Figura 19 - Tipos de fibras musculares encontradas no músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade

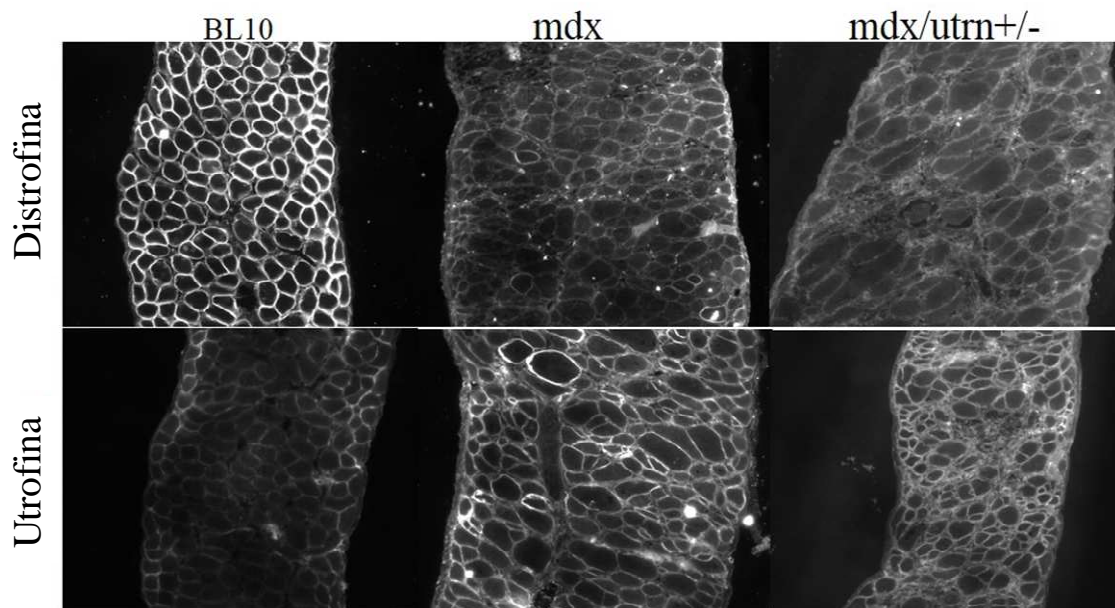


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Fotomicrografia do m. diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- . B. Porcentagem de fibras marcando MyHC- I. C. Porcentagem de fibras marcando MyHC- IIa. D. Porcentagem de fibras marcando MyHC- I/IIa. E. Porcentagem de fibras marcando MyHC- IIa/IIx. F. Porcentagem de fibras marcando MyHC- IIx. G. Porcentagem de fibras marcando MyHC- IIx/IIb.

Na análise qualitativa da marcação da proteína distrofina, observou-se que aos 2 meses de idade, ambos os camundongos, mdx e mdx/utrn+/- não marcaram a proteína distrofina no m. diafragma tal como o BL10. Em relação a marcação da proteína utrofina, observou-se que o camundongo mdx marcou mais utrofina no músculo diafragma que o camundongo mdx/utrn+/- (**Figura 20**).

Figura 20 - Imunocoloração para a marcação da proteína distrofina e utrofina nos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Fotomicrografia do músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade, aumento 20x.

A análise da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma dos camundongos mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com 2 meses de idade iniciou-se com a caracterização dos dados morfométricos do fragmento do m. diafragma utilizado no ensaio de função muscular.

Durante a caracterização dos dados morfométricos observou-se que aos 2 meses de idade, o peso corporal do camundongo mdx apresentou-se significativamente elevado quando comparado com os camundongos BL10 e mdx/utrn+/- . O peso do fragmento do m. diafragma utilizado no ensaio muscular apresentou-se semelhante entre o camundongo BL10 e mdx/utrn+/- . Entretanto, no camundongo mdx o peso do fragmento do m. diafragma exibiu-se significativamente aumentado quando comparado com o camundongo BL10 e mdx/utrn+/- . O comprimento óptimo (L_0) do fragmento do m. diafragma no camundongo mdx/utrn+/- exibiu-se significativamente menor do que no mdx e BL10. Em relação a área de transsecção transversal (CSA – cross-section area), o camundongo mdx/utrn+/- apresentou CSA significativamente menor do que no camundongo mdx e BL10. Dados morfométricos estão exibidos na **Tabela 1** abaixo.

Tabela 1 - Caracterização morfométrica dos camundongos utilizados no ensaio de função muscular com 2 meses de idade

Linhagem	n	Peso Corporal	Peso do fragmento do m. diafragma	Diafragma CSA	L _o
		(g)	(mg)	(mm ²)	(mm)
BL10	12	24.6 ± 0.8	4.1 ± 0.2	0.5 ± 0.03 ^c	7.0 ± 0.3
<i>mdx</i>	19	26.8 ± 0.4 ^a	7.3 ± 0.4 ^a	1.0 ± 0.05	6.4 ± 0.1
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-}	12	23.3 ± 0.7 ^b	4.6 ± 0.2 ^b	0.92 ± 0.05	4.85 ± 0.1 ^c

Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

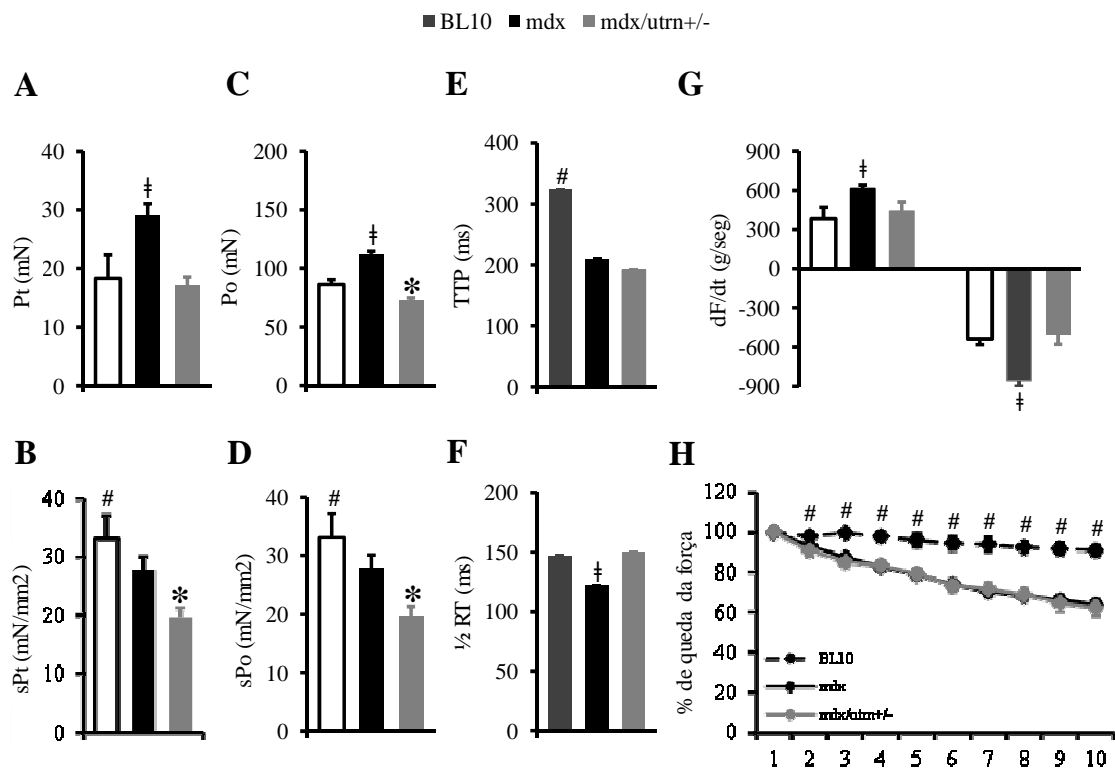
Nota: Valores são as médias ± erro padrão, a= *mdx* significativamente diferente do BL10 e *mdx/utrn*^{+/-}; b= *mdx/utrn*^{+/-} significativamente diferente do *mdx*; c= *mdx/utrn*^{+/-} significativamente diferente do BL10 e *mdx*.

Na análise das propriedades ativa do m. diafragma, observou-se que a força absoluta de contração (P_t) e a força tetânica (P_o) estavam significativamente mais elevadas no camundongo *mdx* do que no BL10 e *mdx/utrn*^{+/-}. Entretanto quando normalizada a força absoluta de P_t e P_o pela área de transecção transversal (CSA – cross-sectional área), a força específica de P_t e P_o (sP_t e sP_o) mostrou-se significativamente diminuída no camundongo *mdx/utrn*^{+/-} (**Figura 21A, 21B, 21C e 21D**). Assim como o esperado, o camundongo BL10 exibiu sP_t e sP_o significativamente mais elevada do que no camundongo *mdx* e *mdx/utrn*^{+/-} (**Figura 21A, 21B, 21C e 21D**).

Para examinar as propriedades cinéticas da força isométrica, foram avaliados o tempo para atingir o pico de tensão muscular (TTP – Time to peak tension) e ½ do tempo de relaxamento (½ RT - ½Relaxation time). No camundongo *mdx/utrn*^{+/-} e *mdx* o TTP mostrou-se significativamente reduzido em relação ao camundongo BL10, que apresentou um rápido TTP (**Figura 21E e 21F**). ½ RT apresentou-se significamente prolongada no m. diafragma dos camundongos BL10 e *mdx/utrn*^{+/-} (**Figura 21F**). Entretanto, o m. diafragma do camundongo *mdx* apresentou um rápido tempo para relaxar (**Figura 21F**).

O raio mínimo de força derivada (dF/dt_{\min}) no camundongo *mdx* estava significamente reduzida quando comparadas com o BL10 e o *mdx/utrn*^{+/-} (**Figura 21G**). O raio máximo de força derivada (dF/dt_{\max}) apresentou-se significamente elevada no *mdx* quando comparada ao BL10 e *mdx/utrn*^{+/-}. A porcentagem de queda da força durante 10 ciclos de contração excêntrica diminuiu significamente nos camundongos *mdx* e *mdx/utrn*^{+/-}, mas manteve-se razoavelmente constante no camundongo BL10 (**Figura 21H**). Interessantemente não houve diferença estatística entre o *mdx* e *mdx/utrn*^{+/-}.

Figura 21 - Propriedades ativas do músculo diafragma do camundongo BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade



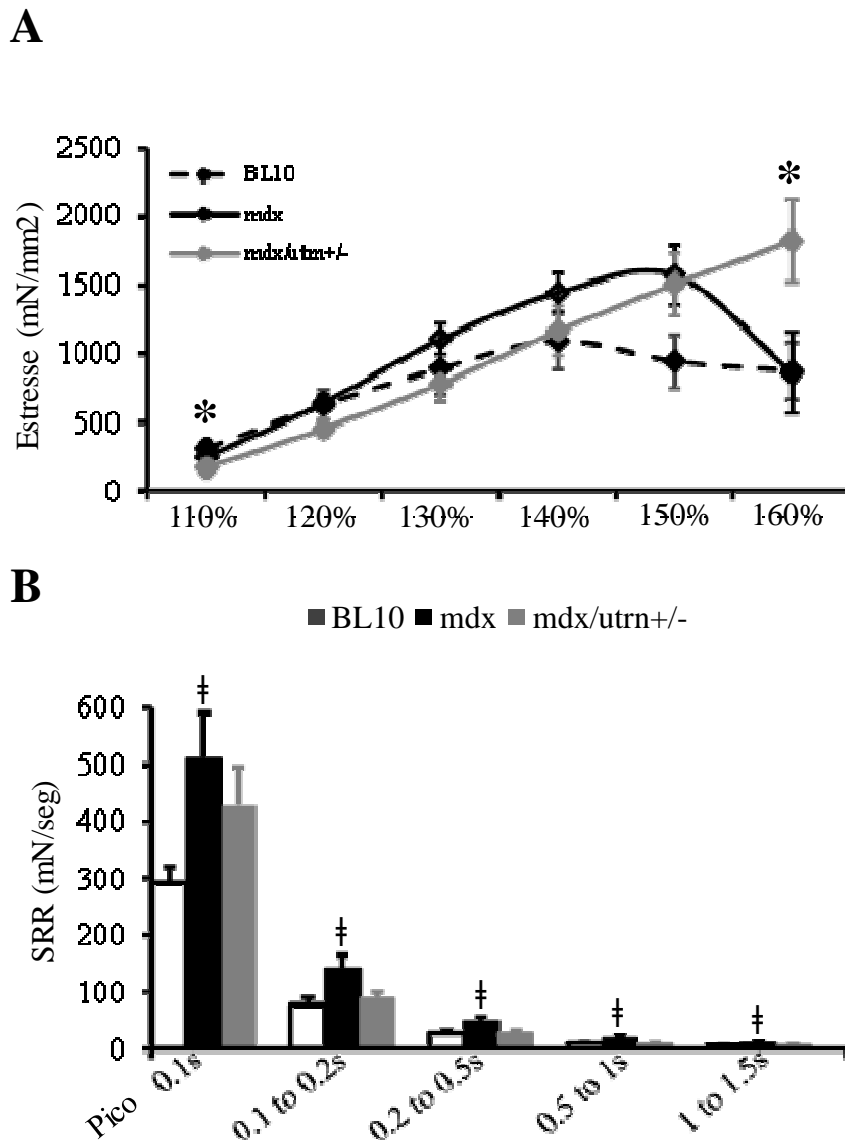
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Força absoluta de contração isométrica (P_t). B. Força de contração isométrica específica (sP_t). C. Força tetânica absoluta (P_o). D. Força tetânica específica (sP_o). E. Tempo de atingir o pico de tensão (TTP – time to peak tension). F. $\frac{1}{2}$ tempo para relaxamento ($\frac{1}{2} RT$ – $\frac{1}{2}$ relaxation time). G. Raio máximo e mínimo de força derivada (dF/dt min e máx). H. Porcentagem de queda de força durante 10 ciclos de contração excêntrica. ‡ mdx significativamente diferente do BL10 e mdx/utrn+/-; * mdx/utrn+/- significativamente diferente do BL10 e mdx, # BL10 significativamente diferente do mdx e mdx/utrn+/-.

Em relação às propriedades passiva do músculo diafragma, ambos mdx e mdx/utrn+/- exibiu aumento da rigidez muscular em relação ao camundongo BL10. No primeiro pico de estresse (110% de tensão sobre o L_o), o camundongo mdx/utrn+/- desenvolveu menor força de resistência do que o BL10 e o mdx. Do pico de estresse de 120-140%, não houve diferença significativa entre BL10, mdx, mdx/utrn+/- . No pico de 150% de tensão, o camundongo mdx/utrn+/- e mdx desenvolveu significante força de resistência comparados com o BL10. Entretanto, o m. diafragma do camundongo durante o estiramento de 150% do L_o apresentou uma rápida queda na tensão, evidenciando a falência muscular (**Figura 22A**). Ao contrário do mdx, no camundongo mdx/utrn+/-, durante o estiramento de 160% da tensão, teve a tensão aumentada (**Figura 22A**). A taxa de estresse-relaxamento (SRR- Stress Relaxation Rate) no m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- e mdx apresentou-se significamente alta no primeiro pico de estresse, comparado com o BL10 (**Figura 22B**). Após o 1 pico de estresse,

somente o camundongo mdx exibiu um aumento significativo na SRR, enquanto que o mdx/utrn+/- e o BL10 apresentaram picos de estresse similares (**Figura 22B**).

Figura 22 - Propriedades passiva do m. diafragma do camundongo BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade



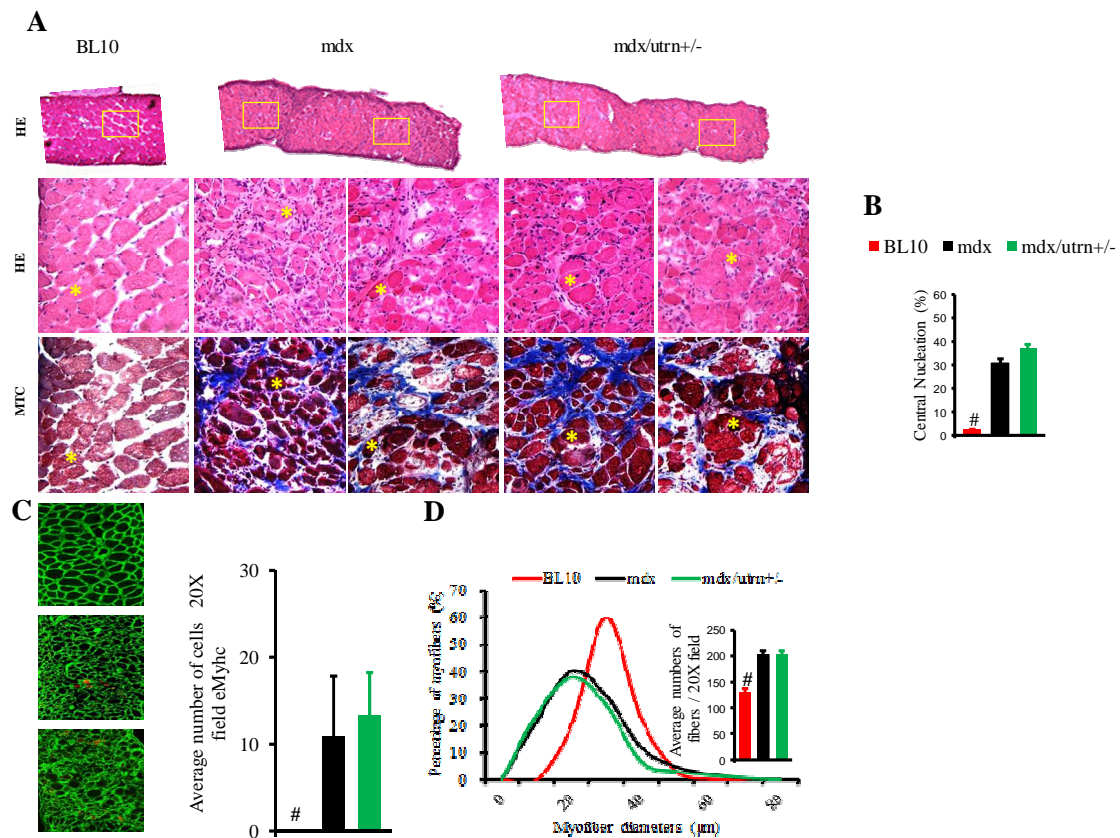
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Pico de estresse durante os estiramentos de 110-160% do comprimento do Lo. B. Taxa de relaxamento de estresse (SRR – Stress Relaxation Ratio). † mdx significamente diferente do BL10 e mdx/utrn+/-.

Na análise morfológica geral do m. diafragma dos camundongos C57BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade, observou-se que o camundongo mdx e mdx/utrn+/-

apresentaram características clássicas da distrofia muscular (**Figura 23A**). Comparando o hemidiafragma das 3 linhagens de animais estudadas, BL10 mdx e mdx/utrn+/-, na coloração de HE, observamos que a distribuição das áreas comprometidas entre mdx e mdx/utrn+/- apresentam-se similares. (**Figura 23A**). Ao contrário do camundongo BL10, que apresentou 2,19% de fibras nucleadas centralmente, o m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- e mdx apresentaram respectivamente, 37,09% e 30,90% (**Figura 23A e 23B**). Os valores observados nos camundongos mdx/utrn+/- e mdx não são estatisticamente diferentes. Na coloração de Tricômio de Masson, observamos que tanto o camundongo mdx quanto o mdx/utrn+/- apresentam maior distribuição de tecido conectivo que o camundongo BL10. Estas áreas são demonstradas pela presença de fibras colágenas coradas pela cor azul (**Figura 23A**). Pequena quantidade de miofibras embrionárias foram observadas no m. diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/- e não foi observado a presença de miofibras embrionárias no m. diafragma do camundongo BL10. A média de número de miofibras embrionárias não foi significamente diferente entre o camundongo mdx/utrn+/- e mdx (12,32 e 10,37, respectivamente) (**Figura 23C**). Comparando o diâmetro das miofibras, os camundongos mdx/utrn+/- e mdx exibiram menor diâmetro de miofibras do que os camundongos BL10 (**Figura 23D**). Não houve diferença significativa entre o número de miofibras dos camundongos mdx e mdx/utrn+/- . Porém como o esperado, o camundongo BL10 classificado como animal controle, apresentou menor número de miofibras do que o mdx e mdx/utrn+/- (**Figura 23D**).

Figura 23 - Morfologia comparativa do m. diafragma do BL10, mdx e mdx/utrn^{+/-} com 6 meses de idade

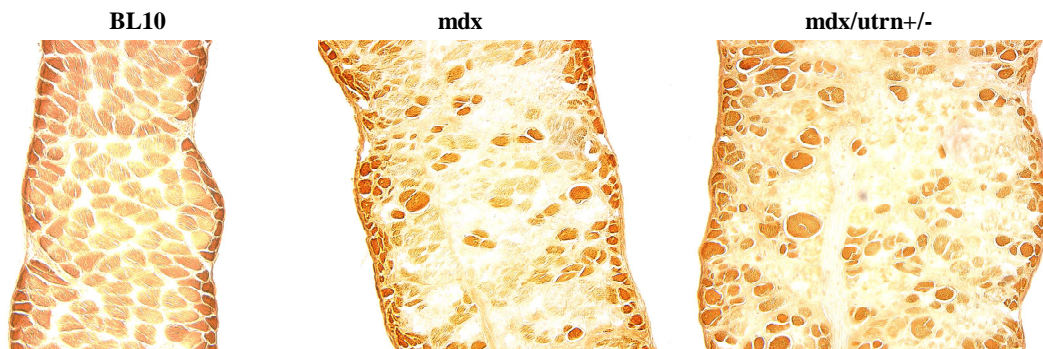


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Mdx e mdx com haploinsuficiência da utrofina (mdx/utrn^{+/-}) apresentam m. diafragma severamente afetado. **A.** Fotomicrografia das colorações de Hematoxilina e Eosina (**HE**) e Tricômio de Masson (**TM**), músculo diafragma do C57BL10 (BL10, normal), mdx e mdx/utrn^{+/-}. O quadrado na imagem “A” identifica a área que foi analisada em maior aumento, abaixo. * identifica a mesma célula localizada na coloração de **HE** e **TM**. **B.** Porcentagem de células nucleadas centralmente. **C.** Fotomicrografia de imunofluorescência de cadeia pesada de miosina embrionária (**eMyHC**) e média no número de células por campo, no aumento de 20X. **D.** Diâmetro das miofibras, BL10, mdx e mdx/utrn^{+/-} e média do número de fibras por campo, aumento de 20X.

Na coloração de Alizarina vermelha (ARS – Alizarine Red Staining) nos animais de 6 meses, não se observou diferença em áreas de calcificação entre os camundongos mdx e mdx/utrn^{+/-}. Não se observou áreas de calcificação no camundongo BL10 (**Figura 24**).

Figura 24 - Músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx, mdx/utrn+/- com 6 meses de idade na coloração de Alizarina Vermelha (ARS – Alizarine Red Staining)

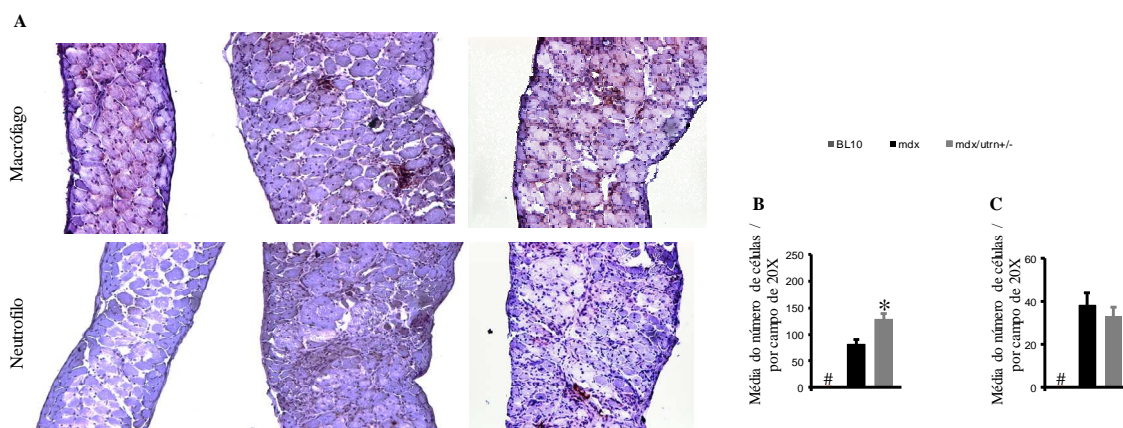


Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Mdx e mdx/utrn+/- distribuição similar de áreas calcificadas.

Consistentemente com a fase crônica da inflamação muscular, a média do número de macrófagos (**Figura 25A e 25B**), mostrou-se significativamente aumentada nos camundongos mdx e mdx/utrn+/- (respectivamente, 81,70 e 127,60) quando comparado com o controle BL10. Entretanto, observou-se que os camundongos mdx/utrn+/- apresentaram um aumento significativo de macrófagos em relação ao mdx (**Figura 25A e 25B**). Poucos neutrófilos foram observados no camundongo mdx e no mdx/utrn+/- (respectivamente 38,36 e 33,05) e nenhum foi observado no camundongo BL10 (**Figura 25A e 25C**).

Figura 25 - Análise de células inflamatórias, macrófagos e neutrófilos nos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade



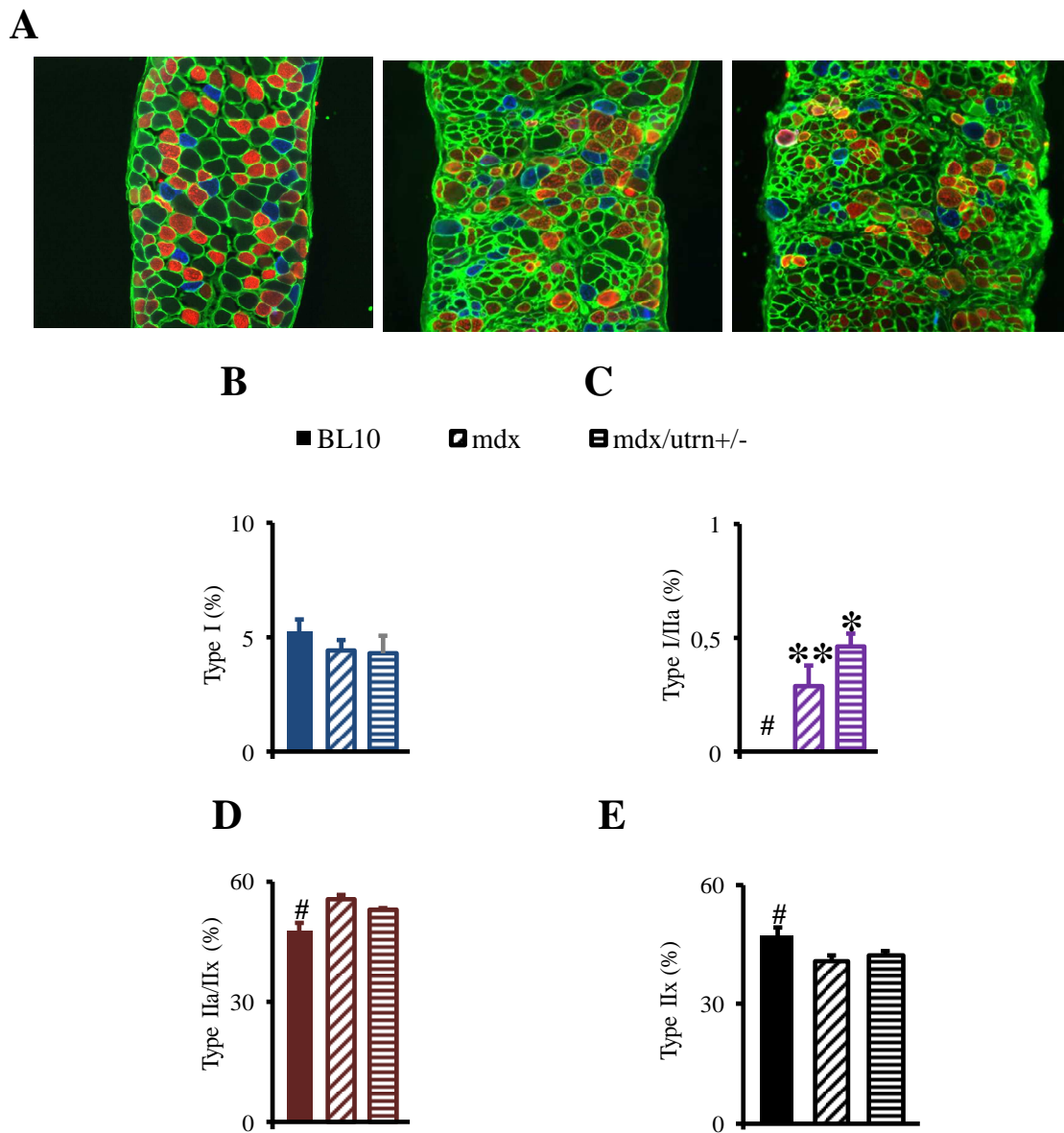
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: Análise de células inflamatórias, macrófagos e neutrófilos nos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade.

Na análise dos tipos de fibras musculares do diafragma dos camundongos C57BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade, não se observou diferença significativa nas fibras

marcando MyHC-I dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- (respectivamente, 5,27%, 3,42% e 4,33%) (**Figura 26A e 26B**). Porém, o camundongo mdx apresentou uma porcentagem menor de MyHC-I. Fibras marcando isoforma MyHC-I/IIa apresentaram significamente aumentadas no mdx (1,02%), diminuídas no camundongo mdx/utrn+/- (0,46%) e ausentes no BL10 (**Figura 26A e 26C**). MyHC-IIa/IIx nos camundongos mdx (55,09%) e mdx/utrn+/- (53,01%) apresentou-se significamente aumentadas em relação aos camundongos BL10 (47,59%) (**Figura 26A e 26D**). Não houve diferença estatística entre mdx e mdx/utrn+/- . Porcentagem de fibras marcando MyHC-IIx encontraram-se significamente aumentadas no BL10 (47,15%) quando comparadas com os camundongos mdx e mdx/utrn+/- (**Figura 26A e 26E**). Não se observou a presença das isoformas MyHC-Ia, MyHC-IIx/IIb e MyHC-IIb nos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/-.

Figura 26 - Tipos de fibras musculares encontradas no músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utr^{+/-} com 6 meses de idade



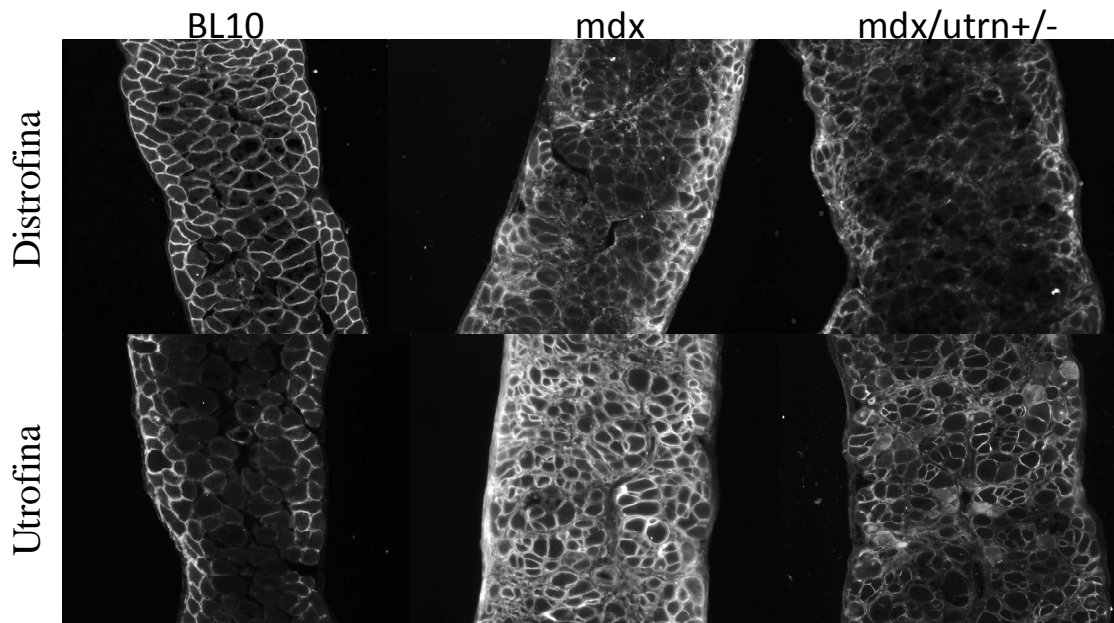
Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Fotomicrografia do m. diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utr^{+/-}. B. Porcentagem de fibras marcando MyHC- I. C. Porcentagem de fibras marcando MyHC- I/IIa. D. Porcentagem de fibras marcando MyHC- II/IIa. E. Porcentagem de fibras marcando MyHC- IIx.

Na análise qualitativa da proteína distrofina no músculo diafragma dos camundongos mdx, mdx/utr^{+/-} e C57BL10 com 6 meses de idade, observou-se que ambos os camundongos, mdx e mdx/utr^{+/-} não marcaram a proteína distrofina no m. diafragma tal como o BL10. Em relação a marcação da proteína utrofina, observou-se que o camundongo

mdx marcou mais a proteína utrofina no músculo diafragma que o camundongo mdx/utrn+/- (Figura 27).

Figura 27 - Imunocoloração para a marcação da proteína distrofina e utrofina nos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: A. Fotomicrografia do músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade, aumento 20x.

A análise da contratilidade e das propriedades passivas do músculo diafragma dos camundongos mdx, mdx/utrn^{+/-} e C57BL10 com 6 meses de idade iniciou-se com a caracterização dos dados morfométricos do fragmento do m. diafragma utilizado no ensaio de função muscular.

Durante a caracterização dos dados morfométricos (**Tabela 2**) observou-se que aos 6 meses de idade, não houve diferença significativa entre o peso corporal dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/. O peso do fragmento do m. diafragma do camundongo BL10 utilizado no ensaio muscular, apresentou-se significativamente menor do que nos camundongos mdx e mdx/utrn+/- (**Tabela 2**). Apesar do peso do fragmento do diafragma do mdx apresentar-se superior ao do mdx/utrn+/-, não foi constatado diferença significativa entre essas duas linhagens (**Tabela 2**). O comprimento óptimo (L_0) do fragmento do m. diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/- exibiu-se significativamente menor do que no BL10 (**Tabela 2**). Em relação a área de transecção transversal (CSA – cross-section area), os

camundongos mdx e mdx/utrn+/- apresentaram CSA significativamente menor do que o camundongo BL10 (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Caracterização morfométrica dos camundongos utilizados no ensaio de função muscular com 6 meses de idade

Linagem	n	Peso Corporal (g)	Peso do fragmento do m. diafragma (mg)	Diafragma CSA (mm ²)	L _o (mm)
BL10	17	31.2 ± 2.2	4.0 ± 1.6	0.5 ± 0.07	7.5 ± 1.1
mdx	19	32.3 ± 2.2	8.3 ± 2.0 ^a	1.4 ± 0.32 ^a	5.6 ± 0.6 ^a
mdx/utrn+/-	10	31.2 ± 2.5	7.2 ± 1.2 ^a	1.6 ± 0.56 ^a	4.4 ± 0.1 ^a

Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Nota: Valores são as médias ± erro padrão, a= mdx e mdx/utrn+/- significativamente diferente do BL10.

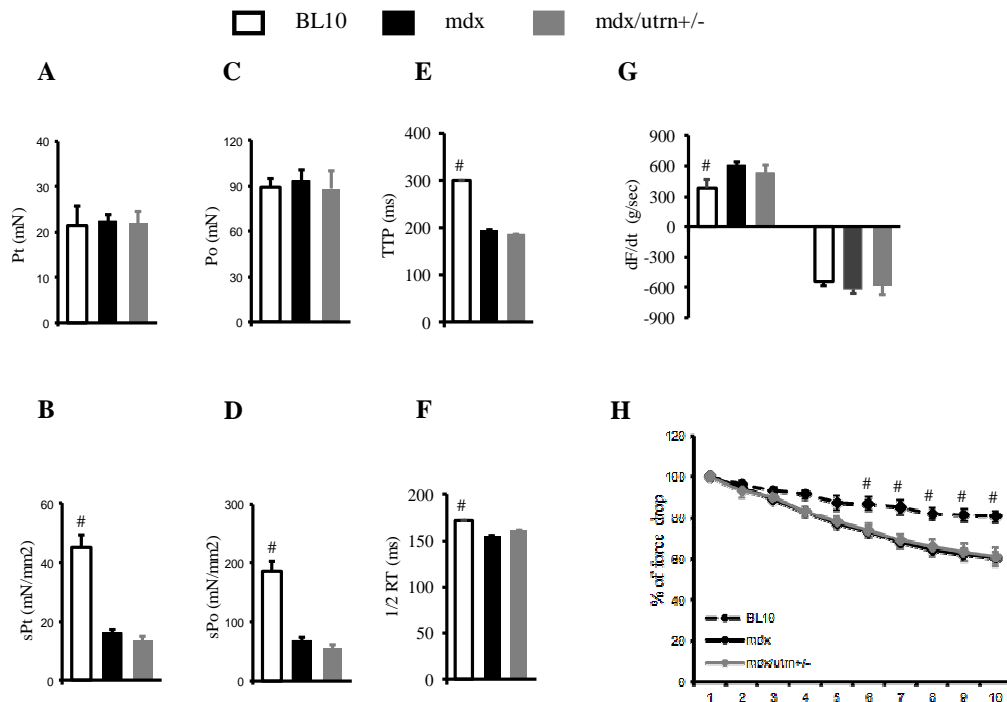
Na análise da contratilidade do m. diafragma, observou-se que aos 6 meses de idade, a força absoluta de contração (P_t) e a força tetânica (P_o) entre os camundongos BL10, mdx e mdx/utrn^{+/-} apresentaram-se similares, não havendo diferença estatística entre as 3 linhagens. Entretanto quando a força absoluta de P_t e P_o foi normalizada pela área de transecção transversal (CSA – cross-sectional área), a força específica de P_t e P_o (sP_t e sP_o) mostrou-se significativamente aumentada no BL10 e diminuída nos camundongos mdx e mdx/utrn^{+/-} (**Figura 28A, 28B, 28C e 28D**). Não houve diferença estatística entre os camundongos mdx e mdx/utrn^{+/-}.

O tempo para atingir o pico de tensão muscular (TTP – Time to peak tension) e ½ do tempo de relaxamento (½ RT - ½Relaxation time) foram avaliados. TTP mostrou-se significativamente reduzido nos camundongos mdx/utrn^{+/-} e mdx em relação ao camundongo BL10, que apresentou um rápido TTP (**Figura 28E**). ½ RT apresentou-se significativamente prolongada no m. diafragma do camundongo BL10 e diminuída no mdx e mdx/utrn^{+/-}. Não foi constatado diferença estatística entre o mdx e o mdx/utrn+/- (**Figura 28F**).

O raio mínimo de força derivada (dF/dt_{min} e $dF/dt_{máx}$) nos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- apresentaram forças similares, reduzidas e com valores estatisticamente não diferentes. O raio máximo de força derivada ($dF/dt_{máx}$) apresentou-se significativamente elevada nos camundongos mdx e mdx/utrn+/- quando comparada ao BL10 (**Figura 28G**). Na avaliação de contração excêntrica, durante 10 ciclos de contração, a porcentagem de força

muscular do diafragma diminuiu significativamente nos camundongos mdx e mdx/utrn+/- a partir do quinto ciclo de contração e manteve-se constante no camundongo BL10 (**Figura 28H**). Assim como nos animais de 2 meses, aos 6 meses não houve diferença estatística entre o mdx e mdx/utrn+/-.

Figura 28 - Propriedades ativas do músculo diafragma do camundongo BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

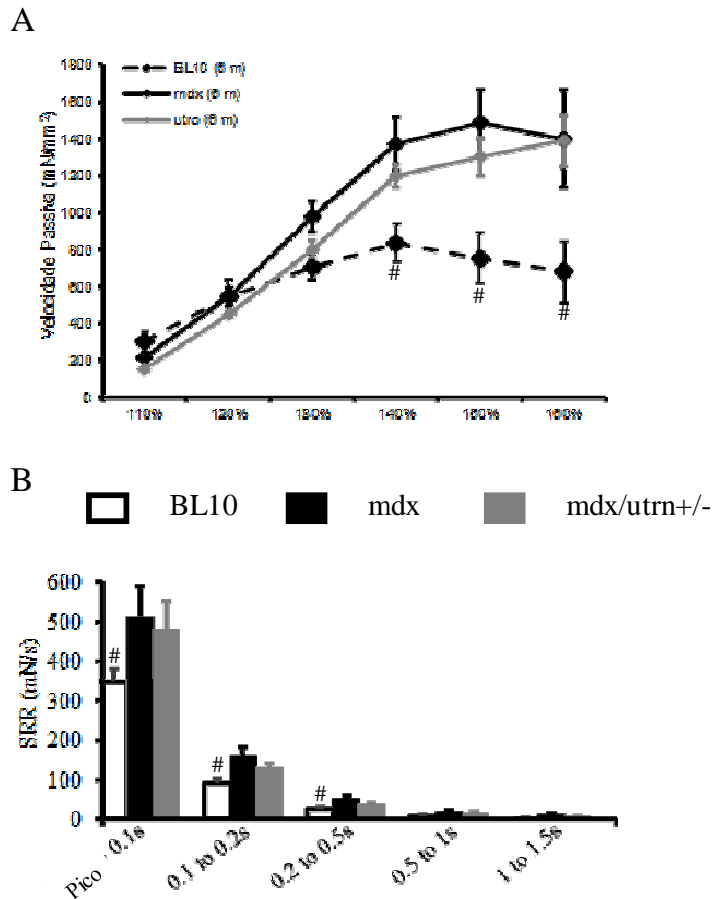
Legenda: A. Força absoluta de contração isométrica (Pt). B. Força de contração isométrica específica (sPt). C. Força tetânica absoluta (Po). D. Força tetânica específica (sPo). E. Tempo de atingir o pico de tensão (TTP – time to peak tension). F. ½ tempo para relaxamento (½ RT – ½ relaxation time). G. Raio máximo e mínimo de força derivada (dF/dt min e máx). H. Porcentagem de queda de força durante 10 ciclos de contração excêntrica. # BL10 significativamente diferente do mdx e mdx/utrn+/-.

Na avaliação de propriedades passiva do músculo diafragma, ambos mdx e mdx/utrn+/- exibiu aumento da rigidez muscular em relação ao camundongo BL10. No primeiro ao segundo pico de estresse (110% e 120% de tensão sobre o L_0), não houve diferença significativa de forças resistivas entre os camundongos, BL10, mdx e mdx/utrn+/-.

No pico de 130% de tensão, o camundongo mdx produziu significativa força de resistência comparado com o BL10. Apesar do mdx/utrn+/- ter gerado força de resistência similar ao do mdx, no pico de 130% de tensão, esta não é estatisticamente diferente dos camundongos BL10. Do pico de tensão de 140%-160%, ambos camundongos, mdx e mdx/utrn+/- produziram força de resistência estatisticamente maior do que o camundongo BL10 durante o

estiramento passivo (**Figura 29A**). A taxa de estresse-relaxamento (SRR- Stress Relaxation Rate) no m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- e mdx apresentou-se significativamente alta do primeiro ao terceiro pico de estresse, comparado com o BL10. Após o terceiro pico de estresse, não houve diferença estatística entre as três linhagens estudadas (**Figura 29B**).

Figura 29 - Propriedades passiva do m. diafragma do camundongo BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade



Fonte: (LESSA, T. B., 2016).

Legenda: **A.** Pico de estresse durante os estiramentos de 110-160% do comprimento do Lo. **B.** Taxa de relaxamento de estresse (SRR – Stress Relaxation Ratio). # mdx significativamente diferente do BL10 e mdx/utrn+/-

A análise da quantidade de hidroxiprolina do músculo diafragma dos camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- não foi realizada pois não foi constatado diferença significativa de forças de resistência e falência/rompimento do músculo diafragma entre os camundongos mdx e mdx/utrn+/. Dessa forma avaliar a quantidade de hidroxiprolina nestes animais, não elucida nenhum dado obtido dos animais com 6 meses de idade.

6 DISCUSSÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia hereditária letal, que infelizmente, até os dias de hoje, não tem cura. Durante anos de pesquisas, os modelos distróficos animais tem representado uma das mais importantes ferramentas para elucidar mecanismos biológicos, fisiológicos, imunológicos e moleculares da DMD (NELSON et al., 2015 (no prelo)²; TABEBORDBAR et al., 2015 (no prelo)³). Através dos modelos distróficos, pesquisadores podem chegar a uma conclusão fatural de como as abordagens experimentais podem possivelmente agir na DMD. Neste contexto, o aprimoramento dos modelos animais representa uma importante chave para que as terapias experimentais sejam mais precisas e para que estas, melhor reproduzam a condição humana de uma criança afetada. Dentre esses animais, o modelo murino da distrofia muscular, o camundongo mdx (X-chromossome linked muscular dystrophy mouse – mdx), desde que descoberto, tem sido amplamente utilizado, fornecendo suporte às pesquisas pré-clínicas na DMD (BULFIELD et al., 1984; WILLMANN et al., 2009; MCGREEVY et al., 2015). Apesar do defeito genético observado no camundongo mdx, se assemelhar a DMD, o camundongo mdx pobremente reproduz os sintomas da DMD e sua expectativa de vida é ligeiramente reduzida (NAKAMURA; TAKEDA, 2011; MCGREEVY et al., 2015).

Atualmente, o camundongo heterozigoto para utrofina, o mdx com haploinsuficiência de utrofina – mdx/utrn+/-, tem sido sugerido como um modelo distrófico intermediário entre o clássico mdx, que apresenta um fenótipo suave da DMD e o severo dko (double-knockout mdx mice) (ZHOU et al., 2008; RAFAEL-FORTNEY et al., 2011; VAN PUTTEN et al., 2012). Autores reportam que o camundongo mdx/utrn+/- apresenta severa inflamação e fibrose no músculo diafragma (ZHOU et al., 2008; HUANG et al., 2011; RAFAEL-FORTNEY et al., 2011; VAN PUTTEN et al., 2012) e que os parâmetros respiratórios destes

² NELSON, C. E.; HAKIM, C. H.; OUSTEROUT, D. G.; THAKORE, P.; MOREB, E.A.; RIVERA, R. M.; MADHAVAN, S.; PAN, X.; RAN, F.A.; YAN, W. X.; ASOKAN, A.; ZHANG, F.; DUAN, D.; GERSBACH, C.A. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Science**, pii: aad5143, 2015. (no prelo)

³ TABEBORDBAR, M.; ZHU, K.; CHENG, J. K.; CHEW, W. L.; WIDRICK, J. J.; YAN, W. X.; MAESNER, C.; WU, E. Y.; XIAO, R.; RAN, F. A.; CONG, L.; ZHANG, F.; VANDENBERGHE, L. H.; CHURCH, G. M.; WAGERS, A. J. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. **Science**, pii: aad5177, 2015. (no prelo)

animais, têm sido considerados mais comprometido do que no mdx aos 6 meses de idade (HUANG et al., 2011). Entretanto, ainda não se encontra elucidado as propriedades contráteis e passivas do mdx/utrn+/- . Considerando o potencial das terapias experimentais como o principal benefício para os pacientes com DMD, um modelo murino intermediário com um fenótipo mais severo que o mdx e com uma expectativa de vida superior ao dko pode representar um avanço nas terapias experimentais.

Neste estudo nós comparamos a histopatologia com as propriedades contráteis e passivas do m. diafragma dos animais de linhagem BL10, mdx e mdx/utrn+/- com 2 e 6 meses de idade. Adicionalmente, nós atualizamos a metodologia de avaliação da força muscular do diafragma. Diferentemente de Lynch et al. (1997); Deconinck et al. (1998); Austin et al. (2000); Rossi et al. (2001); Gregorevic et al. (2002); Law (2004); Matecki, Guibinga e Petrof (2004); Barton et al. (2005); Harcourt et al. (2005); Matecki et al. (2005); Viosin et al. (2005); Hinkle et al. (2007); Gehrig et al. (2008); Stupka et al. (2008); Barton et al. (2010); Beastron et al. (2011); Bish et al. (2011); Peterson et al. (2011); Gehrig et al. (2012); Pauly et al. (2012); Serra et al. (2012); Selsby et al. (2013) e Smith e Barton (2014) que usaram a técnica de sutura para a avaliação das propriedades contráteis do m. diafragma, neste trabalho, foi projetado e testado dois clips e um suporte fixo com a finalidade de fixar e estabilizar o diafragma durante a avaliação da função muscular. Os clips e o suporte fixo durante a avaliação demonstraram ser um acessório de extrema relevância durante a avaliação do diafragma. Através dos clips, o arranjo paralelo das fibras musculares e a estabilidade do fragmento do diafragma puderam ser preservado na sua totalidade, fato esse que não corre na técnica de sutura. Na técnica de sutura descrita pelos autores acima, o diafragma é fixado em duas regiões: a primeira no músculo diafragma próximo a região dos arcos costais e a segunda região, no centro tendíneo. A linha de sutura que fixa o fragmento junto a porção dos arcos costais lesiona o músculo diafragma, podendo comprometer o resultado da avaliação da força muscular, além de não conferir estabilidade ao fragmento durante o ensaio de contratilidade. Já a linha de sutura localizada sobre o centro tendíneo, pode gerar micro lesões imperceptível aos olhos do examinador e assim resultar em dados errôneos. Adicionalmente, a técnica de sutura inviabiliza o teste das propriedades passivas.

Nossos achados indicaram que o m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade apresentou histopatologia e propriedades contráteis e passivas mais comprometida do que no camundongo mdx. Entretanto aos 6 meses de idade, poucas

alterações histopatológicas e músculo funcionais, diferenciaram o m. diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/. Zhou et al. (2008) e Gutpell et al. (2015) previamente descreveram somente a inflamação e as áreas de fibrose no camundongo mdx/utrn+/, não elucidando outros aspectos fisiopatológicos distróficos

Histologicamente o camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade, apresentou elevada porcentagem de fibras nucleadas centralmente, maior área de infiltrado inflamatório e de tecido conectivo, além de um maior número de miofibras embrionárias quando comparados com o camundongo mdx. O aumento de miofibras embrionárias observado nos animais de 2 meses, indicam que as fibras musculares estão sendo regeneradas. Os camundongos BL10 apresentaram morfologia normal. Zhou et al. (2008) e Gutpell et al. (2015) observaram achados semelhantes aos obtidos neste estudo, porém na idade de 3 meses. Diferentemente dos achados de Zhou et al. (2008) e Gutpell et al. (2015), aos 6 meses de idade, ambos animais, mdx e mdx/utrn+/- apresentaram dados similares de porcentagem de fibras nucleadas centralmente, áreas de infiltrado inflamatório e distribuição de tecido conectivo, não se diferenciando entre si. Apesar destas duas linhagens apresentarem-se comprometidas pela distrofia muscular, nossos achados não demonstraram uma diferença estatística entre o mdx e o mdx/utrn+/- aos 6 meses de idade. Pequena quantidade de miofibras embrionárias foram identificadas no diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/- de 6 meses de idade e nenhuma foi identificada nos camundongos BL10. Este fato evidencia a redução do número de fibras regeneradas nos animais de 6 meses. Áreas de calcificação foram mais visualizadas no diafragma do camundongo mdx/utrn+/- de 2 meses do que no mdx de mesma idade. Entretanto, aos 6 meses de idade tanto o mdx quanto o mdx/utrn+/- apresentaram áreas similares de calcificação. A visualização das áreas de calcificação no camundongo mdx/utrn+/- está sendo, até o presente momento, primeiramente demonstrada neste trabalho. Os animais controle, BL10 não apresentaram áreas de calcificação aos 2 e 6 meses de idade.

Assim como previamente descrito por Hakim, Grange e Duan (2011), a quantidade de fibrose presente no músculo é evidentemente ligada a rigidez muscular, um dos sinais clínicos mais importantes na DMD. Consistentemente com os achados morfológicos dos animais de 2 meses de idade, a quantidade de hidroxiprolina observada no m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- apresentou-se aumentada quando comparada com o mdx. Nossos dados corroboram com os achados de Zhou et al. (2008).

Fibras marcando isoformas MyHC-Ia, MyHC-IIa, MyHC-IIx foram encontradas em maior quantidade no camundongo BL10 do que no mdx e mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade. Somente a isoformas MyHC-IIa/IIx apresentou-se reduzida no BL10 quando comparada ao mdx e mdx/+/- com 2 meses. Tal redução da isoformas MyHC-IIa/IIx também ocorre nos animais com 6 meses de idade. Aos 6 meses de idade isoformas expressando MyHC-Ia encontra se diminuída no camundongo mdx; MyHC-IIa ausentes nas 3 linhagens e MyHC-IIx aumentada no BL10. Os dados relacionados aos camundongos BL10 e mdx obtidos neste estudo, estão de acordo com os dados previamente descritos por Petrof et al. (1993), Bates et al. (2012) e Gregorevic et al. (2012). Os achados do camundongo mdx/utrn+/- estão sendo até o presente momento, primeiramente descritos neste estudo.

Em relação a expressão da proteína distrofina, assim como o esperado os camundongos mdx e mdx/utrn+/- de 2 e 6 meses de idade não apresentaram expressão. Já em relação a proteína utrofina, os camundongos mdx em ambas as idades expressaram a presença desta. Os camundongos mdx/utrn+/- apresentaram pouca expressão da proteína utrofina aos 2 e 6 meses de idade. Os resultados vão de encontro ao de Baker et al. (2006) e Zhou et al. (2008).

A análise de contratilidade do músculo diafragma do camundongo mdx/utrn+/- com 2 meses de idade revelou que o valor de P_t apresentou-se similar ao do BL10, enquanto que no mdx esta mostrou-se elevada. Aos 6 meses de idade, as 3 linhagens estudadas apresentaram valores semelhantes de P_t . Entretanto quando o valor de P_t foi normalizado com a área de transecção transversal (CSA- cross-section area), a força específica de P_t (sP_t) aos dois meses de idade apresentou-se mais comprometida no camundongo mdx/utrn+/- do que no BL10 e mdx. Aos 6 meses de idade, os camundongos BL10 apresentaram sP_t elevada e não houve diferença de força entre o mdx e mdx/utrn+/. Comparando a sP_t dos camundongos mdx e mdx/utrn+/- com 2 e 6 meses, observamos que no mdx esta força reduz com o avanço da idade (de 2 para 6 meses) do animal, enquanto que nos mdx/utrn+/- a progressão da idade do animal não acentua os valores de sP_t . Sendo assim, sugere-se que a haploinsuficiência de utrofina no camundongo mdx acentua a redução de sP_t somente aos 2 meses de idade. A força tetânica absoluta, P_o e a específica sP_o aos 2 meses de idade apresentou-se mais comprometida no camundongo mdx/utrn+/- do que no mdx, enquanto que aos 6 meses, não se observou diferença entre P_o e sP_o nos camundongos mdx e mdx/utrn+/. Os valores de sP_o no camundongo mdx e mdx/utrn+/-, diminuíram com o avanço da idade dos animais. Os

resultados provenientes do camundongo mdx, de P_t , sP_t , P_o e sP_o vão de encontro com os resultados por Lynch et al. (1997); Deconinck et al. (1998); Austin et al. (2000); Rossi et al. (2001); Gregorevic et al. (2002); Law (2004); Matecki, Guibinga e Petrof (2004); Barton et al. (2005); Harcourt et al. (2005); Matecki et al. (2005); Viosin et al. (2005); Hinkle et al. (2007); Gehrig et al. (2008); Stupka et al. (2008); Barton et al. (2010); Beastro et al. (2011); Bish et al. (2011); Peterson et al. (2011); Gehrig et al. (2012); Pauly et al. (2012); Serra et al. (2012); Selsby et al. (2013) e Smaith e Barton (2014) que utilizaram a técnica de sutura para avaliar o músculo diafragma. A força específica de P_o no camundongo mdx/utrn+/- está de acordo com os dados previamente publicados de Rafael-Fortney et al. (2011). O tempo de atingir o pico de tensão (TTP – time to peak tension) aos 2 e 6 meses se encontraram diminuídas nos camundongos mdx e mdx/utrn+/- . Este fato pode ser atribuído em partes ao aumento da porcentagem de fibras expressando isoformas MyHC-Ia, MyHC-IIa. As fibras expressando isoformas MyHC-Ia são as primeiras a serem recrutadas durante a contração máxima, seguida da isoformas MyHC-IIa (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2010). Metade do tempo de relaxamento ($\frac{1}{2}$ RT - $\frac{1}{2}$ Relaxation time) encontrou-se reduzido no camundongo mdx aos 2 meses de idade quando comparado ao BL10 e mdx/utrn+/- de mesma idade. Provavelmente, o camundongo mdx necessitou de um menor tempo para relaxar do que o mdx/utrn+/- devido ao fato do mdx diferentemente do mdx/utrn+/- apresentar fibras expressando MyHC-IIx/IIb. Aos 6 meses de idade não foi observado diferença da $\frac{1}{2}$ RT entre os camundongos mdx e mdx/utrn+/- . A taxa de força máxima derivada (dF/dtmax) no mdx com 2 meses de idade mostrou-se elevada quando comparada com o BL10 e o mdx/utrn+/- e a mínima diminuída somente no mdx. Entretanto, aos 6 meses de idade não se observou diferenças entre o mdx e o mdx/utrn+/- . Os dados obtidos do camundongo mdx estão de acordo com Gregorevic et al. (2012). Após 10 ciclos de contração excêntrica, o músculo diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade, apresentaram queda na força de respectivamente, 36.19% e 37.51% da linha de base de 100%, enquanto a força do BL10 reduziu 9.02%. Aos 6 meses de idade, os camundongos mdx e mdx/utrn+/- com 6 meses de idade, apresentaram queda de força de 39.42% e 39.00% respectivamente da linha de base de 100%, enquanto a força do BL10 reduziu 19.40%. Sugerimos que não há diferença na queda de força entre os animais estudados de 2 e 6 meses de idade. Nossos resultados de queda de força no camundongo mdx com 2 meses de idade vão de encontro com os resultados obtidos por Barton et al. (2010).

As propriedades passivas no músculo diafragma do camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade mostrou-se mais comprometida do que no camundongo mdx. Os dados

obtidos dos mdx/utrn+/- até o momento não foram reportados por nenhum autor. Do pico de estresse de 120-140%, as forças resistivas produzidas pelo estiramento do diafragma das 3 linhagens estudadas com 2 meses, apresentaram valores similares. Entretanto, após o pico de estresse de 140%, o músculo diafragma do camundongo mdx/utrn+/- continuou a produzir forças resistivas, ao contrário do mdx que exibiu falência muscular. Assim como os achados de Smith e Barton (2014), o mdx em nosso estudo, apresentou mais rigidez muscular do que o BL10. Aos 6 meses de idade, não se observou diferença das forças resistivas do pico de estresse de 110-120%, entre os camundongos BL10, mdx e mdx/utrn+/- . No pico de estresse de 130%, o camundongo mdx produziu maior força resistiva quando comparados com o BL10 e mdx/utrn+/- . Do pico de estresse de 140-160%, as forças resistivas produzidas pelo estiramento do diafragma do camundongo mdx e mdx/utrn+/- aumentaram, porém, foram similares. Os dados obtidos do camundongo mdx vão de encontro ao descrito por Smith e Barton (2014). Já os dados do camundongo mdx/utrn+/- , até o presente momento, foram primeiramente, descritos neste trabalho. Os resultados obtidos nesta avaliação sugerem que a diferença na quantidade de fibrose, revelada pela quantidade de hidroxiprolina, no músculo diafragma do camundongo mdx/utrn+/- e no mdx aos 2 meses, pode ser considerada um importante agravante da rigidez muscular (SMITH; BARTON; 2014). Diferentemente dos animais de 2 meses, aos 6 meses de idade não se observou diferença nas forças resistivas entre os camundongos mdx e mdx/utrn+/- . Dessa forma, não houve necessidade de se avaliar a quantidade de hidroxiprolina, uma vez que mesmo que elevado o teor de hidroxiprolina nos camundongos mdx e mdx/utrn+/- de 6 meses de idade, este não foi suficiente para diferenciar as propriedades passivas dos camundongos mdx e mdx/utrn+/- , já que ambos apresentaram força resistivas muito aproximadas. Entretanto, a taxa de estresse-relaxamento (SRR- Stress Relaxation Rate) aos 2 e 6 meses de idade apresentou-se elevada somente no camundongo mdx e mdx/utrn+/- , evidenciando nas unidades funcionais do músculo diafragma distrófico. Em outros músculos do mdx, como o extensor longo dos dedos, esta alteração também é observada assim como no diafragma (HAKIM; DUAN, 2012).

7 CONCLUSÃO

Este estudo conclui que:

- 1- Os clips que foram confeccionados e utilizados para a avaliação do músculo diafragma do modelo murino apresentou eficácia durante a avaliação;
- 2- O protocolo de avaliação das propriedades contráteis e passivas do diafragma com o uso dos clips, possibilitou a realização de uma avaliação segura e eficaz da função muscular do diafragma;
- 3- Os aspectos morfológicos gerais do m. diafragma do camundongo mdx/utrn+/- apresentou-se mais severamente comprometido do que o mdx aos 2 meses de idade. Este apresentou significativa inflamação e fibrose. Entretanto aos 6 meses de idade, não foi observado uma diferença morfológica significativa entre o mdx e o mdx/utrn+/-;
- 4- Os tipos de fibras musculares analisados nos camundongos C57BL10, mdx e mdx/utrn+/-, nos sugere que a diminuição das fibras de contração lenta (Tipo I) no mdx e mdx/utrn+/- com 2 meses de idade, pode comprometer o trabalho intermitente do músculo diafragma murino e favorecer a fadiga muscular. Entretanto, o fato das fibras tipo I/IIa e IIa/IIx estarem aumentada no mdx e mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade nos sugere que elas podem agir equilibrando a diminuição das fibras de contração lenta do tipo I. Já aos 6 meses de idade, não houve diferença nas fibras de contração lenta do tipo I. Entretanto as fibras do tipo I/IIa apresentaram-se aumentadas no mdx e diminuídas no mdx/utrn+/-, nos sugerindo que o camundongo mdx/utrn+/- pode apresentar maior comprometimento e susceptibilidade a fadiga do que o mdx;
- 5- A marcação da proteína distrofina e utrofina nos animais de 2 e 6 meses de idade nos permitiu confirmar e assegurar a haploinsuficiência no camundongo mdx/utrn+/-;
- 6- As propriedades contráteis sP_1 e sP_0 no camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade encontram-se significativamente reduzidas no mdx. Entretanto aos 6 mese de idade, não foi observado diferença entre o mdx e mdx/utrn+/- . Isso nos sugere que o camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade apresenta função muscular mais comprometida que os animais de 6 meses. As propriedades passivas no camundongo mdx/utrn+/- aos 2 meses de idade demonstraram significativa aumento na rigidez muscular com posterior falência da

musculatura por rompimento, diferente dos camundongos mdx que produziram mais força resistiva. Isso evidencia que o músculo diafragma do camundongo mdx/utrn+/- apresenta-se severamente comprometido quando comparado com o mdx. Já aos 6 meses de idade não se observou diferença entre os camundongos mdx e mdx/utrn+/-;

Em síntese, estes resultados sugerem que o camundongo mdx/utrn+/- com 2 meses de idade representa um modelo superior ao mdx de mesma idade e que aos 6 meses de idade, não há diferença significativa na função muscular e nos sinais clássicos da distrofia muscular. Assim, o mdx/utrn+/- com dois meses de idade pode representar um melhor modelo animal para testar o potencial das terapias experimentais.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. P. Q. C.; DECO, M. C. de; KLÔH, B. S.; COSTA, M. R.; GÓIS, F. V.; GUIMARÃES, A. F. C. M.; Diagnosis delay of duchenne muscular dystrophy. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n. 2, p. 179-183, 2004.

AUSTIN, L.; BOWER, J. J.; BENNETT, T. M.; LYNCH, G. S.; KAPSA, R.; WHITE, J. D.; BARNARD, W.; GREGOREVIC, P.; BYRNE, E. Leukemia inhibitory factor ameliorates muscle fiber degeneration in the mdx mouse. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 11, p. 1700-1705, 2000.

BAKER, P. E.; KEARNEY, J. A.; GONG, B.; MERRIAM, A.P.; KUHN, D.E.; PORTER, J. D.; RAFAEL-FORTNEY, J. A. 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**, v. 7, n. 2, p. 81-91, 2006.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. 564 p.

BARTON, E. R.; MORRIS, L.; KAWANA, M.; BISH, L. T.; TOURSEL, T. Systemic administration of L-arginine benefits mdx skeletal muscle function. **Muscle Nerve**, v. 32, n. 6, p.751-60, 2005.

BARTON, E. R.; WANG, B. J.; BRISSON, B. K.; SWEENEY, H. L. Diaphragm displays early and progressive functional deficits in dysferlin-deficient mice. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 1, p. 22-29, 2010.

BATES, G.; SIGURDARDOTTIR, S.; KACHMAR, L.; ZITOUNI, N. B.; BENEDETTI, A.; PETROF, B. J.; RASSIER, D.; LAUZON, A. M. Molecular, cellular, and muscle strip mechanics of the mdx mouse diaphragm. **The American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 304, n. 9, p. C873-C880, 2013.

BEASTROM, N.; LU, H.; MACKE, A.; CANAN, B. D.; JOHNSON, E. K.; PENTON, C. M.; KASPAR, B. K.; RODINO-KLAPAC, L. R.; ZHOU, L.; JANSSEN, P. M.; MONTANARO, F. mdx^(5cv) mice manifest more severe muscle dysfunction and diaphragm force deficits than do mdx Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 5, p. 2464-2474, 2011.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador Retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2002.

BERNE, R. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 236-237.

BEYTÍA, M. L. A.; VRY, J., KIRSCHNER, J. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. **Acta Myologica**, v. 31, n. 1, p. 4-8, 2012.

BISH, L. T.; YARCHOAN, M.; SLEEPER, M. M.; GAZZARA, J. A.; MORINE, K. J.; ACOSTA, P.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L. Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal muscle function in dystrophic mice. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20856, 2011.

BLAND, R. D. Special considerations in oxygen therapy of infants and children. **American Review of Respiratory Disease**, v. 22, n. 5, p. 45-54, 1980.

BORG, T. K.; CAULFIELD, J. B. Morphology of connective tissue in skeletal muscle; **Tissue cell**, v. 12, n. 1, p. 197-207, 1980.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A.; MOORE, K. J. X chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, n. 4, p.1189- 1192, 1984.

CAMPBELL K. P. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. **Cell**. v. 80, n. 5, p.675-679, 1995.

CANNATA, D. J.; CROSSLEY, K. J.; BARCLAY, C. J.; Walker, D. W.; West, J. M. Contribution of stretch to the change of activation properties of muscle fibers in the diaphragm at the transition from fetal to neonatal life. **Frontier Physiology**, v. 2, n. 109, p. 1-13, 2011.

CARNWATH, J. W.; SHOTTON, D. M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. **Journal of the Neurological Science**, v. 80, n. 1, p.39-54, 1987.

CAROMANO, F. A. C. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (DMD). **Arquivos de Ciências de Saúde de Unipar**, v. 3, n. 3, p. 211-218, 1999.

CHAMBERLAIN, J. S.; METZGER, J.; REYES, M.; TOWNSEND, D.; FAULKNER, J. A. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 9 p. 2195-204, 2007.

CHANDRASEKHARAN, K.; YOON, J. H.; XU, Y.; DEVRIES, S.; CAMBONI, M.; JANSSEN, P. M.; VARKI, A.; MARTIN, P. T. A human-specific deletion in mouse Cmah increases disease severity in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 42, p.ra54, 2010.

CHUN, J. L.; O'BRIEN, R.; BERRY, S. E. Cardiac dysfunction and pathology in the dystrophin and utrophin-deficient mouse during development of dilated cardiomyopathy. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 4, p. 368-379, 2012.

CROS, D.; HARNDEN, P.; PELLISSIER, J. F.; SERRATRICE, G. Muscle hypertrophy in Duchenne muscular dystrophy: A pathological and morfometric study. **Journal of Neurology**, v. 236, n. 1, p. 43-47, 1989.

CROSSLEY, K. J.; ALLISON, B. J.; POLGLASE, G. R.; MORLEY, C. J.; DAVIS, P. G.; HOOPER, S. B. Dynamic changes in the direction of blood flow through the ductus arteriosus at birth. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 19, p. 4695-4704, 2009.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. pp.720.

DECONINCK, A. E.; RAFAEL, J. A.; SKINNER, J. A. Utrophin dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 717-727, 1997.

DECONINCK, N.; RAFAEL, J. A.; BECKERS-BLEUKX, G.; KAHN, D.; DECONINCK, A. E.; DAVIES, K. E.; GILLIS, J. M. Consequences of the combined deficiency in dystrophin and utrophin on the mechanical properties and myosin composition of some limb and respiratory muscles of the mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 8, n. 6, p. 362-370, 1998.

DECONINCK, N.; TINSLEY, J.; De BACKER, F.; FISHER, R.; KAHN, D.; PHELPS, S.; DAVIES, K.; GILLIS, J. M. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin deficient muscles of mice. **Nature Medicine**, v. 1, n. 3, p.1216-1221, 1997.

DERENNE, J. P.; DEBRU, A.; GRASSINO, A. E.; WHITELAW, W. A. The earliest history of diaphragm physiology. **The European Respiratory Journal**, v. 7, n. 12, p. 2234-2240, 1994.

DIAMENT, A.; CYPEL, S. **Neurologia Infantil**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1113-1131.

DOS SANTOS YAMAGUTI, W. P.; PAULIN, E.; SHIBAO, S.; CHAMMAS, M. C.; SALGE, J. M.; RIBEIRO, M.; CUKIER, A.; CARVALHO, C. Air trapping: The major factor limiting diaphragm mobility in chronic obstructive pulmonary disease patients. **Respirology**, v. 13, n. 1, p. 138-144, 2008.

DOYLE, B. J.; CORBETT, T. J.; CALLANAN, A.; WALSH, M. T.; VORP, D. A.; MCGLOUGHLIN, T. M. An experimental and numerical comparison of the rupture locations of an abdominal aortic aneurysm. **Journal of Endovascular Therapy**, v. 16, n. 3, p. 322-335, 2009.

DUAN, D. Duchenne muscular dystrophy gene therapy in the canine model. **Human Gene Therapy Clinical Development**, v. 26, n. 1, p. 57-69, 2015.

DUCLOS, F.; STRAUB, V.; MOORE, S. A.; VENZKE, D. P.; HRSTKA, R. F.; CROSBIE, R. H.; DURBEEJ, M.; LEBAKKEN, C. S.; ETTINGER, A. J.; VAN DER MEULEN, J.; HOLT, K. H.; LIM, L. E.; SANES, J. R.; DAVIDSON, B. L.; FAULKNER, J. A.; WILLIAMSON, R.; CAMPBELL, K. P. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 142, n. 6, p. 1461-1471, 1998.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Textbook of Veterinary Anatomy**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. 820 p.

FURLEY, D. J.; WILKIE, J. S. **Galen on respiration and the arteries**. Princeton: Princeton University Press, 1984. 304 p.

GAYRAUD, J.; MATECKI, S.; H尼亚, K.; MORNET, D.; PREFAUT, C.; MERCIER, J.; MICHEL, A.; RAMONATXO, M. Ventilation during air breathing and in response to hypercapnia in 5 and 16 month-old *mdx* and C57 mice. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 28, n. 1, p. 29-37, 2007.

GEHRIG, S. M.; RYALL, J. G.; SCHERTZER, J. D.; LYNCH, G.S. Insulin-like growth factor-I analogue protects muscles of dystrophic *mdx* mice from contraction-mediated damage. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 11, p. 1190-1198, 2008.

GEHRIG, S. M.; VAN DER POEL, C.; SAYER, T. A.; SCHERTZER, J. D.; HENSTRIDGE, D. C.; CHURCH, J. E.; LAMON, S.; RUSSELL, A. P.; DAVIES, K. E.; FEBBRAIO, M. A.; LYNCH, G. S. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 394-398, 2012.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 1134 p.

GONZALEZ, J. P.; CRASSOUS, P. A.; SCHNEIDER, J. S.; BEUVE, A.; FRAIDENRAICH, D. Neuronal nitric oxide synthase localizes to utrophin expressing intercalated discs and stabilizes their structural integrity. **Neuromuscular Disorders**, v. 25, n. 12, p. 964-976, 2015.

GOSSELIN, L. E.; BARKLEY, J. E.; SPENCER, M. J.; McCORMICK, K. M.; FARKAS, G. A. Ventilatory dysfunction in *mdx* mice: impact of tumor necrosis factor-alpha deletion. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 3, p. 336–343, 2003.

GOZAL, D. Pulmonary manifestations of neuromuscular disease with special reference to Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. **Pediatric Pulmonology**, v. 29, n. 2, p. 141-150, 2000.

GREGOREVIC, P.; PLANT, D. R.; LEEDING, K. S.; BACH, L. A.; LYNCH, G. S. Improved contractile function of the *mdx* dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 2263-2272, 2012.

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

GUSLITS, B. G.; GASTON, S. E.; BRYAN, M. H.; ENGLAND, S. J.; BRYAN, A. C. Diaphragmatic work of breathing in premature human infants. **Journal of Applied Physiology**, v. 62, n. 4, p. 1410–1415, 1987.

HAKIM, C. H.; DUAN, D. Gender differences in contractile and passive properties of *mdx* extensor digitorum longus muscle. **Muscle Nerve**, v. 45, n. 2, p. 250-256, 2012.

HAKIM, C. H.; GRANGE, R. W.; DUAN, D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2 to 20-month-old *mdx* mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 6, p. 1656–1663, 2011.

HAKIM, C. H.; LI, D.; DUAN, D. Monitoring Murine Skeletal Muscle Function for Muscle Gene Therapy. **Methods in Molecular Biology**, v. 709, n. 1, p. 75-89, 2011.

HAKIM, C. H.; WASALA, N. B.; DUAN, D. Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle ex vivo and tibialis anterior muscle in situ in mice. **Journal of Visualized Experiment**, v. 9, n. 72, pii. 50183, 2013.

HALL, S. J. **Biomecânica básica**. São Paulo: Manole, 2009. p. 542.

HARCOURT, L. J.; HOLMES, A. G.; GREGOREVIC, P.; SCHERTZER, J. D.; STUPKA, N.; PLANT, D. R.; LYNCH, G. S. Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 1131-1134, 2005.

HARRIS, C. R. S. **The Heart and the vascular system in ancient greek medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1973. p. 134-135.

HARTEL, J. V.; GRANCHELLI, J. A.; HUDECKI, M. S.; POLLINA, C. M.; GOSSELIN, L. E. Impact of prednisone on TGF- β 1 and collagen in diaphragm muscle from mdx mice. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 3, p. 428-432, 2001.

HILL, A.V. **First and last experiments in muscle mechanics**, Cambridge: Cambridge University Press, 1970.

HINKLE, R. T.; LEFEVER, F. R.; DOLAN, E. T.; REICHART, D. L.; DIETRICH, J. A.; GROPP, K. E.; THACKER, R. I.; DEMUTH, J. P.; STEVENS, P. J.; QU, X. A.; VARBANOV, A. R.; WANG, F.; ISFORT, R. J. Corticotrophin releasing factor 2 receptor agonist treatment significantly slows disease progression in mdx mice. **BMC Medicine**, v. 12, n. 5, p. 18, 2007.

HOFFMAN, E. P.; BROWN, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 919-928, 1998.

HUANG, P.; CHENG, G.; LU, H.; ARONICA, M.; RANSOHOFF, R. M.; ZHOU, L. Impaired respiratory function in mdx and mdx/utrn^{+/-} mice. **Muscle Nerve**, v. 43, n. 2, p. 263-267, 2011.

IM, W. B.; PHELPS, S. F.; COPEN, E. H.; ADAMS, E. G.; SLIGHTOM, J. L.; CHAMBERLAIN, J. S. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 8, p. 1149-1153, 1996.

ISHIZAKI, M.; SUGA, T.; KIMURA, E.; SHIOTA, T.; KAWANO, R.; UCHIDA, Y.; UCHINO, K.; YAMASHITA, S.; MAEDA, Y.; UCHINO, N. *Mdx* respiratory impairment

following fibrosis of the diaphragm. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 4, p. 342-348, 2008.

JORDE, L. B. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 111-113.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Journal of Neurological Science**, v. 166, n. 2, p. 115-121, 1999.

KORNEGAY, J. N.; CHILDERS, M. K.; BOGAN, D. J.; NGHIEM, P.; WANG, J.; FAN, Z.; HOWARD, J. F. J. R.; SCHATZBERG, S. J.; DOW, J. L.; GRANGE, R. W.; STYNER, M. A.; HOFFMAN, E. P.; WAGNER, K. R. The paradox of muscle hypertrophy in muscular dystrophy. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North American**, v. 23, n. 1, p. 149-172, 2012.

LAW, D. J.; CAPUTO, A.; TIDBALL, J. G. Site and mechanics of failure in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. **Muscle Nerve**, v. 18, n. 2, p. 216-223, 1995.

LAWS, N.; HOEY, A. Progression of kyphosis in mdx mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 5, p. 1970-1977, 2004.

LESSA, T. B.; CARVALHO, R. C.; FRANCIOLLI, A. L. R.; OLIVEIRA, L. J.; BARRETO, R. S.; FEDER, D.; BRESSAN, F. F.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Muscle reorganisation through local injection of stem cells in the diaphragm of mdx mice. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2012.

LYNCH, G. S.; HINKLE, R. T.; FAULKNER, J. A. Force and power output of diaphragm muscle strips from *mdx* and control mice after clenbuterol treatment. **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 2, p. 192-196, 2001.

LYNCH, G. S.; RAFAEL, J. A.; HINKLE, R. T.; COLE, N. M.; CHAMBERLAIN, J. S.; FAULKNER, J. A. Contractile properties of diaphragm muscle segments from old mdx and old transgenic mdx mice. **The American Journal of Physiology**, v. 272, n. 6, pt. 1, p. C2063-C2068, 1997.

MANTILLA, C. B.; SIECK, G. C. Key aspects of phrenic motoneuron and diaphragm muscle development during the perinatal period. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 6, p. 1818-1827, 2008.

MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. *Brazilian Journal Morphological. Science*, v. 21, n. 3, p. 145-152, 2004.

MATECKI, S.; GUIBINGA, G. H.; PETROF, B. J. Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4, p. R961-R968, 2004.

MATECKI, S.; RIVIER, F.; HUGON, G.; KOECHLIN, C.; MICHEL, A.; PREFAUT, C.; MORNET, D.; RAMONATXO, M. The effect of respiratory muscle training with CO₂ breathing on cellular adaptation of mdx mouse diaphragm. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, n. 6, p. 427-436, 2005.

McGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; McINTOSH, M. A.; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 195-213, 2015.

McNALLY, E. M. New approaches in the therapy of cardiomyopathy in muscular dystrophy. **Annual Review of Medicine**, v. 58, n. 1, p. 75-88, 2007.

MEGENEY, L. A.; KABLAR, B.; GARRETT, K.; ANDERSON, J. E.; RUDNICKI, M. A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **Genes and Development**, v. 10, n. 10, p. 1173-1183, 1996.

MICHELE, D. E.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin-glycoprotein complex: Post-translational processing and dystroglycan function. **Journal of Cell Biology**, v. 278, p. 15457-15460, 2003.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 317-358.

MOURKIOTI, F.; KUSTAN, J.; KRAFT, P.; DAY, J. W.; ZHAO, M. M.; KOST-ALIMOVA, M.; PROTOPOPOV, A.; DEPINHO, R. A.; BERNSTEIN, D.; MEEKER, A. K.; BLAU, H. M. Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 895-904, 2013.

MURRAY, J. D.; CANAN, B. D.; MARTIN, C. D.; STANGLAND, J. E.; RASTOGI, N.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; JANSSEN, P. M. The force-temperature relationship in healthy and dystrophic mouse diaphragm; implications for translational study design. **Frontier Physiology**, v. 7, n. 3, p. 422, 2012.

NAKAMURA, A; TAKEDA, S. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2011, n. 2011, p. 184393, 2011.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKASHI, K. Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. A demonstration using the cell maceration scanning electron microscope method. **Acta Anatomica**, v. 151, n. 4, p. 250-257, 1994.

OLVER, R. E.; WALTERS, D. V.; WILSON, S. Developmental regulation of lung liquid transport. **Annual Review of Physiology**, v. 66, n. 1, p. 77-101, 2004

PASSAMANO, L.; TAGLIA, A.; PALLADINO, A.; VIGGIANO, E.; D'AMBROSIO, P.; SCUTIFERO, M.; ROSARIA, C. M.; TORRE, V.; DE LUCA, F.; PICILLO, E.; PACIELLO, O.; PILUSO, G.; NIGRO, G.; POLITANO, L. Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. **Acta Myologica**, v. 31, n. 2, p. 121-125, 2012.

PAULY, M.; DAUSSIN, F.; BURELLE, Y.; LI, T.; GODIN, R.; FAUCONNIER, J.; KOEHLIN-RAMONATXO, C.; HUGON, G.; LACAMPAGNE, A.; COISY-QUIVY, M.; LIANG, F.; HUSSAIN, S.; MATECKI, S.; PETROF, B. J. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. **The American Journal of Pathology**, v. 81, n. 2, p. 583-592, 2012.

PETERSON, J. M.; KLINE, W.; CANAN, B. D.; RICCA, D. J.; KASPAR, B.; DELFÍN, D. A.; DIRIENZO, K.; CLEMENS, P. R.; ROBBINS, P. D.; BALDWIN, A. S.; FLOOD, P.; KAUMAYA, P.; FREITAS, M.; KORNEGAY, J. N.; MENDELL, J. R.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; GUTTRIDGE, D. C.; JANSSEN, P. M. Peptide-based inhibition of NF- κ B rescues diaphragm muscle contractile dysfunction in a murine model of Duchenne muscular dystrophy. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 5-6, p. 508-515, 2011.

PETROF, B. J.; SHRAGER, J. B.; STEDMAN, H. H.; KELLY, A. M.; SWEENEY, H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 90, n. 8, p. 3710-3714, 1993.

PICKERING, M.; JONES, J. F. J. The diaphragm: two physiological muscles in one. **Journal of Anatomy**, v. 201, n. 4, p. 305-312, 2002.

POLAT M.; SAKINCI, O.; ERSOY, B.; SEZER, R. G.; YILMAZ, H. Assessment of sleep-related breathing disorders in patients with duchenne muscular dystrophy, **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 4, n. 5, p. 332-337, 2012.

POLLA, B; D'ANTONA, G.; BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. **Thorax**, v. 59, n. 9, p. 808-817, 2004.

POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 799 p.

PONS, F.; ROBERT, A.; MARINI, J. F.; LEGER, J. J. Does utrophin expression in muscles of mdx mice during postnatal development functionally compensate for dystrophin deficiency. **Journal of the Neurological Science**, v. 122, n. 2, p. 162-170, 1994.

PRIOR, T. W.; BRIDGEMAN, S. J. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of Molecular Diagnostics: JMD**, v. 7, n. 3, p. 317-326, 2005.

RAFAEL-FORTNEY, J. A.; CHIMANJI, N. S.; SCHILL, K. E.; MARTIN, C. D.; MURRAY, J. D.; GANGULY, R.; STANGLAND, J. E.; TRAN, T.; XU, Y.; CANAN, B. D.; MAYS, T. A.; DELFÍN, D. A.; JANSSEN, P. M.; RAMAN, S. V. Early treatment with lisinopril and spironolactone preserves cardiac and skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy mice. **Circulation**, v. L 124, n. 5, p. 582-585, 2011.

ROCHESTER, D. F. The diaphragm: contractile properties and fatigue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 5, p. 1397-1402, 1985.

ROSSI, R.; BOTTINELLI, R.; SORRENTINO, V.; REGGIANI, C. Response to caffeine and ryanodine receptor isoforms in mouse skeletal muscles. **The American Journal of Physiology Cell**, v. 281, n. 2, p. C585-C594, 2001.

ROUSSOS, C.; MACKLEM, P. T. The respiratory muscles. **The New England Journal of Medicine**, v. 307, n. 13, p. 786-797, 1982.

RUDOLPH, A. M. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. **Circulation Research**, v. 57, n. 6, p. 811-821, 1985.

SAXTON, J. M.; DONNELLY, A. E. Length-specific impairment of skeletal muscle contractile function after eccentric muscle actions in man. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 90, n. 2, p. 119-125, 1996.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, 2011.

SCHILZ, R. **Fundamentos da terapia respiratoria de Egan**. São Paulo: Manole, 2000. p. 1408.

SELSBY, J. T.; ACOSTA, P.; SLEEPER, M. M.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L. Long-term wheel running compromises diaphragm function but improves cardiac and plantarflexor function in the mdx mouse. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 5, p. 660-666, 2013.

SERRA, F.; QUARTA, M.; CANATO, M.; TONIOLO, L.; DE ARCANGELIS, V.; TROTTA, A.; SPATH, L.; MONACO, L.; REGGIANI, C.; NARO, F. Inflammation in muscular dystrophy and the beneficial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Muscle Nerve**, v. 46, n. 5, p. 773-784, 2012.

SHIN, J. H.; HAKIM, C. H.; ZHANG, K.; DUAN, D. Genotyping mdx, mdx3cv, and mdx4cv mice by primer competition polymerase chain reaction. **Muscle Nerve**, v. 43, n. 2, p. 283-286, 2011.

SICINSKI, P.; GENG, Y.; RYDER-COOK, A. S.; BARNARD, E. A.; DARLISON, M. G.; BARNARD, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science**, v. 244, n. 4912, p. 1578-1580, 1989.

SIMONDS, A. K.; MUNTONI, F.; HEATHER, S.; FIELDING, S. Impact of nasal ventilation on survival in hypercapnic Duchenne muscular dystrophy. **Thorax**, v. 53, n. 11, p. 949-952, 1998.

SMITH, L. R.; BARTON, E. R. Collagen content does not alter the passive mechanical properties of fibrotic skeletal muscle in mdx mice. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 306, n. 10, p. C889-C898, 2014.

SOUCHARD, Ph.-E. **O diafragma**. São Paulo: Summus Editorial, 1989. 88 p.

SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? **Neuromuscular Disorder**, v. 11, n. 6-7, p. 556-564, 2001.

STROBER, J. B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. **The American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 3, n. 2, p. 225-234, 2006.

STUPKA, N.; SCHERTZER, J. D.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N.; LYNCH, G. S. Stimulation of calcineurin Aalpha activity attenuates muscle pathophysiology in mdx dystrophic mice. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. R983-R992.

TKATCHENKO, A. V.; LE CAM, G.; LEGER, J. J.; DECHESNE, C. V. Large-scale analysis of differential gene expression in hindlimb muscle and diaphragm of mdx mouse. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, n. 1, p. 17-30, 2000.

VAINZOF, M.; PASSOS-BUENO, M. R.; CANOVAS, M.; MOREIRA, E. S.; PAVANELLO, R. C. M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 12, p. 1963-1969, 1996.

VAN PUTTEN, M.; KUMAR, D.; HULSKER, M.; HOOGAARS, W. M.; PLOMP, J. J.; VAN OPSTAL, A.; VAN ITERSOM, M.; ADMIRAAL, P.; VAN OMMEN, G. J.; 'T HOEN, P. A.; AARTSMA-RUS, A. Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 5, p. 406-417, 2012.

VASILEV, V.; ANDREEV, D.; KUHNEL, W. Scanning electron microscopy of the endomysial collagen in the rat paravertebral musculature. **Annals of Anatomy**, v. 177, n. 4, p. 85-87, 1995.

VIANELLO, A.; BEVILACQUA, M.; SALVADOR, V.; CARDAIOLI, C.; VINCENTI, E. Long-term nasal intermittent positive pressure ventilation in advanced Duchenne's muscular dystrophy. **Chest**, v. 105, n. 5, p. 445-448, 1994.

VOISIN, V.; SÉBRIÉ, C.; MATECKI, S.; YU, H.; GILLET, B.; RAMONATXO, M.; ISRAËL, M.; DE LA PORTE, S. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. **Neurobiology of Disease**, v. 20, n. 1, p. 123-130, 2005.

VOS J. H.; VAN, D. E. R.; LINDE-SIPMAN, J. S.; GOEDEGEBUURE, S. A. Dystrophy-like myopathy in the cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 96, n. 3, p. 335-341, 1986.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, v. 138, n. 21, p. 343-350, 1984.

WILLMANN, R.; DE LUCA, A.; BENATAR, M.; GROUNDS, M.; DUBACH, J.; RAYMACKERS, J. M.; NAGARAJU, K. TREAT-NMD Neuromuscular Network. Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 1, p. 43-49, 2012.

WILLMANN, R.; POSSEKEL, S.; DUBACH-POWELL, J.; MEIER, T.; RUEGG, M. A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 4, p. 241-249, 2009.

YANG, H. T.; SHIN, J. H.; HAKIM, C. H.; PAN, X.; TERJUNG, R. L.; DUAN, D. Dystrophin deficiency compromises force production of the extensor carpi ulnaris muscle in the canine model of Duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44438, 2012.

YUE, Y.; LIU, M.; DUAN, D. C-terminal truncated microdystrophin recruits dystrobrevin and syntrophin to the dystrophin-associated glycoprotein complex and reduces muscular dystrophy in symptomatic utrophin/dystrophin double knock-out mice. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 14, n. 1, p. 79-87, 2006.

ZHOU, L.; PORTER, J. D.; CHENG, G.; GONG, B.; HATALA, D. A.; MERRIAM, A. P.; ZHOU, X.; RAFAEL, J. A.; KAMINSKI, H. J. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and TbetaRI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, n. 1, p. 32-38, 2006.

ZHOU, L.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; HUANG, P.; ZHAO, X. S.; CHENG, G.; ZHOU, X.; KAMINSKI, H. J.; LIU, L.; RANSOHOFF, R. M. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. **Journal of Neurological Science**, v. 15, n. 1-2, p. 106-111, 2008.