DANIELA MORAES DE OLIVEIRA

**Análise de expressão da distrofina, miostatina, $\text{tgf-}\beta$ e $\text{nf-kappa } \beta$,
durante a fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden
Retriever Muscular Dystrophy)**

São Paulo

2017

DANIELA MORAES DE OLIVEIRA

**Análise de expressão da distrofina, miostatina, $\text{tgf-}\beta$ e $\text{nf-kappa } \beta$,
durante a fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden
Retriever Muscular Dystrophy)**

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 a obtenção do título de Doutora em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3513
FMVZ

Oliveira, Daniela Moraes de
Análise de expressão da distrofina, miostatina, $\text{tgf-}\beta$ e $\text{nf-kappa } \beta$, durante a fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) / Daniela Moraes de Oliveira. -- 2017
41 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. Distrofia. 2. Distrofina. 3. Duchenne. 4. GRMD. 5. Feto. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise de expressão da distrofina, miostatina, TGF-B e NF-KAPPA B durante a fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy)", protocolado sob o nº 3018/2013, utilizando 35 (trinta e cinco) cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, 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 "Analysis dystrophin gene expression, myostatin, TGF-B and B NF-KAPPA during embryonic and fetal stage in canine model GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy)", protocol number 3018/2013, utilizing 35 (thirty five) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, 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: OLIVEIRA, Daniela Moraes

Título: A Análise de expressão da distrofina, miostatina, $\text{tgf-}\beta$ e $\text{nf-kappa } \beta$, durante fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy)

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 a obtenção do título de Doutora 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: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus amados pais, **Terezinha Ferreira de Moraes** (minha Rainha) e **Benedicto Lazaro de Oliveira** por me trazerem á vida, por me dar amor, carinho, dedicação e apoio. Por não medirem esforços na realização de minha tão sonhada formação acadêmica. Por me ensinar que os sonhos podem se tornar realidade, na medida em que você se esforçar. Por mostrar que o amor e perseverança podem nos levar a qualquer lugar. Mais uma vez obriga por tudo.

Ao meu amado esposo, **Alexandre Teixeira de Melo**, por me presentear com o meu maior sonho, meu amado filho Arthur Moraes Teixeira de Melo.

Ao meu filho **Arthur Moraes Teixeira de Melo**, por estar comigo nesta jornada, tão pequeno e acompanhando a mamãe nos laboratórios, nos plantões. Filho, você é o meu maior orgulho, minha maior felicidade, obrigada por cada sorriso lindo teu, a cada palavra arranhada, a cada beijinho, você me faz sentir viva a cada dia. Você é tudo pra mim meu príncipe.

Aos meus irmãos Alex e Mônica, aos meus cunhados Vânia e Marcos e meus sobrinhos lindos Larissa, Leticia, Isadora e Alexsander. Por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Aos portadores de Duchenne, as pesquisas estão engatinhando, mas um dia, felizes vamos exclamar que a batalha contra a distrofia estará ganha.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, agradeço por me receber em seu laboratório e por me proporcionar grande enriquecimento profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos, conhecimentos, orientação, dedicação, confiança e paciência. Agradeço ainda, pela compreensão e respeito em determinadas fases da minha vida. Palavras são pouco para agradecer minha profunda admiração, gratidão e respeito.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por proporcionar infraestrutura para um desenvolvimento científico e profissional adequado.

Ao canil experimental GRMD-Brasil, por ceder os animais e espaço para o desenvolvimento do experimento.

A professora, Dra. Maria Angélica Miglino, por abrir as portas do seu departamento sem me conhecer, do qual mudou toda a minha vida! Obrigada professora, eu nunca vou esquecer a confiança depositada. Obrigada também pelos animais cedidos ao experimento.

Aos professores, Dr. José Roberto Kfoury Jr, Dra. Camila Infantsi Vannucchi, Dra. Paula de Carvalho Papa por terem disponibilizado seus laboratórios para a execução dos experimentos.

Ao Dr. David Feder, por colaborar com o projeto GRMD-Brasil. O Admiramos pela sua luta e garra pela causa, pelo dom da medicina e da pesquisa. Suas contribuições são indispensáveis pelo avanço das pesquisas no Brasil.

Ao Dr. Carlos Eduardo Ambrósio e a Dra. Filomena dos Anjos por aceitarem o convite de contribuir com este projeto, obrigada.

À Dra. Ana Claudia O. Carreira, que colaborou com os resultados e as análises do projeto, sendo peça chave para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço a paciência durante todas as fases deste trabalho. Obrigada!

Aos Amigos e colaboradores, Dra. Renata dos Santos Silva, Dr. Amilton Cesar dos Santos, Dra. Paula Fratini e Dra. Dilayla Kelly ABreu que sempre estiveram dispostos a me auxiliar na aprendizagem de novas técnicas. Obrigada pela ajuda, mas acima de tudo, pela companhia, pela paciência, pelos momentos agradáveis de convivência e amizade.

Aos amigos, Dr. Bruno Bertassoli e Dra. Thais Borges Lessa, por terem colaborado grandiosamente com as análises e também pelos momentos de descontração.

Aos colegas e amigos de orientação MA, Antônio Neto, Dellys, Paulo Ramos, Dani e Rodrigo pela convivência em vários momentos desta jornada.

Aos alunos de Iniciação Científica Ana e Stefani, suas colaborações ao projeto e ao canil GRMD foram indispensáveis.

Aos colegas do VRA, por colaborar grandiosamente com o experimento.

Aos amigos e colegas de trabalho, Márcio, Lara, Jéssica, Carol e Adriana, pelos momentos de descontração e de parceria.

Aos funcionários do Setor de Anatomia, Jaqueline e Daura, pela simpatia e auxílio durante todo este período.

Aos técnicos, Ronaldo Agostinho, Edinaldo Farias (Índio) e Augusto, pela disponibilidade durante a realização dos experimentos e experiência acadêmica, me auxiliando quando necessário.

A Paulinha, por manter as instalações limpas, pelos cafezinhos diários e pela amizade.

Aos amigos e colegas do Canil GRMD-Brasil e da pós-graduação, com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa, que financiou a execução desta pesquisa.

RESUMO

OLIVEIRA, DM. **Análise de expressão da distrofina, miostatina, $\text{tgf-}\beta$ e $\text{nf-kappa } \beta$, durante a fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy).** [Expression analysis of dystrophin, myostatin, $\text{tgf-}\beta$ and $\text{nf-kappa } \beta$, during the embryonic and fetal phase in the GRMD canine model (Golden Retriever Muscular Dystrophy)]. 2017. 61 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética neuromuscular hereditária, ligada ao cromossomo X, sendo encontrada em humanos do sexo masculino. Esta doença muscular é descrita em outras espécies. O modelo de estudo pré-clínico GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*) apresenta sintomas clínicos fenotipicamente característicos da DMD em humanos e, por esta razão, tem sido amplamente utilizado como modelo de estudos pré-clínicos. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o tecido muscular, no modelo canino distrófico, ao longo da gestação. Quatro fêmeas, portadoras do gene distrófico, foram inseminadas com sêmen fresco de cães distróficos. No 25º dia, pós-inseminação, as fêmeas foram submetidas a exames de ultrassonografia para confirmar a gestação. As fêmeas gestantes passaram por uma ovariosalpingohisterectomia (OSH) para a retirada dos embriões e fetos nos seguintes períodos gestacionais: 28º, 33º, 38º e 42º dias. Em seguida fragmentos de tecido muscular foram analisados macroscopicamente e microscopicamente. Para verificar expressões proteicas, amostras de tecido foram submetidas a técnicas imunológicas, e PCR para distrofina, miostatina, e utrofina. Aos, 33º e 38º dias de gestação, no grupo distrófico, foram observadas características teciduais que corroboram com desenvolvimento tardio do tecido muscular. Os resultados para detecção proteica sugerem que, a distrofina, miostatina e utrofina foram expressas igualmente nos grupos controle e distrófico, durante todos os períodos do desenvolvimento gestacional analisado. Por fim, os dados sugerem que animais distróficos apresentam músculo sadio durante a fase gestacional, o que pode ser benéfico para testes farmacológicos em idade precoce.

Palavras-chave: 1. Distrofia 2. Distrofina 3. Duchenne 4. GRMD 5. Feto.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D. M. **Expression analysis of dystrophin, myostatin, $\text{tgf-}\beta$ and $\text{nf-kappa } \beta$, during the embryonic and fetal phase in the GRMD canine model (Golden Retriever Muscular Dystrophy).** [Análise de expressão da distrofina, miostatina, $\text{tgf-}\beta$ e $\text{nf-kappa } \beta$, durante a fase embrionária e fetal no modelo canino GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy)]. 2017. 61 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a hereditary neuromuscular genetic disease linked to the X chromosome, being found in male humans. This muscle disease is described in other species. The pre-clinical GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) study model presents phenotypically characteristic clinical symptoms of DMD in humans and, for this reason, has been widely used as a model for preclinical studies. The aim of the present study was to evaluate the muscular tissue, in the dystrophic canine model, throughout the gestation. Four females, carriers of the dystrophic gene, were inseminated with fresh semen from dystrophic dogs. On the 25th day, post-insemination, the females were submitted to ultrasonography to confirm the pregnancy. The pregnant females underwent an ovariosalpingohysterectomy (OSH) for the removal of the embryos and fetuses in the following gestational periods: 28^o, 33^o, 38^o and 42^o days. Then fragments of muscle tissue were analyzed macroscopically and microscopically. To verify protein expression, tissue samples were submitted to immunological techniques, and PCR for dystrophin, myostatin, and utrophin. At the 33 and 38th days of gestation, tissue characteristics were observed in the dystrophic group, which corroborate the late development of muscle tissue. The results for protein detection suggest that dystrophin, myostatin and utrophin were also expressed in the control and affected groups, during all periods of the gestational development analyzed. Lastly, the data suggest that dystrophic animals present healthy muscle during the gestational phase, which may be beneficial for pharmacological tests at an early age.

Keywords: Key words: 1. Dystrophy 2. Dystrophin 3. Duchenne 4. GRMD. Fetus.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Canil experimental GRMD Brasil.....	16
--	----

Capítulo II

Figura 2 - Aspectos macroscópicos e mensuração dos parâmetros corporais de embriões e fetos caninos, portadores ou não da distrofia muscular.	27
Figura 3 - Representação esquemática do modelo de embriões caninos portadores e não portadores de Distrofia Muscular. Os esquemas a seguir referem-se ao grupo A.	29
Figura 4 - Reação em cadeia da polimerase para a genotipagem do DNA de embriões e fetos.....	30
Figura 5- A: Média e desvio padrão dos grupos controle e afetado B: Gráfico do peso das amostras, apresentando á média e tendência dos valores em uma linha exponencial. C: Gráfico (comprimento occipto-sacral) das amostras, apresentando á média e os valores em uma linha de tendência.	32
Figura 6 - Análise histológica de fibras musculares esqueléticas de embriões caninos controle e afetado com a GRMD aos 28 dias de gestação. Coloração de H & E e picrosirius	33
Figura 7 - Análise histológica das fibras musculares esqueléticas de fetos caninos controle e afetado com GRMD aos 33 dias de gestação, H & E e picrosirius red.I.....	34
Figura 8 - Análise histológica das fibras musculares esqueléticas de fetos caninos controle e afetado GRMD aos 38 dias de gestação, H & E e picrosirius red.....	35
Figura 9 - Análise imuno-histoquímica no músculo em diferentes idades de desenvolvimento gestacional. Caninos controle e afetado GRMD.....	36

Capítulo III

Figura 10 - Reação em cadeia da polimerase para a genotipagem do DNA de embriões e fetos.	49
Figura 11 - Fotomicrofia dos cães do grupo A (embriões controle e distróficos “GRMD” de 28 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.	50
Figura 12 - Fotomicrofia dos cães do grupo B (fetos controle e distróficos “GRMD” de 33 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red. (embriões controle e distróficos “GRMD” de 28 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.	51
Figura 13 - Fotomicrofia e morfologia dos cães do grupo C (fetos controle e distróficos “GRMD” de 38 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.....	52
Figura 14 - Imunocoloração para marcação da proteína distrofina, dos cães do grupo A, B e C... ..	53
Figura 15 - Imunoflorescência para marcação da distrofina, VEGF, NFkB p50, TGFβ1 e GDF-/11 dos cães do grupo A (embriões controle e distróficos “GRMD” de 28 dias de gestação).....	54
Figura 16 - Imunoflorescência para marcação da proteína distrofina, VEGF, NFkB p50, TGFβ1 e GDF-/11 dos cães do grupo B (fetos controle e distróficos “GRMD” de 33 dias de gestação).para marcação da distrofina	55
Figura 17 - Imunoflorescência para marcação da proteína distrofina, VEGF, NFkB p50, TGFβ1 e GDF-/11 dos cães do grupo C (fetos controle e distróficos “GRMD” de 38 dias de gestação).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela 1. Identificação e organização dos grupos controle e afetados, de acordo com a idade gestacional (A, B e C) de cães.....	31
------------	---	----

SUMÁRIO

SUMÁRIO

capítulo I: INTRODUÇÃO GERAL.....	15
capítulo II: Avaliação do tecido muscular durante o desenvolvimento gestacional no modelo pré-clínico canino da distrofia muscular de Duchenne	19
2 INTRODUÇÃO	21
2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.3 RESULTADOS	30
2.4 DISCUSSÃO	37
Capítulo III: Avaliação da expressão proteica durante o desenvolvimento gestacional no modelo canino da distrofia muscular de Duchenne	39
3 INTRODUÇÃO	41
3.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	42
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.3 RESULTADOS	48
3.4 DISCUSSÃO	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma enfermidade decorrente de mutação ou deleção da proteína distrofina, que se expressa através de um gene de caráter recessivo, localizado no cromossomo X. Este gene é transmitido pela mãe, que raramente apresenta manifestações clínicas da doença por ser heterozigota para o gene. Os descendentes do sexo masculino (XY) de mães afetadas podem herdar o gene recessivo da doença, em uma probabilidade de 50% (SHELTON et al., 2001; NIGUYEN et al., 2002).

A distrofina exerce grande importância na integridade estrutural do músculo durante o período de contração, estando presente na musculatura esquelética e em menor proporção nos outros tecidos. (HOFFMANN et al. 1988; SHELTON et al., 2001; BERGMAN et al., 2002).

Histologicamente são observadas alterações no comprimento das fibras musculares, que se apresentam como fibras musculares necrosadas e com presença de fagócitos. No decorrer do tempo, o tecido muscular perde a capacidade de regeneração e as miofibrilas são substituídas por tecido conjuntivo (CAROMANO, 1999; BOGDANOVICH et al., 2004; GAIAD, 2006).

Em humanos, o diagnóstico clínico da DMD geralmente é tardio. Através de exame clínico é possível excluir sintomas neurológicos e avaliar sintomas resultantes de fraqueza da musculatura e dos membros (ROWLAND, 1997). Para confirmar o diagnóstico, é preciso realizar exames como biópsia muscular, eletromiografia (EMG), dosagem de enzimas séricas, entre elas a creatinofosfoquinase (CPK), além de testes para análise de DNA, que identificam a ausência da distrofina (DIAMENT; CYPEL, 1996; SHELTON et al., 2001).

Em humanos com DMD, os sinais clínicos só incidem após dois anos de vida. Na infância, meninos acometidos por esta enfermidade apresentam dificuldade para correr e, durante a adolescência, dificuldade para subir escadas, o que sugere um estado avançado de comprometimento muscular (EMERY, 2002).

A degeneração muscular é progressiva e os indivíduos acometidos pela doença, com idade entre 10 a 12 anos, em razão da dificuldade na locomoção,

podem necessitar de cadeiras de rodas. A expectativa de vida se restringe entre 20 e 30 anos de idade, devido ao comprometimento do sistema cardiorrespiratório (DAVIS, 1997; EAGLE et al., 2002; EMERY, 2002).

No entanto, estudos recentes demonstram que o auxílio de ventilação mecânica, com um acompanhamento clínico minucioso, pode aumentar a sobrevida dos acometidos pela DMD (ARAUJO, 2004). Porém, estudos ainda não revelaram um tratamento que seja capaz de estabilizar ou retroceder o quadro clínico da DMD (CAROMANO, 1999; MARQUES, 2004; STROBER, 2006).

Modelos animais distróficos de diferentes espécies são descritas como ratos (mdx), cães (GRMD) e gatos (HFMD). Entretanto, destaca-se o camundongo mdx, que apresenta sinais clínicos que se manifestam de forma branda (CHAMBERLAIN et al., 2007; ISHIZAKI et al., 2008). Outro modelo animal comumente utilizado é o canino, Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). Este modelo exibe uma deficiência da distrofina que causa um severo comprometimento clínico, similar ao humano; sendo assim, é considerado o modelo experimental ideal para estudos pré-clínicos em prol de terapias que trazem expectativas promissoras, uma vez que este modelo canino simula a distrofia muscular de Duchenne (VAINZOF et al, 1991.; AMBRÓSIO et al.; 2008.; OLIVEIRA et al.; 2016).

Figura 1 – Canil experimental GRMD Brasil, FMVZ, USP.

Fonte: (Oliveira, D. M., 2016).

Desta forma, os GRMD são considerados os mais adequados para o estudo desta enfermidade, devido a sua comparação em relação ao fenótipo e ao genótipo DMD (KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1988; CATELLI, 2006).

Estudos recentes em fetos humanos apontaram que é possível o tratamento *in-útero* de várias anomalias genéticas e congênitas, sendo que os procedimentos podem ser cirúrgicos ou medicamentosos (SBRAGIA, 2010). Entretanto, é preciso conhecer o desenvolvimento embrionário e fetal da enfermidade a ser tratada, pois cada enfermidade pode se expressar em um diferente período da gestação.

O desenvolvimento gestacional no modelo GRMD ocorre em torno de 63 dias. Ao longo deste período, podemos dividir o tempo gestacional em três fases distintas: 1ª fase de desenvolvimento pré-embrionário, onde o oócito é fecundado e migra da tuba uterina para o útero. Esse evento ocorre por volta do 18º dia de gestação; (2ª) fase embrionária ocorre quando há implantação no útero, entre o 19º e o 33º dia de gestação; (3ª) fase fetal inicia-se quando o embrião expressa características compatíveis com a espécie. Esta fase ocorre a partir do 33º dia de gestação e vai até o nascimento (PRETZER, S. D, 2008).

A partir do nascimento, podemos identificar quadros de acentuada necrose dos músculos do pescoço e do tronco nos animais afetados (NGUYEN et al., 2002), os quais podem ser mais evidentes no primeiro mês de vida, podendo declinar quando o animal atinge a maturidade (COZZI et al., 2001). Com o passar do tempo, observam-se ciclos repetidos de necrose, regeneração muscular, fraqueza, fibrose muscular, alterações de postura, falência cardiorrespiratória e óbitos prematuros (VALENTINE et al., 1992).

A proteína TGF- β exerce um fator importante na fibrogênese que, em indivíduos afetados pela distrofia muscular, contribui com a fibrose, que por sua vez, pode agravar o quadro da doença (ZHANG et al., 2010; TANIGUTI et al., 2011; COHN et al., 2007; NOGUEIRA, R. A. F., 2012).

O fator nuclear NF-KAPPA β , da família NF- $\kappa\beta$, regula a expressão de genes relacionados à inflamação, imunidade e resposta ao estresse agudo em mamíferos. Estudos em humanos distróficos apontam o envolvimento do NF- $\kappa\beta$ no desgaste muscular, em que ocorre um aumento deste fator em todas as fibras musculares regeneradas, além de atingir 20 a 40% das fibras necrosadas (ACHARYYA et al.,

2010; HNIA et al., 2008). Outros estudos em *mdx* mostram que a inibição do fator NF- κ B minimiza a patogênese no músculo esquelético (DOGRA et al., 2008).

Portanto, o presente estudo é de interesse clínico, uma vez que o desenvolvimento patológico da distrofia muscular, durante o desenvolvimento gestacional, é fundamental para identificar variações na morfologia, expressão da distrofina, miostatina, TGF- β e NF-KAPPA β , fornecendo parâmetros para o desenvolvimento de novos estudos.

1.2 JUSTIFICATIVA

Com o intuito de encontrar alternativas no tratamento ou retardo da DMD, modelos pré-clínicos vêm sendo amplamente utilizados nas pesquisas, em prol de uma melhor e/ou maior sobrevida dos indivíduos acometidos pela doença. Sabe-se que meninos afetados pela DMD apresentam sinais clínicos em torno de dois a cinco anos de idade, e o modelo pré-clínico segue este curso da doença, apresentando sinais clínicos em torno de seis meses de vida. No entanto, o desenvolvimento da doença in-utero ainda é desconhecido, fazendo-se necessário estudos sobre o desenvolvimento da doença in-utero. Portanto, estudamos o desenvolvimento gestacional no modelo pré-clínico da distrofia muscular de Duchenne, a fim de descrever mecanismos morfológico e biomolecular dos animais portadores da distrofia, uma vez que o desenvolvimento da enfermidade pós-parto está totalmente elucidado.

Para compreendermos os exatos mecanismos de curso desta patologia, durante a fase embrionária e fetal no modelo GRMD, estudamos a morfologia, e a expressão da distrofina, miostatina, VGF, tgf- β e nf-kappa β , que são proteínas importantes envolvidas no processo de alteração muscular em indivíduos distróficos. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo têm como finalidade determinar se há alteração morfológica no tecido muscular, se os animais distróficos expressam a distrofina e qual é a melhor fase gestacional para realizar estudos pré-clínicos, que fornecerão dados primordiais para possibilitar e aperfeiçoar mecanismos de tratamento precoce em animais distróficos.

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO GESTACIONAL NO MODELO PRÉ-CLÍNICO CANINO DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

RESUMO

O modelo de estudo GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*) apresenta sintomas clínicos característicos da DMD (Distrofia Muscular de Duchenne) em humanos e, por esta razão, tem sido amplamente utilizado como modelo de estudos pré-clínicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o tecido muscular, ao longo da gestação, no modelo canino. Fêmeas, portadoras do gene distrófico, foram monitoradas por citologia vaginal e dosagem de progesterona (P4) para identificar o cio (ovulação). Em seguida, as fêmeas foram inseminadas com sêmen fresco de cão distrófico. No 25º dia, pós-inseminação, foram submetidas a exames de ultrassonografia para confirmar a gestação. As fêmeas gestantes passaram por uma ovariosalpingohisterectomia (OSH) para a retirada dos embriões e fetos nos seguintes períodos gestacionais: 28º, 33º e 38º dias. Após coleta, os embriões e fetos foram divididos em três grupos, de acordo com a idade gestacional, totalizando 23 amostras. Posteriormente, foi realizada morfometria das amostras e fragmentos de tecido muscular, os quais foram utilizados para PCR, histologia e imuno-histoquímica. Por intermédio da microscopia de luz, foram observadas características que corroboram com um desenvolvimento tardio do grupo afetado em relação ao grupo controle. Por PCR, avaliou-se que o gene da distrofina estava ausente em animais distróficos, porém, na análise por imuno-histoquímica, comprovou-se a expressão para distrofina em ambos os grupos. Os resultados sugerem ser possível realizar estudos em animais distróficos em idade precoce, pois os mesmos apresentam tecido muscular viável.

2 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença degenerativa decorrente de mutação ou deleção da proteína distrofina, que se expressa através de um gene de caráter recessivo localizado no cromossomo X. Este gene é transmitido pela mãe, que raramente apresenta manifestações clínicas da doença, por ser heterozigota para o gene. Os descendentes do sexo masculino (XY), de mães afetadas, podem herdar o gene recessivo da doença, em uma probabilidade de 50%, afetando um em cada 3.500 meninos nascidos (SHELTON et al., 2001; NGUYEN et al., 2002).

Além dos humanos, esta severa doença afeta também algumas espécies de animais como rato (mdx), gatos (HFMD) e cães (GRMD), que são utilizados para avaliar terapias pré-clínicas que visam o tratamento da DMD (AMBRÓSIO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Atualmente o modelo animal canino, Distrofia Muscular de Golden Retriever (GRMD), é utilizado por apresentar um severo comprometimento clínico, similar ao humano. Os sintomas são: perda de massa muscular, degeneração e regeneração muscular, anormalidade postural e, com o tempo, apresentam insuficiência cardiorrespiratório, levando-os a óbito em idade precoce. Sendo assim, é considerado o modelo experimental ideal para estudos pré-clínicos, uma vez que este modelo simula a distrofia muscular de Duchenne (AMBRÓSIO et al., 2008; VAINZOF et al., 1991; BRUNKLAUS et al., 2015).

Nenhum tratamento testado foi capaz de reverter à progressão da DMD, porem estudos sugerem que o auxilio de ventilação mecânica, com um acompanhamento clínico minucioso, pode aumentar a sobrevida dos acometidos pela DMD (FINE et al., 2011; MERLINI; SABATELLI, 2011).

Sugere-se que ensaios clínicos para DMD iniciem a terapia experimental em idades precoces, visto que os sinais clínicos surgem nos primeiros anos de vida. Quanto mais jovem iniciar uma terapia, maiores são as chances de manter um quadro estável, pois com o avançar da idade, o músculo é substituído por tecido

conjuntivo e adiposo, reduzindo sua funcionalidade normal, dificultando o tratamento (MERLINI; SABATELLI, 2011; HOFFMAN; MCNALLY, 2014).

Até o momento, poucos estudos discorrem sobre a alteração muscular de GRMD em idade precoce (NGUYEN et al., 2002), apesar de ser o modelo de estudo para DMD com o fenótipo ideal (YANG, 2012). A carência de estudos em GMRD se justifica pela dificuldade na manutenção de um canil experimental (KORNEGAY et al., 2011). Visando analisar alterações precoces em músculo distróficos, analisamos embriões e fetos distróficos e não distróficos através das técnicas de PCR e, em seguida, realizamos a caracterização macroscópica, microscópica e a distribuição tecidual da distrofina, em tecido muscular, no modelo canino pré-clínico da distrofia muscular de Duchenne.

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.2 Distrofia muscular

A Distrofia muscular é um termo utilizado frequentemente para se referir á doença primária dos músculos esqueléticos, que resultam em degeneração progressiva, regeneração limitada e fibrose das fibras musculares (BERGMAN *et al.*, 2002). Estas distrofias formam um grupo heterogêneo de enfermidades de origem genética, que geram uma perda crescente das fibras musculares decorrentes de mutação ou deleção de proteínas estruturais da musculatura, podendo desencadear efeitos sistêmicos (WALLACE; MCNALLY, 2008).

Dos pacientes acometidos pela distrofia muscular, 60% têm ausência total do gene da distrofina, compreendendo a maioria dos pacientes que são afetados pela DMD. Os 40% dos pacientes que apresentam uma redução na produção de distrofina, são caracterizados como distrofia muscular de BECKER, uma enfermidade que induz a diferentes graus de sinais clínicos. (DAVIS, 1997;

HOFMMAN; DRESSMAN, 2001). Diament e Cypel (1996) relatam que para realizar o diagnóstico das Distrofias Musculares Progressivas, é de suma importância exames como: biopsia muscular, eletromiografia (EMG), dosagem de enzimas séricas, entre elas a (CPK), e teste para análise de DNA.

2.1.3 Distrofia muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) foi relatada pelo neurologista francês, Dr. Guillaíne Benjamin Amand Duchenne, em 1868, descreveu que, esta distrofia afeta inicialmente os membros inferiores e posteriormente os superiores (EMERY, 1980).

O gene causador da Distrofia Muscular foi identificado e descrito em 1986, em pacientes com deleção no cromossomo Xp21. Esta deleção causa ausência da distrofina, uma proteína do sarcolema que se liga ao citoesqueleto. (HOFFMAN et al., 1987)

Na DMD, esta alteração genética é de caráter recessivo, esta localizada no cromossomo X. Portanto, mulheres portadoras do gene distrófico são heterozigotas para este gene, raramente apresentam manifestações clínicas da doença. Entretanto, descendentes do sexo masculino (XY) de mães afetadas, poderão herdar o gene recessivo da doença (SHELTON *et al.*, 2001; NGUYEN *et al.*, 2002).

Nesta enfermidade, apesar da falta ou redução da distrofina estar estabelecida desde o nascimento, os sinais clínicos incidem na infância. Meninos acometidos por esta enfermidade possuem dificuldades para correr e, durante a adolescência, a dificuldade se estende para subir escadas, sugerindo um estado avançado de acometimento muscular (EMERY, 2002; THIBAUD *et al.*, 2007).

A fraqueza muscular é progressiva, por volta de 12 anos de idade, os pacientes tornam-se cadeirantes. Em alguns casos, o atraso mental pode ser encontrado em aproximadamente 20% a 30% dos pacientes com DMD. A causa da morte é comum por alterações cardiorrespiratórias. A perspectiva de vida é de proximamente 20 anos, em alguns casos pode ser prolongada até aos 30 anos,

conforme os cuidados do sistema respiratórios por terapia assistida (DAVIES, 1997; EMERY, 2002).

2.1.4 Modelo pré-clínico GRMD

O cão Golden Retriever, portador da Disrofia Muscular (GRMD), comparado a Distrofia Muscular de Duchenne Humana (DMD), possui alto grau de similaridade, portanto é considerado o modelo experimental mais adequado para o estudo desta enfermidade, devido ao grau de similaridade. (COOPER *et al.*, 1988; KORNEGAY *et al.*, 1988; VALENTINE *et al.*, 1988, 1992).

No período gestacional do modelo canino, o desenvolvimento pré-natal é de aproximadamente 63 dias. Durante este período, podemos dividir o tempo gestacional em três fases distintas: o desenvolvimento pré-embriônico, onde o oócito é fecundado e migra da tuba para o útero, este evento ocorre em torno do 18º dias de gestação; a fase embrionária ocorre, quando há implantação no útero, entre os 19º a 33º dias de gestação; a fase fetal se inicia quando o embrião expressa características compatíveis com a espécie, esta fase ocorre a partir de 33º dias de gestação até o nascimento (PRETZER, S. D, 2008).

A partir do nascimento, no modelo GRMD, pode-se identificar uma acentuada necrose muscular nos membros, pescoço e tronco (NGUYEN *et al.*, 2002), da a qual pode ser mais pronunciada no primeiro mês de vida, podendo declinar quando o animal atinge a maturidade (COZZI *et al.*, 2001). Aos seis primeiros meses de vida, pode-se desenvolver fibrose severa e contraturas das articulações, causando uma deambulação (KORNEGAY *et al.*, 1994 a-b, VALENTINE *et al.*, 1988).

As lesões patológicas nos músculos esqueléticos e cardíacos são potencialmente idênticas, tanto no modelo canino afetado pela GRMD, quanto nos humanos afetados pela DMD. Em ambos os casos, observam-se ciclos repetidos de necrose, regeneração muscular, fraqueza, fibrose muscular, alterações de postura,

falência cardiorrespiratória, causando óbitos prematuros (VALENTINE *et al.*, 1988; VALENTINE *et al.*, 1992).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

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, protocolado sob o nº 3018/2013 e com aprovação em reunião de 14/08/2013.

2.2.1 Animais

Os animais foram provenientes do plantel GRMD-Brasil da FMVZ. Três cadelas em idade de 3 a 4 anos e peso médio de 30 kg foram submetidas a exame obstétrico para identificar o momento de estro. Em seguida, as cadelas foram inseminadas conforme descrito no item 5.2.

O momento da ovulação foi monitorado pelo exame clínico de citologia vaginal e determinação dos níveis séricos de P4 em amostra de sangue via pulsão da veia cefálica. As concentrações plasmáticas de P4 foram realizadas pelo método multiparamétrico, de imunoanálises mini Vidas®, com o kit de mensuração Biomérieux (Biomérieux Brasil S/A), sendo a técnica realizada pela empresa Provet (São Paulo, Brasil).

O dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração de P4 atingiu valores $\geq$ a 5 ng/ml (CONCANNON, 1993).

2.2.2 Inseminação

Dois cães machos, afetados pela distrofia muscular, foram selecionados para a coleta de sêmen através de manipulação digital do pênis, com a presença de uma fêmea no cio. O ejaculado foi coletado e acondicionado em um tubo graduado, ao qual foi mantido a uma temperatura de aproximadamente 38°C. A ejaculação foi fracionada em três partes, a qual foi coletada apenas a fração rica em espermatozoides (fração 2). A avaliação dos espermatozoides foi realizada visualmente (volume e coloração). Realizou-se, também, a avaliação pela microscopia de luz (200x) para observar a motilidade.

Para a realização da inseminação, optou-se pela técnica de inseminação artificial intravaginal (IAIV). Com uma sonda rígida, o sêmen foi depositado diretamente na porção cranial da vagina. Posteriormente, os membros pélvicos foram elevados por 15 minutos, visando prevenir o refluxo do sêmen na cadela.

2.2.3 Diagnóstico gestacional

O diagnóstico de prenhes e a idade gestacional foi avaliada por ultrassonografia. Utilizou-se um aparelho de ultrassom da marca CHISON, modelo D600VET, acoplado com um transdutor linear.

2.2.4 Coletas dos conceptos

As coletas dos conceptos foram realizadas através de ovárioossalpingohisterectomia (OSH) nas idades de 28 (grupo A), 33 (grupo B) e 38 (grupo C) dias.

Para o procedimento de OHS, as fêmeas passaram por um prévio jejum sólido de 12 horas e hídrico de 8 horas. Posteriormente, foram submetidas à medicação pré-anestésica (MPA): acepromazina 0,2%, 0,03 mg/kg, IM + Meperidina, 5%, 4 mg/Kg via intramuscular (IM). A indução foi realizada por Tiopental 25 mg/Kg,

via endovenoso. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano 1,5 V%, via inalatória.

Após a coleta, os embriões e fetos foram identificados e as amostras de tecido muscular da região cervical de embriões e dos membros pélvicos de fetos foram armazenadas em solução de paraformaldeído (4%) para realização de análises histológicas e Imunohistoquímicas, e outra porção foi congelada em freezer a -80°C para realização de PCR para genotipagem dos animais.

2.2.5 Mensurações de peso e tamanho

Após a coleta, os embriões e fetos foram pesados em balança de precisão, e mensurados (comprimento e largura), com auxílio de paquímetro.

Figura 2. Aspectos macroscópicos e mensuração dos parâmetros corporais de embriões e fetos caninos, portadores ou não da distrofia muscular.

A: Embrião de 28 dias. B: Feto de 33 dias. C: Feto de 38 dias de gestação.

As fotodocumentações macroscópicas foram realizadas utilizando uma câmera Sony Mavica 3.2.

2.2.6 Análises do material por PCR

Para a identificação de animais distróficos e normais, foi realizada a genotipagem (MEAD et al., 2014). Para purificação do DNA genômico de músculo coletado no nascimento, empregou-se o Kit Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation (GE Healthcare). A região contendo a mutação de ponto foi amplificada por meio da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR), utilizando o termociclador PTC-200 (MJ Research). Os pares de primers utilizados foram: GF2 (5' – CTT AAG GAA TGA TGG GCA TGG G – 3') e GR2 (5' – ATG CAT AGT TTC TCT ATC ATG C – 3'), localizados, respectivamente, no intron 6 e exon 7, do gene da distrofina canino. Os amplicons gerados foram submetidos à digestão com a enzima *Sau96 I* (GE Healthcare), capaz de reconhecer o sítio mutado. Os produtos de digestão enzimática foram analisados em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídeo.

2.2.7 Microscopia de luz.

As amostras de tecidos foram identificadas e fixadas em solução de paraformaldeído a 4%. Posteriormente passaram por uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizados em xilol, seguido de inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo Leica RM 2165, com espessura média de 5µm e posteriormente corados com hematoxilina/eosina e tricomio de Masson.

Para a preparação das lâminas do grupo A (embriões) foram obtidos cortes longitudinais das células musculares da região cervical (Figure 2).

Para o grupo B e C, foram utilizadas amostras de tecido muscular do membro pélvico. O material foi fotodocumentado utilizando-se um aparelho fotomicroscópico da marca Olympus, modelo BX61-VS.

Figura 3. Representação esquemática do modelo de embriões caninos portadores e não portadores de Distrofia Muscular. Os esquemas a seguir referem-se ao grupo A.

A: Embrião por 28 dias. B: Modelo esquemático de desenvolvimento embrionário. C: Local de corte para a preparação das lâminas.

2.2.8 Imunohistoquímica

Cortes na espessura de 5µm foram fixados em lâmina previamente sinalizada. As lâminas foram desparafinadas em estufa a 37°C por 24 horas, seguindo de protocolo de desparafinização e desidratação em xilol e álcoois. Em seguida realizamos o bloqueio com peroxidase a 3% em álcool etílico absoluto. Em seguida, realizamos uma lavagem em água destilada, as lâminas foram inseridas em tampão citrato por 14 minutos em micro-ondas na potência de 80%. Após o esfriamento das lâminas ainda dentro do tampão, estas foram lavadas em água destilada sob agitação. Então realizamos bloqueio de proteínas inespecíficas com *Protein block* (Dako) por 45 minutos em câmara úmida. Retiramos o excesso de *protein block* e o anticorpo primário DYS-1 (Novocastra) na diluição de 1:10 foi aplicado em apenas um corte *overnight*, deixando outro como controle negativo (PBS), afim de avaliarmos a eficácia do protocolo e descartarmos os testes falso-positivos. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, e o anticorpo secundário, vimentina-sptreptavidina (LSAB±Dako), foi aplicado nos dois cortes de cada lâmina, deixando-os reagir por 45 minutos cada. A revelação foi

realizada por kit DAB+ (Dako), e as lâminas coradas com hematoxilina foram novamente desidratadas em bateria de alcoóis e xilol.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Identificação dos grupos por PCR

A genotipagem foi baseada na mutação pontual herdada em cães distróficos, no qual origina-se um sítio da enzima de restrição *Sau 96I*.

Foram utilizadas 23 amostras de DNA diferentes, sendo caracterizadas como 13 normais, 6 portadores e 4 afetados (Figure 4).

Figura 4. Reação em cadeia da polimerase para a genotipagem do DNA de embriões e fetos .

Genotipagem de cães GRMD, com base na mutação pontual hereditária em cães distróficos que dá origem a uma nova enzima de restrição *Sau 96I*. Faixa 200pb = afetada (A); Faixa 300pb = normal (N); Faixa de 200 e 300 pb = portadora (P).

Após a genotipagem, os grupos foram classificados conforme a idade gestacional (Tabela 1), sendo grupo A= 28 dias de gestação, Grupo B= 33 dias de gestação, Grupo C=38 dias de gestação. Cada grupo foi dividido conforme as características apresentadas na genotipagem (normal, portador e afetado). Fêmeas são apenas portadoras do gene da distrofina e não apresentam alterações clínicas da doença, portanto, caracterizou-se como grupo controle. Os grupos foram divididos em controle: normal e portador do gene, e, grupo afetado: animais afetados pela distrofia (Tabela 1).

As idades dos embriões e fetos foram selecionadas de acordo com a cronologia do desenvolvimento muscular na espécie canina, a partir do 22º dia de gestação ocorre a morfogênese embrionária, portanto selecionamos um embrião de idade mais avançada, que expressasse o tecido muscular. O tempo entre idades de

cinco dias foram definidas de acordo com o marco de transição entre as fases embrionária e fetal (33 dias). Resolvemos manter este tempo cronológico para padronizar os dias das coletas (28 33 e 38 dias de gestação).

Tabela 1.

Tabela 1. Identificação e organização dos grupos controle e afetados, de acordo com a idade gestacional (A, B e C) de cães.

Grupos	Grupo Controle		Grupo Afetado	Total
	normais	portadoras	afetados	
A (28 dias).	8	1	1	10
B (33 dias).	3	4	2	9
C (38 dias).	2	1	1	4

2.3.2 Morfometria

Após a divisão dos grupos, as amostras foram individualmente pesadas e avaliadas. A média e o desvio padrão dos grupos foram comparados entre si (Figura 3A).

O grupo afetado apresentou um peso maior nos períodos gestacionais iniciais (A e B), entretanto no período mais tardio de desenvolvimento gestacional (C), o grupo controle apresentou um peso maior (Figura 3B).

O grupo afetado apresentou *crown-rump* (CR) maior nos períodos A e C, quando comparado ao grupo controle. Porém, os dados são próximos entre os grupos, não apresentando diferença significativa (Figura 3C).

Os dados biométricos (Figura 3) revelaram a tendência exponencial de ganho de massa corpórea para ambos os grupos estudados. Para o crescimento, o CR dos conceptos apresentou crescimento linear em ambos os grupos.

Figura 5. Peso, e *Crown-rump* (comprimento occipito-sacral) de embriões e fetos caninos de acordo com a idade gestacional.

A: Média e desvio padrão dos grupos controle e afetado B: Gráfico do peso das amostras, apresentando á média e tendência dos valores em uma linha exponencial. C: Gráfico (comprimento occipito-sacral) das amostras, apresentando á média e os valores em uma linha de tendência.

2.3.3 Analise histológica e imunohistoquímica

A análise de microscopia de luz para o grupo A, mostrou que o colágeno e a fibra muscular tipo1 estão presentes em maior quantidade no grupo controle (Figura 6: A e C). No grupo afetado foi difícil evidenciar a presença de colágeno e de fibra muscular tipo 1 (Figura 3: B e D).

No grupo (A), os embriões já estavam desenvolvidos e apresentavam brotos dos membros pélvicos com membranas interdigitais e pigmentação do olho (Figura 3 A).

Figura 6. Análise histológica de fibras musculares esqueléticas de embriões caninos controle e afetado com a GRMD aos 28 dias de gestação. Coloração de H & E e picrosirius.

A e B: controle C e D: afetado. Fibra muscular primária ○ colágeno . ➤

O grupo B caracteriza-se por uma fase de transição de embrião para feto, apresentando pálpebras, pelos táteis nos lábios, primórdios dos órgãos genitais, hérnia fisiológica umbilical e palato secundário fundido.

Amostras do grupo B revelaram um arranjo de fibras muscular organizado e mais desenvolvido (Figura 7). A característica de tecido muscular já esta presente nessa fase, onde é possível evidenciar as fibras musculares primárias, secundárias, colágenos e vasos.

Nesta fase foi possível observar a formação de estruturas celulares de músculo esquelético. O grupo controle apresentou células primárias em intensa divisão celular e pontos de neovascularização (Figura 7: A e B). Estas mesmas características de formação muscular também foram observadas no grupo afetado

pela distrofia, porém com células primárias apresentando pouca divisão celular (Figura 7: B e D).

Figura 7. Análise histológica das fibras musculares esqueléticas de fetos caninos controle e afetado com GRMD aos 33 dias de gestação, H & E e picrosirius red.

A e B: grupo de controle C e D: grupo afetado. Fibra muscular primária , fibra muscular secundária , endomísio , perimísio , colágeno , vaso .

No grupo C, os fetos apresentaram pelos táteis, e órgãos genitais externos nos machos. Nas amostras do grupo C, o tecido muscular estava desenvolvido e apresentou características de tecido muscular esquelético já formado (Figura 8). O grupo controle (Figura 8: A e C) apresentou células musculares secundárias em predomínio. O grupo afetado apresentou várias células musculares primárias e poucas secundárias (Figura 8: B e D).

Figura 8. Análise histológica das fibras musculares esqueléticas de fetos caninos controle e afetado

A e B: grupo de controle C e D: grupo afetado. Fibra muscular primária ○, fibra muscular secundária ○, endomísio —, perimísio —, colágeno ➤, vaso ●

Figura 9. Análise imuno-histoquímica no músculo em diferentes idades de desenvolvimento gestacional. Caninos, controle e afetado GRMD.

A, C e E: grupo controle. B, D e F: grupo afetado. Imunocoloração positiva ← para a distrofina. Observe a marcação positiva em ambos os grupos, controle e afetados.

A imunolocalização para distrofina no grupo A, foi menos evidente que os demais grupos estudados, devido à diferenciação das células musculares correspondentes à fase embrionária, entretanto, é possível evidenciar marcação positiva em ambos os grupos. A expressão da distrofina ocorreu nos grupos B e C (Figura 9).

2.4 DISCUSSÃO

Após décadas do descobrimento do gene da distrofina, pouco se sabe sobre o desenvolvimento gestacional de indivíduos afetados pela distrofia muscular.

Os dados morfométricos em embriões e fetos caninos apresentaram diferenças mínimas de peso nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e fetal aos 28 e 33 dias de gestação, respectivamente (grupos A e B). Aos 35 dias de gestação (Grupo C) os animais afetados apresentaram baixo peso quando comparado ao grupo controle. A perda de peso é uma característica clínica da distrofia muscular em humanos nos períodos que sucedem ao nascimento, principalmente nos primeiros anos de vida (RAPISARDA et al., 1995). Aos 28 dias de gestação (grupo A), os embriões já estavam desenvolvidos e apresentavam brotos dos membros pélvicos com membranas interdigitais e pigmentação do olho (CARLSON, 2004). As análises histológicas neste período evidenciaram diferenciação da fibra muscular esqueléticas. As células musculares miogênicas apresentavam divisões mitóticas e já formavam mioblastos pós-mitóticos. (CARLSON, 2004; YOUNG et al., 2008).

Nos embriões com 28 dias de idade gestacional (Grupo A), predominou o tecido conjuntivo tipo I (vermelho claro) e tipo três (amarelo) em meio aos mioblastos (Figura 6). Os controles do grupo de 28 dias (normais e portadores) expressaram bem o tecido conjuntivo nas colorações de *Picrosirius red* e Hematoxilina Eosina. Já no grupo afetado, foram apresentadas menores quantidades de fibras colágenas. Aos 33 dias de gestação (grupo B), fase de transição de embrião para feto, os mesmos apresentaram pálpebras, pelos táteis nos lábios, primórdios dos órgãos genitais, herniação fisiológica umbilical e palato secundário fundido. Nesta fase, os mioblastos embrionários já se fundiram com os miotúbulos primários. Os mioblastos,

que nesta fase são considerados fetais, contribuem para a formação dos miotúbulos secundários e células satélites (CARLSON, 2004). Nesta fase (Figura 7), foi possível evidenciar formação das fibras musculares primárias e secundárias. Nota-se que, no grupo controle de 33 dias, há uma intensa atividade celular de fibras musculares primárias e secundárias, demonstrando que estas fibras estão se diferenciando. Nesta fase, o arranjo do tecido conjuntivo desempenha um papel decisivo na morfogênese do músculo, sendo possível visualizar os brotos capilares em desenvolvimento para nutrir a musculatura. De acordo com CARLSON (2004) e YOUNG et al., (2008) quando ocorre a diferenciação em fibra secundária, é um indício da formação dos primeiros axônios motores nos músculos. As células já estão arranjadas e dispostas como tecido muscular. Nesta mesma faixa etária, de 33 dias de gestação, o grupo de afetados apresentou um nível estrutural de células musculares com poucas fibras primárias e células em diferenciação. Os fetos, aos 38 dias de gestação (grupo C), apresentaram pelos táteis evidentes e órgãos genitais externos nos machos. Nesta fase, notou-se uma estrutura muscular em fase de crescimento, onde os músculos são macroscopicamente identificáveis. A organização do tecido muscular já estava definida em endomísio, perimísio e epimísio. O tecido muscular, aos 38 dias, encontrava-se totalmente diferenciado (Figura 8). Entretanto, os afetados apresentavam células musculares primárias ou em estágio incompleto de diferenciação (Figura 6: B e D), demonstrando um retardo do desenvolvimento das fibras musculares em relação ao grupo controle.

Sendo assim, evidenciamos um atraso na miogênese dos animais afetados pela distrofia muscular. O atraso na miogênese fetal em humanos distróficos foi relatado por FARNINI et al., 2016. KIM et al., 2016. Atrasos durante o desenvolvimento gestacional pode comprometer a miogênese, o crescimento muscular e sua capacidade regenerativa pós-natal. Apesar da Distrofina não ser expressa em humanos com Duchenne ou no modelo canino GRMD (NGUYEN et al., 2002; VAINZOF et al., 1991) pós-nascimento, a distrofina foi expressa no modelo GRMD em todas as fases gestacionais estudadas (Figura 9).

Os animais distróficos apresentaram tecido muscular com morfologia preservada e expressão do gene da distrofina. Os achados se tornam relevantes, uma vez que estudos com fármacos podem vir a retardar ou desacelerar lesões no tecido muscular distrófico em pacientes em idade precoce.

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO GESTACIONAL NO MODELO CANINO DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Resumo

O objetivo da pesquisa foi avaliar a expressão da distrofina e proteínas ligadas ao desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular de embriões e fetos no modelo pré-clínico canino da distrofia muscular de Duchenne, buscando estabelecer possíveis alterações musculares durante a fase gestacional. Fêmeas, portadoras do gene distrófico, foram inseminadas e posteriormente passaram por uma ovariosalpingohisterectomia (OSH), para coleta dos embriões e fetos nos seguintes períodos gestacionais: 28^o, 33^o e 38^o dias. Posteriormente fragmentos de tecido muscular foram utilizados para PCR, histologia, imuno-histoquímica e imunofluorescência. Após a genotipagem, das amostras, dividimos os grupos em controle e distróficos. Posteriormente analisamos as amostras por imuno-histoquímica e imunofluorescência. Aqui demonstramos que ocorre expressão da distrofina, miostatina e demais proteínas (VEGF, NFK β p50 e TG β 1) com fator de crescimento e diferenciação tecidual nos músculos de embriões e fetos distróficos.

Palavras chave: Distrofina, Miostatina, VEGF

3 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne é uma doença causada por uma alteração genética de caráter recessivo, localizada no cromossomo X. Portanto, descendentes do sexo masculino (XY) de mães afetadas poderão herdar o gene recessivo da doença (SHELTON et al., 2001; NGUYEN et al., 2002).

Nesta doença, os sinais clínicos incidem na infância. Meninos acometidos por esta enfermidade possuem dificuldades para correr e, durante a adolescência, a dificuldade se estende para subir escadas. A perspectiva de vida é de aproximadamente 20 anos, em alguns casos pode ser prolongada até os 30 anos, conforme os cuidados do sistema respiratórios por terapia assistida. (DAVIES, 1997; EMERY, 2002; THIBAUD et al., 2007).

Atualmente não existe tratamento capaz de reverter a progressão da DMD. Entretanto, estudos feitos nos modelos pré-clínico MDX e canino da doença, têm apresentado resultados que contribuem para o sucesso de novos tratamentos clínicos.

O modelo pré-clínico canino Golden Retriever, portador da distrofia Muscular (GRMD), comparado a Distrofia Muscular de Duchenne Humana (DMD), possui alto grau de similaridade, por esta razão é considerado o modelo experimental mais adequado para o estudo desta enfermidade, devido ao grau de similaridade com humanos afetados pela DMD. (COOPER et al., 1988; KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1988, 1992).

Na distrofia muscular, tanto de GRMD como DMD, apresentam fibrose muscular com o passar do tempo, o que agrava a doença (JORDE, 2004).

A reação inflamatória no músculo agrava o quadro clínico dos distróficos, através de alterações teciduais que são exacerbadas devido ao infiltrado inflamatório, que libera citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) e interferon - γ (IFN- γ). Em longo prazo, a expressão intensa do TNF- α induz a apoptose de cardiomiócitos, contribuindo para o surgimento de patologias cardíacas secundárias à distrofia (DHINGRA et al., 2009; PORTER et al., 2002).

Devido à piora subsequente do quadro clínico dos distróficos, estudos sugerem que ensaios clínicos para DMD iniciem terapia experimental em idades

precoces, visto que os sinais clínicos surgem nos primeiros anos de vida (MERLINI; SABATELLI, 2015)

Quanto mais jovem iniciar uma terapia, maiores são as chances de manter um quadro estável. Com o avançar da idade, o músculo é substituído por tecido conjuntivo e adiposo, reduzindo sua funcionalidade normal, e consequentemente, dificultando o tratamento (MERLINI; SABATELLI, 2015; HOFFMAN; MCNALLY, 2014). .

Neste artigo analisamos algumas das características da DMD que podem influenciar novos ensaios clínicos para tratamentos DMD. Primeiro avaliamos a possibilidade de estudar o tecido muscular em animais distróficos em idades precoces, visto que a distrofia tem um curso progressivo durante a infância.

Em seguida analisamos possíveis alterações musculares durante o desenvolvimento gestacional.

Posteriormente, analisamos a expressão da distrofina, utrofina e fatores que mediam a inflamação no músculo, a fim de identificar possíveis danos musculares em cães distróficos, durante o desenvolvimento gestacional.

3.1 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo CAROMANO (1999), em pacientes com DMD são observado alterações no comprimento das fibras musculares, Além de necroses com presença de fagócitos. Também há substituição das fibras por gordura e tecido conjuntivo. Marques (2004) relata que, na distrofia muscular, os músculos perdem a capacidade de regeneração e as miofibrilas são gradualmente substituídas por tecidos adiposos e conjuntivos, explicando assim o quadro clínico de fibrose e atrofia muscular.

A fibrose muscular se altera no decorrer do tempo, com isso a rigidez esta relacionada com o a quantidade de colágeno expressa, o que agrava ainda mais a doença. As células musculares morrem de forma gradual, na mesma medida em que são submetidas à tensão pelas contrações musculares (JORDE, 2004).

As alterações teciduais em distróficos são exacerbadas devidas às alterações de infiltrado inflamatório, as quais liberam citocinas pró-inflamatórias, como o fator

de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) e interferon – γ (IFN- γ) (DE CARVALHO, et al., 2013)

A TNF- α é produzida por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e monócitos, que se acumulam imediatamente na lesão. A expressão da TNF- α em miofibras, tanto na DMD quanto GRMD, induz à inflação intensa (PORTER et al., 2002).

A reação inflamatória, exacerbada no musculoesquelético, agrava o quadro dos pacientes afetados pela DMD, devido à superexpressão das citocinas. Em longo prazo, esta expressão intensa do TNF- α induz a apoptose de cardiomiócitos, contribuindo para o surgimento de patologias cardíacas secundárias à distrofia (DHINGRA et al., 2009; PORTER et al., 2002).

O excesso de tecido conjuntivo leva a uma fibrose, que incapacita a função muscular normal. A proteína TGF- β exerce um fator importante na fibrogênese. Em indivíduos afetados pela distrofia muscular, a fibrose pode agravar o quadro da doença (ZHANG et al., 2010; TANIGUTI et al., 2011; COHN et al., 2007; NOGUEIRA, R. A. F., 2012).

Fármacos que reduzam a ação do TGF- β são amplamente estudados para reduzir a fibrose nas distrofias musculares (COHN et al., 2007; NOGUEIRA, R. A. F., 2012).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

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, protocolado sob o nº 3018/2013 e com aprovação em reunião de 14/08/2013.

3.2.1 Animais

Os animais foram provenientes do plantel GRMD-Brasil da FMVZ. Três cadelas em idade de 3 a 4 anos e peso médio de 30 kg foram submetidas a exame obstétrico para identificar o momento de estro. Em seguida, as cadelas foram inseminadas conforme descrito no item 3.1.2.

O momento da ovulação foi monitorado pelo exame clínico de citologia vaginal e determinação dos níveis séricos de P4 em amostra de sangue via pulsão da veia cefálica. As concentrações plasmáticas de P4 foram realizadas pelo método multiparamétrico, de imunoanálises mini Vidas®, com o kit de mensuração Biomérieux (Biomérieux Brasil S/A), sendo a técnica realizada pela empresa Provet (São Paulo, Brasil).

O dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração de P4 atingiu valores $\geq$ a 5 ng/ml (CONCANNON, 1993).

3.2.2 Inseminação

Dois cães machos, distróficos, foram selecionados para a coleta de sêmen através de manipulação digital do pênis, com a presença de uma fêmea no cio. O ejaculado foi coletado e acondicionado em um tubo graduado, o qual foi mantido a uma temperatura de aproximadamente 38°C. A ejaculação foi fracionada em três partes, a qual foi coletada apenas a fração rica em espermatozoides (fração 2). A avaliação dos espermatozoides foi realizada visualmente (volume e coloração). Realizou-se, também, a avaliação pela microscopia de luz (200x) para observar a motilidade.

Para a realização da inseminação, optou-se pela técnica de inseminação artificial intravaginal (IAIV). Com uma sonda rígida, o sêmen foi depositado diretamente na porção cranial da vagina. Posteriormente, os membros pélvicos foram elevados por 15 minutos, visando prevenir o refluxo do sêmen na cadela.

3.2.3 Diagnóstico gestacional

O diagnóstico de prenhes e a idade gestacional foi avaliada por ultrassonografia. Utilizou-se um aparelho de ultrassom da marca CHISON, modelo D600VET, acoplado com um transdutor linear.

3.2.4 Coletas dos conceptos

As coletas dos conceptos foram realizadas através de ováriossalpingohisterectomia (OSH) nas idades de 28 (grupo A), 33 (grupo B) e 38 (grupo C) dias.

Para o procedimento de OHS as fêmeas passaram por um prévio jejum sólido de 12 horas e hídrico de 8 horas. Posteriormente, foram submetidas à medicação pré-anestésica (MPA): acepromazina 0,2%, 0,03 mg/kg, IM + Meperidina, 5%, 4 mg/Kg via intramuscular (IM). A indução foi realizada por Tiopental 25 mg/Kg, via endovenoso. A manutenção anestésica foi realizada com isofluorano 1,5 V%, via inalatória.

Após a coleta, os embriões e fetos foram identificados e as amostras de tecido muscular de embriões e dos membros pélvicos de fetos foram armazenadas em solução de paraformaldeído (4%) para realização de análises histológicas, Imunohistoquímicas, imunoflorescencia e outra porção foi congelada em freezer a – 80C° para realização de PCR para genotipagem dos animais.

3.2.5 Análises do material por PCR

Para a identificação de animais distróficos e normais, foi realizada a genotipagem (MEAD et al., 2013). Para purificação do DNA genômico de músculo coletado no nascimento, empregou-se o Kit Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation (GE Healthcare). A região contendo a mutação de ponto foi amplificada por meio da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR), utilizando o termociclador PTC-200 (MJ Research). Os pares de primers utilizados foram: GF2 (5' – CTT AAG GAA TGA TGG GCA TGG G – 3') e GR2 (5' – ATG CAT AGT TTC TCT ATC ATG C – 3'), localizados, respectivamente, no intron 6 e exon 7, do gene da distrofina canino. Os amplicons gerados foram submetidos à digestão com a enzima *Sau96 I* (GE Healthcare), capaz de reconhecer o sítio mutado. Os produtos de digestão enzimática foram analisados em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídeo.

3.2.6 Microscopia de luz.

As amostras de tecidos foram identificadas e fixadas em solução de paraformaldeído a 4%. Posteriormente passaram por uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizados em xilol, seguido de inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo Leica RM 2165, com espessura média de 5µm e posteriormente corados com hematoxilina/eosina e tricomo de Masson.

Para a preparação das lâminas do grupo A (embriões) foram obtidos cortes longitudinais, das células musculares da região cervical (Figure 2).

Para o grupo B e C foram utilizadas amostras de tecido muscular do membro pélvico. O material foi fotodocumentado utilizando-se um aparelho fotomicroscópico da marca Olympus, modelo BX61-VS.

3.2.7 Imunohistoquímica

Cortes da espessura de 5µm foram fixados em lâminas previamente sinalizadas. As lâminas foram desparafinadas em estufa a 37°C por 24 horas, seguindo de protocolo de desparafinização e desidratação em xilol e alcoóis. Em seguida realizamos o bloqueio com peroxidase a 3% em álcool etílico absoluto.

Para a recuperação antigênica, realizamos uma lavagem em água destilada. as lâminas foram inseridas em tampão citrato por 10 minutos em micro-ondas na potência de 80%. Após o esfriamento das lâminas ainda dentro do tampão, estas foram lavadas em água destilada sob agitação. Então realizamos bloqueio de proteínas inespecíficas em peróxido de hidrogênio a 1% em água destilada por 10 minutos em câmara úmida.

Os cortes foram lavados em PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com soro de equino diluído em PBS (1:200) 2 acrescido de 1% BSA po 1 hora. Retiramos o excesso de Soro Equino e o anticorpo primário DYS-1 (Novocastra) na diluição de 1:10 foi aplicado em apenas um corte *overnight*, deixando outro como controle negativo (PBS), afim de avaliarmos a eficácia do protocolo e descartarmos os testes falso-positivos. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e o anticorpo secundário, vimentina-

sptreptavidina (LSAB±Dako), foi aplicado nos dois cortes de cada lâmina, deixando-os reagir por 30 minutos cada. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Os mesmos foram lavados em tampão PBS por três vezes de 5 minutos e incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Os cortes foram incubados durante 5 minutos com solução DAB (DAB + Subtrate buffer; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc) para exposição da marcação da proteína estudada (marcação marrom). As lâminas foram lavadas 3 vezes em água destilada, por 5 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos ou variável dependendo do corte, seguido de uma lavagem com água corrente por no máximo 10 minutos. Em seguida foram lavadas em uma sequência de etanol em diferentes concentrações por 2 minutos e xilol I e xilol II, respectivamente e fechadas com lamínula e Permont.

3.2.8 Imunoflorescência

Cortes da espessura de 3µm foram fixados em lâmina previamente sinalizada. As lâminas foram desparafinadas foram imersas em xilol (Reagentes Analíticos Dinâmica) aquecido a 60°C por 20 minutos, e em seguida, em xilol por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foram hidratados em etanol 100%, duas vezes de 10 minutos cada. Em seguida em etanol 90% e 70% por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e água corrente por 10 minutos cada. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram inseridas em tampão citrato de sódio (pH 6,0) aquecido por 10 minutos em micro-ondas na potência de 80%. Após o esfriamento das lâminas foram lavadas em PBS duas vezes por cinco minutos. A permeabilização foi feita com a incubação por 15 minutos contendo 0,2% de Triton X-100 (Triton®, Merck).

Em sequencia, foram realizadas três lavagens em PBS por cinco minutos cada.

Em seguida, fizemos o bloqueio de ligações de anticorpo inespecífico, incubando o material com Peroxidase Blocking (Ref. S2001, Dako®) por 30 minutos. O material então foi lavado duas vezes em PBS por 5 minutos; em seguida incubado com o anticorpo primário.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, e o anticorpo secundário que continha o fluoróforo (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Invitrogen®), por duas horas no escuro. Depois, o material foi lavado mais uma vez em PBS por cinco minutos, e foi feita a montagem da lamina utilizando o Vectashield (mounting médium for fluorescence with DAPI – H-1200, Vector Laboratories, Inc), e finalmente sendo selada, também no escuro, com esmalte para prevenir a secagem e movimentação das lâminas no microscópio. As Lâminas foram armazenadas a 4°C. O material foi observado e fotografado em microscópio para imuno-florescencia (Olympus BX 60), utilizando-se o programa AxioVision (AxioCam HRc-Zeiss).

3.2.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo Prism Statistical software(Graphpad, San Diego, CA). Os dados foram representados como média +- desvio padrão e, estatisticamente comparados usando análise de variância One Way ANOVA e teste t unipareado. Níveis de confiança > 95% ($p < 0,05$) foram considerados significativos (*).

3.3 RESULTADOS

Os Resultados foram divididos em:

3.3.1 Genotipagem

Utilizamos 23 amostras de DNA de embriões e fetos caninos (Figura 10). Divididos em três grupos de diferentes idades, A: 28 dias de gestação; B: 33 dias de gestação e C: 38 dias de gestação.

Figura 10 – Reação em cadeia da polimerase para a genotipagem do DNA de embriões e fetos.

Genotipagem com base na mutação pontual hereditária em cães distróficos que dá origem a uma nova enzima de restrição Sau 96I. Faixa 200pb = afetada (A); Faixa 300pb = normal (N); Faixa de 200 e 300 pb = portadora (P).

3.3.2 Análise morfológica

Sob microscopia de luz dos animais do grupo A (embriões de 28 dias de gestação), observamos que ambos os embriões do grupo controle e GRMD apresentaram na coloração de hematoxilina-eosina, morfologia preservada (Figura 11). Na coloração de Picrosirius Red, a fibra muscular do tipo1 é mais evidente no grupo controle (Figura 11). Tais resultados sugerem alteração morfológica durante esta fase do desenvolvimento entre os grupos.

Figura 11 – Fotomicrografia dos cães do grupo A (embriões controle e distróficos “GRMD” de 28 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.

Legenda: Fotomicrografia **A**, cães do grupo controle e **C** cães do grupo distrófico (GRMD), (Hematoxilina-eosina) Fibra muscular primária **○**Fibra muscular **→**. **B**, cães do grupo controle e **C** cães do grupo distrófico, (Picrosirius Red).

Nos animais do grupo B (CTR e GRMD de 33 dias de gestação), observamos que os cães CTR e GRMD apresentam células em intensa divisão, ambos com morfologia muscular preservada e sem infiltrado inflamatório (Figura 12A). Comparando o diâmetro das miofibras, tanto os cães do grupo CTR quanto o GRMD apresentaram dados similares (Figura 12B). Entretanto o grupo CTR apresentou um aumento significativo no perímetro das miofibras, o que não ocorreu nos cães do grupo GRMD (Figura 12C).

Em relação à análise estrutural do músculo quadríceps dos animais do grupo B, é possível visualizar fascículos musculares em ambos os grupos. Dessa forma podemos sugerir que na análise histológica as células musculares estão em desenvolvimento nos fetos estudados.

Figura 12 – Fotomicrografia e morfologia dos cães do grupo B (fetos controle e distróficos “GRMD” de 33 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.

Legenda: 12.A Fotomicrografia, cães do grupo controle e distrófico (GRMD) na coloração de (Hematoxilina-eosina) e (Picrosirius Red), observar fibra muscular primária , fibra muscular secundária , perímio . 12.B Área das miofibras dispostas em gráfico comparativo (GRMD e CTL). 12.C Perímetro das miofibras dispostas em gráfico comparativo (GRMD e CTL) * indica diferença significativa.

Os animais do grupo C (CTR e GRMD fetos de 38 dias de gestação) apresenta tecido muscular já formado, ambos os grupos apresentaram na coloração de hematoxilina-eosina e picrosirius red morfologia preservada (Figura 13A). Entretanto, o grupo GRMD apresenta, em sua maioria células em divisão e com núcleo centralizado, diferentemente dos animais do grupo CTR, que apresenta fibras musculares secundárias e com núcleo lateralizado. Estas diferenças podem sugerir um atraso no desenvolvimento gestacional de animais GRMD. Entretanto, comparando o diâmetro e o perímetro das miofibras dos cães do grupo CTR e GRMD não tiveram diferenças significativas. (Figura 13B e 13C).

Figura 13 – Fotomicrografia e morfologia dos cães do grupo C (fetos controle e distróficos “GRMD” de 38 dias de gestação) na coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.

Legenda: 13.A Fotomicrografia, cães do grupo controle e distrófico (GRMD) na coloração de (Hematoxilina-eosina) e (Picrosirius Red), observar fibra muscular primária , fibra muscular secundária endomísio . 13.B Área das miofibras dispostas em gráfico comparativo (GRMD e CTL). 13.C Perímetro das miofibras dispostas em gráfico comparativo (GRMD e CTL).

3.2.3 Imunohistoquímica

Técnicas imunológicas para a distrofina de embriões e fetos aos 28, 33 e 38 DG revelaram que a proteína distrofina está presente em embriões e no músculo de fetos (Figura 14). Em relação a imunolocalização da proteína citada, foi possível observar que as células muscular em fetos foram imunorreativas, enquanto que a marcação no grupo A (embrião) foi reativa, porém com pouco diferenciação tecidual das células muscular.

Figura 14 – Imunocoloração para marcação da proteína distrofina, dos cães do grupo A, B e C.

Legenda: Fotomicrografia do grupo A (25 DG), B (33 DG) e C (38 DG). Observar a marcação positiva no grupo controle (A, B e C) e no grupo distrófico (D, E e F). Perimísio (setas), endomísio (ponta de seta), fibra muscular (○) Barras de 100.

Assim, evidenciamos que a distrofina está presente em ambos os grupos, controle e distróficos (GRMD), em diferentes DG.

3.3.4 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência para distrofina, VEGF, NFK β p50, TG β 1 e GDF-8/11 no grupo A (embriões) revelam importantes alterações como a imunorreatividade para distrofina em ambos os grupos nesta fase (Figura 15: A e F). Em relação á marcação para O VEGF, o mesmo não apresentou imunorreatividade para ambos os grupos (Figura 15: B e G). Por outro lado, os embriões foram reativos no grupo controle e negativo no grupo distrófico (GRMD) para a expressão do NFK β p50 (Figura 15: C e H). Quando analisamos os embriões para TG β 1, apenas o grupo controle apresentou imunorreatividade (Figura 15: D e I). Entretanto, ao analisar o GDF-8/11, ambos os grupos, controle e distrófico, foram positivos (Figura 15: E e J).

Figura 15 – Imunofluorescência para marcação da distrofina, VEGF, NFkB p50, TGFβ1 e GDF-8/11 dos cães do grupo A (embriões controle e distróficos “GRMD” de 28 dias de gestação).

Legenda: Fotomicrografia do grupo controle (CTR) e distrófico (GRMD) pela distrofia muscular (GRMD), de cães do grupo A (embriões controle e distróficos de 28 dias de gestação).

Quando avaliamos o grupo B (fetos 33 DG) (Figura 16), evidenciamos marcação positiva em ambos os grupos (controle e distrófico) para: distrofina, VEGF,

TG β 1 e GDF-8/11, exceto para NFK β p50 que foi imunorreativo apenas no grupo controle (Figura 16:C), o grupo distrófico (GRMD) não apresentou imunorreatividade (Figura 16:H).

Figura 16 – Imunofluorescência para marcação da proteína distrofina, VEGF, NFKB p50, TGF β 1 e GDF-8/11 dos cães do grupo B (fetos controle e distróficos “GRMD” de 33 dias de gestação).

Legenda: Fotomicrografia do músculo quadríceps femoral de cães do grupo: controle (CTR) e afetado pela distrofia muscular (GRMD) do grupo B (fetos controle e distrófico GRMD de 33 dias de gestação).

O grupo C (fetos 38 DG), expressa uma marcação positiva em ambos os grupos (controle e distrófico) para: distrofina, VEGF, TG β 1 e GDF-8/11. Entretanto, foi imunorreativo para NFK β p50 no grupo controle (Figura 17:C), já o grupo distrófico (GRMD) apresentou imunorreatividade (Figura 17:H).

Figura 17 – Imunofluorescência para marcação da proteína distrofina, VEGF, NFkB p50, TGFβ1 e GDF-8/11 dos cães do grupo C (fetos controle e distróficos “GRMD” de 38 dias de gestação).

Legenda: Fotomicrografia do músculo quadríceps femoral de cães do grupo controle (CTR) e afetado pela distrofia muscular (GRMD), de cães do grupo C (fetos controle e distrófico GRMD de 38 dias de gestação).

3.4 DISCUSSÃO

É importante ressaltar que este é o primeiro estudo que avalia o tecido muscular distrófico no modelo canino (GRMD) *in-uteru*.

Estudos relatam que as fibras musculares são formadas na metade da embriogenese, por células que se originam dos somitos (BUCKINHUAM et al., 2003). Por isso escolhemos uma idade embrionária que apresenta formação de fibras musculares.

No presente estudo, não foi possível avaliar morfologicamente as fibras musculares do grupo A. As análises morfológicas começaram a partir do grupo B.

O perímetro das células no grupo B (33 DG) apresentou significativamente um aumento no grupo controle, este fato pode sugerir um pequeno atraso do grupo distrófico (GRMD) nesta fase de desenvolvimento. Este achado corrobora com estudos em embriões MDX, que relatam um atraso no desenvolvimento das miofibras (MERRICK ET AL., 2007; FARINI et al., 2016).

Para compreender melhor o desenvolvimento do músculo distrófico, buscou-se evidenciar possíveis alterações proteicas que comumente ocorre em tecido muscular. Para isso, avaliamos a distrofina, a mesma não é expressa em tecido muscular distrófico (GOEMANS et al., 2016), entretanto, a distrofina foi expressa em todas as idades estudada (Figura 5) e não mostrou diferença aparente entre o grupo controle e distrófico. Isso pode ocorrer porque *in-uteru* os animais não sofrem carga mecânica (FARINI et al., 2016). Este resultado demonstra um tecido muscular sadio em músculo distrófico de cães.

Estudos demonstram uma diminuição da densidade vascular e alteração da angiogênese em músculos distróficos (MOTOHASHI et al., 2014), por tal motivo, procuramos evidenciar ao longo da gestação se os animais distróficos expressam o VEGF, fator que estimula a angiogênese durante o desenvolvimento embrionário e fetal (MOTOHASHI et al., 2014).

No grupo A (embriões 28 DG) não expressaram positividade para VEGF, fato que corrobora com o desenvolvimento da espécie na fase de embrião, onde o mesmo só desenvolve vascularização na fase de transição de embrião para feto (CARLSON., 2004). O VEGF, entretanto, foi expresso em ambos os grupos, controle e distróficos em idade gestacional mais avançada B (33 DG) e C (38 DG).

O NFK β p50 este intimamente ligado a fatores mitogenos ou de crescimento celular, estudos apontam um aumento deste fator em pacientes DMD (HNIA et al., 2008). Em nosso estudo, o NFK β p50 foi avaliado, porém, não foi expresso nos animais do grupo distrófico no grupo B (33 DG), já no grupo C (38 DG) o grupo controle não expressa reatividade. Estes resultados indicam uma diminuição da atividade mitogênica durante estas fases do desenvolvimento.

Analizamos também um fator importante na proliferação, diferenciação e transformação celular o TGF β 1. Estudos apontam que esta proteína tem um importante papel na deposição de fibrose (TANIGUTI et al., 2011). Alguns estudos relatam que seu aumento está intimamente ligado ao excesso de deposição de tecido conjuntivo, o que incapacita as funções musculares (COHN et al., 2007). Em nosso trabalho, apenas o grupo A apresentou alteração, sendo que o embrião distrófico não expressou imunorreatividade. Este fato pode estar ligado a um atraso no desenvolvimento deste grupo.

A miostatina ou GDF-8/11 pertence á superfamília TGF- β e é expressa nas fibras musculares, principalmente nas fibras de contrações rápidas. Estudos revelam que a miostatina é um regulador negativo do crescimento do músculo esquelético (KORNEGAY et al., 2012). Em nosso trabalho a miostatina foi expressa nos embriões e fetos distróficos e controle de todos os grupos (A, B e C). Esta imunorreatividade faz uma conotação positiva em nosso trabalho, pois o tecido muscular, durante o desenvolvimento gestacional, não demonstra diferença quanto à expressão da distrofina e miostatina. Esses resultados reforçam a tese de que o tecido muscular distrófico, durante o desenvolvimento gestacional, se mantém sadio e saudável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo proporcionou, pela primeira vez, uma avaliação do desenvolvimento muscular no modelo pré-clínico canino da distrofia muscular de *Duchenne* em idade precoce. Morfologicamente, os animais distróficos apresentaram um atraso no desenvolvimento muscular aos 38 dias de gestação. Por outro lado, os tecidos apresentaram imunorreatividade para distrofina e miostatina, durante todos os períodos do desenvolvimento gestacional analisado, demonstrando uma estrutura funcional normal do tecido muscular distrófico.

Sugerimos que estudos futuros, em fases precoces, devem ser realizados ainda *in utero* ou na fase neonatal de animais distróficos, por expressarem distrofina e por não constatarem alterações inflamatórias durante a fase gestacional.

REFERÊNCIAS

- ACHARYYA, S.; SHARMA, S.M.; CHENG, A. S.; LADNER, K. J.; HE, W.; KLINE, W.; WANG, H.; OSTROWSKI, M. C.; HUANG, T.H.; GUTTRIDGE, D.C. TNF Inhibits Notch-1 in Skeletal Muscle Cells by Ezh2 and DNA Methylation Mediated Repression: Implications in Duchenne Muscular Dystrophy. **Plos One**. V.5, n.1, p. 1-9. 2010.
- AMBRÓSIO, C. E.; VALADARES, M. C.; ZUCCONI, E.; CABRAL, R.; PEARSON, P. L, GAIAD, T. P.; CANOVAS, H.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. **Neuromuscular Disorders**. V.18, n. 11, p. 892-893. 2008.
- ARAUJO, A.P.Q.C.; DE DECO, M.C.; KLOH, 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.
- 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.
- BRUNKLAUS, A.; PARISH, E.; MUNTONI, F.; SCUPLAK, S.; TUCKER, S. K.; FENTON, M.; HUGHES, M. L.; MANZUR, A. Y. The value of cardiac MRI versus echocardiography in the pre-operative assessment of patients with Duchenne muscular dystrophy. **European Journal of Paediatric Neurology**, V. 19, n. 4, p.395-401. 2015.
- BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O. B, T. O. B.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, V. 82, n. 2, p. 102-115. 2004.
- BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUËL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D., ROCANCOURT, D.; RELAIX, F: The formation of skeletal muscle: from somite to limb.. **Journal Anatomy**. V. 202, p. 59-68. 2003.
- CARLSON, B. M. **Human Embryology and Developmental Biology**. 3. ed. Philadelphia: Mosby, 2004. 560 p.
- CAROMANO, F. A. C. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (DMD). **Arquivos de Ciências da Saúde de Unipar**, V. 3, n. 3, p. 211-218. 1999.
- CARVALHO, S. C.; APOLINÁRIO, L. M.; MATHEUS, S. M. M.; NETO, H.S.; MARQUES, M. J. Epa protects against muscle damage in the *mdx* mouse model of duchenne muscular dystrophy by promoting a shift from the m1 to m2 macrophage phenotype. **Journal of Neuroimmunology**, V. 264, n. 1–2, p. 41-47. 2013
- CATELLI, A. A. **Altrações do tubo digestivo em cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)

– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

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

CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of reproduction and fertility Supplement**, V. 47, p. 3–27. 1993.

COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINI, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKELL, L. M.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AVERY, R. J.; WILLIAMS, J. R.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature*, V. 334, p. 154-156. 1988.

COHN, R.D.; ERP, C.; HABASHI, J. P.; SOLEIMANI, A. A.; KLEIN, E. C.; LISI, M. T.; GAMRADT, M.; RHYS, C.M.; HOLM, T. M.; LOEYS, B. L.; RAMIREZ, F.; JUDGE, D. P.; WARD, C. W.; DIETZ, H. C. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic state. **Nature Medicine**. V. 13, n.2, p. 204-210. 2007.

COZZI, F.; CERLETTI, M.; LUVONI, G. C.; LOMBARDO, R.; BRAMBILLA, P.G.; FAVERZANI, S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M. Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II Quantutative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathologica**, V. 101, n. 5, p. 469-478. 2001.

DAVIS, K. E. Challenges in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, V. 7, p. 482-486. 1997.

DHINGRA, S.; SHARMA, A. K.; ARORAL, R. C.; SLEZA, J.; SINGAL, P. K. IL-10 atteniates TNF α -induced NF κ B pathway activation an cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovascular Research**. V. 82, p. 59-66. 2017.

DHINGRA, S.; SHARMA, A. K.; ARORAL, R. C.; SLEZA, J.; SINGAL, P. K. IL-10 attenuates TNF- α -induced NF κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovascular Research**. v. 82, p. 59-66, 2009.

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

DOGRA, C.; SRIVASTAVA, D. S.; KUMAR, A. Protein-DNA Array-based Identification of Transcription Factor Activities Differentially Regulated in Skeletal Muscle of Normal and Dystrophin-deficient Mdx Mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**. V. 312, p. 17-24. 2008.

EAGLE, M.; BAUDOUIN, S. V.; CHANDLER, C.; GIDDINGS, DR.; BULLOCK, R.; BUSHBY, K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life

expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. **Neuromuscular Disorders**. V.12, p. 926–929. 2002.

EMERY, A.E.H. Duchenne muscular dystrophy: genetics aspects, Carrier detection and antenatal diagnosis. **British Medical Bulletin**, vol. 36, p. 117-22, 1980.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **The Lancet**. V. 359, p. 687-695. 2002.

FADIC, R. Cell surface and gene expression. Relation molecules in dystrophinopathy: mdx vx. *Duchenne Pesquisa Biológica*, 2005, vol. 38, n. 4, p. 375-380.

FARINI, A.; SITZIA, C.; CASSINELLI, L.; COLLEONI, F.; PAROLINI, D.; GIOVANELLA, U.; MACIOTTA, S.; COLOMBO, A.; MEREGALLI, M.; TORRENTE, Y. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-dependent Ca²⁺ signaling mediates delayed myogenesis in Duchenne muscular dystrophy fetal muscle. **Development**. V. 143, n. 4, p. 658-669. 2016.

FINE, D. M.; SHIN, J. H.; YUE, Y.; VOLKMANN, D.; LEACH, S. B.; SMITH, B. F., MCLINTOSH, M.; DUAN, D. Age-matched comparison reveals early electrocardiography and echocardiography changes in dystrophin-deficient dogs. **Neuromuscular Disorders**. V. 21, n. 7, p.453-461. 2011.

GAIAD, T. P. **Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GOEMANS, N. M.; TULINIUS, M.; VAN DEN HAUWE, M.; KROKSMARK, A. K.; BUYSE, G.; WILSON, R.J.; VAN DEUTEKOM, J. C.; KIMPO, S. J.; LOURBAKOS, A.; CAMPION, G. Long-term efficacy, safety, and pharmacokinetics of drisapersen in duchenne muscular dystrophy: results from an open-label extension study. **Plos One**. V.11, n.9, p. 1-20. 2016.

HOFFMAN, E.P.; FISCHBECK, H. K.; BROWN, R. H.; JOHNSON, M.; MEDORI, R.; LOIRE, J. D.; Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. **New England Journal of Medicine**. V. 318, n.21, p. 1363-1368. 1988.

HOFFMAN, E. P.; MCNALLY, E. M. Exon-skipping therapy: a roadblock, detour, or bump in the road? **Science translational medicine**. V. 6, p. 230-244. 2014.

HOFFMAN, E. P.; JR, R. H. B.; KUNKEL, L. M. DYSTROPHIN: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v.51, n.6, p. 919-928, 1987

HOFFMAN, E. P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 9, p. 264-470, 2001.

HNIA, K.; GAYRAUD, J.; HUGON, G.; RAMONATXO, M.; PORTE, S.D.L.; MATECKI, S.; MORNET, D. L-Arginine Decreases Inflammation and Modulates the Nuclear Factor-B/Matrix Metalloproteinase Cascade in Mdx Muscle Fibers. **The American Journal of Pathology**. V.172, p.1509-1519. 2008.

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. 425 p.

KIM, J.; HOPKINSON, M.; KAVISHWAR, M.; FUENTE, M. F.; BROWN, C. C. Prenatal muscle development in a mouse model for the secondary dystroglycanopathies. **Journal Skeletal Muscle**. V. 6, n.3, p.1-15. 2016.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHILDERS, M. K.; GRANGE, R. W. Muscle Gene Therapy. **Molecular Therapy**. V. 3, n. 5, p. 276–282. 2011

KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MOLLER, D. M.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of Golden Retriever dogs. **Muscle & Nerve**. V.11, p.1056-1064. 1988.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J. H.; BOGAN, D. J.; VAN CAMP, S. D.; METCALF, J. R. O. Contraction tension and kinetics of the peroneus longus muscle in golden retriever muscle dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 123, p. 100-107, 1994.

KORNEGAY, J. N.; CHILDERS, M. K.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; NGHIEM, P.; WANG, J.; FAN, Z.; HOWARD, J.F.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 & Rehabilitation Clinics of North America**, V. 23, n.1, p.149-72. 2012

MARQUES, M. J.; LUZ, M. A. M.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Muscle regeneration in dystrophic mdx mice is enhanced by isosorbide dinitrate. **Neuroscience Letters**. V. 382, p. 342-345. 2004.

MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; SARAIVA, N. Z.; WENCESLAU, C. V.; MORINI, A. C.; KERKIS, I.; Garcia, J. M.; Miglino, M. A. Early development and putative primordial germ cells characterization in dogs. **Reproduction in Domestic Animals**. V.46, n. 1, p. 62–66. 2011.

MOTOHASHI, Y, S.; ASAKURA, A. Angiogenesis as a Novel Therapeutic Strategy for Duchenne Muscular Dystrophy through Decreased Ischemia and Increased Satellite Cells." **Frontiers in Physiology**. V. 5, n.50. p. 1-7. 2017.

MEAD, A. F.; PETROV, M.; MALIK, A. S.; MITCHELL, M. A.; CHILDERS, M.; BOGAN, J.; SAIDNER, G.; KORNEGAY, J. N.; STEDMAN, H. H. Diaphragm Remodeling and Compensatory Respiratory Mechanics in a Canine Model of Duchenne 1 Muscular Dystrophy. **Journal of Applied Physiology**. V. 116, n. 7, p. 807-815. 2014.

MERLINI, L.; SABATELLI, P. Improving clinical trial design for Duchenne muscular dystrophy. **Bio Med Central Neurology**. V. 15, n. 1, p. 807-815. 2015.

MERRICK, D.; TING, T.; STADLER, L. K.; ESMITH, J. A role for insulin-like growth factor 2 in specification of the fast skeletal muscle fibre. **Developmental Biology**. V.7, n.65, p. 1-16. 2007.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**. V. 126, n. 2-3, p. 100–1088. 2002

NOGUEIRA, R. A. F. **Estudo de longo prazo do tratamento farmacológico com multi-fármacos das alterações patofisiológicas do modelo canino de distrofia muscular**. 153f. Tese “Doutorado em Ciências”. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OLIVEIRA, D. M.; HAGEN, S. C.; SANTOS, A. C.; MIGLINO, A. M.; ASSIS NETO, A. C. Noninvasive evaluation of respiratory muscles in pre-clinical model of Duchenne Muscular Dystrophy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 36, n. 4, p. 290-296. 2016.

OLIVEIRA, D. M.; SANTOS, A. C.; BERTASSOLI, B. M.; VIANA, D. C.; PRADO, A. A. F.; ASSIS NETO, A. C. Comparative study of the kidneys from dystrophic mice. **Jounal Morphology Sci**. V. 30, n. 3, p. 186–190. 2013.

PORTER, J. D.; KHANNAL, S.; KAMINSKI, H. J.; RAO, J. S.; MERRIAM, A. P.; RICHMONDS, C. R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F. H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Human Molecular Genetics**. v. 11, n. 3, p. 263-272, 2002.

PRETZER, S. D. Canine embryonic and fetal development: A review. **Theriogenology**. V.70, p.300–303, 2008.

RAPISARDA, R.; MUNTONI, F.; GOBBI, P.; DUBOWITZ, V.; Duchenne muscular dystrophy presenting with failure to thrive. **Archives of Disease in Childhood**. V. 72, n. 5, p. 437-438. 1995.

ROWLAND, L. P. **Merit-tratado de neurologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1997. p. 914 p.

SBRAGIA, L. Intrauterine fetal abnormalities therapy. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetricia**. V. 32, p. 47-54. 2010.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.;

ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal of veterinary internal medicine**. V. 15, n.3, p.240–244. 2001.

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

TANIGUTI, A. P. T.; PERTILLE, A.; MATSUMURA, C.Y.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J.; Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in *mdx* mice by suramin, a $\text{tgf-}\beta$ blocker. **Muscle Nerve**. V. 43, p. 82-87. 2011.

THIBAUD, J. L.; MONNET, A.; BERTOLDI, D.; BARTHÉLÉMY, I.; BLOT, S.; CARLIER, P. G. Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. **Neuromuscular Disorders**, v. 17, p. 575-584, 2007.

VAINZOF, M.; PAVANELLO, R. C, PAVANELLO, F. I.; PASSOS-BUENO, M. R.; RAPAPORT, D.; HSI, C. T.; ZATZ, M. Dystrophin immunostaining in muscles from patients with different types of muscular dystrophy: a Brazilian study. **Journal of the neurological sciences**. V. 98, n. 2-3, p.221–233. 1991.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. Na animal modelo f Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal Neurological Science**. V. 88, p. 69-81, 1988.

VALENTINE, B. A.; WINAND, N. J.; PRADHAN, D.; MOISE, N S.; DELAHUNTA, A.; KORNEGAY, J. N.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of duchenne muscular dystrophy **American Journal of Medical Genetics**. V. 42, p. 352-356, 1992.

WALLACE, G. Q.; MCNALLY, E. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. **Annual Review of Physiology**, v.71 n. 22, p.37-57, 2008.

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**. 2012;7(9):44438e

YOUNG, B.; LOWE, J. S.; STEVENS, A.; JOHN, H. W. **Wheater's Functional Histology**. 5. ed. Reino Unido: Elsevier, 2008. 448 p.

ZHANG, C.; MCFARLENE, C.; LOKIREDDY, S.; BONALA, S.; GE, S.; MASUDA, S.; GLUCKMAN, P. D.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signaling pathway. **Diabetologia**. V.54, n.6, p. 1491-1501, 2011.