Carlos Roberto Bueno Júnior

**Abordagens terapêuticas em modelo
experimental de distrofia muscular**

*Therapeutic approaches in an experimental model of
muscular dystrophy*

São Paulo

2011

Carlos Roberto Bueno Júnior

Abordagens terapêuticas em modelo experimental de distrofia
muscular

*Therapeutic approaches in an experimental model of muscular
dystrophy*

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

Orientadora: Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2011

Bueno Júnior, Carlos Roberto

Abordagens terapêuticas em modelo
experimental de distrofia muscular

117 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva, 2011.

1. distrofia muscular 2. tratamentos I.

Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Mayana Zatz - Orientadora

“Sempre que o homem sonha o mundo pula e avança como uma
bola colorida nas mãos de uma criança.”

Antônio Gedeão

Agradecimentos

Quando comecei a pensar nas pessoas/instituições que deveria agradecer nesse momento, veio à mente vários nomes - então decidi agrupá-los em “categorias”. A próxima dúvida foi a ordem da lista de agradecimentos: como cada pessoa/instituição tem um papel diferente, acredito que ficaria difícil reunir critérios para estabelecer tal ordem. Para ser “metodologicamente” correto, determinei essa ordem aleatoriamente por meio de sorteio. Portanto, agradeço imensamente:

- Os colegas de outros laboratórios ou de “república”, com os quais desenvolvo trabalhos, discuto resultados e/ou aprendo técnicas de pesquisa - além da convivência. São eles: Bechara, Bozi, Guga, Cleverton, Lucas, Aline, Enéas, Ana Paula, Luciana, Paulo, Vanessa, Raquel, Vera e Patricia;

- A minha família pelo apoio, incentivo e exemplos de determinação, força de vontade e persistência: Regina, Carlos, André, Renan e Larissa;

- A minha orientadora Dra. Mayana Zatz, pesquisadora extremamente motivada e batalhadora com a qual aprendo muito a cada dia, especialmente em relação ao pensamento crítico e à auto-cobrança;

- O pessoal do Centro de Estudos do Genoma Humano (IB-USP) pelos ensinamentos nas técnicas experimentais, pelas discussões científicas e não científicas, e pela convivência no laboratório e nos congressos: Marcos, Mariane, Heloísa, Tatiana, Natássia, Eder, Denise, Constância, Estela, Mayra, Amanda, Juliana, Camila, Gabriela, Carla, Miguel, Monize, Luciana, Inês, Natale, Michel, Mariz e seus alunos;

- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, bolsa de doutorado processo número 2008/58541-9), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (bolsas e recursos para o desenvolvimento dos projetos científicos) desde a iniciação científica.

Índice

Introdução Geral	9
Capítulo 1. Caracterização de Modelos Murinos de Distrofia Muscular	18
Capítulo 2. Treinamento Físico e Agonistas de AMPK e PPAR	38
Capítulo 3. Células-tronco e Aminoácidos	68
Conclusões	97
Resumo	99
Abstract	100
Referências Bibliográficas	101
Biografia	110

Introdução Geral

“Paraplégie hypertrophique de l'enfance de cause cérébrale” (DUCHENNE, 1861). Foi assim que em 1861, na segunda edição de seu famoso livro de aplicação da eletricidade na medicina, que o médico Duchenne, da cidade de Bolonha na França, descreveu seu primeiro caso de distrofia muscular. Devido ao prejuízo intelectual da criança, ele sugeriu que a condição devia ter uma origem cerebral. Em 1868, contudo, em uma série de registros de casos, ele apontou a musculatura esquelética como o tecido originário da doença (DUCHENNE, 1868).

Apesar de não ter nenhuma ligação formal com nenhum hospital de Paris, Duchenne dedicou os últimos anos de sua vida visitando vários hospitais da região para aplicar eletroestimulação na musculatura de pacientes com diferentes doenças neurológicas. Além de ser o pai da aplicação da eletricidade na medicina, tanto no diagnóstico como na terapia, Duchenne foi o inventor da agulha para biópsia muscular (DUBOWITZ, 1975).

Em Londres, outro médico teve grande contribuição nas descrições iniciais da distrofia muscular. Em 1852, dez anos antes de Duchenne, Meryon descreveu em detalhes uma família na qual quatro meninos foram afetados com a condição. Ele apontou a visível alteração no interior da musculatura esquelética e na necropsia de um dos casos também notou que o sistema nervoso central parecia normal - então ele sugeriu que era uma doença de origem muscular. Por fim, segue uma de suas descrições de um dos meninos: “Em maio de 1847, quando tinha aproximadamente nove anos de idade, ele caminhou da rua *Bruton* até a ponte *Westminster*, mas em novembro de 1848

ele não conseguia caminhar nem ficar de pé, e em 1850 seus braços perdiam força rapidamente” (MERYON, 1852).

Além desses relatos do século XIX, há registros que sugerem a presença da distrofia muscular em sociedades bem mais antigas. Um exemplo é um desenho no templo egípcio da rainha *Hatshepsut*, que reinou entre 1500 e 1480 a.C. Os egípcios fizeram uma expedição para *Punt* e o desenho mostra a rainha de *Punt* e seus familiares dando-lhes as boas vindas - o que chama a atenção é que a rainha e sua filha apresentam anormalidades na musculatura das pernas, na postura e na aparência facial (DUBOWITZ, 1975).

Atualmente o conceito de distrofia muscular engloba mais de 30 diferentes doenças genéticas causadas por mutações em diferentes genes, resultando geralmente em degeneração muscular, prejuízos locomotores e, na maioria dos casos, morte precoce (DALKILIC & KUNKEL, 2003; DAVIES & NOWAK, 2006).

A distrofia muscular mais comum é a de Duchenne, uma doença de herança recessiva ligada ao cromossomo X que afeta um em 3500 meninos, cuja progressão culmina com a necessidade de cadeira de rodas e morte na segunda década de vida. Essa distrofia é gerada pela completa ausência da proteína distrofina ou, raramente, pela presença da proteína truncada, ou seja, não funcional (MOZZETTA et al., 2009).

Já a distrofia muscular de Becker, que também é causada por mutações no gene da distrofina, geralmente apresenta quadro clínico mais leve do que a de Duchenne devido ao fato das mutações ocorrerem em fase, mantendo o quadro de leitura do RNA mensageiro e, portanto, gerando uma proteína de tamanho diminuído, mas parcialmente funcional. Além disso, é conhecido que

deleções nas regiões de ligações da distrofina com as proteínas com as quais ele interage (actina e complexo de glicoproteínas) resultam em quadro mais grave do que deleções na região central do gene (DAVIES & NOWAK, 2006).

No indivíduo saudável essa proteína encontra-se na membrana plasmática das fibras musculares, onde interage com uma série de outras proteínas, dentre elas as distroglicanas, as sarcoglicanas, a laminina, a disferlina e a caveolina-3. A principal função desse complexo protéico é transmitir mecanicamente a tensão gerada pelas proteínas contráteis no interior da célula muscular para a matriz extracelular, permitindo, em última instância, que na musculatura esquelética apendicular essa tensão seja transmitida à estrutura óssea e, finalmente, haja o movimento do segmento corporal (MOZZETTA et al., 2009)

Qualquer prejuízo na função dessas proteínas aumenta consideravelmente a vulnerabilidade de lesão da membrana plasmática das fibras musculares, fenômeno que é acompanhado por uma série de eventos maléficos ao tecido, como influxo de cálcio para o meio intracelular, infiltração de macrófagos, degradação protéica, disfunção mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio e de fatores inflamatórios, além de necrose (WALLACE & MCNALLY, 2008). Em resposta a essa degeneração muscular, uma série de processos regenerativos, inclusive com a ativação das células satélites musculares, são organizados com o propósito de contrabalancear o dano. No entanto, com a progressão da doença, essa capacidade de regeneração diminui substancialmente e, nesse momento, as manifestações clínicas da doença são exacerbadas - o tecido muscular é progressivamente substituído por tecido conjuntivo fibroso e gordura. Como o diafragma e o

coração também são afetados, a parada cádio-respiratória é uma causa de morte comum (SHI & GARRY, 2006).

Com o objetivo de se estudar as distrofias musculares, diferentes modelos experimentais animais têm sido utilizados. Dentre os mais conhecidos estão os cães da raça *Golden Retriever*, que apresentam deficiência na expressão de distrofina (VAN DEUTEKOM & VAN OMMEN, 2003) e alguns modelos em camundongos: os *mdx* também apresentam deficiência na distrofina, os *sjl* na disferlina e os *dy* e *dy^{2J}* na laminina. Diferentemente dos camundongos *dy* e *dy^{2J}* (MEIER & SOUTHARD, 1970; SUNADA et al., 1995), os *mdx* e *sjl* (BULFIELD et al., 1984; BITTNER et al., 1999) não apresentam fraqueza muscular grave. É interessante salientar que os camundongos *mdx* apresentam a mesma deficiência de distrofina que os pacientes com a doença de Duchenne, no entanto não apresentam tanto fraqueza muscular como em humanos - especula-se que isso possa ocorrer devido à maior capacidade regenerativa da musculatura murina e/ou ao fato da proteína utrofina substituir a distrofina nessa espécie animal (BULFIELD et al., 1984). Apesar destes estudos em relação aos diferentes modelos de distrofia muscular, não há comparação entre eles em relação a diferentes variáveis e estes conhecimentos são importantes na escolha do modelo experimental mais adequado para cada experimento.

Em relação à terapêutica das distrofias, várias estratégias têm sido estudadas ao longo do tempo, porém nenhuma é realizada com considerável sucesso na clínica (NOWAK & DAVIES, 2004). Como foi supracitado, uma das primeiras tentativas foi a eletroestimulação realizada por Duchenne (DUBOWITZ, 1975).

Os extraordinários e recentes avanços nas áreas de genética e biologia molecular, que têm como grandes marcos a descoberta da estrutura molecular do DNA por Watson e Crick em 1953 (WATSON & CRICK, 1953) e o completo sequenciamento do DNA humano em 2003 (VENTER, 2003), resultaram nos estudos relacionados às distrofias musculares em uma série de pesquisas utilizando a terapia gênica e a terapia celular como abordagens direcionadas ao tratamento dessas doenças.

Trabalhos que utilizaram a terapia gênica em modelos de distrofia muscular apresentaram uma série de resultados promissores. No entanto, essa abordagem terapêutica ainda apresenta uma série de desafios aos pesquisadores, como a inserção do gene completo da distrofina - o maior do genoma humano - em vetores, a passagem do vetor pela matriz extracelular, o potencial efeito danoso ao organismo de estruturas virais utilizadas como vetores, reações do sistema imunológico e o controle do tempo e do nível de ação do constructo artificial no organismo (KAPSA et al., 2003).

Em relação às células-tronco, elas podem ser divididas em embrionárias e adultas. Apesar das células-tronco embrionárias apresentarem a vantagem de seres capazes de teoricamente se diferenciarem em todos os 216 tipos tissulares do organismo, por questões éticas sua utilização em pesquisas científicas é dificultada ou até mesmo proibida legalmente em uma série de países (KASTENBERG & ODORICO, 2008).

Partindo dos pressupostos supracitados e da necessidade de investigações científicas que em reduzido intervalo de tempo possam resultar em aplicações clínicas, a utilização de células-tronco adultas estromais apresenta-se como uma estratégia atraente. Essas células são dotadas de

certas características que as tornam candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa, tais como facilidade de isolamento e cultivo; potencial de renovação e diferenciação em vários tipos de tecidos, como osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo; e efeitos tróficos mediados pela produção de fatores de crescimento e citocinas (KASSEM et al., 2004; LE BLANC & PITTENGER, 2005; CAPLAN & DENNIS, 2006).

No ser humano, a medula óssea é a sua mais tradicional fonte (DEASY et al., 2004). Entretanto, as células-tronco estromais também já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido adiposo (ZUK et al., 2001; VIEIRA et al., 2008), o endotélio e o sub-endotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003), o sangue de cordão umbilical e placentário (LEE et al., 2004; YU et al., 2004), a vilosidade coriônica da placenta (IGURA et al., 2004), a polpa dentária (SEO et al., 2004), o cordão umbilical (SECCO et al., 2008), a musculatura esquelética (MCLOON et al., 2007), a tuba uterina (JAZEDJE et al., 2009) e o tecido cerebral (FERNANDES et al., 2007).

Em relação à via de administração das células-tronco, como partimos do pressuposto que a distrofia muscular gera seus efeitos deletérios em uma série de músculos, a aplicação pelo leito venoso aparece como uma alternativa atraente, além de ser pouco invasiva. A efetividade desse procedimento também tem sido comprovada no tratamento das distrofias musculares (VIEIRA et al., 2008).

Nos últimos anos as células-tronco estromais têm despertado grande interesse devido ao seu possível potencial de envolvimento no processo de reparo tissular. Entretanto, suas funções não estão restritas à reposição celular. As citocinas e fatores de crescimento liberados por elas apresentam efeitos

tróficos, tais como modulação do sistema imune, inibição da fibrose e da apoptose, aumento da angiogênese, estímulo para divisão celular e diferenciação, que são importantes no reparo tissular (CAPLAN & DENNIS, 2006). Recentemente foram demonstrados efeitos pró-angiogênicos e anti-apoptóticos das células-tronco estromais derivadas do tecido adiposo em miócitos sujeitos a condições de hipóxia. Estes efeitos eram mediados pela produção e secreção de quantidades significantes de IGF-1 e VEGF por essas células (SADAT et al., 2007).

A terapia celular no momento é alvo de vários estudos, tem sido testada para inúmeras patologias e vários desafios têm sido apresentados aos pesquisadores. Dentre esses grandes desafios estão a incorporação dessas células nos tecidos alvos em quantidades suficientes para exercerem seu papel e a presença de um “ambiente” que favoreça as ações dessas células no tecido (CHOUMERIANOU et al., 2008).

Neste sentido, uma melhora no quadro nutricional pode ser crucial para os benefícios gerados pelas células-tronco, pois se elas sinalizarem para um estado regenerativo e anabólico da musculatura esquelética é necessário que haja também energia e aminoácidos. Pacientes com distrofia muscular apresentam prejuízos nutricionais devido a uma série de fatores, como dificuldade para mastigar, arquitetura anormal da boca, prejuízo na condução do alimento da boca até o esôfago e refluxo gastro-esofágico - apesar de parecer simples, o ato de engolir, por exemplo, é um processo extremamente complexo que exige a participação coordenada de 31 pares de músculos estriados (PHILPOT et al., 1999). Segundo os autores desse artigo,

infelizmente essas alterações alimentares geralmente não são consideradas na prática clínica.

Dentre várias abordagens terapêuticas utilizadas em um estudo, como aminoácidos, creatina, fatores de crescimento, inibidores de proteases, imunossupressores e antiinflamatórios, a associação dos aminoácidos alanina e glutamina foi a intervenção que, descritivamente, apresentou os maiores incrementos na força muscular de camundongos *mdx* (GRANCHELLI et al., 2000).

Dentre todos os aminoácidos, a glutamina é o mais abundante livre no corpo e corresponde a 60% dos aminoácidos livres na musculatura esquelética, além de ser o grande precursor da gliconeogênese, combustível para tecidos com alta taxa de renovação celular, regulador da síntese protéica e inibidor da degradação protéica muscular (HANKARD et al., 1999; JEPSON et al., 1988; HANKARD et al., 1998). Além disso, a glutamina é o aminoácido que apresenta mais estudos atestando seus efeitos benéficos em pacientes e modelo experimental de distrofia muscular (HANKARD et al., 1998; HANKARD et al., 1999; MOK et al., 2006; MOK et al., 2008).

Além da terapia celular e da intervenção nutricional, tanto estímulos físicos como farmacológicos também podem potencialmente ser interessantes no tratamento das distrofias musculares. É válido ressaltar que tais abordagens terapêuticas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação.

Apesar de vários trabalhos mostrarem que o treinamento físico aeróbico é benéfico na distrofia muscular (DUPONT-VERSTEEGDEN et al., 1994; CARTER et al., 1995; HAYES & WILLIAMS, 1996; HAYES & WILLIAMS, 1998; BOUCHENTOUF et al., 2006; CALL et al., 2008), outros apresentam resultados

contrários, alegando que o exercício físico pode gerar um estresse mecânico exacerbado na musculatura esquelética (GRANCHELLI et al., 2000; EAGLE, 2002; CARTER et al., 2002). Sabendo que recentemente foram publicados estudos nos quais os autores mimetizaram o efeito do treinamento físico aeróbico com a utilização de drogas que estimulam as vias de sinalização intracelular AMPK e PPAR α em camundongos, as quais inclusive aumentam a expressão de utrofina - proteína que pode compensar a ausência de distrofina nos animais *mdx* (NARKAR et al., 2008; RICHTER et al., 2008) - é plausível testar essa abordagem terapêutica associada ao treinamento físico em modelo experimental de distrofia muscular.

Os estudos relacionados a esta tese objetivam contribuir para uma melhor compreensão a respeito dos processos celulares e moleculares envolvidos em modelo experimental de distrofina muscular e também tem uma interface com estratégias terapêuticas, na medida em que os resultados encontrados podem justificar novos estudos relacionados ao tratamento da síndrome. Além disso, essa investigação poderá fornecer subsídios para inúmeras outras condições que também apresentam comprometimento morfofuncional da musculatura esquelética, como câncer, AIDS, doenças cardíacas, situações de imobilização prolongada e microgravidade.

Capítulo 1. Caracterização de Modelos Murinos de Distrofia

Muscular

Função muscular e resistência aeróbica de modelos murinos de distrofia muscular

Carlos R. Bueno Júnior¹, Raquel Sirvente², Vera Maria Cury Salemi², Patricia Chakur Brum³, Mayana Zatz¹

¹Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, ²Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, ³Escola de Educação Física e Esporte, Universidade of São Paulo, São Paulo, Brazil

Título abreviado: Modelos murinos de distrofina muscular

Autora para correspondência:

Mayana Zatz, PhD

e-mail: mayazatz@usp.br

Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

R. do Matão, Travessa 13, 106 - Butantã - São Paulo - SP

05508-900 - Brasil

Telefone: (5511) 3091-7563

Resumo

Distrofias musculares são doenças genéticas, até o momento sem cura, que resultam em disfunções funcionais, estruturais e moleculares na musculatura esquelética. Apesar de vários estudos utilizarem avaliações relacionadas a diferentes capacidades físicas (como força e resistência aeróbica) de diferentes modelos murinos de distrofia muscular com objetivo de testar diferentes abordagens terapêuticas para a doença, são escassos os estudos que compararam o padrão fenotípico destes animais. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar a função muscular e a resistência aeróbica em três modelos murinos de distrofia muscular (MDX, *dy* e *dy*^{2J}), além dos animais controle aos dois meses de idade. A função muscular foi avaliada pelos testes de deambulação, força de preensão e *Rotarod*; a resistência aeróbica por meio da análise do consumo de oxigênio em repouso em exercício físico máximo progressivo até a exaustão; a função cardíaca por meio de ecocardiograma; e a ingestão de ração e água, e excreção de fezes e urina por meio de gaiolas metabólicas. Em termos fenotípicos, os animais MDX constituem o modelo de distrofia muscular mais leve e os *dy* o mais grave. Conhecer as reais magnitudes das diferenças entre estes modelos é um parâmetro importante para a escolha da linhagem mais apropriada para cada objeto de estudo.

Palavras-chave: Rotarod, *grip meter*, ecocardiograma, gaiola metabólica

Introdução

Distrofias musculares são doenças genéticas causadas por mutações em diferentes genes, resultando geralmente em degeneração muscular, prejuízos locomotores e, na maioria dos casos, morte precoce (Dalkilic & Kunkel, 2003; Davies & Nowak, 2006). Como são doenças sem cura até o momento, apesar dos avanços científicos e tecnológicos, estudos científicos são desenvolvidos em vários centros de pesquisa em todo o mundo utilizando diferentes modelos experimentais para testar os efeitos de diferentes abordagens terapêuticas em variáveis da aptidão física, como força muscular e resistência aeróbica.

Apesar de diversos modelos experimentais serem conhecidos e utilizados em estudos relacionados às distrofias musculares, são escassos os estudos que analisaram simultaneamente as variáveis da aptidão física nestes modelos murinos e esta informação é fundamental para a escolha da linhagem mais adequada a cada estudo (Vainzof et al., 2008).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi comparar a função muscular e a resistência aeróbica em três modelos murinos de distrofia muscular: MDX, nos quais a proteína distrofina está ausente; e dy^{2J} e dy , nos quais há redução nos níveis da proteína laminina- $\alpha 2$.

Métodos

Amostra. 21 animais C57/BL6J (controles), 32 MDX, 18 dy^{2J} e 14 dy foram estudados aos dois meses de idade. O presente estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos em experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (www.cobea.org.br) e aprovado

pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (087/99). Até a idade dos experimentos os camundongos foram mantidos em um ciclo claro-escuro 12: 12 h em temperatura ambiente controlada (22°C) com livre acesso à água e à ração (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil).

Função muscular. No teste de deambulação as patas dianteiras dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica e em seguida eles foram posicionados em uma caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, oito cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para caminharem por três tentativas. Antes de terem as patas pintadas, os animais caminharam pela caixa três vezes para adaptação. Posteriormente, o comprimento das passadas foi medido (Kennel et al., 1996).

No teste de força de preensão foi utilizado o *Grip Strentgh System* (modelo DFE-002) da *San Diego Instruments (San Diego, Cal, USA)* com a grade não inclinada. Foram realizadas três tentativas de preensão com as patas dianteiras sem que os valores fossem considerados. Cada tentativa consistiu em tensionar o animal pela cauda, de modo que as patas dianteiras passassem por todos os arames da grade e ele se desprendesse da mesma - as patas traseiras não tocaram a grade em nenhum momento. Na sequência foram realizadas tentativas válidas e os três maiores valores de tensão aplicados registrados em *Newton (N)* (Paas-Rozner et al., 2000; Anderson et al., 2004; Blanco et al., 2007).

Por fim, no teste do *Rotarod* o aparelho utilizado foi o modelo 755 da *IITC Life Science (Woodland Hills, CA, USA)* programado para apresentar

velocidade inicial de 1rpm e velocidade final de 40rpm, alcançada 300 segundos após o início do movimento - a aceleração foi constante durante todo o experimento. Foram realizadas três tentativas por animal, com intervalo de 10 segundos entre elas, e o tempo até a queda de cada uma foi registrado (Serradj & Jamon, 2007; Turgeman et al., 2008; Li et al., 2008).

Resistência aeróbica. Para avaliar a tolerância ao esforço físico aeróbico foi realizado um teste progressivo até a exaustão em esteira rolante. O teste teve velocidade inicial de 6m/min e incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos até que o animal deixou de manter a velocidade de corrida. Foi considerado o tempo até a exaustão (Ferreira et al., 2007).

Para medida do consumo de oxigênio em repouso utilizou-se uma caixa metabólica conectada a um analisador de gases capaz de fornecer a concentração de oxigênio no interior da mesma (Brooks e White, 1978). A essa câmara foi conectado um tubo na forma de “Y” de onde parte da amostra foi retirada por uma bomba (FANEM, MOD. CAL) e, outra parte, com menor fluxo, foi retirada pela bomba do analisador de gases (Sable Systems Subsamplers Version 3, SS-3). A parte da frente da caixa possui uma abertura que permite a entrada de um fluxo de ar unidirecional sugado pelas bombas aspiradoras. Um programa específico foi utilizado (Expedata) para análise do VO₂. A luminosidade ambiente foi reduzida, a temperatura mantida em aproximadamente 22°C e a umidade do ar esteve em torno de 70%. O ambiente dentro da caixa acrílica era reestabilizado antes do início do teste do animal subsequente.

Para avaliar a medida do consumo pico de oxigênio (VO_{2pico}), a caixa metabólica foi posicionada sobre uma esteira rolante, seguindo o protocolo de exercício físico progressivo descrito acima.

Função cardíaca. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com halotano 1,0%, com fluxo 1 l/min de O_2 misturado ao anestésico. Foi utilizado um ecocardiógrafo (Acuson Corporation, Sequoia 512 - Mountain View, CA, EUA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas com uma frequência de 14 MHz. A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) na altura dos músculos papilares, foi realizado o modo M e as medidas do diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo foram obtidas e utilizadas para o cálculo da fração de encurtamento (FS). A fórmula utilizada foi: $FS = (DDVE - DSVE) / DDVE$. A ecocardiografista (R. S.) estava cega para o genótipo dos animais.

Gaiola metabólica. Os animais permaneceram por 24h em gaiolas metabólicas (Insight Pesquisa e Ensino, Brasil) para adaptação. Na sequência, permaneceram um dia em gaiolas comuns e 24h nas mesmas gaiolas metabólicas para medição da ingestão de ração e água, e da excreção de fezes e urina (Witte et al., 2010).

Análise estatística. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Como os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias similares (teste de Levene), os dados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) de um caminho

(Statistica, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Quando necessário, o pós-teste de Duncan foi utilizado. O nível de significância adotado foi 5%.

Resultados

Função muscular. Na Figura 1 podemos observar que em todos os testes de função muscular realizados, os animais *dy* foram os que apresentaram pior desempenho e os MDX as menores alterações em relação aos animais controle. No entanto, todos os modelos apresentaram fraqueza muscular em relação aos animais sem distrofia muscular.

A **B** **C**

Figura 1: Testes de função muscular em animais controles e três modelos de distrofia muscular. O número amostral encontra-se entre parêntesis. Nos testes representados nos painéis A e B os valores estão normalizados pelo comprimento dos animais. *: $p \leq 0.05$.

Resistência aeróbica. Na Figura 2 são demonstrados resultados semelhantes aos de função muscular no teste de resistência aeróbica máxima e no consumo máximo de oxigênio durante este exercício físico. No entanto, como foi mostrado no painel B, apenas os animais *dy* apresentaram consumo de oxigênio de repouso reduzido em relação aos animais controles.

A **B** **C**

Figura 2: Teste de resistência aeróbica (painel A), consumo de oxigênio em repouso (painel B) e consumo máximo de oxigênio durante corrida em esteira rolante (painel C) de animais controles e três modelos de distrofia muscular. O número amostral encontra-se entre parêntesis. *: $p \leq 0.05$.

Função cardíaca. A Tabela 1 apresenta os dados de função do coração, os quais apresentam resultados inferiores em todos os três modelos de distrofia muscular, especialmente os dy e os dy^{2J} , pois os animais MDX apresentaram prejuízo apenas na VTI.

Tabela 1: Dados ecocardiográficos de animais controles e três modelos de distrofia muscular. FS: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; VMPicoE: velocidade pico da onda E; VTI: integral da velocidade do fluxo aórtico. O número amostral encontra-se entre parêntesis. *: $p \leq 0.05$ versus Controle; #: $p \leq 0.05$ versus MDX; \$: $p \leq 0.05$ versus MDX e dy^{2J} .

	Controle (21)	MDX (16)	dy^{2J} (11)	dy (12)
FS (%)	24±6	27±5	19±7*	24±6
VMPicoE (m/s)	0,79±0,2	0,75±0,15	0,65±0,21*	0,52±0,12*#
VTI (cm/s)	2,17±0,4	1,7±0,47*	1,77±0,38*	1,41±0,37*\$

Gaiola metabólica. Por fim, na Figura 3 está demonstrado que os modelos de distrofia muscular estudados apresentaram menor retenção tanto de água quanto de nutrientes.

A **B** **C** **D** **E** **F**

Figura 3: Medidas obtidas em gaiola metabólica em animais controles e três modelos de distrofia muscular. O número amostral encontra-se entre parêntesis. Nos testes representados nos painéis A, B, E F os valores estão normalizados pelo comprimento dos animais. *: $p \leq 0.05$.

Discussão

A principal contribuição do presente estudo foi comparar três modelos de distrofia muscular (MDX, *dy* e *dy*^{2J}) em relação à função muscular, resistência aeróbica, função cardíaca e experimentos em gaiola metabólica - em termos gerais os animais MDX apresentam o fenótipo mais leve e os *dy* o mais grave.

Em relação à força muscular, um aspecto importante de ser comentado é que apesar de visualmente os animais MDX não apresentarem fraqueza muscular, este prejuízo funcional é evidente em todos os testes realizados. Outro aspecto importante é que nos três testes de função muscular realizados o padrão de diferenças entre os grupos foi similar, sugerindo que estes testes podem ser utilizados em estudos que envolvam estes modelos murinos de distrofia muscular. Apesar de haver diferentes estudos comparando diferentes modelos experimentais de distrofia muscular (Straub et al. 1997; Nonaka, 1998; Connolly et al., 2001; Durbeej & Campbell, 2002; Watchko et al., 2002; Vainzof et al., 2008), são raros os estudos que compararam a função muscular destes diferentes modelos em um mesmo experimento (Connolly et al., 2001).

Como foi apresentado no tempo até a exaustão no teste em esteira rolante e no consumo de oxigênio durante este teste, o mesmo padrão visto nos testes locomotores foi observado, ou seja, os animais MDX constituem o modelo de distrofia muscular com fenótipo mais leve e os *dy* o mais grave. Em

relação ao consumo de oxigênio de repouso, no entanto, apenas os animais *dy* tiveram valores estatisticamente inferiores aos animais controle. Este achado pode ter relação com a grande redução na massa corpórea e, consequentemente, no gasto energético em relação aos outros modelos. Apesar de prejuízos na capacidade aeróbica já terem sido relatados em modelos de distrofia muscular e até serem analisados em testes terapêuticos (Hudecki et al., 1993; Qiao et al., 2008), nenhum estudo comparou diferentes modelos experimentais de distrofias musculares.

Em relação à função cardíaca, três variáveis foram utilizadas: VTI, que apresenta relação com o fluxo de sangue que sai pela artéria aorta, a fração de encurtamento, um reconhecido índice de função sistólica, e a VMPicoE, a qual tem relação com o enchimento do ventrículo esquerdo. Nestes dados, os animais MDX também apresentaram menores e os *dy* maiores diferenças em relação aos animais controle. Os prejuízos funcionais cardíacos apresentados podem ajudar a explicar, pelo menos em parte, as alterações discutidas em relação à função muscular e à resistência aeróbica. Não há na literatura nenhum estudo prévio que analisou o desempenho cardíaco em diferentes modelos de distrofia muscular, apesar da disfunção cardíaca já ter sido observada em diferentes estudos relacionados a esta classe de doenças (Jasmin & Bajusz, 1962; Saito et al., 1982; Rudge & Duncan, 1988; Jung et al., 2008).

Por fim, nos experimentos em gaiola metabólica é possível perceber que os animais *dy* foram os que apresentaram menor retenção líquida e de nutrientes, o que pode contribuir, pelo menos em parte, para os níveis mais baixos de função muscular, resistência aeróbica e função cardíaca destes

animais. Por outro lado, não podemos excluir a hipótese de que a menor utilização de nutrientes é uma consequência e não uma causa da menor ativação muscular (Dupont-Versteegden et al., 1994; Mok et al. 2006; Radley et al., 2007). Não há na literatura nenhum estudo prévio que analisou tais variáveis em diferentes modelos de distrofia muscular.

É possível concluir que em termos fenotípicos os animais MDX constituem o modelo de distrofia muscular mais leve e o mais grave. Saber as magnitudes das diferenças entre estes modelos é um parâmetro importante para a escolha do grupo mais apropriado para cada pergunta experimental.

Referências bibliográficas

Anderson KD, Abdul M, Steward O. Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. *Exp Neurol* 2004; 190(1):184-91.

Blanco JE, Anderson KD, Steward O. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice. *Exp Neurol* 2007; 203(2):333-48.

Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 1978; 45(6):1009-15.

Connolly AM, Keeling RM, Mehta S, Pestronk A, Sanes JR. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in

dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin alpha2-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 2001; 11(8):703-12.

Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opin Genet Develop* 2003; 13(3):231-238.

Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2006; 10:762-773.

Dupont-Versteegden EE, Baldwin RA, McCarter RJ, Vonlanthen MG. Does muscular dystrophy affect metabolic rate? A study in mdx mice. *J Neurol Sci* 1994; 121(2):203-7.

Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(3):349-61.

Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:760-765.

Hudecki MS, Pollina CM, Granchelli JA, Daly MK, Byrnes T, Wang JC, Hsiao JC. Strength and endurance in the therapeutic evaluation of prednisolone-treated MDX mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 79(1):45-60.

Jasmin G, Bajusz E. Myocardial lesions in strain 129 dystrophic mice. *Nature* 1962; 193:181-2.

Jung C, Martins AS, Niggli E, Shirokova N. Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca^{2+} signalling and reactive oxygen species-generating pathways. *Cardiovasc Res* 2008; 77(4):766-73.

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

Li ZF, Wu X, Jiang Y, Liu J, Wu C, Inagaki M, Izawa I, Mizisin AP, Engvall E, Shelton GD. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J Neurol Sci* 2008; 264(1-2):77-86.

Mok E, Eleouet-Da Violante C, Daubrosse C, Gottrand F, Rigal O, Fontan JE. Oral glutamine and amino acid supplementation inhibit whole-body protein degradation in children with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(4):823-828.

Nonaka I. Animal models of muscular dystrophies. *Lab Anim Sci* 1998; 48(1):8-17.

Paas-Rozner M, Dayan M, Paas Y, Changeux JP, Wirguin I, Sela M, Mozes E. Oral administration of a dual analog of two myasthenogenic T cell epitopes down-regulates experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(5):2168-73.

Qiao C, Li J, Jiang J, Zhu X, Wang B, Li J, Xiao X. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Hum Gene Ther* 2008; 19(3):241-54.

Radley HG, De Luca A, Lynch GS, Grounds MD. Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(3):469-77.

Rudge MF, Duncan CJ. Ultrastructural changes in the cardiomyopathy of dystrophic hamsters and mice. *Tissue Cell* 1988; 20(2):249-53.

Saito K, Ohkura H, Kashima T, Katanasako H, Tanaka H. An electrophysiological study on the myocardium of dystrophic mice. *Experientia* 1982; 38(3):359-60.

Serradj N, Jamon M. Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j. *Behav Brain Res* 2007; 177(1):80-9.

Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139(2):375-85.

Turgeman T, Hagai Y, Huebner K, Jassal DS, Anderson JE, Genin O, Nagler A, Halevy O, Pines M. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord* 2008; 18(11):857-68.

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

Watchko JF, O'Day TL, Hoffman EP. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol* 2002; 93(2):407-17.

Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(3):520-8.

Capítulo 2. Treinamento Físico e Agonistas de AMPK e PPAR

O artigo abaixo foi submetido em 8 de novembro de 2011 para o *Journal of Applied Physiology*.

Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training improves skeletal muscle function in mdx mice

Carlos R. Bueno Júnior¹, Lucas C. Pantaleão², Patricia Chakur Brum³, Mayana Zatz¹

¹Human Genome Research Center - Institute of Biosciences, ²Department of Physiology and Biophysics - Institute of Biomedical Sciences, ³School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abbreviated title: Exercise training and its mimetics in mdx mice

Author for correspondence:

Mayana Zatz, PhD

e-mail: mayazatz@usp.br

Human Genome Research Center, Institute of Biosciences, University of São Paulo

R. do Matão, Travessa 13, 106 - Butantã - São Paulo - SP

05508-900 - Brazil

Telephone: (5511) 3091-7563

Abstract

The present investigation was undertaken to test whether exercise training (ET) associated with AMPK/PPAR agonists (EM) would improve skeletal muscle function in mdx mice. These drugs have the potential to improve oxidative metabolism. This is of particular interest because oxidative muscle fibers are less affected in the course of the disease than glycolytic counterparts. Therefore, a cohort of 34 male congenic C57Bl/6J mdx mice included in this study was randomly assigned into four groups: vehicle solution (V), EM [AICAR (50 mg/Kg⁻¹.day⁻¹, ip) and GW 1516 (2.5 mg/Kg⁻¹.day⁻¹, gavage)], ET (voluntary running on activity road) and EM+ET. Muscular strength (grip meter and rotarod), aerobic capacity (running test), muscle histopathology, serum creatine kinase (CK), levels of ubiquitinated proteins, oxidative metabolism protein expression (AMPK, PPAR, myoglobin and SCD) and intracellular calcium handling (DHPR, SERCA and NCX) protein expression were analyzed. Experiments started when the animals were two months old and were maintained for one month. A significant functional improvement ($p < 0.05$) was observed in animals submitted to the combination of ET and EM. CK levels were decreased and the expression of proteins related to oxidative metabolism was increased in this group. There were no differences among the groups in the intracellular calcium handling protein expression. To our knowledge, this is the first study that tested the association of ET with EM in an experimental model for some disease. Our results suggest that the association of ET and EM should be further tested as a potential therapeutic approach in muscular dystrophies.

Key words: GW, AICAR, dystrophy, oxidative metabolism, calcium handling

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido para testar se o treinamento físico (ET) associado com agonistas de AMPK/PPAR (EM) pode melhorar a função muscular esquelética de camundongos mdx. Estas drogas têm o potencial de melhorar o metabolismo oxidativo. Isto é de particular interesse porque as fibras musculares oxidativas são menos afetadas pela distrofia muscular do que as glicolíticas. Para isso, 34 camundongos mdx machos C57Bl/6J incluídos neste estudo foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: solução veículo (V), EM [AICAR ($50 \text{ mg/Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, ip) e GW 1516 ($2.5 \text{ mg/Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, gavagem)], ET (corrida voluntária em roda de atividade) e EM+ET. Força muscular (força de preensão e rotarod), capacidade aeróbica (teste de corrida), histopatologia muscular, creatina quinase sanguínea (CK), níveis de proteínas ubiquitinadas, e expressão protéica relacionada ao metabolismo oxidativo (AMPK, PPAR, mioglobina e SCD) e ao transiente intracelular de cálcio (DHPR, SERCA e NCX) foram analisados. Os tratamentos começaram quando os animais tinham dois meses de idade e foram mantidos por um mês. Uma melhora funcional significativa ($p < 0.05$) foi observada nos animais submetidos à combinação de ET e EM. Os níveis de CK foram reduzidos e a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo estava aumentada neste grupo. Não houve diferenças entre os grupos na expressão das proteínas relacionadas ao transiente intracelular de cálcio. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que testou a associação do ET com EM em um modelo experimental para alguma doença. Nossos resultados sugerem que a associação do ET e EM deve ser testada como uma potencial abordagem terapêutica nas distrofias musculares.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked lethal genetic disease caused by the absence of the protein dystrophin (36). This protein, localized in the plasma membrane, transmits the tension from the contractile proteins to the extracellular matrix and maintains the stability of the plasma membrane, avoiding the extrusion of intracellular constituents, including creatine kinase to blood serum, which is hallmark of the disease (26). All patients have grossly increased serum CK levels (37, 38) since birth, which decrease with the progression of the dystrophic process, reaching almost normal levels in the late stages. Affected boys are usually wheelchair-bound around age 10-12 and assisted ventilation is required in order to prolong survival after adolescence. The mdx mouse also lack muscle dystrophin and is the most widely used animal model for DMD (34).

Although many investigators suggest that exercise training is beneficial in muscular dystrophies (3, 5, 7, 11, 21, 22), others claim it has detrimental effects, which could be caused by the incapacity of the dystrophic muscle to recover after mechanical stress (6, 13, 20).

AMPK (AMP-activated protein kinase) and PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) agonists are exercise mimetics. In 2009, Miura et al. demonstrated that a PPAR agonist reduced the number of skeletal muscle fiber membrane lesions and decreased force drop due to eccentric contractions in mdx mice (24).

The aim of the present study was to verify the effect of the association of exercise training with AMPK and PPAR agonists, named exercise mimetics, in the functional performance of mdx mice. It has been demonstrated that these

drugs are able to improve the oxidative metabolism - they induce mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation (28). The improvement of the oxidative metabolism in muscular dystrophies is critical since it has been demonstrated, both in experimental models and humans, that slow oxidative muscles display reduced damage when compared to the glycolytic counterparts (25, 35). Therefore, the aim of this study was to verify whether AMPK and PPAR agonists would promote additional effect when combined with exercise training. In order to address this question, several parameters, such as functional tests, histopathology, skeletal muscle protein expression related to oxidative metabolism and calcium handling, renal function, and fat in the carcass, were analyzed in animals submitted or not to exercise.

Materials and Methods

Study Population. A cohort of 34 two-months old male congenic C57Bl/6J mdx mice were randomly assigned into four groups: vehicle solution (V), exercise mimetics (EM), exercise training (ET) and EM+ET. This study was conducted in accordance with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (www.cobea.org.br) and was approved by the University of São Paulo, Institute of Biosciences Ethical Committee (087/99). Experiments started when the animals were three months-old. One month before the EM mice received AICAR ($100 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$, ip) and GW 1516 ($5 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$, gavage) every other day and the ET animals stayed in individual cages with activity road and a cycle computer to register time and intensity of exercise. The mice were maintained in a 12:12 h dark-light cycle and temperature-controlled environment (22°C) with free access to tap water

and standard laboratory chow (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR Brazil). Before being killed, the animals stayed for 24 hours in metabolic cages for measurements of food intake, feces excretion, water intake and urine excretion. Furthermore, after a night fasting (one week before to be killed), their blood was harvested for glucose, triglycerides and cholesterol analysis (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

Functional Tests. In order to evaluate the grip force, the animals were allowed to grab onto the Grip Strength System (model: DFE-002, San Diego Instruments, San Diego, Cal, USA) with the forepaws as the experimenter gently pulled on their tails - the result is the maximal force before the animal releases the forepaws of the bar (1). For the rotarod test, the equipment (model 755, IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA) was programmed to present an initial speed of 1rpm and a final speed of 40rpm, 300 seconds later. The result is the mean time that the animal is able to stay under the gyratory road - each animal performed three trials (4, 23, 30, 33). Finally, aerobic exercise tolerance was evaluated using a graded treadmill exercise protocol for mice, as previously described (15). Briefly, after being accustomed to treadmill exercises over a week (10 min per day), mice were placed in the treadmill lane and allowed to acclimatize for at least 30 minutes. The intensity of exercise was increased by 3m/min (6-33m/min) every 3 min at 0% grade until exhaustion.

Muscle Histopathology. After the tests, the mice were killed and triceps brachialis muscle was harvested, immediately frozen in melting isopentane and stored in liquid nitrogen. The frozen muscles were cut into 10- μ m cross sections

from the proximal to distal region using a cryostat (Criostat Mícron HM505E, Walldorf, Germany). Sections of muscle were then stained with hematoxylin and eosin as previously described (10). The cross-sectional area of the fibers was evaluated at 200x magnification and further analyzed on a digitizing unit connected to a computer (Image Pro-plus, Media Cybernetic, Silver Spring, MD, USA). The cross-sectional area and the percentage of interstitium in the muscle were analyzed in blind test. In addition, serum creatine kinase was analyzed when the animals were three months old, when normal values for control animals are reported to be low (around 100 U/l) (31).

Skeletal Muscle Protein Expression. In order to evaluate aspects related to muscular structure, oxidative metabolism and calcium handling, immunoblots of triceps braquialis muscle homogenates were performed according to Bacurau et al. (2). Briefly, frozen muscles in liquid nitrogen were homogenized in a buffer containing 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 25mM HEPES (pH.7.5), 100μM PMSF, 2mM DTT, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (1:100, Sigma-Aldrich, MO, USA). Samples were loaded and subjected to SDS-PAGE in polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were electro-transferred to nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, NJ, USA). Equal loading of samples (25 μg) and even transfer efficiency were monitored using 0.5% Ponceau S staining of the blotted membrane. The blotted membrane was then incubated in a blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, and 0.1% Tween 20) for 2 h at room temperature and then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: ubiquitinated proteins (1:1000) from Santa Cruz Biotechnology;

AMPK α (1:1000) and p-AMPK α (Thr172, 1:1000) from Cell Signaling Technology; PPAR δ (1:1000), Myoglobin (1:1000) and SCD (1:1000) from Abcam; and DHPR- α 1 (1:1000), SERCA 1 (1:1000) and NCX (1:1000) from ABR Incorporation. Binding of the primary antibody was detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, 1:3000, for 90 minutes at room temperature) and developed using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ, USA) detected by autoradiography. Quantification analysis of blots was performed using Scion Image software (Scion Corporation based on NIH image).

Creatinine Clearance and Fat in the Carcass. In order to evaluate mice renal function, we evaluated creatinine clearance (14). Carcass fat was determined by its chemical analysis. Initially, carcasses stayed in a ventilated oven (70°C) for 7 days. Then, whole dry carcass was chopped up and wrapped in gauze and filter paper for determination of body fat by the solvent extraction technique using a Soxhlet apparatus and ethyl ether as solvent (9).

Statistical Analysis. All values are presented as means $\pm$ standard error (SE). One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan post-hoc test (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) were used to compare the groups. Statistical significance was considered as $p < 0.05$.

Results

Basic Parameters. As presented in the Table 1, there was no statistical difference among the groups in body weight, food intake, feces excretion, water

intake and urine excretion. In addition, the data of serum glucose and cholesterol after night fasting were similar in the groups. Only triglycerides levels were increased in the group that received exercise mimetics and exercise training when compared to the values of the vehicle group.

Functional Capacity. Figure 1 shows that the group submitted to both exercise mimetics and exercise training presented improved muscular strength (grip meter - Figure 1A and rotarod - Figure 1B) as well as aerobic capacity (running test - Figure 1C), which was statistically significant when compared to the vehicle group. Exercise mimetics only ameliorated significantly grip force (Figure 1A) and exercise training only improved significantly aerobic capacity (Figure 1C).

Skeletal Muscle Histology, Serum Creatine Kinase and Ubiquitinated Proteins. In animals that had a better functional capacity (exercise mimetics + training), skeletal muscle showed statistically increased cross sectional area (Figure 2A) associated with reduced interstitium (Figure 2B), serum creatine kinase (Figure 2C) and ubiquitinated proteins (Figure 2D) as compared to the vehicle group. Exercise training alone led to significantly augmented fibers (Figure 2A) and reduced percentage of interstitium and ubiquitinated proteins levels (Figure 2B and D), but increased levels of blood creatine kinase (Figure 2C). Exercise mimetics alone, on the other hand, statistically improved cross sectional area (Figure 2A), percentage of interstitium (Figure 2B) and levels of ubiquitinated proteins (Figure 2D), with no change on creatine kinase levels (Figure 2C).

Protein Expression Related to Oxidative Metabolism and Calcium Handling.

Since an improvement in oxidative metabolism is a proposed mechanism to explain the beneficial effects of both exercise mimetics and exercise training, we evaluated the expression of proteins related to oxidative metabolism. As observed in Figure 3, the association of both approaches increased the expression of key proteins and the activity of one of them (AMPK α), assessed by phosphorylation levels (Figure 3A-D). Interestingly, in this group the expression of SCD, a pivotal enzyme in lipogenesis, was decreased (Figure 3E) when compared to the control group. However, when we analyzed exercise training and its mimetics isolatedly, there was a significant increase only in the level of AMPK α phosphorylation in the exercise training group.

Since impaired transsarcolemmal calcium flux and sarcoplasmic reticulum calcium release/reuptake has been identified as main contributors to skeletal muscle functional and structural abnormalities (Franco & Lansman, 1990), we further investigated whether exercise mimetics and exercise training would change the expression of DHPR, SERCA and NCX. However, as shown in Figure 4, there was no statistical difference among the groups studied.

Renal Function and Fat in the Carcass. As a potential adverse effect of exercise mimetics could be an impaired renal function, we analyzed creatinine clearance. Interestingly, the exercise mimetics group displayed better renal function than the other groups (Figure 5A). There was no difference among the other groups (Figure 5A).

Finally, as both aerobic exercise training and AMPK/PPAR agonists accelerate the oxidative metabolism, an expected consequence would be a

reduction in the amount of fat in the body. In order to test this hypothesis, we analyzed the carcass fat of the animals. The results are presented in the Figure 5B. When compared to the vehicle group, all three approaches reduced the amount of fat in mice, but the group that received both exercise mimetics and exercise training showed a statistically significant decrease when compared to the groups submitted to the isolated approaches.

Discussion

The main result of the present study was that voluntary exercise training combined with AMPK/PPAR agonists improves the muscular strength and the aerobic capacity of mdx mice. Of particular interest is the fact that these functional improvements might be associated to reduced muscle degeneration (increased muscle fiber cross sectional area and diminished ubiquitinated proteins expression) and improved efficiency of the aerobic metabolism. To our knowledge, this is the first study that tested the association of exercise training with AMPK/PPAR agonists in a disease murine model.

Here we show that the association of exercise training and AMPK/PPAR agonists resulted in functional improvements related to muscular strength (grip meter and rotarod) and aerobic capacity (running test). The animals submitted only to the exercise training showed improved aerobic capacity, supporting the efficiency of the training, and the animals that received only the drugs had an improvement in the grip meter test. Our data in the running test corroborated Narkar et al. (28), who reported that the association of AICAR and exercise training improved the running capacity in control mice. On the other hand, in relation to the muscular strength, it is possible that AMPK/PPAR agonists might

increase protein synthesis through higher metabolism efficiency and reducing the need of proteolysis to generate energy by gluconeogenesis. In fact, both groups that received AMPK/PPAR agonists had decreased ubiquitinated proteins - the ubiquitination of proteins has a direct relationship with the activity of the ubiquitin-proteasome system, the main mechanism of protein breakdown in the cell (8).

We have no explanation for the apparently decreased activity in serum CK in the mimetics group. It could be due to the small sample size or to the natural fluctuation that is seen in this enzyme which might not be directly related to the dystrophic process. Creatine kinase, an enzyme localized inside muscle fibers, has its concentration increased in serum when there is muscle plasma membrane disruption, which is a hallmark in muscular dystrophies (29).

We also observed that in the group in which exercise training was associated with AMPK/PPAR agonists, there was an increased expression of AMPK, phosphorylated AMPK and PPAR δ . The exercise training group also presented increased AMPK activity evaluated by phosphorylation and these results corroborate the running test data since both groups with highest running performance presented increased AMPK activity. Additionally, it is known that mice with dysfunction in the skeletal muscle AMPK signaling present reduced running capacity (27, 32) and many studies have demonstrated that exercise training increases the AMPK activation (12, 18, 28). Finally, the group submitted to both exercise training and its mimetics displayed increased myoglobin protein expression - a protein that has pivotal importance in the storage of oxygen in the muscle cell, specially in dystrophic muscle fiber, in which myoglobin can leak from the cell cytosol due the disruption of plasma membrane (19), and

reduced levels of SCD, a key enzyme in the lipogenesis (16). In fact, in this group the levels of triglycerides were increased.

Although they were not analyzed in previous studies with AMPK/PPAR agonists (24, 28), potential adverse effects related to exercise mimetics should be monitored carefully. Interestingly, the exercise mimetics group showed improved renal function by creatinine clearance test. Finally, we showed that all strategies reduced carcass fat, but with higher magnitude in the animals submitted to both exercise training and AMPK/PPAR agonists. This result suggests increased lipolysis and generation of energy by the oxidative metabolism, which is supported by the increased serum levels of triglycerides in this group. The significance of the reduction in the carcass fat is highlighted if we consider that there was no statistical difference among the groups in body weight.

In short, a beneficial effect of combination of exercise training and AMPK/PPAR agonists was observed in mdx mice. Although exercise training alone or alternatively its mimetics showed some improvement in skeletal muscle histology and aerobic capacity of mdx mice, the combination of both strategies seems more effective. In addition, our results suggest that a favorable protein turnover (represented by decreased levels of ubiquitinated proteins and increased cross sectional area) as well an improved efficiency of the oxidative metabolism might explain, at least in part, the observed functional improvements. It will be interesting to repeat these studies in other experimental models of muscular dystrophy. Although most dystrophic patients are not able to run as the mdx mice, it would be important to test if AMPK/PPAR agonists associated to passive exercise may also be beneficial.

Grants

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - CEPID 98/14254-2), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) for funding the present research. CRBJ and LCP hold scholarship from FAPESP.

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

References

1. **Anderson KD, Abdul M, Steward O.** Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. *Exp Neurol* 190(1): 184-191, 2004.
2. **Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR Jr, Alba-Loureiro TC, Negrao CE, Casarini DE, Curi R, Ramires PR, Moriscot AS, Brum PC.** Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol* 106(5): 1631-1640, 2009.
3. **Bouchentouf M, Benabdallah BF, Mills P, Tremblay JP.** Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice. *Neurom Disord* 16: 518-529, 2006.
4. **Bueno CR Jr, Ferreira JC, Pereira MG, Bacurau AV, Brum PC.** Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *J Appl Physiol* 109(3): 702-709, 2010.
5. **Call JA, Voelker KA, Wolff AV.** Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. *J Appl Physiol* 105: 923-932, 2008.

6. **Carter GT, Abresch RT, Fowler Jr WM.** Adaptations to exercise training and contraction-induced muscle injury in animal models of muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 81: S151-S161, 2002.
7. **Carter GT, Wineinger MA, Walsh SA, Horasek SJ.** Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neurom Disord* 5: 323-332, 1995.
8. **Clague MJ, Urbé S.** Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* 143(5): 682-685, 2010.
9. **Donato J Jr, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapegui J.** Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrit* 22(5): 520-527, 2006.
10. **Dubowitz V.** Muscle biopsy: a practical approach. London: Bailliere Tindall, 1985.
11. **Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ, Katz MS.** Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. *J Appl Physiol* 77: 1736-1741, 1994.
12. **Durante PE, Mustard KJ, Park SH, Winder WW, Hardie DG.** Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein

- kinase isoforms in rat muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E178-E186, 2002.
13. **Eagle M.** Report on muscular dystrophy campaign workshop: exercise in neuromuscular diseases. *Neurom Disord* 12: 975-983, 2002.
14. **Eisner C, Faulhaber-Walter R, Wang Y, Leelahavanichkul A, Yuen OS, Mizel D, Star RA, Briggs JP, Levine M, Schnermann J.** Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int* 77(6): 519-526, 2010.
15. **Ferreira JC, Bacurau AV, Bueno CR Jr, Cunha TC, Tanaka LY, Jardim MA, Ramires PR, Brum PC.** Aerobic exercise training improves Ca^{2+} handling and redox status of skeletal muscle in mice. *Exp Biol Med* 235(4): 497-505, 2010.
16. **Flowers MT, Ntambi JM.** Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim Biophys Acta* 1791(2): 85-91, 2009.
17. **Franco A Jr, Lansman JB.** Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 344(6267): 670-3, 1990.

18. **Frøsig C, Jørgensen SB, Hardie DG, Richter EA, Wojtaszewski JF.** 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E411-E417, 2004.
19. **Garrood P, Eagle M, Jardine PE, Bushby K, Straub V.** Myoglobinuria in boys with Duchenne muscular dystrophy on corticosteroid therapy. *Neurom Disord* 18(1): 71-73, 2008.
20. **Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS.** Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neurom Disord* 10: 235-239, 2000.
21. **Hayes A, Williams DA.** Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. *J Appl Physiol* 80(2): 670-679, 1996.
22. **Hayes A, Williams DA.** Contractile function and low-intensity exercise effects of old dystrophic (mdx) mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: 1138-1144, 1998.
23. **Li ZF, Wu X, Jiang Y, Liu J, Wu C, Inagaki M, Izawa I, Mizisin AP, Engvall E, Shelton GD.** Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J Neurol Sci* 264(1-2): 77-86, 2008.

24. **Miura P, Chakkalakal JV, Boudreault L, Bélanger G, Hébert RL, Renaud J, Jasmin BJ.** Pharmacological activation of PPAR β/δ stimulates utrophin A expression in skeletal muscle fibers and restores sarcolemmal integrity in mature mdx mice. *Hum Mol Genet* 18(23): 62-73, 2009.
25. **Moens P, Baatsen PH, Marechal G.** Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil* 14: 446-451, 1999.
26. **Mozzetta C, Minetti G, Puri PL.** Regenerative pharmacology in the treatment of genetic diseases: the paradigm of muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 41(4): 701-710, 2009.
27. **Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ.** A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7: 1085-1094, 2001.
28. **Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM.** AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell* 134(3): 405-415, 2008.

29. **Ozawa E, Hagiwara Y, Yoshida M.** Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem* 190(1-2): 143-151, 1999.
30. **Serradj N, Jamon M.** Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j. *Behav Brain Res* 177(1): 80-89, 2007.
31. **Taniguti AP, Pertille A, Matsumura CY, Santo Neto H, Marques MJ.** Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- β 1 blocker. *Muscle Nerve* 43(1): 82-87, 2011.
32. **Thomson DM, Porter BB, Tall JH, Kim HJ, Barrow JR, Winder WW.** Skeletal muscle and heart LKB1 deficiency causes decreased voluntary running and reduced muscle mitochondrial marker enzyme expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E196-E202, 2007.
33. **Turgeman T, Hagai Y, Huebner K, Jassal DS, Anderson JE, Genin O, Nagler A, Halevy O, Pines M.** Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord* 18(11): 857-868, 2008.
34. **Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PCG, Martins PCM, Lopes VF, Zilberztajn D, Maia LS, Sell K, Yamamoto LU.** Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci* 34: 241-248, 2008.

35. **Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM.** Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52: 503-513, 1988.
36. **Worton RG, Thompson MW.** Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Genet* 22: 601-629, 1988.
37. **Zatz M, Frota-Pessoa O, Levy JA, Peres CA.** Creatine-phosphokinase (CPK) activity in relatives of patients with x-linked muscular-dystrophies - A Brazilian study. *Journal de Génétique Humaine* 24: 153-168, 1976.
38. **Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Rocha JML, Passos-Bueno MR, Rabbi-Bortolini E, Pavanello RCM, Peres CA.** Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activity as a function of clinical evolution in Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 102: 190-196, 1991.

Table and figures

Table 1: Basic parameters.

	V (9)	EM (8)	ET (9)	EM+ET (8)
Body weight (g)	31.4±1.1	29.2±1.1	29.4±0.7	29.9±1.2
Food intake (g/day)	3.5±0.2	4±0.1	3.5±0.2	3.6±0.1
Feces (g/day)	2.4±0.1	2.7±0.2	2.1±0.1	2.2±0.1
Water intake (g/day)	3.2±0.4	2.9±0.3	3.1±0.2	2.9±0.2
Urine (g/day)	2±0.3	1.7±0.2	1.5±0.1	1.9±0.1
Glucose (mg/dl)	90.8±4.7	100.7±5.1	83.5±6.6	97±7.3
Triglycerides (mg/dl)	140.3±19.1	170.3±13.2	172.4±22.5	231.4±25.6*
Cholesterol (mg/dl)	110.3±5.6	104.5±4.4	117.8±7.7	115.9±4.8

The number of animals in each group is shown in parentheses and the data are presented as mean ± SE. *P<0.05 versus vehicle group (V) after one-way ANOVA and Duncan post-hoc test.

Figure 1: Exercise training associated with its mimetics causes the best improvements on functional capacity in mdx mice.

Grip force (A), time until fall in the Rotarod evaluation (B) and time until exhaustion in the treadmill test (C) after one month of vehicle solution (V), exercise mimetics (EM), exercise training (ET) and EM+ET. The number of animals in each group is shown in parentheses and the data are presented as mean $\pm$ SE. *P<0.05 versus vehicle group (V) after one-way ANOVA and Duncan post-hoc test.

Figure 2: When associated with its mimetics, exercise training does not impair skeletal muscle structure in mdx mice.

Cross sectional area (A), intersticiium (B), blood creatine kinase (C) and ubiquitined proteins (D) after one month of vehicle solution (V), exercise mimetics (EM), exercise training (ET) and EM+ET. The number of animals in each group is shown in parentheses and the data are presented as mean $\pm$ SE.

* $P < 0.05$ versus vehicle group (V) after one-way ANOVA and Duncan post-hoc test.

.

Figure 3: Exercise training associated with its mimetics improves protein expression related to the oxidative metabolism.

Muscular protein expression of AMPK α (A), p-AMPK α (Thr172) (B), PPAR δ (C), Myoglobin (D) and SCD (E) after one month of vehicle solution (V), exercise mimetics (EM), exercise training (ET) and EM+ET. The number of animals in each group is shown in parentheses and the data are presented as mean $\pm$ SE.

*P<0.05 versus vehicle group (V) after one-way ANOVA and Duncan post-hoc test.

.

Figure 4: Exercise training and its mimetics do not change calcium handling protein expression.

DHPRA1 (A), SERCA 1 (B) and NCX (C) protein expression after one month of vehicle solution (V), exercise mimetics (EM), exercise training (ET) and EM+ET. The number of animals in each group is shown in parentheses and the data are presented as mean $\pm$ SE. * $P < 0.05$ versus vehicle group (V) after one-way ANOVA and Duncan post-hoc test.

Figure 5: Exercise training associated with its mimetics does not impair renal function and reduces fat in the carcass.

Creatinine clearance (A) and fat in the carcass (B) after one month of vehicle solution (V), exercise mimetics (EM), exercise training (ET) and EM+ET. The number of animals in each group is shown in parentheses and the data are presented as mean $\pm$ SE. *P<0.05 versus vehicle group (V) after one-way ANOVA and Duncan post-hoc test. \$P<0.05 versus EM and ET groups.

Capítulo 3. Células-tronco e Aminoácidos

Efeitos de células-tronco estromais humanas e suplementação com aminoácidos na função muscular, metabolismo e sobrevida de camundongos MDX

Carlos R. Bueno Júnior¹, Natássia Moreira Vieira¹, Juliana Gomes¹, Eder Zucconi¹, Patricia Chakur Brum², Mayana Zatz¹

¹Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, ²Escola de Educação Física e Esporte, Universidade of São Paulo, São Paulo, Brazil

Título abreviado: Células-tronco e aminoácidos em camundongos *mdx*

Autora para correspondência:

Mayana Zatz, PhD

e-mail: mayazatz@usp.br

Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

R. do Matão, Travessa 13, 106 - Butantã - São Paulo - SP

05508-900 - Brasil

Telefone: (5511) 3091-7563

Resumo

A terapia celular constitui uma abordagem terapêutica potencial para as distrofias musculares, pois as células-tronco podem se diferenciar em miócitos e/ou liberar fatores tróficos. A suplementação com os aminoácidos alanina e glutamina também podem favorecer a regeneração do músculo distrófico. Portanto, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito da terapia celular isolada ou combinada com a suplementação com tais aminoácidos em camundongos com distrofia muscular (MDX). O tratamento durou dos dois aos oito meses de idade, os aminoácidos foram administrados diariamente por injeção intraperitoneal ($10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e 10^6 células-tronco estromais provenientes de lipoaspiração humana foram utilizadas a cada injeção - nos dois primeiros meses de tratamento as injeções ocorreram a cada 10 dias e nos quatro meses subsequentes foram mensais. A função muscular foi avaliada pelos testes de deambulação, força de preensão e *Rotarod*; e a ingestão de ração e água, e excreção de fezes e urina por meio de gaiolas metabólicas. A glicemia de jejum e o tempo de vida também foram estudados. Apesar de nenhum tratamento gerar melhora na função muscular, os animais tratados apenas com células-tronco viveram por um tempo estatisticamente maior quando comparados aos animais não tratados e aos animais submetidos a ambas as terapias. Tais resultados justificam estudos futuros que elucidem a relação das terapias celulares com a mortalidade nas distrofias musculares.

Palavras-chave: Rotarod, *grip meter*, mortalidade, gaiola metabólica

Introdução

Degeneração muscular, prejuízos locomotores e, na maioria dos casos, morte precoce são características comuns das distrofias musculares, um grupo de doenças genéticas causadas por mutações em diferentes genes (Dalkilic & Kunkel, 2003; Davies & Nowak, 2006). Até o momento não há cura conhecida para as distrofias musculares e a utilização de células-tronco estromais potencialmente pode ser um estratégia interessante tanto pelo seu potencial de diferenciação quanto pela liberação de fatores tróficos (Kassem et al., 2004; Le Blanc & Pittenger, 2005; Caplan & Dennis, 2006).

Ao atingir o tecido muscular esquelético, tais células podem encontrar um ambiente desfavorável à regeneração, inclusive com baixa disponibilidade de aminoácidos. Além disso, tem sido demonstrado, dentre diferentes abordagens nutricionais e farmacológicas, que a combinação dos aminoácidos alanina e glutamina foi a estratégia mais efetiva para aumentar a força de animais com distrofia muscular (Granchelli et al., 2000).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da administração de células-tronco estromais humanas isoladas ou em combinação com os aminoácidos alanina e glutamina em camundongos com distrofia muscular em relação à função muscular e ao tempo de sobrevivência.

Métodos

Amostra. Camundongos C57/BL6J (controle) e MDX foram obtidos aos dois meses de idade. Estes, por sua vez, foram subdivididos em quatro grupos: salina, células-tronco, suplementação com aminoácidos, e células-tronco mais suplementação com aminoácidos. O presente estudo foi conduzido de acordo

com os princípios éticos em experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (www.cobea.org.br) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (087/99). Os camundongos foram mantidos em um ciclo claro-escuro 12: 12 h em temperatura ambiente controlada (22°C) com livre acesso à água e à ração (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil).

Terapia celular. A separação das células-tronco estromais humanas foi realizada a partir de tecido adiposo proveniente de cirurgias de lipoaspiração, com consentimento do doador. O tecido foi acondicionado em frasco estéril dentro do centro cirúrgico e transportado até o laboratório em caixas de isopor. A separação das células foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Zuk et al. (2001). Primeiramente foi realizada a lavagem do tecido adiposo com PBS (phosphate-buffered saline) contendo 100U/ml de penicilina e 100g/ml de estreptomicina, seguida pela dissociação com 0,075% colagenase (Sigma, EUA) a 37 °C por 15 minutos. A atividade da colagenase foi neutralizada por DMEM com alto teor de glicose (DMEM/High Glucose; Dulbecco's modified eagle médium, Invitrogen, EUA) contendo 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco, EUA). O infranadante foi isolado e centrifugado a 1200 x G por cinco minutos. As células do *pellet* foram plaqueadas em frascos de cultivo celular (NUNC) na concentração de 1000-3500 células/cm² em DMEM/High suplementado com 10% SFB e 100 U/ml de penicilina e 100g/ml de estreptomicina. 72 horas após o plaqueamento, as culturas foram lavadas para remoção das células mortas. As células-tronco estromais foram selecionadas pela aderência ao frasco de cultura.

As células provenientes do tecido adiposo foram cultivadas de acordo com o protocolo descrito por Zuk et al., 2001. As células foram mantidas em DMEM/High suplementado com 10% SFB até atingirem 75%-90% de confluência. As passagens foram feitas por digestão com tripsina (TripLE Express, Invitrogen, EUA) e as células plaqueadas na concentração de 5000 células/cm².

Classicamente, as células-tronco estromais expressam alguns marcadores como CD73, CD105, CD29 e CD90, porém não expressam os marcadores de células hematopoéticas (CD34, CD45 e CD117) ou endoteliais (CD31) (Barry & Murphy, 2004; Dazzi et al., 2006). Para caracterização imunofenotípica das amostras foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais fluorescentes: HLA-DR-PE, HLA-ABC-FITC, CD29-PECy5, CD73, CD90-PE, CD105-PE, CD31-PE, CD34-PerCP, CD45-FITC, e CD117-PE, todos produzidos pela BD Pharmingen (EUA). Foram utilizadas $4,0 \times 10^5$ células para cada marcador. O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas. As células foram separadas pelo *forward scatter* para eliminar os debris. Para eliminar uma possível autofluorescência das células, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas. A percentagem de células marcadas e/ou não marcadas foi calculada a partir da aquisição de 5.000 eventos celulares. A captura dos resultados foi realizada por meio do programa Guava EasyCyte System (Guava Technologies, EUA).

Foram injetadas 10^6 células por animal, por infusão sistêmica pela veia caudal (via endovenosa), pois já foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais infundidas por via endovenosa são capazes de migrar

especificamente para o sítio de lesão. Esta habilidade foi demonstrada em estudos com fraturas ósseas, infarto do miocárdio e isquemia cerebral (Barry & Mruphy, 2004; Vieira et al., 2008). Nos dois primeiros meses de tratamentos as injeções ocorreram a cada dez dias e nos quatro meses subsequentes foram mensais.

Suplementação com aminoácidos. A administração dos aminoácidos alanina ($10 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e glutamina ($10 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foi realizada diariamente por meio de injeção intraperitoneal (Granchelli et al., 2000).

Função muscular. No teste de deambulação as patas dianteiras dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica e em seguida eles foram posicionados em uma caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, oito cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para caminharem por três tentativas. Antes de terem as patas pintadas, os animais caminharam pela caixa três vezes para adaptação. Posteriormente, o comprimento das passadas foi medido (Kennel et al., 1996).

No teste de força de preensão foi utilizado o *Grip Strentgh System* (modelo DFE-002) da *San Diego Instruments* (*San Diego, Cal, USA*) com a grade não inclinada. Foram realizadas três tentativas de preensão com as patas dianteiras sem que os valores fossem considerados. Cada tentativa consistiu em tensionar o animal pela cauda, de modo que as patas dianteiras passassem por todos os arames da grade e ele se desprendesse da mesma - as patas traseiras não tocaram a grade em nenhum momento. Na sequência foram realizadas tentativas válidas e os três maiores valores de tensão

aplicados registrados em *Newton* (N) (Paas-Rozner et al., 2000; Anderson et al., 2004; Blanco et al., 2007).

Por fim, no teste do *Rotarod* o aparelho utilizado foi o modelo 755 da *IITC Life Science (Woodland Hills, CA, USA)* programado para apresentar velocidade inicial de 1rpm e velocidade final de 40rpm, alcançada 300 segundos após o início do movimento - a aceleração foi constante durante todo o experimento. Foram realizadas três tentativas por animal, com intervalo de 10 segundos entre elas, e o tempo até a queda de cada uma foi registrado (Serradj & Jamon, 2007; Turgeman et al., 2008; Li et al., 2008).

Variáveis metabólicas. Os animais permaneceram por 24h em gaiolas metabólicas (Insight Pesquisa e Ensino, Brasil) para adaptação. Na sequência, permaneceram um dia em gaiolas comuns e 24h nas mesmas gaiolas metabólicas para medição da ingestão de ração e água, e da excreção de fezes e urina (Witte et al., 2010).

DNA humano. Após incubação por 12 h em tampão de lise (10 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml Proteinase K e 0.5% SDS), o DNA do músculo tríceps braquial foi extraído, precipitado em isopropanol e quantificado em espectrofotômetro. Em seguida, 100 ng de DNA foram adicionados a um tampão para reação em cadeia da polimerase (*PCR*) com *primers* específicos para a detecção de sequências de DNA humano (Tabela 1) (Invitrogen). Usando diluições com células humanas e de camundongos, a sensibilidade para detecção de sequências de DNA humano em tecido murino é de um em 100.000. *Primers* para GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) que

amplificam tanto DNA humano quanto murino foram utilizados para confirmação da presença de DNA nas amostras (Chan et al., 2007).

Tabela 1: *Primers* para detecção de sequências de DNA humano e tanto humano quanto murino.

<i>Primer</i>	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'	Tamanho (pb)
<i>DNA humano</i>			
Microglobulina $\beta 2$	gtgtctgggttcatcaatc	ggcaggcatactcatctttt	162
HLA DQ α	gtgctgcaggtgtaaactgtaccag	cacggatccggtagcagcggtaga	242
<i>DNA humano e murino</i>			
GAPDH	atgatgacatcaagaaggtgg	ataccaggaaatgagcttgac	179

Análise estatística. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Como os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias similares (teste de Levene), os dados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) de um caminho (Statistica, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), inclusive para medidas repetidas quando oportuno. Quando necessário, o pós-teste de Duncan foi utilizado. O nível de significância adotado foi 5%.

Resultados

Função muscular. Conforme pode ser observado na Figura 1, os animais MDX apresentaram menor desempenho nos testes de função muscular tanto no pré quanto no período pós experimental - e nenhum tratamento teve efeito significativo. Em agosto de 2011 iniciamos o tratamento com células-tronco

estromais de gordura de outros 12 animais MDX (no experimento há também 12 animais MDX não tratados e 12 animais sem distrofia muscular) e até o momento vimos que o tratamento também não gerou nenhuma melhora funcional. Tais animais serão mantidos para análise do tempo de vida.

A **B** **C**

Figura 1: Testes de função muscular em animais controle e MDX. Os animais MDX foram divididos em quatro grupos: não tratados (NT), tratados com células-tronco (CT), com suplementação nutricional (S) e submetidos a ambas as abordagens terapêuticas (CT + S). Barras pretas: pré-período experimental (2 meses de idade); barras brancas: pós-período experimental (9 meses de idade). O número amostral encontra-se entre parêntesis. Nos testes representados nos painéis A e B os valores estão normalizados pelo comprimento dos animais. *: $p \leq 0.05$.

Variáveis metabólicas. É possível observar que todos os animais MDX (Figura 2E), independentemente do tratamento, apresentaram maior diferença entre a ingestão de ração e a excreção de fezes do que os animais controle.

Figura 2: Medidas obtidas em gaiola metabólica em animais controle e MDX.

Os animais MDX foram previamente (6 meses antes da realização das

medidas) divididos em quatro grupos: não tratados (NT), tratados com células-tronco (CT), com suplementação nutricional (S) e submetidos a ambas as abordagens terapêuticas (CT + S). O número amostral encontra-se entre parêntesis. Nos testes representados nos painéis A, B, E e F os valores estão normalizados pelo comprimento dos animais. *: $p \leq 0.05$.

Já na Figura 3 são apresentados os dados de glicemia após 12 horas de jejum nos animais após seis meses de tratamento. Conforme pode ser observado, os grupos MDX não tratados com células-tronco apresentaram redução dos valores glicêmicos em relação aos animais controles.

Figura 3: Glicemia após 12 horas de jejum em animais controle e MDX. Os animais MDX foram previamente (6 meses antes da realização da medida) divididos em quatro grupos: não tratados (NT), tratados com células-tronco (CT), com suplementação nutricional (S) e submetidos a ambas as abordagens terapêuticas (CT + S). O número amostral encontra-se entre parêntesis *: $p \leq 0.05$.

Sobrevida. Conforme pode ser observado na Figura 4, os animais injetados com células-tronco apresentaram maior sobrevivência do que os

grupos que receberam salina e a combinação de ambas as estratégias terapêuticas. O tempo médio de vida dos animais que receberam salina foi 550 (± 90) dias, o do grupo células-tronco 695 (± 40), o do grupo suplementação nutricional 612 (± 37) e o do grupo que combinou ambas as abordagens terapêuticas 458 (± 58).

Figura 4: Curva de sobrevivência em camundongos MDX não tratados (NT, n=5), tratados com células-tronco (CT, n=5), com suplementação nutricional (S, n=7) e submetidos a ambas as abordagens terapêuticas (CT + S, n=8). Há diferença estatística ($p=0.0465$) segundo o teste de Kaplan-Meier entre os grupos CT e NT/CT +S.

DNA humano. Como pode ser observado na Figura 5, utilizando dois *primers* diferentes, não foi encontrado DNA nos animais injetados com as células-tronco estromais provenientes de gordura de lipoaspiração - vale ressaltar que o DNA foi extraído após a morte dos animais.

Figura 5: Experimento representativo para análise da presença ou ausência de seqüências de DNA humano [painéis A (HLA DQ α) e B (microglobulina β 2)] em amostras de DNA humano (CH), camundongos MDX não injetados (S) e camundongos MDX injetados com células-tronco estromais humanas (CT e CT+S). O painel C representa os produtos de *PCR* após amplificação com *primers* que reconhecem tanto o DNA humano quanto o murino.

Discussão

O principal achado do presente estudo foi que apesar dos tratamentos (células-tronco, suplementação com aminoácidos e a combinação de ambos) não gerarem melhora na função muscular, os animais MDX tratados com células-tronco apresentaram sobrevida significativamente maior do que os animais não tratados/tratados com ambas as abordagens terapêuticas. Não há na literatura nenhum estudo que avaliou o efeito destas terapias sobre a mortalidade. Além disso, os animais que receberam células-tronco estromais humanas, isoladamente ou em combinação com a suplementação com os aminoácidos alanina e glutamina, apresentaram níveis aumentados de glicemia de jejum.

Como foi mostrado, apesar dos animais MDX apresentarem função muscular reduzida quando comparados aos animais controles em todas as avaliações realizadas, nenhuma abordagem terapêutica resultou em melhoras funcionais. Tais resultados encontram-se em desacordo com trabalhos anteriores do nosso grupo, nos quais foram observadas melhoras clínicas em camundongos de outro modelo de distrofia muscular, os animais SJL, tratados com células-tronco estromais (Vieira et al., 2008; Vieira et al., 2010; Zucconi et al., 2011). Além disso, Granchelli et al. (2000) e Mok et al. (2006), em relação à suplementação com os aminoácidos alanina e glutamina, também mostraram efeito funcional benéfico em animais MDX e pacientes com distrofia muscular de Duchenne, respectivamente.

Entretanto, é importante salientar que há uma série de diferenças entre o presente projeto e os anteriores do nosso grupo, as quais podem estar relacionadas aos resultados controversos:

- Os animais nos estudos são modelos de distrofia muscular diferentes;
- Foram utilizados testes de função muscular diferentes;
- Os animais dos estudos pertenciam a raças diferentes (Swiss x C57BL/6J);
- Foram utilizadas células-tronco provenientes de diferentes doadores.

Analisando a literatura, é possível perceber que além destes estudos do nosso grupo, não há nenhum outro que demonstrou efeito funcional benéfico de células-tronco estromais humanas em modelo experimental de distrofia muscular. Há apenas um trabalho publicado em chinês (Yang et al., 2009), que sugere melhora clínica em pacientes que receberam transplante autólogo de células-tronco estromais de medula óssea e de sangue de cordão umbilical. No entanto, a percepção subjetiva dos próprios indivíduos foi utilizada para monitorar a eficiência do tratamento. Além disso, há dois trabalhos em chinês com um paciente em cada demonstrando efeitos benéficos de células-tronco hematopoiéticas (Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2005B).

Além disso, dentre vários, há apenas outros seis trabalhos com efeitos funcionais benéficos de células-tronco adultas de diferentes naturezas em modelos animais de distrofia muscular:

1. Torrente et al. (2004) mostraram efeitos benéficos de células-tronco positivas para AC133+ (hematopoiéticas) em camundongos MDX;
2. Li et al. (2011) mostraram o efeitos benéficos de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos na função motora de camundongos com ruptura dos genes que codificam para distrofina e utrofina;

3. Dellavalle et al. (2007) mostraram efeitos positivos de pericitos (células progenitoras localizadas na parede dos vasos da musculatura esquelética) sobre a função muscular de camundongos MDX. No entanto, no artigo, em um painel da figura relacionada à avaliação funcional não há análise estatística e em todos os painéis não há concordância dos tamanhos das amostras do texto e das legendas. Por fim, há grupos com apenas três animais;
4. Sampaolesi et al. (2006) estudaram o efeito de células-tronco associadas aos vasos (mesangioblastos) em cães da raça *Golden Retriever* com distrofia muscular. Apesar do trabalho mostrar efeitos benéficos na funcionalidade dos animais tratados com tais células, esse trabalho recebeu uma série de críticas (Bretag, 2007), como o fato dos avaliadores saberem quais animais pertenciam a cada grupo, a falta de biópsia antes do início do tratamento e o fato da capacidade funcional dos diferentes grupos ser diferente antes do início do tratamento;
5. Pinheiro et al. (2011) demonstraram positivos de células-tronco mesenquimais murinas em camundongos MDX na função muscular. No entanto, o trabalho apresenta aspectos passíveis de discussão, como o fato de não apresentar os dados de um dos três grupos estudados (animais sem distrofia muscular, MDX não tratados e MDX tratados) em cinco das variáveis estudadas;
6. Rouger et al. (2011) demonstraram efeitos funcionais benéficos de células-tronco musculares caninas em cães GRMD com distrofia

muscular. No entanto, as avaliações realizadas foram qualitativas e o avaliador sabia que animais pertenciam a cada grupo por “questões práticas”, segundo os autores afirmam no manuscrito.

Por outro lado, estudos que não encontraram efeitos benéficos do tratamento com células-tronco estromais humanas em modelos experimentais (Torrente et al., 2007; Rose et al., 2008; Gang et al., 2009) citaram as seguintes possibilidades para justificar tais achados:

- O número de células que atinge o tecido-alvo geralmente é muito pequeno;
- Células humanas não teriam efeito em modelos animais;
- As células-tronco teriam dificuldade de sobreviver no “ambiente hostil” característico do músculo distrófico;
- Há a possibilidade de resposta do sistema imunológico dos animais (dos seis trabalhos enumerados acima, apenas o dois e o cinco não tinham imunossupressão associada ao tratamento com as células-tronco), apesar do conhecido efeito imuno-modulatório das células-tronco.

Além disso, um grupo de pesquisa de um dos estudos acima que mostrou efeito funcional benéfico das células-tronco em modelo de distrofia muscular escreveu uma revisão de literatura em 2010 sobre o assunto e na conclusão afirmam que, com base nos estudos até o momento, seria imprudente predizer a “cura” desta classe de doenças com a terapia celular. Os autores também afirmam que no momento as pesquisas deveriam se voltar prioritariamente para o entendimento das propriedades biológicas das células-tronco e seus efeitos parácrinos no tratamento das distrofias musculares ao invés de testar terapias com base em tentativa e erro (Quattrocchi et al., 2010).

Em relação aos dados dos experimentos na gaiola metabólica vimos que os animais MDX apresentaram valores estatisticamente maiores da diferença entre a ingestão de ração e a excreção de fezes, o que pode ser uma resposta à regeneração muscular aumentada característica do tecido muscular esquelético distrófico (Dupont-Versteegden et al., 1994; Mok et al., 2006; Radley et al., 2007).

Em relação aos dados glicêmicos, vimos que os animais MDX são hipoglicêmicos em relação aos controles e que apenas os animais tratados com as células-tronco estromais humanas não apresentaram esta redução da glicemia. Apesar de alguns estudos associarem as distrofias musculares com quadros diabéticos (Kouki et al., 2005), uma série deles demonstrou quadros hipoglicêmicos nesta doença (Shu et al., 1989; Nishio et al., 1990; Bruce et al., 1995; Ørngreen et al., 2003).

Em relação ao tempo de vida, foi observado que o grupo tratado apenas com as células-tronco estromais humanas apresentou tempo de vida estatisticamente maior quando comparado ao grupo sem tratamento e aos animais que receberam terapia celular associado à suplementação com os aminoácidos alanina e glutamina. Não encontramos na literatura nenhum estudo que avaliou o efeito da terapia celular na sobrevida. Estudos futuros devem também elucidar se a associação de células-tronco com aminoácidos não gera, por exemplo, uma sobrecarga renal em modelos experimentais de distrofias musculares, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o resultados apresentados em relação à sobrevida.

Por fim, vimos a ausência de sequências de DNA humano no tecido obtido após a morte dos animais injetados com as células-tronco, que ocorreu

em média por volta de 11 meses após a última injeção. Este resultado está em acordo com a literatura. Vieira et al. (2011), por exemplo, demonstraram a presença de distrofina humana em cães distróficos GRMD injetados com células-tronco estromais humanas seis meses após a última injeção, mas não 12 meses após o fim do tratamento.

Em conclusão, apesar de nenhuma terapia utilizada ter resultado em melhora na função muscular, os animais que receberam células-tronco estromais de tecido adiposo humano apresentaram aumento na sobrevida.

Referências bibliográficas

Anderson KD, Abdul M, Steward O. Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. *Exp Neurol* 2004; 190(1):184-91.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4):568-584.

Blanco JE, Anderson KD, Steward O. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice. *Exp Neurol* 2007; 203(2):333-48.

Bretag AH. Stem cell treatment of dystrophic dogs. *Nature* 2007; 450(7173):E23-5.

Bruce AK, Jacobsen E, Dossing H, Kondrup J. Hypoglycaemia in spinal muscular atrophy. *Lancet*. 1995; 346(8975):609-10.

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98(5):1076-1084.

Chan J, Waddington SN, O'Donoghue K, Kurata H, Guillot PV, Gothelstrom C, Themis M, Morgan JE, Fisk NM. Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mice. *Stem Cells* 2007; 25:875-884.

Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion Genet Develop* 2003; 13(3):231-238.

Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 10:762-773.

Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006; 20(3):161-171.

Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(3):255-67.

Dupont-Versteegden EE, Baldwin RA, McCarter RJ, Vonlanthen MG. Does muscular dystrophy affect metabolic rate? A study in mdx mice. *J Neurol Sci* 1994; 121(2):203-7.

Gang EJ, Darabi R, Bosnakovski D, Xu Z, Kamm KE, Kyba M, Perlingeiro RC. Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp Cell Res* 2009; 315(15):2624-36.

Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS. Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neurom Disord* 2000; 10:235-239.

Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Bas Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95(5):209-214.

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

Kouki T, Takasu N, Nakachi A, Tamanaha T, Komiya I, Tawata M. Low-dose metformin improves hyperglycaemia related to myotonic dystrophy. *Diabet Med* 2005; 22(3):346-7.

Leblanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005; 7(1):36-45.

Li Z, Liu HY, Lei QF, Zhang C, Li SN. Improved motor function in dko mice by intravenous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2011; 13(1):69-77.

Li ZF, Wu X, Jiang Y, Liu J, Wu C, Inagaki M, Izawa I, Mizisin AP, Engvall E, Shelton GD. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J Neurol Sci* 2008; 264(1-2):77-86.

Mok E, Eleouet-Da Violante C, Daubrosse C, Gottrand F, Rigal O, Fontan JE. Oral glutamine and amino acid supplementation inhibit whole-body protein degradation in children with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(4):823-828.

Nishio H, Wada H, Matsuo T, Horikawa H, Takahashi K, Nakajima T, Matsuo M, Nakamura H. Glucose, free fatty acid and ketone body metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Brain Dev* 1990; 12(4):390-402.

Ørngreen MC, Zacho M, Hebert A, Laub M, Vissing J. Patients with severe muscle wasting are prone to develop hypoglycemia during fasting. *Neurology* 2003; 61(7):997-1000.

Paas-Rozner M, Dayan M, Paas Y, Changeux JP, Wirguin I, Sela M, Mozes E. Oral administration of a dual analog of two myasthenogenic T cell epitopes down-regulates experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(5):2168-73.

Pinheiro CH, Queiroz JCF, Guimarães-Ferreira L, Vitzel KF, Nachbar RT, Sousa LGO, Souza-Jr AL, Nunes MT, Curi R. Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Stem Cell Rev and Rep* 2011.

Quattrocelli M, Cassano M, Crippa S, Perini I, Sampaolesi M. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differ* 2010; 17(8):1222-9.

Radley HG, De Luca A, Lynch GS, Grounds MD. Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(3):469-77.

Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype and do not become functional cardiomyocytes in vitro, *Stem Cells* 2008; 26:2884-2892.

Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps JY, Le Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, Theret M, Orlando P, Ledevin M, Zuber C, Leroux I, Deleau S, Guigand L, Testault I, Le Rumeur E, Fiszman M, Chérel Y. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol* 2011; 179(5):2501-18.

Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mogno P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthélémy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordinon C, Bottinelli R, Cossu G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006; 444(7119):574-9.

Serradj N, Jamon M. Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j. *Behav Brain Res* 2007; 177(1):80-9.

Shu S, Cruse RP, Redmond GP. Hypoglycemia in a child with congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 1989; 11(1):62-5.

Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, Dantona G, Cogiamanian F, Pisati F, Gavina M, Giordano R, Tonlorenzi R, Fagiolar G, Lamperti C, Porretti L, Lopa R, Sampaolesi M, Vicentini L, Grimoldi N, Tiberio F, Songa V, Baratta P, Prella A, Forzenigo L, Guglieri M, Pansarasa O, Rinaldi C, Mouly V, Butler-Browne GS, Comi GP, Biondetti P, Moggio M, Gaini SM, Stocchetti N, Priori A, D'Angelo MG, Turconi A, Bottinelli R, Cossu G, Rebull P, Bresolin N. Autologous

transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant* 2007; 16(6):563-77.

Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, Tonlorenzi R, Porretti L, Gavina M, Mamchaoui K, Pellegrino MA, Furling D, Mouly V, Butler-Browne GS, Bottinelli R, Cossu G, Bresolin N. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004; 114(2):182-95.

Turgeman T, Hagai Y, Huebner K, Jassal DS, Anderson JE, Genin O, Nagler A, Halevy O, Pines M. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord* 2008; 18(11):857-68.

Vieira NM, Bueno CR Jr, Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, Secco M, Suzuki MF, Camargo MM, Bartolini P, Brum PC, Vainzof M, Zatz M. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* 2008; 26(9):2391-8.

Vieira NM, Valadares M, Zucconi E, Secco M, Bueno Junior CR, Brandalise V, Assoni A, Gomes J, Landini V, Andrade T, Caetano HVA, Vainzof M, Zatz M. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant* 2011.

Vieira NM, Zucconi E, Bueno CR Jr, Secco M, Suzuki MF, Bartolini P, Vainzof M, Zatz M. Human multipotent mesenchymal stromal cells from distinct sources show different in vivo potential to differentiate into muscle cells when injected in dystrophic mice. *Stem Cell Rev* 2010; 6(4):560-6.

Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(3):520-8.

Yang XF, Xu YF, Zhang YB, Wang HM, Lü NW, Wu YX, Lü X, Cui JP, Shan H, Yan Y, Zhou JX. Functional improvement of patients with progressive muscular dystrophy by bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantations. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009; 89(36):2552-6.

Zhang C, Chen W, Xiao LL, Tan EX, Luo SK, Zheng D, Ye X, Li Z, Lu XL, Liu Y. Allogeneic umbilical cord blood stem cell transplantation in Duchenne muscular dystrophy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005; 85(8):522-5.

Zhang C, Feng HY, Huang SL, Fang JP, Xiao LL, Yao XL, Chen C, Ye X, Zeng Y, Lu XL, Wen JM, Zhang WX, Li Z, Feng SW, Xu HG, Huang K, Zhou DH, Chen W, Xie YM, Xi J, Zhang M, Li Y, Liu Y. Therapy of Duchenne muscular dystrophy with umbilical cord blood stem cell transplantation. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2005B; 22(4):399-405.

Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR Jr, Secco M, Jazedje T, Costa Valadares M, Fussae Suzuki M, Bartolini P, Vainzof M, Zatz M. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:715251.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2):211-228.

Conclusões

Inicialmente, por meio da comparação entre três modelos murinos de distrofia (MDX, dy^{2J} e dy) em relação à função muscular, capacidade aeróbica e dados oriundos de experimentos em gaiolas metabólicas, observou-se que os camundongos MDX constituem o modelo com fenótipo mais leve e os animais dy o fenótipo mais grave, apesar de todos apresentarem alterações significativas em relação aos animais sem distrofia muscular.

Como neste estudo inicial os animais MDX apresentaram disfunção significativa em relação aos animais controle e representam o modelo experimental da distrofia muscular mais grave e frequente, a de Duchenne, eles foram escolhidos para os dois estudos subsequentes, relacionados a abordagens terapêuticas para a doença.

No primeiro deles foi demonstrado que os animais que receberam a associação do treinamento físico em roda de atividade com drogas agonistas de AMPK e PPAR apresentaram resultados superiores em relação à função muscular quando comparados aos camundongos que receberam as abordagens terapêuticas isoladas ou não foram tratados. Esta melhora funcional, por sua vez, ocorreu em paralelo a alterações estruturais e alteração na expressão e atividade de proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo.

Por fim, no segundo conjunto de experimentos, cujas intervenções eram a terapia celular, a suplementação com aminoácidos e a combinação de ambas, foi demonstrado que apesar de nenhuma estratégia resultar em melhora funcional, os animais tratados com as células-tronco estromais provenientes de tecido adiposo humano tiveram tempo de vida estatisticamente

maior do que os animais não tratados ou tratados com ambas as estratégias terapêuticas.

Os resultados relacionados aos efeitos positivos da combinação do treinamento físico com as drogas agonistas de AMPK e PPAR, assim como o aumento da sobrevida em decorrência da terapia celular nos camundongos MDX justificam futuros estudos em outros modelos de distrofia. Os achados desta investigação científica podem contribuir para o entendimento de aspectos funcionais, histológicos, metabólicos e moleculares desta classe de doenças e também para o progresso dos estudos relacionados às intervenções direcionadas ao seu tratamento.

Resumo

As distrofias musculares são doenças genéticas causadas por mutações em diferentes genes caracterizadas por degeneração muscular, prejuízos locomotores e, geralmente, morte precoce. Dentre elas, a de Duchenne, causada por mutações no gene que codifica para a proteína distrofina, é a mais comum e grave, tendo os camundongos MDX como modelo experimental mais utilizado. O objetivo do presente estudo foi testar quatro abordagens terapêuticas potenciais neste modelo animal, divididas em dois experimentos: 1. treinamento físico voluntário em roda de atividade e/ou drogas agonistas das proteínas AMPK e PPAR em dias alternados (AICAR: 100 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, ip; GW 1516: 5 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, gavagem); 2. células-tronco estromais humanas provenientes de lipoaspiração (um milhão a cada injeção intravenosa; uma injeção a cada 10 dias nos dois primeiros meses de tratamento e injeções mensais nos quatro meses subsequentes) e/ou suplementação com os aminoácidos alanina e glutamina (10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, injeção diária intraperitoneal). Em relação ao primeiro experimento, o principal achado foi que os animais submetidos ao treinamento físico associado às drogas apresentaram índices de função muscular superiores aos outros grupos. Já em relação ao segundo grupo de análises, foi observado que os animais submetidos à terapia celular apresentaram tempo de vida significativamente maior quando comparados aos animais não tratados e aos tratados com ambas as terapias. Tais resultados, nunca demonstrados previamente pela literatura científica, podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia das distrofias musculares e para o avanço de potenciais abordagens terapêuticas.

Abstract

Muscular dystrophies are genetic diseases caused by mutations in different genes. They are characterized by muscle degeneration, motor prejudices and, generally, early death. Among them, Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common and severe form and it is caused by mutations in the dystrophin gene. The most widely used animal model of DMD is the MDX mouse. The aim of this study was to test four potential therapeutic approaches assigned in two experiments: 1. voluntary exercise training in activity road and/or AMPK and PPAR agonists drugs every other day in MDX mice (AICAR: 100 mg.Kg⁻¹.day⁻¹, IP; GW 1516: 5 mg.Kg⁻¹.day⁻¹, gavage); 2. Intravenous injection of stromal stem cells from human adipose tissue (10⁶ cells every 10 days in the first two months and monthly injections in the following four months) and/or alanine and glutamine amino acids supplementation (10 mg.Kg⁻¹.day⁻¹, daily IP injections). In the first experiment we demonstrated that mdx mice submitted to exercise training associated to drugs presented improved muscle function when compared to the other groups. In the second experiment, on the other hand, it was observed that the animals submitted to cell therapy presented increased survival when compared to non injected animals and animals treated with both approaches. These results, here demonstrated for the first time, can contribute to understand the physiopathology of muscular dystrophies and may give insights for future therapeutic approaches.

Referências Bibliográficas

BITTNER, R. E.; ANDERSON, L. V.; BURKHARDT, E.; et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 141-142, 1999.

BOUCHENTOUF, M.; BENABDALLAH, B. F.; MILLS, P.; TREMBLAY, J. P. Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, p. 518-529, 2006.

BULFIELD, G.; et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 81, p. 1189-1192, 1984.

CALL, J. A.; VOELKER, K. A.; WOLFF, A. V.; et al. Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, p. 923-932, 2008.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.

CARTER, G. T.; ABRESCH, R. T.; FOWLER JR, W. M. Adaptations to exercise training and contraction-induced muscle injury in animal models of muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, p. S151-S161, 2002.

CARTER, G. T.; WINEINGER, M. A.; WALSH, S. A.; HORASEK, S. J.; et al. Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 5, p. 323-332, 1995.

CHOUMERIANOU, D. M.; DIMITRIOU H.; KALMANTI, M. Stem cells: promises versus limitations. **Tissue Engineering**, v. 14, p. 53-60, 2008.

COVAS, D. T.; SIUFI, J. L.; SILVA, A. R.; ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

DALKILIC, I.; KUNKEL, L. M. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 3, p. 231-238, 2003.

DAVIES, K. E.; NOWAK, K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 762-773, 2006.

DEASY, B. M., et al. Tissue engineering with muscle-derived stem cells. **Biotechnology**, v. 15, p. 419-423, 2004.

DUBOWITZ, V. Neuromuscular disorders in childhood - Old dogmas, new concepts. **Archives of Disease in Childhood**, v. 50, p. 335-346, 1975.

DUCHENNE, G. B. De l'Electrisation Localisee et son Application d la Pathologie et d la Therapeutique, 2nd ed., p. 353. Ballleire et Fils, Paris, 1861.

DUCHENNE, G. B. Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myosclerosique. **Archives Générales de Médecine**, v. 11, p. 5-16, 1968.

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

EAGLE, M. Report on muscular dystrophy campaign workshop: exercise in neuromuscular diseases, Newcastle, January 2002. **Neuromuscular disorders**, v. 12, p. 975-983, 2002.

FERNANDES, D.; et al. The stem cells as a potential treatment for neurodegeneration. **Methods in Molecular Biology**, v. 399, p. 199-213, 2007.

GRANCHELLI, J. A.; POLLINA, C.; HUDECKI, M. S. Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 10, p. 235-239, 2000.

HANKARD, R.; HAMMOND, D.; HAYMOND, M.; DARMANN, D. Oral glutamine slows down whole body protein breakdown in Duchenne muscular dystrophy. **Pediatric Research**, v. 43, p. 1-5, 1998.

HANKARD, R.; MAURAS, N.; HAMMOND, D.; HAYMOND, M.; DARMAUN, D.

Is glutamine a 'conditionally essential' amino acid in Duchenne muscular dystrophy? **Clinical Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 365-369, 1999.

HAYES, A.; WILLIAMS, D. A. Beneficial effects of voluntary wheel running on

the properties of dystrophic mouse muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 2, p. 670-679, 1996.

HAYES, A., WILLIAMS, D. A. Contractile function and low-intensity exercise

effects of old dystrophic (mdx) mice. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 274, p. 1138-1144, 1998.

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.;

TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v. 6, n. 6, p. 543-553, 2004.

JAZEDJE, T.; PERIN, P. M.; CZERESNIA, C. E.; MALUF, M.; HALPERN, S.;

SECCO, M.; BUENO, D. F.; VIEIRA, N. M.; ZUCCONI, E.; ZATZ, M. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, p. 7:46, 2009.

JEPSON, M.; BATES, P.; BROADBENT, P.; PELL, J.; MILLWARD, D. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 255, p. E166-E172, 1988.

KAPSA, R.; KORNBERG A. J.; BYRNE, E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Lancet Neurology**, v. 2, p. 299-310, 2003.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 95, n. 5, p. 209-214, 2004.

KASTENBERG, Z. J.; ODORICO, J. S. Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. **Transplantation Reviews**, v. 22, p. 215-222, 2008.

LEBLANC, K.; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy**, v. 7, n. 1, p. 36-45, 2005.

LEE, M. W.; CHOI, J.; YANG, M. S.; MOON, Y. J.; PARK, J. S.; KIM, H. C.; KIM, Y. J. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 1, p. 273-278, 2004.

MCLOON, L. K., et al. Myogenic precursor cells in craniofacial muscles. **Oral Diseases**, v.13, p. 134-140, 2007.

MEIER, H.; SOUTHARD, J. L. Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy-locus. **Life Sciences**, v. 9, p. 137-144, 1970.

MERYON, E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. **Medico-Chirurgical Transactions**, v. 35, p. 73-80, 1852.

MOK, E.; CONSTANTIN, B.; et al. L-glutamine administration reduces oxidized glutathione and MAP kinase signaling in dystrophic muscle of mdx mice. **Pediatric Research**, v. 63, p. 268-273, 2008.

MOK, E.; VIOLANTE, C. E.; DAUBROSSE, C.; et al. Oral glutamine and amino acid supplementation inhibit whole-body protein degradation in children with Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 823-828, 2006.

MOZZETTA, C.; MINETTI, G.; PURI, P. L. Regenerative pharmacology in the treatment of genetic diseases: the paradigm of muscular dystrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 4, p. 701-710, 2009.

NARKAR, V. A.; DOWNES, M.; YU R. T.; et al. AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. **Cell**, v. 134, p. 405-415, 2008.

NOWAK, K. J.; DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **EMBO Reports**, v. 5, n. 9, p. 872-876, 2004.

PHILPOT J, BAGNALL A, KING C, DUBOWITZ V, MUNTONI F. Feeding problems in merosin deficient congenital muscular dystrophy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 80, p. 542-547, 1999.

RICHTER, E. A.; KIENS, B.; WOJTASZEWSKI, J. F. P. Can exercise mimetics substitute for exercise? **Cell metabolism**, v. 8, n. 2, p. 96-98, 2008.

SADAT, S.; GEHMERT, S.; SONG, Y. H.; YEN, Y.; BAI, X.; GAISER, S.; KLEIN, H.; ALT, E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 3, p. 674-679, 2007.

SECCO, M.; et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, p. 146-150, 2008.

SEO, B. M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J.; YOUNG, M.; ROBEY, P. G.; WANG, C. Y.; SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-155, 2004.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**, v. 20, n. 13, p. 1692-1708, 2006.

SUNADA, Y.; BERNIER, S. M.; UTANI, A.; et al. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. **Human Molecular Genetics**, v. 4, p. 1055-1061, 1995.

VAN DEUTEKOM, J. C.; VAN OMMEN, G. J. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 10, p. 774-783, 2003.

VENTER, J. C.; et al 2003. A part of the human genome sequence. **Science**, v. 299, p. 1183-1184, 2003.

VIEIRA, N. M.; BUENO JUNIOR, C. R.; BRANDALISE, V.; MORAES, L. V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; SUZUKI, M. F.; CAMARGO, M. M.; BARTOLINI, P.; BRUM, P. C.; VAINZOF, M.; ZATZ M. Sjl dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2391-2398, 2008.

WALLACE, G. Q.; MCNALLY, E. M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. **Annual Review of Physiology**, v. 71, n. 7, p. 7-21, 2008.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

YU, M.; XIAO, Z.; SHEN, L.; LI, L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. **British Journal of Haematology**, v. 124, n. 5, p. 666-675, 2004.

ZUK PA; ZHU M; MIZUNO H; HUANG J; FUTRELL JW; KATZ AJ; BENHAIM P; LORENZ HP; HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

Biografia

Formação acadêmica/titulação

2007 - 2009 Mestrado em Educação Física, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Orientadora: Dra. Patricia Chakur Brum. Título da dissertação: Efeito do treinamento físico na expressão de proteínas que transportam Ca^{2+} e participam do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} na musculatura esquelética em modelo experimental de insuficiência cardíaca

2003 - 2006 Graduação em Educação Física, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

2000 - 2002 Ensino Médio, Escola Estadual Monsenhor Mário Araújo Guimarães, Carmo do Rio Claro, MG, Brasil

1992 - 1999 Ensino Fundamental, Escola Estadual Geraldo de Andrade Vilela e Escola Estadual Monsenhor Mário de Araújo Guimarães, Carmo do Rio Claro, MG, Brasil

Produção bibliográfica

Livro

BUENO JUNIOR, C. R. Fisiologia - um novo conceito em livro didático. São Paulo: Scortecci, 2011. ISBN 978-85-366-2380-1.

Capítulo de livro

MOREIRA, J. B. N.; VOLTARELLI, V. A.; BOZI, L. H. M.; BUENO JUNIOR, C. R.; BRUM, P. C. Adaptações fisiológicas ao treinamento físico aeróbio. In: PINTO, A. L. S.; Gualano, B.; LIMA, F. R.; ROSCHEL, H. Exercício Físico nas Doenças Reumatológicas, Editora Sarvier, 2011.

Artigos científicos

BUENOR JUNIOR, C. R., PANTALEÃO, L. C., BRUM, P. C., ZATZ, M. Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training improves skeletal muscle function in mdx mice. Journal of Applied Physiology (submetido).

BUENO JUNIOR, C. R., PINHEIRO, C. H. BACURAU, A. V. N., CURI, R., BRUM, P. C. Mild food restriction in mice is associated with impaired skeletal muscle function and calcium handling protein expression. Clinics (submetido).

YAMADA, A. K., VERLENGIA, R., BUENO JUNIOR, C. R. Myostatin: genetic variants, therapy and gene doping. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (submetido).

ZANCHI, N. E., FERREIRA, L. G., FILHO, M. A. S., BUENO JUNIOR, C. R., LIRA, F. S., GERLINGER, F., FELITTI, V., LANCHÁ JUNIOR, A. H. Leucine supplementation in energy-restricted but not in dexamethasone-treated rats allows muscle sparing and glucose homeostasis. Amino Acids (submetido).

PANTALEÃO, L. C., TEODORO, G. F. R., TORRES-LEAL, F. L., VIANNA, D., PAULA, T. D., MATOS-NETO, E. M., TRINDADE, M., ROGERO, M. M., BUENO JUNIOR, C. R., TIRAPEGUI, J. Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway activity in skeletal muscle of weaning rats. *British Journal of Nutrition* (submetido).

CUNHA, T., BUENO JUNIOR, C. R., MOREIRA, J. B., CAMPOS, J., BACURAU, A. V. N., PAIXÃO, N., FERREIRA, J. C. B., BRUM, P. C. Aerobic exercise training up-regulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *Journal of Applied Physiology* (revisores solicitaram alterações).

YAMADA, A. K., VERLENGIA, R. BUENO JUNIOR, C. R. Mechanotransduction pathways in skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2011.

VIEIRA, N. M., VALADARES, M., ZUCCONI, E., SECCO, M., BUENO JUNIOR, C. R., BRANDALISE, V., ASSONI, A., GOMES, J., LANDINI, V., ANDRADE, T., CAETANO, H. V., VAINZOF, M., ZATZ, M. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplantation*. 2011 Oct 14. [Epub ahead of print].

METAIRON, S., ZAMBONI, C. B., SUZUKI, M. F., BUENO JUNIOR, C. R., SANT'ANNA O. A. Elemental analysis of biological tissues of animal models in

muscular dystrophies investigation. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2011 Jun 19. [Epub ahead of print].

ZUCCONI, E., VIEIRA, N. M., BUENOR JUNIOR, C. R., SECCO, M., JAZEDJE, T., VALADARES, M. C., SUZUKI, M. F., BARTOLINI, P., VAINZOF, M., ZATZ, M. Pre-clinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal-cells in different animal models for muscular dystrophy. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011:715251. Epub 2011 Jul 15.

BUENO JUNIOR, C. R. Prescrição do exercício físico personalizada geneticamente. Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício. 2011;5(26):88-89.

CARMO, E. C., BUENO JUNIOR, C. R., FERNANDES, T., BARRETI, D., SILVA JUNIOR, N. D., MELO, S. F., UCHIDA, M. C., BRUM, P. C., OLIVEIRA, E. M. O papel do esteróide anabolizante sobre a hipertrofia e força muscular em treinamentos de resistência aeróbia e de força. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 2011;17(3):212-217.

VIEIRA, N. M., ZUCCONI, E., BUENO JUNIOR, C. R., SECCO, M., SUZUKI, M. F., BARTOLINI, P., VAINZOF, M., ZATZ, M. Human multipotent mesenchymal stromal cells from distinct sources show different in vivo potential to differentiate into muscle cells when injected in dystrophic mice. Stem Cells Reviews and Reports. 2010;6(4):560-566.

BUENO JUNIOR, C. R., FERREIRA, J. C. B., BACURAU, A. V. N., PEREIRA, M. G., BRUM, P. C. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca^{2+} handling-related proteins expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *Journal of Applied Physiology*. 2010:109(3):702-709.

LARA, A., DAMASCENO, D. D., PIRES, R., GROS, R., GOMES, E. R., GAVIOLI, M, LIMA, R. F., GUIMARÃES, D., LIMA, P., BUENO JUNIOR, C. R., VASCONCELOS, A., ROMAN-CAMPOS, D., MENEZES, C. A., SIRVENTE, R. A., SALEMI, V. M., MADY, C., CARON, M. G., FERREIRA, A. J., BRUM, P. C., RESENDE, R. R., CRUZ, J. S., GOMEZ, M. V., PRADO, V. F., DE ALMEIDA, A. P., PRADO, M. A., GUATIMOSIM, S. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Molecular and Cellular Biology*. 2010:30(7):1746-1756.

BUENO JUNIOR, C. R., PEREIRA, M. G. Biologia molecular como ferramenta no esporte de alto rendimento: possibilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*. 2010:31(3):231-249.

MIYABARA, E., CONTE, T., BAPTISTA, I. L., BUENO JUNIOR, C. R., FIAMONCINI, J., LAMBERTUCCI, R. H., SERRA, C. S., BRUM, P. C., PITHON-CURI, T. C., CURI, R., AOKI, M. S., OLIVEIRA, A. C., MORISCOT, A. S. Mammalian target of rapamycin complex is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo. *Muscle & Nerve*. 2010:42(5):778-787.

FERREIRA, J. C., BACURAU, A. V. N., BUENO JUNIOR, C. R., CUNHA, T. F., TANAKA, L. Y., JARDIM, M. A., RAMIRES, P. R., BRUM, P. C. Exercise training improves Ca^{2+} handling and redox status in skeletal muscle. *The Journal of Biochemistry* (Maywood). 2010;235(4):497-505.

ZUCCONI, E., VALADARES, M. C., VIEIRA, N. M., BUENO JUNIOR, C. R., SECCO, M., JAZEDJE, T., SILVA, H. C. A., VAINZOF, M., ZATZ, M. Ringo: Discordance between the molecular and clinical manifestation in a Golden Retriever Muscular Dystrophy dog. *Neuromuscular Disorders*. 2010;20(1):64-70.

SOUSA, L. G. O., BUENO JUNIOR, C. R., SANTANA, M. C., MOURA, M. A. Estudo transversal de variáveis antropométricas e da aptidão física de mulheres idosas do Recife-PE. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*. 2010;9(2):121-133.

PEREIRA, M. G., FERREIRA, J. C. B., BUENO JUNIOR, C. R., BRUM, P. C. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *European Journal of Applied Physiology*. 2009;105(6):843-50.

COELHO, D. F., BENATTI, F. B., GUALANO, B., SILVA, H., BUENO JUNIOR, C. R., FERNANDES, T., LANCHI JUNIOR, A. H. Exercise training attenuates lipectomy-induced impaired glucose tolerance in rats. *Endocrine Regulations*. 2009;43(3):107-116.

BACURAU, A. V. N., JARDIM M. A., FERREIRA, J. C. B., BECHARA, L. R., BUENO JUNIOR, C. R., ALBA-LOUREIRO, T., NEGRÃO, C. E., CASARINI, D., CURI, R., RAMIRES, P. R., C. R., MORISCOT, A. S., BRUM P. C. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(5):1631-1640.

CUNHA, T. F., BUENO JUNIOR, C. R., MATTOS, K. C., BRUM, P. C. Resposta taquicárdica e balanço autonômico no exercício físico em modelo experimental de insuficiência cardíaca. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2009;15(4):260-263.

BUENO JUNIOR, C. R. Relevância e tratamento das lesões características da insuficiência cardíaca na musculatura esquelética. *Revista Medicina (Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP - Universidade de São Paulo)*. 2009;42(4): 437-450.

YAMADA, A. K., BUENO JUNIOR, C. R. Células satélites e atividade física: um exemplo de transferência dos conhecimentos básicos para a prática profissional. *Brazilian Journal of Science and Movement*. 2009;17(1):78-99.

MATTEONI, S. P. C., BUENO JUNIOR, C. R., TEIXEIRA, L. R. Efeito de um programa de condicionamento físico no broncoespasmo induzido pelo exercício

em mulheres obesas. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 2009;15(3):190-194.

VIEIRA, N. M., BUENO JUNIOR, C. R., BRANDALISE, V., MORAES, L. V., ZUCCONI, E., SECCO, M., SUZUKI, M. F., CAMARGO, M. M., BARTOLINI, P., BRUM, P. C., VAINZOF, M., ZATZ, M. Sjl dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. Stem Cells. 2008;26(9):2391-2398.

CONTE, T. C., FRANCO, D. V., BAPTISTA, I. L., BUENO JUNIOR, C. R., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., BRUM, P. C., MORISCOT, A. S., MIYABARA, E. H. Radicicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. Toxicon. 2008;52(1):146-55.