Priscila Clara Calyjur

Efeitos da mutação *mdx* no *background* 129/Sv

São Paulo

2015

Priscila Clara Calyjur

Efeitos da mutação *mdx* no *background* 129/Sv

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

Orientador(a): Mariz Vainzof

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Calyjur, Priscila C.

Efeitos da mutação *mdx* no *background*

129/Sv

89p.

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

1. *mdx* 2. Perfil de expressão 3. Efeito
modificador. Universidade de São Paulo. Instituto
de Biociências. Departamento de Biologia -
Genética.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Mariz, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e sempre me deu todo o apoio.

Agradeço também à Lydia e à Martinha que compartilharam comigo conhecimentos fundamentais.

Também agradeço a todos os meus companheiros de laboratório que sempre me ajudaram muito: André, Antônio, Áurea, Camila, Danielle, Leo, Letícia, Marina, Paula, Poliana, Renata e Stephanie. Sem esquecer de outros colegas que de um jeito ou de outro também participaram desse processo: Fernando, Meire, Naila, Simone, Vanessa Naomi, Vanessa Sato e Wagner.

Um agradecimento especial vai para minha família que sempre me apoiou em minhas escolhas e decisões e ainda mais especialmente para minha mãe, que tornou possível que eu pudesse estudar por todos esses anos.

Por fim agradeço ao CEPID, FAPESP, INCT, CNPq e FINEP pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento dessa pesquisa.

Lista de siglas

CDG – complexo distrofina-glicoproteínas associadas

DG – distroglicana

DMD – distrofia muscular de Duchenne

DNA – ácido desoxirribonucleico

GDE – genes diferencialmente expressos

mRNA – RNA mensageiro

OPN – osteopontina

RNA – ácido ribonucleico

SG – sarcoglicana

Sgcd – delta sarcoglicana

Sgcg – gama sarcoglicana

Índice

Introdução

1. O músculo estriado esquelético	08
2. A miogênese	09
3. Proteínas musculares	10
4. As distrofias musculares	11
5. Degeneração e regeneração	12
6. O camundongo <i>mdx</i>	13
7. Correlações genótipo-fenótipo	14
7.1. Variabilidade fenotípica	14
7.2. Efeito modificador	15
8. Estudos de expressão gênica	16

Objetivos

1. Objetivos específicos	18
--------------------------------	----

Materiais e Métodos

1. Animais	19
2. Cruzamentos	19
3. Genotipagem	20
4. Avaliações funcionais	20
5. Análises estatísticas	21
6. Histologia	21
7. Perfil de expressão gênica total (<i>Microarray</i> de expressão)	22
7.1. Extração do RNA	22
7.2. Preparação das amostras e hibridização nos chips.....	22
7.3. Análise dos dados	22

Resultados

1. Animais obtidos nas diferentes gerações	23
2. Avaliações funcionais	23
3. Análises histológicas	27
4. Estudos de expressão gênica (<i>Microarray</i> de expressão)	28

4.1. Extração e qualidade do RNA	28
4.2. Verificação da qualidade dos dados	29
4.3. Identificando genes diferencialmente expressos (GDEs)	32
4.3.1. Comparação dos <i>backgrounds</i> C57BL e 129/Sv	34
4.3.2. Comparação dos dois modelos de <i>mdx</i>	34
4.3.3. Comparação dos dois modelos de <i>mdx</i> (genes de músculo)	37
4.3.3.1. Análise dos genes que deixaram de ser expressos no <i>mdx</i> ¹²⁹ F3 em relação ao <i>mdx</i> ^{C57BL}	40
4.3.3.2. Análise dos GDEs somente em 129/Sv x <i>mdx</i> ¹²⁹ F3	40
4.3.3.3. Análise dos GDEs somente em <i>mdx</i> ^{C57BL} x <i>mdx</i> ¹²⁹ F3	41
4.3.4. Comparação do aumento do background 129/Sv nas gerações de <i>mdx</i> ¹²⁹	42
Discussão	44
Conclusão	52
Resumo	53
Abstract	54
Anexos	55

Introdução

1. O músculo estriado esquelético

Os músculos estriados esqueléticos são órgãos especializados na geração de movimento e força. São formados por feixes de fibras alongadas, cilíndricas e multinucleadas, que apresentam estriações transversais. O músculo é dividido em compartimentos revestidos de tecido conjuntivo: a camada mais externa, que envolve um músculo todo é chamada epimísio; deste partem septos chamados perimísio que se dirigem para o interior do músculo dividindo-o em feixes; do perimísio também partem septos, chamados endomísio, que envolvem cada fibra individualmente. Os núcleos ficam localizados na periferia da fibra, logo abaixo do sarcolema (Junqueira e Carneiro, 2004) (Figura 1).

Figura 1: Representação gráfica do músculo estriado esquelético. Modificado de: (Andersen, Schjerling e Saltin, 2000).

No citoplasma da fibra muscular, são encontradas as miofibrilas, formadas por miofilamentos, principalmente filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina. As estriações no músculo são devidas a repetições desses miofilamentos que formam os sarcômeros, as unidades contráteis do músculo (Junqueira e Carneiro, 2004) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática de um sarcômero mostrando seus principais componentes. Disponível em: <http://www1.imperial.ac.uk/nhli/molecular/et/>

Existem dois tipos principais de fibras que compõem os músculos dependendo da demanda funcional de cada um. As fibras do tipo 1 são chamadas de fibras de contração lenta, ricas em mioglobina e enzimas oxidativas e são especializadas para atividades contínuas. As fibras do tipo 2 são fibras de contração rápida, caracterizadas pelo metabolismo glicolítico e especializadas para atividades que exigem rápida mudança de ritmo (paradas bruscas ou arranques) (Schiaffino e Reggiani, 2011).

2. A miogênese

Em vertebrados, o músculo esquelético tem origem em células precursoras nos somitos, os quais são, inicialmente, esferas de células epiteliais cilíndricas. Células da porção ventral dos somitos darão origem ao esclerótomo, tecido precursor para a formação da coluna vertebral. As células do epitélio dorsal dos somitos formam o chamado dermomiótomo, que dará origem à pele e ao músculo esquelético (Figura 2). Células no dermomiótomo expressam os fatores de transcrição Pax3 e Pax7 (*paired box transcription factors*). Conforme essas células migram para formar o miótomo, iniciam a expressão de MyoD e Myf5 (*basic helix-loop-helix transcriptional activators*) e simultaneamente perdem a expressão de Pax3 e Pax7 (Reshef, Maroto e Lassar, 1998). Essas células expressando MyoD e Myf5 são chamadas de mioblastos. Os mioblastos saem do ciclo celular para se tornar miócitos terminalmente diferenciados que expressam Miogenina e Myf6 e subsequentemente irão expressar genes músculo-específicos, como cadeia pesada de miosina e creatina quinase muscular. Finalmente, os miócitos mononucleados fundem-se uns com outros para formar a fibra contrátil.

Figura 3: Representação gráfica da derivação das células precursoras musculares durante a embriogênese do camundongo. Modificado de: (Hawke e Garry, 2001).

Durante o desenvolvimento do músculo, uma subpopulação distinta de células musculares não se diferencia, mas permanece associada à superfície da miofibrila como células satélites quiescentes (Chen e Goldhamer, 2003). Em resposta a estímulos, como danos musculares, essas células tornam-se ativas, passam a expressar marcadores miogênicos e diferenciam-se em mioblastos, os quais podem fundir-se a fibras pré-existentes causando hipertrofia ou podem fusionar-se uns com os outros para formar novas fibras, recapitulando o que acontece durante a miogênese (Hawke e Garry, 2001).

3. Proteínas musculares

O músculo conta com diversas proteínas com funções estruturais, sinalizadoras e contráteis. Dentre os muitos complexos proteicos presentes no músculo, o complexo distrofina-glicoproteínas associadas (CDG) merece destaque por seu envolvimento em várias doenças neuromusculares.

O CDG (Figura 4) é um complexo de multisubunidades formado por proteínas periféricas e integrais de membrana expressas no músculo esquelético (Yoshida e Ozawa, 1990; Ervasti e Campbell, 1993). Sua função é fazer a ligação entre o citoesqueleto de actina no interior da fibra com a matriz extracelular através das interações entre suas proteínas (Ervasti e Campbell, 1993). Essas proteínas são divididas em três subcomplexos: distrofina-sintrofina, distroglicanas (DG) e sarcoglicanas (SG)-sarcospan (Cohn e Campbell, 2000). O subcomplexo distroglicano compreende as proteínas α -DG e β -DG. O subcomplexo sarcoglicano é formado por α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG e ε -SG (Hack, Groh e McNally, 2000).

Figura 4. Representação gráfica do CDG mostrando as ligações entre as proteínas e entre o citoesqueleto e a matriz extracelular. Modificado de:(Khurana e Davies, 2003).

A distrofina total – 427 kDa – é expressa nos músculos esquelético e cardíaco e no cérebro e possui quatro domínios: uma região N-terminal, um domínio central em bastão, um domínio rico em cisteína e uma região C-terminal (Koenig, Monaco e Kunkel, 1988). A região N-terminal interage com a F-actina (Rybakova, Amann e Ervasti, 1996) enquanto seu domínio C-terminal interage com a β -DG (Jung *et al.*, 1995). A β -DG interage com a α -DG, a qual se liga à laminina por sua cadeia $\alpha 2$ e esta faz conexões com componentes da matriz. Desta forma, o CDG promove a ligação entre as proteínas internas da fibra muscular e a matriz extracelular (Ervasti e Campbell, 1993).

4. As distrofias musculares

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética, levando ao desenvolvimento de fraqueza muscular e perda de capacidade motora.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), de herança recessiva ligada ao cromossomo X, é a mais comum, afetando 1 em cada 3500 meninos nascidos vivos (Emery, 1993). Os sinais clínicos iniciam-se entre 3-5 anos de idade, com quedas frequentes, dificuldade para subir escadas, correr e levantar do chão. O confinamento em cadeira de rodas se dá até os 12 anos de idade e os afetados raramente sobrevivem após a terceira década de vida (Zatz, Vainzof e Passos-Bueno, 2001).

A doença é causada por mutações no gene da distrofina. Cerca de 60% das mutações são causadas por deleções, entre 5-6% dos casos, são duplicações, e nos casos restantes, são mutações de ponto. Essas mutações mudam o quadro de leitura do mRNA, resultando na ausência total da proteína no músculo (Koenig *et al.*, 1989).

A ausência de distrofina na DMD resulta na deficiência secundária dos componentes do CDG. Como consequência, ocorre a instabilidade desse complexo, e as fibras musculares ficam mais suscetíveis ao estresse mecânico causado pela contração muscular, levando ao processo de degeneração (Ervasti e Campbell, 1993).

Figura 5. Características histológicas de músculo normal (A) e músculo distrófico (B).

5. Degeneração e regeneração

A degeneração muscular acontece devido a diversos fatores, entre eles estresse mecânico excessivo, substâncias químicas e doenças degenerativas. Depois do trauma os resíduos de fibras danificadas são removidos por células do sistema imune e ocorre a ativação das células satélites (Hiroki *et al.*, 2011). As células satélites ativadas se proliferam eventualmente sofrendo divisão assimétrica: uma célula mãe dará origem a duas células filhas, uma idêntica a ela que retomará a quiescência mantendo o *pool* (auto-renovação) e uma que se comprometerá com a diferenciação miogênica (Tedesco *et al.*, 2010). Estas então migrarão para o local da lesão onde se fusionarão à fibra existente ou se alinharão para formar uma nova fibra. Na fibra recém-formada os núcleos inicialmente estão localizados de forma central, mas migrarão para a periferia com o amadurecimento da mesma (Saini *et al.*, 2009) (Figura 5).

Figura 6. Representação gráfica da regeneração muscular pelas células satélites (Saini *et al.*, 2009).

6. O camundongo *mdx*

Modelo murino para DMD, o camundongo *mdx* (C57BL/10ScSn-*Dmd*^{*mdx*}) foi identificado em uma colônia de C57BL/10ScSn enquanto (Bulfield *et al.*, 1984) buscavam mutantes para atividade enzimática de glicólise. Esses animais apresentavam altos níveis das enzimas piruvato e creatina quinase e esse fenótipo segregava como uma mutação recessiva ligada ao X. Observações histológicas revelaram lesões musculares similares às encontradas em pacientes com distrofia muscular: variação no tamanho das fibras, núcleos centrais, degeneração de fibras e infiltração de células fagocíticas.

A base molecular da mutação do camundongo *mdx* foi caracterizada como uma mutação de ponto, C3185T, no exon 23 do gene da distrofina, que resulta em um códon de parada prematuro (Sicinski *et al.*, 1989).

Entretanto, a distrofia muscular nesses animais é muito mais branda do que nos pacientes humanos. Sua expectativa de vida é similar à de camundongos normais e são capazes de se reproduzir (Bulfield *et al.*, 1984).

No músculo esquelético do camundongo *mdx* a necrose está ausente antes da segunda semana de vida, se tornando ativa entre a terceira e a oitava semanas e diminuindo progressivamente permanecendo em baixa intensidade pelo resto da vida do animal (Torres e Duchon, 1987; Mcgeachie *et al.*, 1993; Roig *et al.*, 2004).

Roig *et al.* (2004) estudaram as mudanças patológicas no grupo muscular gastrocnêmio do *mdx* durante sua vida e identificaram três fases principais em sua doença:

1) fase pré-necrose muscular: do nascimento à terceira semana de vida; 2) fase de máxima necrose: de três semanas a um mês e meio de vida e 3) fase estável: após três meses de vida, quando a necrose começa a diminuir progressivamente permanecendo estável.

Todas essas características fazem do camundongo *mdx* um bom modelo genético e molecular para DMD, mas não um bom modelo funcional.

7. Correlações genótipo-fenótipo

7.1. Variabilidade fenotípica

Muitas características herdadas de modo Mendeliano podem ter fenótipos variantes. São diferenças na idade de manifestação, gravidade dos sintomas e em outras características fenotípicas. A variabilidade fenotípica é frequentemente descrita tanto em humanos quanto em animais e ainda é pouco compreendida.

Em relação às distrofinopatias, diversos estudos relataram que pacientes com a mesma mutação no gene da distrofina apresentavam grande variabilidade fenotípica (Beggs *et al.*, 1991; Muntoni, Torelli e Ferlini, 2003; Chakkalakal *et al.*, 2005; Strober, 2006).

Tal variabilidade também já foi descrita em pacientes com outras distrofias. (Mcnally *et al.*, 1996) descreveram uma família com quatro irmãos portadores da mesma mutação ($\Delta 521$ -T) no gene que codifica a γ -sarcoglicana. Três desses irmãos perderam a capacidade de ambulação por volta dos 15 anos de idade, enquanto que o irmão mais novo, aos 8 anos apresentava apenas hipertrofia das panturrilhas sem fraqueza muscular evidente.

O modelo animal canino para DMD, o *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD) também apresenta variações. Em 2009 foi relatado o caso de Ringo, um GRMD nascido em 2003 que à época do relato era capaz de correr, pular, se apoiar nos membros posteriores, tinha força suficiente para abrir portas e foi capaz de se reproduzir naturalmente (Zucconi *et al.*, 2010).

Em 2006, Dubowitz relatou o caso de um menino de quase 5 anos de idade com diagnóstico confirmado de DMD que, entretanto, é capaz de correr, pular, se manter apoiado em uma só perna e subir e descer escadas. Ao levantar do chão ele se apoia minimamente no joelho e quando deitado, tem uma leve dificuldade de levantar a cabeça. Fora esses mínimos sintomas, o sinal mais visível da doença são suas panturrilhas proeminentes (Dubowitz, 2006).

7.2. Efeito modificador

Diferenças no fenótipo podem ter causas genéticas, pela ação de genes modificadores. Evidências do efeito modificador vêm de uma série de variações fenotípicas que não podem ser explicadas pelos alelos do gene da doença ou por fatores ambientais em famílias com doenças humanas e linhagens isogênicas de camundongos com diferentes *backgrounds* (Nadeau, 2001).

Estudos recentes feitos em grupos de pacientes com DMD e fenótipos variantes identificaram o polimorfismo rs28357094 no gene da osteopontina (SPP1) o qual se provou ser um modificador de DMD. O alelo G mutante foi associado a maior fraqueza e perda de ambulação mais precoce em duas coortes diferentes de pacientes com DMD (Pegoraro *et al.*, 2011).

Em animais de laboratório, o efeito modificador é geralmente atribuído ao *background* genético das linhagens estudadas.

(Heydemann *et al.*, 2005) realizaram estudos com camundongos *knockout* para γ -sarcoglicana em quatro linhagens diferentes: C57BL, 129, DBA e CD1. Foram verificadas a permeabilidade da membrana, fibrose e foi realizado um teste de atividade locomotora. Em todos os testes, a linhagem DBA apresentou os piores resultados, demonstrando que essa mutação nessa linhagem causa redução de massa muscular, defeitos de permeabilidade de membrana e maior infiltração de tecido fibroso do que nas outras linhagens. Nesse mesmo estudo, por causa da alta similaridade de aminoácidos entre Sgcg e Sgcd, foram comparados animais nulos para δ -sarcoglicana nos *backgrounds* 129 e C57BL. Não houve diferenças fenotípicas entre C57 Sgcg(-/-) e C57 Sgcd(-/-), mas o fenótipo dos animais 129 Sgcd(-/-) foi mais grave que os animais 129 Sgcg(-/-).

(Lima *et al.*, 2010) observaram as alterações fenotípicas de uma variante mg Δ do modelo para síndrome de Marfan em duas linhagens murinas distintas, C57BL/6 e 129/Sv. Aos 3 meses, os animais mg Δ /129/Sv apresentaram alterações pulmonares mais graves que os mg Δ /C57BL, cujas alterações só foram consideradas graves aos 6 meses. Ainda aos 3 meses, os animais no background 129/Sv também apresentaram alterações vasculares mais graves que os do background C57BL na mesma idade. Estes só foram apresentar o mesmo grau de gravidade aos 9 meses. O mesmo aconteceu com as alterações esqueléticas, que foram desenvolvidas pelos mg Δ /129/Sv com menos idade do que os mg Δ /C57BL. Outro fato em relação às duas linhagens foi a homogeneidade de fenótipos entre os animais de

background C57BL e a grande variabilidade entre os animais de background 129/Sv. Por exemplo, aos 3 meses, em relação às alterações vasculares, 60% dos animais *mgΔ/129/Sv* foram considerados assintomáticos e 40% com fenótipo moderado. Já aos seis meses, os assintomáticos diminuíram para 33%, enquanto os animais com fenótipo grave contavam 66%. Portanto, a depender da linhagem de camundongos, uma mesma mutação pode apresentar fenótipo variável.

8. Estudos de expressão gênica

Os defeitos genéticos primários das distrofias musculares são bem conhecidos, entretanto, os processos moleculares que levam à degeneração do músculo ainda são mal compreendidos. A análise da expressão gênica em larga escala permite indagar quanto às diferenças entre as vias moleculares patofisiológicas no músculo distrófico e as vias moleculares no músculo normal. O que se espera tendo um perfil completo do mRNA é que mudanças correlatas em diferentes mRNAs possam destacar o envolvimento de determinados sistemas regulatórios (Haslett e Kunkel, 2002). Existem diversos estudos utilizando o *microarray* de expressão para determinar o perfil do transcriptoma tanto de pacientes DMD quanto de camundongos *mdx*. As plataformas e os métodos estatísticos utilizados são diferentes entre os diversos estudos, gerando listas únicas de genes mas com sobreposições entre elas. Também é importante ressaltar que mudanças na expressão gênica não necessariamente implicam em mudanças nas concentrações das proteínas correspondentes, assim como mudanças nas proteínas podem não estar refletidas na expressão do mRNA no momento do estudo.

Em estudos feitos com pacientes de DMD, concluiu-se que os resultados moleculares refletem o que é observado nos estudos histológicos. A maioria dos genes diferencialmente expressos (GDEs) se encontravam superexpressos, um reflexo do *turnover* proteico decorrente do processo de regeneração. Entre os GDEs também foram encontrados genes relacionados ao remodelamento da matriz extracelular e relacionados à sinalização (Haslett *et al.*, 2002; Haslett *et al.*, 2003).

Outro estudo foi feito com pacientes de DMD, porém na fase inicial da doença, ou fase assintomática. Novamente a maioria dos GDEs se encontra superexpressa, entre eles, genes ligados à resposta inflamatória e ao remodelamento da matriz extracelular. Concluiu-

se que os genes são modulados de forma similar tanto na fase inicial da doença, quanto em fases mais tardias (Pescatori *et al.*, 2007).

Os estudos com *mdx* variam de acordo com a idade dos animais, a plataforma e os métodos estatísticos utilizados, bem como os objetivos de cada estudo.

Em estudo publicado em 2000, Tkatchenko e colaboradores (Tkatchenko *et al.*, 2000) verificaram o perfil de expressão dos músculos da perna e do diafragma de camundongos *mdx* de 3 meses de idade. A maioria dos GDEs se encontra superexpressa em ambos os grupos musculares. Genes relacionados ao metabolismo energético apresentam subexpressão, enquanto genes ligados ao crescimento e diferenciação celular se encontram superexpressos. Entre eles, foi destacado o gene *Igf2*, que pode estar envolvido no processo hipertrófico desses animais. Em relação à homeostase de íons, a superexpressão do gene que codifica a proteína sarcolipina pode ser responsável pelo menor acúmulo de Ca^{2+} no retículo endoplasmático. Genes relacionados à organização muscular também apresentam superexpressão, num reflexo direto da proliferação e diferenciação celular constantes que ocorre nesses animais. Ainda foram categorizados genes envolvidos em processos proteolíticos e de resposta e sistema imune.

Boer e colaboradores (2002) investigaram o transcriptoma de *mdx* durante o processo de regeneração. Novamente a maioria dos genes envolvidos se mostrou superexpressa e os processos mais proeminentes são os ligados a regeneração, inflamação e proteólise. O estudo conclui que a regeneração ativa se dá provavelmente pelo recrutamento de fatores de regulação miogênicos, fatores de crescimento e de remodelamento da matriz extracelular.

Turk e colaboradores (2005) também examinaram a regeneração do *mdx* através do perfil de expressão gênica. Foi observado que os genes que codificam componentes do CDG estão geralmente subexpressos no *mdx*. Vários genes com possíveis funções na regeneração foram estudados mais detalhadamente e a maioria deles atingiu o pico de superexpressão na idade de 8 semanas, quando, de fato, ocorre o máximo de regeneração. Comparando esses dados com dados de pacientes DMD, estes têm poucos genes relacionados a regeneração ativados, indicando que este processo é menos eficiente em humanos.

Objetivos

Considerando o fenótipo benigno do camundongo *mdx*, e a dificuldade de avaliar melhoras funcionais em protocolos terapêuticos, o objetivo deste estudo é o de gerar um camundongo *mdx* no *background* 129/Sv e verificar se a inserção desta mutação em outro perfil gênico poderia levar a manifestações fenotípicas mais graves e mais precoces, mais condizentes com os observados em pacientes de DMD.

Objetivos específicos

- Através de cruzamentos sucessivos, introduzir a mutação *mdx* na linhagem 129/Sv;
- Avaliar funcionalmente os animais *mdx*¹²⁹ em diferentes gerações comparando-os com *mdx*^{C57Bl} para verificar possíveis diferenças funcionais;
- Realizar estudo histológico para determinar a morfologia muscular, com o intuito de estabelecer os efeitos da mutação *mdx* no *background* 129/Sv;
- Estudar a expressão gênica global através de *microarray* de expressão de RNA para determinar genes diferencialmente expressos.

Material e métodos

1. Animais

Os camundongos 129/Sv foram adquiridos do biotério do ICB – USP e os animais *mdx* são provenientes do biotério do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB – USP, onde todos foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura, com livre acesso a água e comida. Todos os experimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências conforme documento anexo.

2. Cruzamentos

Para transferir a mutação *mdx* do *background* C57Bl para o *background* 129/Sv, fêmeas *mdx* foram cruzadas com machos 129/Sv. A geração F1 é constituída de machos afetados e fêmeas portadoras, seguindo as proporções mendelianas. As fêmeas portadoras de F1 são retrocruzadas com os machos 129/Sv e a geração F2 é formada por: machos normais e afetados; fêmeas normais e portadoras, também de acordo com as proporções mendelianas. A partir dessa geração, faz-se necessária a genotipagem para a identificação dos animais de interesse. As fêmeas identificadas como portadoras em F2 foram retrocruzadas com os machos 129/Sv e a geração F3 procedente foi genotipicamente idêntica à F2 (Figura 7).

Figura 7. Heredograma ilustrando os cruzamentos realizados bem como as proles obtidas.

A cada geração, o *background mdx* diminui em 50%, segundo o protocolo clássico e não considerando eventos de recombinação (Wakeland *et al.*, 1997). Na tabela abaixo se encontram as porcentagens de cada background em cada geração de acordo com os critérios já citados.

Geração	Background C57BL (%)	Background 129/Sv (%)
F1	50	50
F2	25	75
F3	12,5	87,5
F4	6,25	93,75
F5	3,12	96,87
F6	1,56	98,43
F7	0,78	99,21
F8	0,39	99,60
F9	0,19	99,80
F10	0,09	99,89
F11	0,04	99,94
F12	0,02	99,97

Tabela 1. Porcentagens de cada *background* a cada geração não considerando eventos de recombinação.

Portanto, para considerar que houve mudança de *background*, é necessário repetir os retrocruzamentos por pelo menos 10 gerações. Foram realizados 3 cruzamentos obtendo assim 3 gerações de animais com diferentes proporções de background 129/Sv. Não houve cruzamentos subsequentes devido à discordância dos resultados das avaliações funcionais com o objetivo inicial do estudo.

3. Genotipagem

O DNA genômico é extraído de fragmento de cauda por incubação *overnight* em solução de extração (100mM Tris HCl, pH 8,5; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl) e proteinase K (10mg/mL).

A genotipagem é feita através de PCR, utilizando protocolo previamente descrito (Shin *et al.*, 2011).

4. Avaliações funcionais

Todos os machos afetados obtidos em cada uma das 3 gerações foram avaliados mensalmente por 6 meses, utilizando animais *mdx*^{C57BL} para fins comparativos. Os testes realizados foram:

- Resistência nos membros anteriores: o animal é posicionado suspenso pelos membros anteriores em barra de metal de 3mm de espessura e é medido o tempo em que o mesmo se mantém suspenso (Chiavegatto *et al.*, 2000). Consideramos 60 minutos como tempo máximo de teste e são feitas 3 tentativas sucessivas, das quais é calculada uma média.

- Resistência nos quatro membros: posiciona-se o animal suspenso pelos 4 membros em barra de metal de 3mm e conta-se o tempo em que o mesmo permanece suspenso (Chiavegatto *et al.*, 2000). Também consideramos 60 minutos como tempo máximo de teste e também são feitas 3 tentativas sucessivas, das quais é calculada uma média (Figura 8A).

- Força nos membros anteriores (*grip strength*): o animal é posicionado de modo que agarre a grade anexada a um dinamômetro com os membros anteriores e é puxado pela cauda até que se solte. São feitas 5 medições sucessivas, são consideradas as três maiores e então é tirada uma média (Chiavegatto *et al.*, 2000) (Figura 8B).

- Força nos membros posteriores (*grip strength*): o animal é posicionado de modo que agarre a grade anexada ao dinamômetro com os membros posteriores e é puxado pela cauda até que solte. Também são feitas 5 medições sucessivas, são consideradas as três maiores e então é tirada uma média (Chiavegatto *et al.*, 2000).

Figura 8: A) Exemplo dos testes de resistência (suspensão na barra). B) exemplo do teste de força nos membros anteriores (*grip strength*).

5. Análises estatísticas

As análises estatísticas das avaliações funcionais foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney no software *Minitab* (*Minitab Inc.*), e $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significante.

6. Histologia

Após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, o músculo gastrocnêmio foi dissecado, fixado em blocos de cortiça com TissueTec O.C.T. (Qiagen), crioprotégido com talco e congelado em nitrogênio líquido. Os blocos foram posteriormente cortados em criostato em seções de 6µm de espessura, fixados em lâminas de vidro cobertas de polilisina e corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

7. Perfil de expressão gênica total (*Microarray de expressão*)

7.1. Extração do RNA

Para os estudos de transcriptoma, foram utilizados 5 animais Dmd^{mdx} e 3 animais mdx¹²⁹ de cada geração (F1, F2 e F3), na idade de 6 meses. O RNA total dos músculos da parte posterior da perna foi extraído utilizando o *RNeasy Microarray Tissue Mini Kit (Qiagen)* segundo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop em 260nm. A pureza foi avaliada pela razão A₂₆₀/A₂₈₀, sendo consideradas adequadas as amostras que apresentaram essa razão entre 1,7 e 2,1. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%. Amostras contaminadas por DNA foram tratadas com RNase e purificadas por precipitação por etanol.

7.2. Preparação das amostras e hibridização nos chips

As amostras foram preparadas utilizando os kits *Ambion® WT Expression* e *GeneChip® WT Terminal Labeling (Invitrogen)* e hibridizadas nos chips *GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)*.

7.3. Análise dos dados

Os resultados foram pré-analisados no programa *Expression Console™ (Affymetrix)*, onde é possível verificar os controles de qualidade e realizar a normalização dos dados através do algoritmo RMA (*Robust Multi-array Average*). Os dados normalizados passaram por análise no programa *MeV* onde foi utilizado o algoritmo SAM para determinar os genes diferencialmente expressos (GDEs). Para estudar os genes selecionados, foi utilizado o programa IPA (*Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com*) que indica as funções e possíveis relações entre os genes tendo como base dados da literatura. Nesse programa também é possível aplicar filtros específicos para melhor direcionar as análises e identificar aqueles

que, segundo artigos publicados, agem em determinado tecido, órgão, sistema, entre outros. A análise de enriquecimento de funções do *Gene Ontology (GO)* foi feita com a ferramenta *DAVID (Database for Annotation, Visualuzation and Integrate Discovery, [HTTP://david.abcc.ncifcrf.gov/](http://david.abcc.ncifcrf.gov/))*.

Resultados

1. Animais obtidos nas diferentes gerações

Na primeira geração (F1), foram obtidos 9 animais machos afetados. Em F2, o número de machos afetados foi de 13 animais, e em F3, esse número foi de 14 animais. Doravante, por questões práticas, esses animais serão chamados de mdx^{129} , ou serão referidos pela sua geração e os animais mdx serão chamados de mdx^{C57Bl} .

2. Avaliações funcionais

Todos os machos afetados obtidos nas 3 gerações foram submetidos às avaliações funcionais previamente descritas, as quais foram realizadas mensalmente por um período de 6 meses. Tendo como base o número de 9 animais afetados da geração F1, foram avaliados 9 animais mdx^{C57Bl} para comparação. As tabelas com os dados obtidos para cada animal em cada idade estão na seção de material complementar. O tempo que o animal fica suspenso na barra é dado em segundos (s) e a força é dada em Newtons (N).

Nos testes de resistência nos membros anteriores, os animais mdx^{129} de F1 se mostraram mais resistentes que os camundongos mdx . O correto posicionamento do animal na barra foi muito difícil, pois eles eram capazes de suspender o corpo facilmente e prender os membros posteriores na barra. Ainda assim, os resultados tiveram significância apenas nas idades de 2, 4 e 5 meses (Gráfico 1).

Nos testes de resistência e equilíbrio nos quatro membros também foi notada maior resistência dos mdx^{129} quando comparados aos mdx^{C57Bl} , mas só houve significância aos 2, 4 e 6 meses de idade (Gráfico 2).

Nos testes de força dos membros dianteiros (*grip strength*), os mdx^{129} também obtiveram resultados superiores aos mdx^{C57Bl} e novamente, os resultados só foram significativos em algumas idades. Quando avaliamos os membros traseiros, os resultados foram menos significativos e os valores entre os dois grupos de animais foram mais parecidos (Gráficos 3A e 4A).

Na segunda geração (F2), observamos que os mdx^{129} mostram um aumento significativo de desempenho em todos os testes, quando comparados aos animais mdx^{C57Bl} . Nos testes de resistência de 2 e 4 membros, vemos que os animais mdx^{129} conseguem

permanecer na barra por todo o tempo do teste, 60 segundos, e os valores foram significativos para todas as idades (Gráficos 1B e 2B). Também observamos aumento da força desses animais em comparação com os *mdx*^{C57Bl} (Gráficos 3B e 4B).

Observando os resultados dos testes da geração F3, confirmamos o aumento progressivo tanto da resistência quanto da força dos animais *mdx*¹²⁹.

Nos testes de resistência na barra, tanto em 2 quanto em 4 membros, os animais foram capazes de se manter suspensos por todo o tempo do teste sem demonstrar fadiga nem dificuldade (Gráficos 1C e 2C). Nos testes de força, os *mdx*¹²⁹ também tiveram resultados maiores que os *mdx*^{C57Bl} e progressivamente maiores que F1 e F2 (Gráficos 3C e 4C).

Para uma melhor visualização, os dados foram plotados nos gráficos abaixo.

Gráfico 1. Gráficos dos testes de resistência em dois membros das gerações F1, F2 e F3, (A, B e C respectivamente), em relação aos animais *mdx*.

Gráfico 2. Gráficos dos testes de resistência em quatro membros das gerações F1, F2 e F3, (A, B e C respectivamente), em relação aos animais *mdx*.

Gráfico 3. Gráficos dos testes de força nos membros anteriores das gerações F1, F2 e F3, (A, B e C respectivamente), em relação aos animais *mdx*.

Gráfico 4. Gráficos dos testes de força nos membros posteriores das gerações F1, F2 e F3, (A, B e C respectivamente), em relação aos animais *mdx*.

Abaixo se encontram os níveis de significância (p valor) obtidos por análise não paramétrica (teste de *Mann-Whitney*) comparando cada grupo de animais, mdx^{129} versus mdx^{C57Bl} , nos diferentes testes, idades e gerações (Tabela 2).

		p (barra 2 membros)	p (barra 4 membros)	p (Grip anteriores)	p (Grip posteriores)
F1	30 dias	0,0633	0,2325	0,0303	0,015
	2 meses	0,0265	0,0053	0,4517	0,0132
	3meses	0,6583	0,1333	0,0467	0,0133
	4 meses	0,003	0,0004	0,0026	0,0631
	5meses	0,0035	0,0926	0,6265	0,5955
	6 meses	0,1704	0,0303	0,0047	0,1221
F2	30 dias	0	0	0,0001	0,0001
	2 meses	0,0001	0	0,0041	0,0001
	3meses	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	4 meses	0,0013	0,0026	0,0711	0,0001
	5meses	0,0004	0,0026	0,0011	0,0008
	6 meses	0,0001	0,0011	0,0111	0,0083
F3	30 dias	0	0	0,0001	0,0002
	2 meses	0,0005	0	0,0001	0,0001
	3meses	0	0	0,0001	0,0001
	4 meses	0	0	0,0022	0,0006
	5meses	0	0	0,0004	0,0001
	6 meses	0	0	0,0006	0,0001

Tabela 2. Valores de p obtidos por análises não paramétricas na comparação entre animais mdx^{C57Bl} e mdx^{129} em cada geração e nas diferentes idades.

3. Análises histológicas

Aos 21 dias, a musculatura do mdx^{C57Bl} já mostra sinais de regeneração, o que pode ser constatado pelas fibras centronucleadas de pequeno calibre. Nos animais mdx^{129} das três gerações a musculatura se encontra bastante conservada, com núcleos periféricos e fibras de tamanho homogêneo (Figura 9).

Aos 3 meses pode se observar que tanto os animais mdx^{C57Bl} quando os animais mdx^{129} apresentam a musculatura bastante afetada, com focos de degeneração e regeneração intensa, como pode ser visto pelas fibras centronucleadas de tamanhos diversos.

Aos 6 meses, houve estabilização entre os processos degenerativos e regenerativos na musculatura do mdx^{C57Bl} . Entretanto, nos animais mdx^{129} , ainda é possível encontrar os focos de regeneração.

Figura 9. Animais de 21 dias. A) mdx^{C57BL} , B) mdx^{129} F1, C) mdx^{129} F2, D) mdx^{129} F3

4. Estudos de expressão gênica (*Microarray*)

4.1. Extração e qualidade do RNA

Todas as amostras produziram quantidades adequadas de RNA total e razão A_{260}/A_{280} dentro do esperado, entre os valores 1,7 e 2,1. Na avaliação da integridade do RNA por gel de agarose 1% todas as amostras se mostraram íntegras. Aquelas contaminadas por DNA passaram pelo tratamento já descrito (Figura 10).

Figura 10. Exemplo de um gel de agarose 1% para determinar a pureza e a integridade do RNA. A banda que indica contaminação por DNA se encontra acima da banda 28S. A integridade é determinada pela ausência de arrastes entre as bandas 28S e 18S.

4.2. Verificação da qualidade dos dados

A pré-análise dos dados obtidos pela leitura dos chips é feita no programa *Expression Console* (Affymetrix) e consiste de vários controles de qualidade e da normalização dos dados.

O primeiro controle de qualidade consiste da imagem das lâminas, obtida no momento do escaneamento dos chips. As imagens devem ser homogêneas, indicando hibridização em toda a extensão da lâmina. Além disso, deve se verificar as áreas de hibridização do controle Oligo B2, que servirá como um guia para que o software desenhe uma grade sobre a imagem para delimitar a área do chip e para identificar a localização das sondas (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Exemplo de imagem de uma lâmina. A) visão geral da lâmina toda com 4% de seu tamanho original. Deve se notar a área escura retangular no centro da lâmina que é característica dos chips de expressão de camundongos. B) região da lâmina em 100% do tamanho original. Cada ponto indica uma sonda.

Figura 12. Exemplo das áreas de hibridização do controle Oligo B2. Deve-se notar o contorno da área do chip em padrão alternado, bem como pequenos *clusters* também em padrão alternado nos cantos do chip e distribuídos por sua superfície. O nome do chip também deve estar presente.

O próximo passo é verificar a qualidade das reações de amplificação e hibridização. O parâmetro *perfect mean* (*pm_mean*) é a média de intensidade bruta de todas as sondas na lâmina e está relacionado ao *background mean* (*bgrd_mean*), que é a intensidade bruta das sondas utilizadas para calcular o *background*. Os valores de *bgrd_mean* devem ser menores que os valores de *pm_mean*. O contrário indica reações de baixa qualidade. Todas as amostras utilizadas atenderam a esse critério (Figura 13).

Figura 13. Gráfico de *bgrd_mean* e *pm_mean* de todas as amostras analisadas.

O valor “positivos *versus* negativos” (*pos_vs_neg_auc*), compara os sinais entre os controles positivos (medida de positivos verdadeiros) e controles negativos (medida de falsos positivos). Valores próximos de 1,0 indicam separação perfeita entre os controles, já valores iguais ou abaixo de 0,5 indicam a não separação dos mesmos. Foi possível constatar a boa separação dos controles em todas as amostras analisadas, já que os valores ficaram entre 0,90 e 0,92 (Figura 14).

Figura 14. Gráfico de *pos_vs_neg_auc* de todas as amostras analisadas.

O próximo controle de qualidade consiste na análise das intensidades dos controles de hibridação que devem aparecer em valores crescentes na ordem *BioB*, *BioC*, *BioD* e *Cre*; e Poli-A os quais também devem aparecer em valores crescentes na ordem *Lys*, *Phe*, *Dap* e *Thr*. Todas as amostras analisadas mostraram os valores na ordem correta, indicando boa qualidade (Figura 15).

Figura 15. Gráfico dos controles Poly-A e de hibridação de todas as amostras analisadas.

O histograma da intensidade de sinal das sondas também é um controle de qualidade. Seu formato deve ser parecido ao de uma curva normal, o que atesta a qualidade dos chips. O histograma das amostras analisadas se mostrou dentro dos padrões esperados (Figura 16).

Figura 16. Histograma de intensidade de sinal para de todas as amostras analisadas.

Além disso, a análise do *Relative Signal Box Plot* confirma a semelhança no padrão de intensidade entre os chips. As médias dos *box plots* devem ser zero ou muito próximas de zero, o que foi possível observar em todas as amostras analisadas (Figura 17).

Figura 17. *Box plot* de todas as amostras analisadas.

4.3. Identificando genes diferencialmente expressos (GDEs)

Os resultados de cada pré-análise do *Expression Console* foi então transferida para o software *Mev*, onde foi aplicado um filtro inespecífico de variância para que fossem retirados da análise os genes que não variam entre as amostras. Este filtro foi configurado para fazer um *ranking* dos genes baseado no desvio padrão e então manter apenas 50% dos genes com maior variação. Desta forma, dos 35556 genes iniciais, foram considerados apenas os 17778 genes (50%) com maior variância.

Para a seleção dos GDEs foi usado o método estatístico *SAM (Significance Analysis of Microarrays)*. Como parâmetros, foram utilizadas 5000 permutações e mediana do número de falso positivos igual a zero para cada análise.

Cada comparação resulta em uma lista de dados que é então visualizada no programa *IPA (Ingenuity Systems Inc.)*, no qual é possível verificar quem são os GDEs, além de filtrar as listas de dados, fazer comparações entre elas e identificar redes funcionais entre os genes selecionados. Para tornar a análise mais direcionada, foi aplicado um filtro para músculo esquelético nas listas de GDEs geradas. Os filtros do IPA são baseados em dados encontrados na literatura, dessa forma pode-se restringir a análise a genes que, segundo artigos publicados, têm ação em determinado tecido, tipo celular, espécie, entre outros.

A tabela abaixo mostra os números de GDEs encontrados em cada comparação (número total e após a aplicação do filtro) e quantos deles se encontram super ou subexpressos (Tabela 3 e gráfico 13):

	Mapeados			Filtro músculo		
C57BL x 129/Sv	44	↑ 11 ↓ 33	25% 75%	13	↑ 1 ↓ 12	8% 92%
C57BL x <i>mdx</i> ^{C57BL}	371	↑ 320 ↓ 51	86% 14%	135	↑ 107 ↓ 28	79% 21%
129 x <i>mdx</i> ¹²⁹ F1	145	↑ 143 ↓ 2	99% 1%	65	↑ 65	100%
129 x <i>mdx</i> ¹²⁹ F2	207	↑ 200 ↓ 7	97% 3%	89	↑ 88 ↓ 1	99% 1%
129 x <i>mdx</i> ¹²⁹ F3	137	↑ 130 ↓ 7	95% 5%	61	↑ 60 ↓ 1	98% 2%
<i>mdx</i> ^{C57BL} x <i>mdx</i> ¹²⁹ F1	20	↑ 16 ↓ 4	80% 20%	8	↑ 8	100%
<i>mdx</i> ^{C57BL} x <i>mdx</i> ¹²⁹ F2	25	↑ 13 ↓ 12	52% 48%	8	↑ 5 ↓ 3	62.50% 37,5%
<i>mdx</i> ^{C57BL} x <i>mdx</i> ¹²⁹ F3	36	↑ 19 ↓ 17	53% 47%	14	↑ 7 ↓ 7	50% 50%
<i>mdx</i> ¹²⁹ F1 x <i>mdx</i> ¹²⁹ F2	3	↓ 3	100%	1	↓ 1	100%
<i>mdx</i> ¹²⁹ F1 x <i>mdx</i> ¹²⁹ F3	5	↑ 1 ↓ 4	25% 75%	2	↑ 1 ↓ 1	50% 50%
<i>mdx</i> ¹² F2 x <i>mdx</i> ¹² F3	0			0		

Tabela 3. Numero total de GDEs mapeados e filtrados para músculo esquelético em cada comparação realizada.

Gráfico 13. Representação gráfica do número total de GDEs em cada análise.

4.3.1. Comparação dos backgrounds C57BL X 129/Sv

A primeira comparação foi realizada entre os animais selvagens **C57BL e 129/Sv**, para se determinar as diferenças entre esses dois *backgrounds*. Foram encontrados 44 GDEs, sendo 33 deles subexpressos e 11 superexpressos nos animais 129/Sv (Tabela 3). Pela pequena quantidade de genes, pode se supor que os dois *backgrounds* são muito parecidos. Quando utilizada a ferramenta DAVID, não foi possível dividir esses genes em categorias funcionais.

4.3.2. Comparação dos dois modelos de mdx

		Mapeados	
C57BL x 129/Sv	44	↑ 11	25%
		↓ 33	75%
C57BL x mdx ^{C57BL}	371	↑ 320	86%
		↓ 51	14%
129 x mdx ¹²⁹ F3	137	↑ 130	95%
		↓ 7	5%

Tabela 4. Número total de GDEs nas análises C57BL x 129/Sv, C57BL x mdx^{C57BL}, 129/Sv x mdx¹²⁹ F3 .

A comparação entre **C57BL e mdx^{C57BL}** apresentou 371 GDEs dentre todos os genes mapeados, sendo 320 superexpressos e 51 subexpressos nos camundongos mdx^{C57BL}. Quando comparados os animais **129/Sv e mdx¹²⁹F3**, foram identificados 137 GDEs, sendo 130 superexpressos e apenas 7 subexpressos nos camundongos mdx¹²⁹F3 (Tabela 4). Portanto, nos dois *backgrounds* das linhagens distróficas, o efeito da mutação do gene da distrofina resulta em uma maior superexpressão de genes do que na subexpressão.

Entretanto, o número de GDEs no mdx^{C57BL} é muito maior do que no mdx^{129} quando comparados a animais selvagens de mesmo *background*.

Utilizando o software IPA, foi realizado o cruzamento dessas listas de genes, o qual identificou apenas 1 GDE comum entre as três análises. Este é o gene MMP12, Além disso, foram identificados 101 GDEs em comum entre **C57BL x mdx^{C57BL}** e **129/Sv x mdx^{129} F3** (Figura 18)

Considerando genes que foram diferencialmente expressos somente em cada linhagem, o mdx^{C57BL} expressou 183 GDEs, o mdx^{129} F3, 35 GDEs. A comparação destas duas linhagens mostrou 31 GDEs diferencialmente expressos apenas em **mdx^{C57BL} x mdx^{129} F3**.

Figura 18. Diagrama de Venn da comparação entre as listas C57BL x mdx^{C57BL} , 129/Sv x mdx^{129} F3 e mdx^{C57BL} x mdx^{129} F3

Quando classificados em categorias funcionais, os genes de ambas as comparações se enquadram em categorias semelhantes, sendo a categoria relacionada a sistemas e processos imunes a mais significativa, reunindo 60% dos GDEs em **C57BL x mdx^{C57BL}** e 80% deles em **129/Sv x mdx^{129} F3** (Gráfico 5).

Gráfico 5. Representação gráfica da divisão em categorias funcionais dos DEGs nas análises C57BL x *mdx^{C57BL}* (A) e 129/Sv x *mdx¹²⁹* F3 (B).

Como a categoria de sistema e processos imunes é muito significativa em ambas as comparações, optou-se por retirá-la para que as categorias restantes pudessem ser melhor visualizadas (Gráfico 6).

Gráficos 6. Representação gráfica da divisão em categorias funcionais dos DEGs nas análises C57BL x *mdx^{C57BL}* (A) e 129/Sv x *mdx¹²⁹* F3 (B).

Foi possível observar que as categorias com genes **relacionados** a homeostase e genes diversos não aparece na comparação **129/Sv x *mdx¹²⁹* F3**. A categoria predominante na comparação **C57BL x *mdx^{C57BL}***, relacionada a rota endo e exocítica ficou com a porcentagem reduzida em mais da metade na comparação **129/Sv x *mdx¹²⁹* F3**. A categoria de genes relacionados a matriz extracelular triplicou em **129/Sv x *mdx¹²⁹* F3**, tornando se a categoria dominante nessa comparação. As categorias relacionadas a ligações a moléculas e

células, atividade enzimática e processos metabólicos mostraram pouca diferença entre as duas comparações, apresentando apenas uma leve tendência a aumentar em **129/Sv x mdx¹²⁹F3**.

4.3.3. Comparação dos 2 modelos de mdx – genes de músculo

Para tentar visualizar melhor as mudanças ocorridas no perfil de expressão dos animais *mdx¹²⁹*, foram utilizadas as listas **C57BL x mdx^{C57BL}**, **129/Sv x mdx¹²⁹F3** e **mdx^{C57BL} x mdx¹²⁹F3** filtradas para músculo esquelético para verificar quais foram as mudanças ocorridas.

	Filtro músculo		
C57BL x mdx^{C57BL}	135	↑ 107	79%
		↓ 28	21%
129/Sv x mdx¹²⁹F3	59	↑ 58	98,5%
		↓ 1	1,5%
mdx^{C57BL} x mdx¹²⁹F3	14	↑ 7	50%
		↓ 7	50%

Tabela 5. Representação gráfica da divisão em categorias funcionais dos DEGs nas análises **C57BL x mdx^{C57BL}** e **129/Sv x mdx¹²⁹F3**.

A avaliação por IPA, com o cruzamento dessas listas de genes, não identificou nenhum GDE comum entre as três análises. Também não foram identificados GDEs em comum entre as comparações **129/Sv x mdx¹²⁹F3** e **mdx^{C57BL} x mdx¹²⁹F3** (Figura 19).

Foram identificados 48 GDEs em comum entre **C57BL x mdx^{C57BL}** e **129/Sv x mdx¹²⁹F3** e 2 GDEs em comum entre **C57BL x mdx^{C57BL}** e **mdx^{C57BL} x mdx¹²⁹F3**.

Ainda foram identificados 85 GDEs que estão diferencialmente expressos apenas em **C57BL x mdx^{C57BL}**, 13 GDEs com expressão diferenciada apenas em **129/Sv x mdx¹²⁹F3** e 12 GDEs diferencialmente expressos apenas em **mdx^{C57BL} x mdx¹²⁹F3**.

Figura 19. Diagrama de Venn da comparação entre as listas de genes GDEs musculares em C57BL x mdx^{C57B}, 129/Sv x mdx¹²⁹ F3 e mdx^{C57B} x mdx¹²⁹ F3

Ainda através da análise por IPA, foi possível avaliar as listas de GDEs para identificar as vias nas quais estes genes participam. Foram analisadas as listas 129/Sv x mdx¹²⁹ F3 e C57BL x mdx^{C57BL}, gerando diversas vias cada uma. Considerando a via com o maior número de moléculas envolvidas, observamos em ambos os modelos uma via com DGES concordantes (Figura 20).

Entretanto, no mdx^{129} estão envolvidas somente 6 moléculas, sendo que todas essas moléculas também estão presentes na via gerada pela lista C57BL x mdx^{C57BL} , porem associadas a um número muito maior de outros DGES.

4.3.3.1. Análise dos genes que deixaram de ser diferencialmente expressos no mdx^{129} F3, em relação ao mdx^{C57BL}

Foram encontrados 85 GDEs diferencialmente expressos apenas em C57BL x mdx^{C57BL} , o que significa que esses genes deixaram de ser diferencialmente expressos em **129/Sv x mdx^{129} F3** e em **mdx^{C57BL} x mdx^{129} F3**. Quando distribuídos em categorias funcionais, nota-se que a categoria dominante é de genes relacionados a ligações a moléculas e/ou células. As categorias relacionadas a processos imunes, matriz extracelular e lipídeos/ácidos graxos tem representação semelhante. A categoria com menor representação é de genes relacionados aos lisossomos (Gráfico 7).

Gráfico 7. Representação gráfica das categorias funcionais a que pertencem os genes que deixaram de apresentar expressão diferenciada em mdx^{129} x 129/Sv em relação a mdx^{C57BL} x C57BL

4.3.3.2. Análise dos genes diferencialmente expressos somente em 129/Sv x mdx^{129} F3

Os 13 GDEs diferencialmente expressos somente em **129/Sv x mdx^{129} F3** estão listados na tabela abaixo. Pela pouca quantidade de genes, a ferramenta DAVID não consegue agrupá-los em categorias. O gene com maior diferença de expressão foi o SPP1 (Tabela 6).

Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
1,417	COL5A2	collagen, type V, alpha 2
1,509	MAGED2	melanoma antigen family D, 2
1,529	THBS4	thrombospondin 4
1,591	DCSTAMP	dendrocyte expressed seven transmembrane protein
1,634	HIST2H3A	histone cluster 2, H3a
1,726	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma
1,783	P4HA3	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide III
1,896	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
1,974	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist
2,228	TNC	tenascin C
2,423	PLEK	Pleckstrin
2,812	Cd52	CD52 antigen
4,588	SPP1	secreted phosphoprotein 1

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos somente em 129/Sv x mdx^{129} F3.

4.3.3.3. Análise dos genes diferencialmente expressos somente em mdx^{C57BL} x mdx^{129} F3

Os 12 GDEs diferencialmente expressos em mdx^{C57BL} x mdx^{129} F3 estão listados na tabela abaixo e como foi o caso do item anterior, não foi possível utilizar a ferramenta DAVID para categoriza-los. O gene com maior diferença de expressão foram o gene KLK3 (3,547 aumentado) e Mup1 (3,62 vezes reduzido) (Tabela 7).

Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-3,621	Mup1 (includes others)	major urinary protein 1
-2,461	CLEC4M	C-type lectin domain family 4, member M
-1,360	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
-1,280	DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
-1,207	NXPE4	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 4
-1,154	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8
-1,099	5330426P16Rik	RIKEN cDNA 5330426P16 gene
1,132	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3
1,650	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C
1,803	ESCO1	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1
1,837	Ifi202b	interferon activated gene 202B
3,547	KLK3	kallikrein-related peptidase 3

Tabela 7. Genes diferencialmente expressos somente em mdx^{C57BL} x mdx^{129} F3.

4.3.4. Comparação do aumento do *background* 129/Sv nas gerações *mdx*¹²⁹

Quando comparadas com o animal selvagem as diferentes gerações de *mdx*¹²⁹ (F1, F2 e F3) não apresentaram grandes diferenças no número de GDEs com o aumento da porcentagem de *background* 129/Sv. Em todas as gerações, cerca de 95-99% dos GDEs são superexpressos.

	Mapeados			Filtro músculo		
129 x <i>mdx</i>¹²⁹ F1	145	↑ 143 ↓ 2	99% 1%	65	↑ 65 ↓ 1	100% 1%
129 x <i>mdx</i>¹²⁹ F2	207	↑ 200 ↓ 7	97% 3%	89	↑ 88 ↓ 1	99% 1%
129 x <i>mdx</i>¹²⁹ F3	137	↑ 130 ↓ 7	95% 5%	61	↑ 60 ↓ 1	98% 2%

Tabela 8. Número de GDEs encontrados em cada comparação.

Quando divididos em categorias funcionais, os perfis das três gerações foram muito parecidos e cerca de 80% dos GDEs totais se encontra envolvida com o sistema e ou processos imunes, como acontece na comparação **C57BL x *mdx*^{C57BL}** (Gráfico 8).

Gráfico 8. Representação gráfica da distribuição em categorias funcionais dos GDEs encontrados nas análises 129/Sv x *mdx*¹²⁹F1 (A), 129/Sv x *mdx*¹²⁹F2 (B) e 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3 (C).

Quando comparadas entre si, as gerações de animais *mdx*¹²⁹ mostraram um perfil de expressão praticamente idêntico entre si, o que fica muito evidente na comparação **F2 x F3**, em que não foi achado nenhum GDE (Tabela 9).

	Mapeados			Filtro músculo		
F1 x F2	3	↓ 3	100%	1	↓ 1	100%
F1 x F3	5	↑ 1	25%	2	↑ 1	50%
		↓ 4	75%		↓ 1	50%
F2 x F3	0			0		

Tabela 9. Número de GDEs encontrados em cada comparação.

Discussão

O objetivo inicial deste trabalho consistiu em tentar obter um modelo murino para DMD que apresentasse fenótipo mais fiel às manifestações clínicas humanas da doença. Examinando o trabalho de Lima *et al.* 2010 em síndrome de Marfan, onde o fenótipo apresentado era mais característico da doença na linhagem 129/Sv, optou-se por transferir a mutação do camundongo *mdx* também para a linhagem 129/Sv. Interessantemente, o nosso novo modelo para distrofia muscular de Duchenne no *background* 129/Sv, ao contrário do fenótipo mais grave almejado, apresentou uma melhora funcional significativa. Portanto, os estudos foram redirecionados para melhor entender as causas desta melhora, visando identificar fatores que possam contribuir para o desenvolvimento de terapias para esta doença tão grave.

As análises foram realizadas com o objetivo de tentar responder as seguintes questões:

1. A mutação *mdx* em *background* 129/Sv é compatível com a vida e sobrevida normal?

Foram observados 3 tipo de casais durante esse trabalho: machos 129/Sv com fêmeas *mdx*, *mdx*¹²⁹F1 e *mdx*¹²⁹F2. Não foram observados problemas reprodutivos entre nenhum deles, gerando proles em média a cada 21 dias, com número médio de 8 filhotes por prole os quais sobreviveram bem até as idades utilizadas nos experimentos. A morte de filhotes por motivos desconhecidos foi mínima, e não foi observado canibalismo por parte das fêmeas.

2. A mutação *mdx* no *background* 129/Sv intensifica o fenótipo distrófico?

Cada geração de animais *mdx*¹²⁹ foi avaliada mensalmente por 6 meses e comparada com animais *mdx*^{C57BL} da mesma idade. Em F1, em que os animais contam com 50% de cada *background*, já é possível observar que os *mdx*¹²⁹ apresentam mais força e resistência que os animais *mdx*^{C57BL}. Nas gerações F2 e F3, com o aumento de *background* 129/Sv, o desempenho dos animais *mdx*¹²⁹ se mostrou muito superior ao dos animais *mdx*^{C57BL}.

Estes resultados foram o oposto do que se havia esperado, e pensou-se na hipótese de que alguma característica própria do *background* 129/Sv pudesse estar de alguma forma protegendo esses animais dos efeitos da mutação DMD. A partir destes resultados, os estudos foram direcionados para a identificação de fatores que beneficiariam o fenótipo *mdx*.

3. A variação fenotípica observada está relacionada com alterações histológicas?

Uma característica preponderante do camundongo *mdx*^{C57BL} é a regeneração intensa, que se inicia desde o dia 21, com a presença de grupos de fibras pequenas, basofílicas e com núcleos centrais. Em estágios mais tardios, este camundongo apresenta todas as fibras centronucleadas, com diâmetro maior, sugerindo uma finalização deste processo regenerativo (Roig *et al.*, 2004). No novo modelo *mdx*¹²⁹ observa-se que a musculatura se encontra bastante conservada, nas 3 gerações, com núcleos mantidos na periferia na idade de 21 dias. Aos 3 meses, o *mdx*¹²⁹ apresenta sinais de focos de degeneração e regeneração, e a regeneração ativa é mantida até os 6 meses de idade.

Estas observações sugerem que os animais *mdx*¹²⁹ entram no processo de degeneração mais tardiamente que o *mdx*^{C57BL}, e que o processo de regeneração se estende por mais tempo.

4. Estudos da expressão gênica global nos dois fenótipos podem nos revelar genes diferencialmente expressos de interesse?

Com os resultados inesperados dos testes funcionais, optou-se pelo *microarray* de expressão para investigar o transcriptoma dos animais *mdx*¹²⁹ comparativamente ao *mdx*^{C57BL}, sendo cada linhagem comparada aos animais selvagens do mesmo *background*. Também se optou por utilizar material de animais de 6 meses de idade, quando a doença já se encontra bem estabelecida.

O método estatístico SAM (Significance Analysis of Microarrays) foi usado para selecionar os genes diferencialmente expressos. Trata-se de um método desenvolvido especificamente para dados de *microarray* que seleciona os genes através de cálculos não paramétricos. Os dados são permutados repetidamente para determinar se a expressão é significativa (Tusher, Tibshirani e Chu, 2001).

Foi observada uma grande diferença no número de genes diferencialmente expressos (GDEs), sugerindo grandes alterações no perfil de expressão gênica que merecem uma avaliação mais detalhada, visando responder as seguintes questões:

4.1. Há diferenças entre os transcriptomas dos *backgrounds* C57BL e 129/Sv selvagens?

Comparando os *backgrounds* C57BL e 129/Sv foram identificados 44 GDEs, o que demonstra que ambas as linhagens são muito semelhantes em seu perfil transcricional. Além disso, analisando a lista de genes diferencialmente expressos entre estas duas linhagens normais, não foram identificados genes que pudessem estar associados com alguma função diretamente relacionada à atividade muscular que eventualmente atribuiria uma proteção contra a mutação DMD no *background* 129/Sv.

4.2. Há diferença de expressão gênica global entre o mdx^{C57BL} e o mdx^{129} ?

Em seguida, foram comparados os dois modelos de *mdx* (mdx^{C57BL} e mdx^{129}) com seus respectivos *backgrounds* (C57BL e 129/Sv). A comparação **C57BL x mdx^{C57BL}** resultou em 371 GDES. Já as comparações entre 129/Sv e cada uma das gerações resultou respectivamente, em 145, 207, e 137 GDEs. Considerando que C57BL e 129/Sv por possuírem poucos GDEs entre eles, são muito similares em relação à expressão gênica, poderia se esperar que os dois modelos *mdx* também fossem semelhantes em relação aos seus *backgrounds* selvagens, entretanto foi possível observar que o mdx^{C57BL} apresenta muito mais GDEs do que o mdx^{129} . Por outro lado, em ambos os modelos, o número de genes superexpressos foi bem superior ao de subexpressos (mdx^{C57BL} - 86:15 e o mdx^{129} - 95:5), sugerido que as alterações distróficas e regenerativas estão mais associadas com a ativação do que a repressão de genes.

Além disso, na análise global, existem 185 genes com expressão diferenciada apenas no modelo no modelo mdx^{C57BL} , ou seja, esses genes voltaram a ter expressão normal no modelo mdx^{129} sugerindo que pode ter ocorrido algum tipo de correção de expressão desses genes.

4.3. Os GDEs em ambos os modelos de *mdx* pertencem às mesmas categorias funcionais?

Quando os GDEs dos dois modelos de *mdx* são distribuídos em categorias funcionais, é possível ver o grande predomínio da categoria relacionada ao sistema imune. Esse resultado já era esperado, uma vez que a inflamação crônica é uma característica do músculo distrófico (Porter *et al.*, 2002).

Para poder visualizar melhor as outras categorias, subtraímos aquela relacionada ao sistema imune, e avaliamos a distribuição das categorias restantes. Desta forma, ambos os modelos apresentam categorias funcionais similares, em sua maioria, com exceção de duas que só aparecem na comparação entre C57BL e *mdx*^{C57BL} (homeostase e outros). Por outro lado, a proporção com que essas categorias aparecem em cada comparação foi diferente. A categoria de genes envolvidos com a rota endo/exocítica sofreu diminuição de 28% em **C57BL x *mdx*^{C57BL}** para 10% em **129/Sv x *mdx*¹²⁹F3**. Já as outras categorias como matriz extracelular e ligação moléculas/células sofreram aumento em **129Sv x *mdx*¹²⁹F3**. Sabe-se que o tráfego de vesículas é um processo necessário para o mecanismo de reparo de membrana (Han, 2011) e estudos já demonstraram a importância desse mecanismo no fenótipo de distrofias musculares (He *et al.*, 2012; Swaggart *et al.*, 2014). Assim sendo, pode-se sugerir que a diminuição da participação de genes relacionados a esse processo nos animais *mdx*¹²⁹F3 deve-se a maior estabilidade na membrana celular desses animais o que poderia apresentar, como consequência, melhor conservação da fibra muscular e melhor desempenho funcional. Essa estabilidade de membrana também pode explicar o desaparecimento da categoria de genes relacionados a homeostase nesses animais, já que o mecanismo de reparo é cálcio dependente (Reddy, Caler e Andrews, 2001).

Entre as categorias funcionais de genes que apresentaram aumento nos animais *mdx*¹²⁹F3 a mais notável foi a de genes relacionados à matriz extracelular. Como mostrado pelos cortes histológicos, a regeneração nesses animais está presente ainda aos 6 meses de idade, assim sendo, pode-se esperar que durante esse processo também esteja ocorrendo remodelamento de componentes da matriz extracelular, o que pode explicar o aumento da participação de genes relacionados com esses processos (Gillies e Lieber, 2011).

Portanto, vários sistemas ficam afetados pela diferença de expressão gênica nestes dois modelos com destaque para redução na participação das vias endo/exocítica e homeostase, e aumento das vias da matriz extracelular e atividade enzimática no *mdx*¹²⁹

4.4. Há diferença de expressão de genes especificamente musculares entre o *mdx*^{C57Bl} e o *mdx*¹²⁹?

Para direcionar as análises, foram utilizadas as listas de GDEs filtradas para músculo esquelético. O diagrama de Venn (Figura 19) mostrou que dos 135 GDEs do *mdx*^{C57Bl}, 85 são exclusivos a esta linhagem. Já o *mdx*¹²⁹F3 apresentou 13 GDEs exclusivos, e a comparação do *mdx*^{C57Bl} x *mdx*¹²⁹F3 identificou 12 GDEs únicas. Interessantemente, quando comparadas, as 3 análises, não se encontrou nenhum GDE comum às 3.

Portanto, cada modelo tem GDEs exclusivos que merecem análise mais detalhada.

4.5. O que fazem os genes que são diferencialmente expressos no *mdx*^{C57Bl} e deixaram de ser GDEs no *mdx*¹²⁹?

Foram encontrados 85 GDEs expressos somente em C57Bl x *mdx*^{C57Bl}, o que significa que esses genes não estão mais diferencialmente expressos no *mdx*¹²⁹. Quando esses genes foram distribuídos em categorias funcionais, a categoria mais significativa foi a de genes relacionados a ligação a moléculas e células, seguida pela categoria relacionada ao sistema imune.

A inflamação crônica é uma das principais características do músculo distrófico (Tidball e Wehling-Henricks, 2005; Whitehead, Yeung e Allen, 2006) e diversos estudos mostram que a diminuição da inflamação tem resultados positivos na melhora do fenótipo distrófico (Serra et al., 2012; Vidal et al., 2012; Mojumdar et al., 2014). Assim sendo, pode se sugerir que a diminuição de GDEs relacionados ao sistema imune nos animais *mdx*¹²⁹ implica na melhor modulação da inflamação, de modo que não interfira negativamente na regeneração muscular.

4.6. O que fazem os genes que são diferencialmente expressos somente no *mdx*¹²⁹

Quanto à comparação 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3, foram encontrados 13 GDEs exclusivos. Entre eles há dois genes que merecem destaque: SPP1 e IL1RN.

Os animais *mdx*¹²⁹F3 apresentaram um aumento de 4,6 vezes na expressão de SPP1 em relação ao seu controle normal, o que poderia estar associado ao seu melhor desempenho.

O gene SPP1 codifica a proteína osteopontina (OPN), que existe tanto como um componente da matriz extracelular como uma molécula solúvel com propriedades de citocina (O'regan e Berman, 2000) e foi descrita como um componente do ambiente inflamatório do músculo. distrófico e ferido (Haslett et al., 2002; Porter et al., 2002; Hirata et al., 2003). Os mecanismos precisos da ação da OPN na degeneração e regeneração musculares e seus efeitos na progressão da distrofia muscular ainda não são claros. Na verdade, os diversos trabalhos sobre os efeitos da OPN na distrofia apresentam resultados discordantes, pois há trabalhos que associam sua super expressão com piora clínica, enquanto que muitos outros, com uma melhora no músculo distrófico.

(Vetrone *et al.*, 2009), observaram em um estudo que utilizou camundongos nulos para distrofina e osteopontina, que a deficiência desta proteína aumentou a força muscular e diminuiu a fibrose no músculo duplo *knockout*, sugerindo que a superexpressão de osteopontina contribua para o agravamento da patologia.

Por outro lado, está descrito um polimorfismo rs28357094, no promotor do gene da osteopontina que é relacionado com a variação de fenótipo em pacientes com DMD. Aqueles que possuem o alelo G raro apresentam força muscular diminuída e perda de ambulação mais precoce do que os pacientes portadores do alelo T (Pegoraro et al., 2011). Em células HeLa transfectadas esse polimorfismo causa uma diminuição da expressão do mRNA do gene SPP1, o que consequentemente resultaria em menores níveis de osteopontina. Assim sendo, a redução na expressão do gene SPP1 estaria então associada a um pior fenótipo, portanto os portadores do alelo T contariam com o efeito protetor e pró-regenerativo dessa proteína (Giacopelli et al., 2004). Este resultado foi confirmado em diversos estudos internacionais, e atualmente, este polimorfismo esta sendo utilizado como um biomarcador de prognóstico na DMD (ENMC Internacional Workshop on Biomarkers in DMD, 2014).

A partir dos diversos trabalhos apresentados, Pagel e col. ((Pagel *et al.*, 2014) sugeriram um modelo para a participação da OPN na regeneração muscular. Sua expressão é induzida em resposta a uma lesão e sua liberação nesse local promove a proliferação de mioblastos derivados de células satélites além da infiltração de células inflamatórias. Tanto os mioblastos quanto as células inflamatórias também liberam OPN e altos níveis dessa proteína ajuda a manter um pool de mioblastos proliferativos no local da lesão. A OPN até então solúvel, é imobilizada por sua incorporação na matriz extracelular em remodelamento

e a diferenciação e fusão de mioblastos é favorecida em detrimento da proliferação. Durante a maturação da fibra a OPN é perdida do local da lesão.

Mais estudos serão necessários para verificar qual seria a via responsável pela melhora fenotípica de nosso novo modelo.

Já o gene IL1RN codifica a proteína IL-1Ra, a qual é um antagonista de interleucina 1, ligando-se de forma competitiva ao seu receptor (Korthagen *et al.*, 2012). Interleucinas são citocinas pró-inflamatórias e pró fibróticas. Portanto o aumento da expressão do gene de seu antagonista sugere que os animais *mdx*¹²⁹F3 podem estar mais protegidos do processo inflamatório causado por essas moléculas.

4.7. O que fazem os genes musculares diferencialmente expressos somente na comparação do *mdx*^{C57BL} com o *mdx*¹²⁹?

Quanto à comparação *mdx*^{C57BL} com *mdx*¹²⁹, foram encontrados 12 GDEs exclusivos. Dentre estes, o gene com maior diferença de expressão foi o gene KLK3, que estava 3,5 vezes aumentado no *mdx*^{C57BL} e o gene Mup1, que estava 3,6 vezes reduzido neste mesmo modelo.

O gene KLK3 codifica a proteína PSA (prostate-specific antigen), a qual é um conhecido biomarcador para câncer de próstata (Amaro *et al.*, 2014), assim sendo, não encontramos uma correlação entre esse gene e o fenótipo dos animais *mdx*¹²⁹, sendo necessários mais estudos.

O gene Mup1 faz parte de uma família de genes envolvidos na comunicação química entre os animais (camundongos e ratos) (Kumar *et al.*, 2014) e poucos estudos foram feitos sobre as funções metabólicas desse gene. (Hui *et al.*, 2009) observaram que o músculo esquelético é um grande alvo de Mup1. Em seu estudo com camundongos obesos, estes mostravam níveis reduzidos de mRNA de Mup1 no fígado quando comparados com controles normais. Também foi observado que a correção parcial dos níveis dessa proteína aliviou a resistência a insulina e a intolerância a glicose melhorando a função mitocondrial no músculo esquelético. Em nossos estudos, o modelo *mdx*¹²⁹F3 apresenta níveis de Mup1 quase 4 vezes maiores do que o modelo *mdx*^{C57BL}, sugerindo, segundo o estudo anteriormente citado, que esses animais podem apresentar maior eficiência energética, o que pode ser um reflexo de sua função muscular melhorada em relação ao *mdx*^{C57BL}.

4.8. Há diferenças entre as redes gênicas dos dois modelos?

Quando as listas para genes que têm ação no músculo esquelético foram analisadas para a geração de redes gênicas, foi observada a geração de diversas redes, entretanto, a maioria delas possui pequena quantidade de moléculas e não são relevantes para o estudo. Nas análises dos dois modelos de *mdx*, foi gerada apenas uma via com número relevante de moléculas.

A via gerada pela análise da lista C57BL x *mdx*^{C57BL} possui mais moléculas do que a via gerada pela análise da lista 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3, porém, todas as moléculas presentes nesta via, estão presentes na via C57BL x *mdx*^{C57BL}, indicando que mesmo com número diferente de moléculas envolvidas, os genes participam das mesmas vias.

4.9. O aumento do *background* 129/Sv nas diferentes gerações de animais *mdx*¹²⁹ promove diferenças na expressão gênica ?

A comparação de cada geração com o selvagem 129/SV mostrou número de GDEs na mesma ordem de grandeza, e com distribuição em categorias funcionais muito similares. Adicionalmente, as comparações entre as gerações sucessivas de *mdx*¹²⁹ mostram que elas são basicamente idênticas, uma vez que a comparação entre **F1 e F2** rendeu apenas 3 GDEs, a comparação entre **F1 e F3** rendeu 5 GDEs e entre **F2 e F3** não foram identificados GDEs. Esse resultado sugere que os efeitos da mudança de *background* estão presentes desde a primeira geração e não se alteram significativamente com os cruzamentos sucessivos.

Conclusões

1. Desempenho funcional

A mudança do *background*, de C57BL para 129/Sv, resultou em melhora significativa dos animais, ao contrário do que era esperado.

2. Histologia

Há diferença no padrão histológico em geral entre o mdx^{C57BL} e o mdx^{129} . Os animais mdx^{129} entram no processo de degeneração mais tardiamente que o mdx^{C57BL} , e seu processo de regeneração se estende por mais tempo.

3. Análise da Expressão gênica

- 3.1. O perfil transcricional das linhagens selvagens C57BL e 129/Sv é muito semelhante.
- 3.2. O fenótipo do mdx^{C57BL} é causado por um número muito maior de GDEs do que o mdx^{129} F3, e há um predomínio de genes superexpressos em ambos.
- 3.3. Em ambos os modelos de mdx pode-se observar que a via mais envolvida é aquela relacionada com o sistema imune.
- 3.4. Excluindo a categoria de sistema imune, destaca-se no modelo mdx^{129} a redução da participação das vias endo/exocítica e homeostase e aumento das vias da matriz extracelular e atividade enzimática.
- 3.5. Cada modelo tem GDEs exclusivos, com destaque para os genes SPP1 e IL1RN no modelo mdx^{129} F3.
- 3.6. A rede gênica com envolvimento de maior número de moléculas é similar em ambos os modelos, mas com um número diferente de GDEs.
- 3.7. Os efeitos da mudança de *background* estão presentes desde a primeira geração de mdx^{129} e não se alteram significativamente com os cruzamentos sucessivos.

Resumo

O camundongo *mdx*, modelo murino para a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) possui uma mutação de ponto no gene da distrofina que resulta na ausência da proteína no músculo, porém seu fenótipo é brando o que o torna um bom modelo genético e molecular, mas não um bom modelo funcional. Esperando obter um modelo para DMD que tivesse um fenótipo mais fiel ao apresentado pelos pacientes humanos, optou-se por transferir a mutação *mdx* para o *background* 129/Sv.

Através de cruzamentos sucessivos foram obtidas 3 gerações de animais *mdx* com *background* 129/Sv (*mdx*¹²⁹) e cada geração foi avaliada funcionalmente por 6 meses. Desde a primeira geração é possível observar que os animais *mdx*¹²⁹ são mais fortes do que os *mdx* originais em *background* C57BL (*mdx*^{C57BL}), sendo o oposto do esperado no início dos experimentos. O estudo então foi redirecionado para tentar entender o motivo dessa melhora.

Em relação ao padrão histológico, em geral há diferenças entre o *mdx*^{C57BL} e *mdx*¹²⁹. Observa-se também que os animais *mdx*¹²⁹ entram no processo de degeneração mais tardiamente que os animais *mdx*^{C57BL} e seu processo de regeneração se estende por mais tempo.

Através de estudos de *microarray* foi possível observar que os animais 129/Sv apresentam poucos genes diferencialmente expressos (GDEs) em relação aos animais C57BL, portanto os dois *backgrounds* são muito semelhantes. O *mdx*^{C57BL} apresenta muito mais GDEs em relação ao seu selvagem (C57BL) do que o *mdx*¹²⁹ em relação ao 129/Sv, entretanto, ambos os modelos apresentam mais genes superexpressos do que subexpressos, indicando que as alterações distróficas e regenerativas estão mais associadas com a ativação do que a repressão de genes.

Quando os GDEs de ambos os modelos de *mdx* são distribuídos em categorias funcionais, há o predomínio de genes ligados ao sistema imune e quando essa categoria é omitida para melhor visualização das restantes, observa-se que ambos os modelos apresentam categorias funcionais semelhantes, porém com proporções diferentes. No modelo *mdx*¹²⁹ se destaca a diminuição da participação da categoria de rota endo/exocítica (tráfego de vesículas) e homeostase e aumento da participação das categorias de matiz extracelular e atividade enzimática.

Cada modelo apresenta genes exclusivos, destacando os genes SPP1 e IL1RN na comparação 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3. O gene SPP1 codifica a proteína osteopontina (OPN) e o polimorfismo rs28357094 neste gene é utilizado como biomarcador de prognóstico para DMD. O papel da OPN na progressão da distrofia não é bem conhecido. Alguns estudos afirmam que a ausência dessa proteína melhora a força muscular de camundongos *mdx*, enquanto outros apontam que sua participação é necessária para a regeneração muscular. Assim sendo, mais estudos serão necessários para verificar qual seria a via responsável pela melhora fenotípica do modelo *mdx*¹²⁹. Já o gene IL1RN codifica a proteína IL-1Ra, a qual é um antagonista de interleucina 1 (citocina pró-inflamatória e pró fibrótica). Portanto o aumento da expressão do gene de seu antagonista sugere que os animais *mdx*¹²⁹F3 podem estar mais protegidos do processo inflamatório causado por essas moléculas.

Quando analisadas as listas filtradas para músculo esquelético das comparações C57BL x *mdx*^{C57BL} e 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3 para a formação de vias metabólicas, foi gerada apenas uma via em ambas as comparações com número relevante de moléculas. A via gerada pela análise da lista C57BL x *mdx*^{C57BL} possui mais moléculas do que a via gerada pela análise da lista 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3, porém, todas as moléculas presentes nesta via, estão presentes na via C57BL x *mdx*^{C57BL}, indicando que mesmo com número diferente de moléculas envolvidas, os genes participam das mesmas vias.

Tanto a comparação de cada geração de *mdx*¹²⁹ com o 129/Sv como a comparação das gerações entre si mostram que os efeitos da mudança de *background* estão presentes desde a primeira geração e não se alteram significativamente com os cruzamentos sucessivos.

Abstract

The *mdx* mouse, murine model for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) has a point mutation in the dystrophin gene that results in the absence of the protein in the muscle, however its phenotype is mild, which makes it a good genetic and molecular model, but not a good functional model. Hoping to obtain a model for DMD with a phenotype that is more similar the patients', it was chosen to transfer the *mdx* mutation to the 129/Sv background.

Through successive breedings, 3 generations of *mdx* animals with 129/Sv background were obtained and each generation was functionally evaluated for 6 months. Since the first generation it is possible to observe that the *mdx*¹²⁹ animals are stronger than the original *mdx* with C57BL background. The results were the opposite of what was expected in the beginning of the experiments, therefore the study was redirectioned to try to understand the reason of the improved phenotype.

About the general histological pattern, there are differences between *mdx*^{C57BL} and *mdx*¹²⁹. It can be observed that the *mdx*¹²⁹ animals enter the degenerative process later than the *mdx*^{C57BL} animals and the regenerative process lasts longer.

Through microarray studies it was possible to observe that the 129/Sv animals present few differentially expressed genes (DEGs) in comparison to the C57BL animals; therefore both backgrounds are very similar. The *mdx*^{C57BL} presents many more DEGs in comparison to C57BL than *mdx*¹²⁹ in comparison to 129/Sv, however both models present more super expressed genes than sub expressed, indicating that the dystrophic and regenerative alterations are more associated to the activation rather than the repression of genes.

When the DEGs of both *mdx* models are distributed in functional categories, there is the predominance of genes related to the immune system and when this category is omitted for the better visualization of the remaining, it can be observed that both models present similar functional categories, but with different proportions. In the *mdx*¹²⁹ model we can highlight the decrease in participation of the endo/exocytic pathway (vesicle traffic) and homeostasis categories, and increase in participation of the extracellular matrix and enzymatic activity categories.

Each model presents exclusive genes, highlighting SPP1 and IL1RN in the comparison 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3. SPP1 encodes the protein osteopontina (OPN) and the polymorphism rs28357094 in this gene is used as a DMD prognostic biomarker. The role of OPN in the dystrophy progression is not well known. Some studies claim that the absence of OPN increases the muscle strength of the *mdx* mouse, while others indicate that its participation is necessary to muscle regeneration. More studies are needed to ascertain what pathway is responsible for the phenotypic improvement of the *mdx*¹²⁹ model. The IL1RN gene encodes the protein IL-1Ra, and interleukin 1 antagonist, which is a pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokine. Therefore, the increase in the expression of its antagonist suggests that the *mdx*¹²⁹F3 animals may be more protected from the inflammatory process caused by these molecules.

When the filtered lists for skeletal muscle of the comparisons C57BL x *mdx*^{C57BL} e 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3 were analyzed for the formation of metabolic pathways, only one pathway was generated in both comparisons. The pathway generated in the analysis C57BL x *mdx*^{C57BL} has more molecules than the one generated by the 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3 list, but all molecules present in the latter are also present in the former, indicating that even with different numbers of molecules involved, the genes participate in the same pathways.

The comparisons of each generation of *mdx*¹²⁹ with the 129/Sv and the comparison of the generations among each other show that the effects of the background change are present since the first generation and are not altered with the successive breedings.

Anexos

1. Valores dos resultados dos testes funcionais

Tabela 1. Animais *mdx*^{C57BL}:

30 dias	Número	Barra 2 membros (s)	Média	Barra 4 membros (s)	Média	Grip anteriores (N)	Média	Grip posteriores (N)	Média
	1	9 8 1	6	3 1 8	4	,031 0,34 0,38	0.34	0,55 0,58 0,58	0.57
	2	6 3 4	4.3	5 1 2	2.6	0,26 0,27 0,28	0.27	0,47 0,49 0,56	0.5
	3	36 9 6	17	8 32 4	16.6	0,45 0,46 0,47	0.46	0,41 0,41 0,45	0.42
	4	9 3 2	4.6	18 2 14	11.3	0,27 0,31 0,32	0.3	0,56 0,57 0,63	0.58
	5	19 6 4	9.6	12 2 12	8.6	0,29 0,31 0,36	0.32	0,53 0,54 0,64	0.57
	6	24 1 4	9.6	60 34 1	31.6	0,58 0,59 0,65	0.6	0,68 0,80 0,88	0.78
	7	18 2 2	7.3	6 2 2	3.3	0,53 0,64 0,71	0.62	0,64 0,66 0,67	0.65
	8	19 6 0	8.3	8 11 3	7.3	0,45 0,49 0,56	0.5	0,54 0,58 0,65	0.59
	9	1 1 1	1	1 1 0	0.6	0,30 0,35 0,36	0.33	0,42 0,47 0,50	0.45
	Média		7.5		9.5		0.41		0.56
	Desv pad		4.51		9.64		0.13		0.11
2 meses	1	38 8 6	15.3	30 9 13	17.3	0,67 0,67 0,73	0.69	0,90 0,91 0,96	0.92
	2	15 4 2	6.6	17 1 0	6	0,43 0,45 0,45	0.44	0,86 0,87 0,88	0.87
	3	19 2 4	8.3	23 19 10	17.3	0,41 0,52 0,53	0.48	0,90 0,90 0,96	0.92
	4	50 7 1	19.3	41 12 3	18.6	0,45 0,45 0,46	0.45	0,85 0,87 0,95	0.89
	5	2 15 2	6.3	17 7 2	8.6	0,33 0,34 0,39	0.35	0,92 0,97 1,11	1
	6	17 7 2	8.6	31 3 4	12.6	0,36 0,40 0,40	0.38	0,92 0,92 1,00	0.94
	7	60 5 6	23.6	24 16 6	15.3	0,83 0,92 0,93	0.89	0,91 0,97 0,99	0.95
	8	29 5 6	13.3	26 9 10	15	0,58 0,60 0,62	0.6	0,85 0,89 0,90	0.88
	9	26 12 6	14.6	39 22 14	25	0,66 0,73 0,84	0.74	0,91 0,91 0,96	0.92
	Média		12.8		15		0.55		0.92
	Desv pad		5.99		5.60		0.18		0.04
3 meses	1	16 7 1	8	44 4 25	24.3	0,61 0,66 0,73	0.6	0,83 0,88 0,94	0.88
	2	45 6 3	18	8 25 0	11	0,61 0,65 0,85	0.7	0,86 0,89 0,90	0.88
	3	60 5 8	24.3	55 10 5	23.3	0,66 0,68 0,77	0.7	0,73 0,79 0,81	0.77
	4	62 9 5	24.6	42 7 3	17.3	0,48 0,61 0,70	0.59	0,99 1,01 1,12	1.04
	5	12 24 3	13	30 3 12	15	0,76 0,82 0,84	0.8	1,04 1,04 1,17	1.08
	6	22 5 3	10	34 21 3	19.3	0,64 0,66 0,79	0.69	0,88 0,97 1,03	0.96
	7	19 2 3	8	6 14 4	8	0,34 0,40 0,55	0.43	0,83 0,90 1,03	0.92
	8	60 14 2	25.3	60 6 0	22	0,59 0,62 0,67	0.62	0,90 1,00 1,10	1
	9	50 12 2	21.3	50 13 0	21	0,67 0,74 0,80	0.73	0,82 0,93 0,93	0.89
	Média		16.9		17.9		0.65		0.93
	Desv pad		7.30		5.62		0.11		0.10
4 meses	1	60 14 17	30.3	54 31 23	36	0,88 1,06 1,31	1.08	1,02 1,02 1,12	1.05
	2	36 4 3	14.3	21 12 1	11.3	0,79 0,82 0,92	0.84	1,02 1,18 1,22	1.14
	3	60 6 11	25.6	41 24 3	22.6	0,76 0,77 1,10	0.87	0,97 0,99 1,01	0.99
	4	60 7 12	26.3	38 26 4	22.6	0,48 0,52 0,54	0.51	0,92 0,99 1	0.97
	5	26 19 4	16.3	33 8 6	15.6	1,01 1,17 1,27	1.15	1,10 1,10 1,19	1.13
	6	31 6 7	14.6	43 9 3	18.3	0,70 0,76 0,82	0.76	1,10 1,12 1,12	1.11
	7	4 30 12	15.3	9 36 12	19	0,54 0,74 1,08	0.78	1,13 1,15 1,25	1.17
	8	39 4 5	16	60 5 7	24	1 1,10 1,35	1.15	1,01 1,04 1,10	1.05
	9	60 18 5	27.6	12 21 16	16.3	0,88 0,95 0,95	0.92	0,85 0,91 0,97	0.91
	Média		20.7		20.6		0.89		1.05
	Desv pad		6.56		7.02		0.21		0.09
5 meses	1	10 6 3	6.3	4 15 2	7	0,79 0,60 0,61	0.66	0,97 1,17 1,27	1.13
	2	12 5 3	6.6	16 13 2	10.3	0,65 0,66 0,81	0.7	1,06 1,08 0,87	1
	3	41 5 5	17	26 2 24	17.3	0,70 0,81 0,82	0.77	1,28 1,32 1,35	1.31
	4	29 5 4	12.6	20 7 3	10	0,38 0,40 0,45	0.41	1,04 1,04 1,07	1.05
	5	20 6 4	10	11 4 6	7	0,70 0,72 0,72	0.71	1,14 1,14 1,15	1.14

	6	8 3 1	4	4 5 2	3.6	0,43 0,47 0,63	0.51	1,13 1,16 1,29	1.19
	7	12 4 3	6.3	7 19 8	11.3	0,75 0,84 0,88	0.82	1,13 1,19 1,30	1.2
	8	16 7 4	9	2 6 2	3.3	0,68 0,69 0,72	0.69	1,23 1,27 1,40	1.3
	9	7 4 1	4	9 2 0	3.6	0,45 0,49 0,54	0.49	0,86 0,88 0,92	0.88
	Média		8.4		8.1		0.64		1.13
	Desv pad		4.26		4.60		0.14		0.14
6 meses	1	14 13 3	10	37 5 1	14.3	0,72 0,93 ,094	0.86	1,18 1,21 1,29	1.22
	2	25 4 2	10.3	14 20 9	14.3	0,78 0,80 1,00	0.86	1,22 1,33 1,35	1.3
	3	55 9 8	24	60 4 6	23.3	1,01 1,03 1,22	1.08	1,11 1,22 1,28	1.2
	4	7 3 3	4.3	2 10 3	5	0,31 0,31 0,54	0.38	1,12 1,13 1,27	1.17
	5	15 8 5	9.3	23 6 1	10	0,82 0,90 0,95	0.89	1,26 1,26 1,27	1.26
	6	5 12 3	6.6	10 1 2	4.3	0,84 0,95 1,05	0.94	1,13 1,18 1,24	1.18
	7	20 5 2	9	4 18 10	10.6	0,74 0,80 1,01	0.85	1,08 1,32 1,44	1.28
	8	7 6 7	6.6	8 5 3	5.3	0,83 0,90 1,06	0.93	1,22 1,27 1,32	1.27
	9	35 10 2	15.6	5 9 3	5.6	1,13 1,21 1,24	1.19	0,94 1,01 1,03	0.99
	Média		10.6		10.3		0.88		1.2
	Desv pad		5.93		6.25		0.22		0.09

Tabela2. Geração mdx^{129} F1:

30 dias	Número	Barra 2 membros (s)	Média	Barra 4 membros (s)	Média	Grip anteriores (N)	Média	Grip posteriores (N)	Média
	1	10 4 1	6.3	17 5 2	8	0,22 0,24 0,31	0.25	0,77 0,85 0,88	0.83
	2	2 10 1	4.3	4 3 1	2.6	0,28 0,28 0,29	0.28	0,86 0,90 0,90	0.88
	3	0 1 2	1	1 0 1	0.6	0,22 0,23 0,35	0.26	0,45 0,50 0,51	0.48
	4	3 1 1	1.6	1 1 4	2	0,27 0,30 0,32	0.29	0,82 0,88 0,89	0.86
	5	2 0 6	2.6	4 2 3	3	0,24 0,27 0,31	0.27	0,70 0,70 0,85	0.75
	6	1 2 1	1.3	6 3 12	7	0,27 0,27 0,31	0.28	0,80 0,81 0,82	0.81
	7	4 2 1	2.3	6 4 2	4	0,33 0,33 0,40	0.35	0,70 0,72 0,74	0.72
	8	6 1 3	3.3	2 1 1	1.3	0,27 0,31 0,31	0.29	0,52 0,60 0,64	0.58
	9	25 22 1	16	29 19 46	31.3	0,36 0,42 0,63	0.47	0,85 0,85 0,90	0.86
	Média		4.3		6.6		0.3		0.75
	Desv pad		4.69		9.57		0.07		0.14
2 meses	1	60 60 60	60	60 60 60	60	0,49 0,55 0,56	0.53	1,11 1,11 1,14	1.12
	2	60 60 60	60	60 60 60	60	1,01 0,90 0,65	0.85	1,16 1,19 1,33	1.22
	3	18 4 1	7.6	17 24 28	23	0,38 0,40 0,46	0.41	0,89 0,94 0,96	0.93
	4	60 14 2	25.3	60 10 8	26	0,46 0,47 0,54	0.49	0,98 1,03 1,14	1.05
	5	46 7 3	18.6	60 10 32	34	0,40 0,43 0,51	0.44	1,32 1,33 1,44	1.36
	6	60 22 12	31.3	60 60 12	44	0,47 0,47 0,52	0.48	1,07 1,10 1,11	1.09
	7	60 60 60	60	54 7 35	32	0,41 0,43 0,49	0.44	1,23 1,31 1,38	1.3
	8	44 3 1	16	24 2 0	8.6	0,29 0,31 0,36	0.32	0,75 0,79 0,88	0.8
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	0,40 0,38 0,42	0.4	1,33 1,34 1,72	1.46
	Média		37.6		38.6		0.48		1.14
	Desv pad		22.15		18.61		0.15		0.21
3 meses	1	31 17 5	17.6	60 30 60	50	0,74 0,79 0,85	0.79	1,01 1,19 1,19	1.14
	2	43 9 7	19.6	32 17 8	19	0,78 0,92 0,94	0.88	0,96 0,98 1,46	1.13
	3	51 11 2	21.3	60 13 20	31	0,94 1,03 1,06	0.91	1,05 1,10 1,70	1.28
	4	54 4 5	21	23 9 23	18.3	0,83 0,86 0,93	0.87	0,91 0,95 1,10	0.98
	5	60 13 3	25.3	60 60 30	50	0,79 0,93 1,17	0.96	1,16 1,21 1,83	1.4
	6	60 16 11	29	30 17 20	22.3	0,77 0,77 0,86	0.8	1,03 1,15 1,25	1.14
	7	14 3 16	11	10 11 47	22.6	0,50 0,50 0,50	0.5	1,32 1,37 1,46	1.38
	8	19 2 2	7.6	12 3 6	7	0,45 0,45 0,50	0.46	0,65 0,75 0,76	0.72
	9	54 5 7	22	60 60 12	44	0,92 1,14 1,16	1.07	1,19 1,42 1,42	1.37
	Média		19.3		29.3		0.8		1.17
	Desv pad		6.64		15.39		0.20		0.22
4 meses	1	60 52 11	41	60 60 60	60	0,95 0,99 1,01	0.98	1,15 1,19 1,42	1.25
	2	60 16 13	29.6	60 31 6	32.3	1,22 1,26 1,81	1.43	1,33 1,36 1,37	1.35
	3	60 10 7	25.6	60 8 12	26.6	0,89 0,97 1,20	1.02	0,99 1,02 1,02	1.01
	4	60 35 20	38.3	53 15 6	24.6	1,15 1,26 1,40	1.27	1,03 1,03 1,10	1.05

	5	60 60 6	42	60 53 21	44.6	1,00 1,08 1,21	1.09	1,42 1,45 1,49	1.45
	6	60 43 13	38.6	60 25 3	29.3	1,18 1,19 1,29	1.22	1,22 1,32 1,36	1.31
	7	60 12 8	26.6	60 60 28	49.3	1,22 1,30 1,39	1.3	1,44 1,45 1,57	1.48
	8	60 12 4	25.3	55 22 10	29	1,17 1,26 1,31	1.24	1,13 1,25 1,33	1.23
	9	60 60 5	41.6	60 45 7	37.3	1,06 1,17 1,18	1.13	0,96 0,97 0,99	0.97
	Média		34.2		37		1.18		1.23
	Desv pad		7.33		11.97		0.14		0.19
5 meses	1	60 31 8	33	60 51 14	41.6	0,58 0,58 0,66	0.6	1,23 1,39 1,46	1.36
	2	53 4 3	20	22 9 5	12	0,76 0,76 0,80	0.77	0,68 0,68 1,03	0.79
	3	54 5 4	21	11 5 6	7.3	0,67 0,81 0,95	0.81	1,12 1,13 1,22	1.15
	4	50 3 3	18.6	34 3 10	15.6	0,56 0,68 0,85	0.69	1,00 1,13 1,28	1.13
	5	60 9 4	24.3	23 3 3	9.6	0,66 0,76 0,88	0.76	1,28 1,29 1,51	1.36
	6	35 3 1	13	10 10 0	6.6	0,52 0,54 0,55	0.53	0,98 0,99 1,19	1.05
	7	60 5 5	23.3	32 15 16	21	0,58 0,59 0,65	0.6	0,73 0,79 0,86	0.79
	8	28 4 3	11.6	11 4 6	7	0,52 0,56 0,91	0.66	1,33 1,42 1,46	1.4
	9	16 5 4	8.3	15 34 5	18	0,56 0,79 0,85	0.73	1,26 1,36 1,36	1.32
	Média		19.2		15.4		0.68		1.15
	Desv pad		7.52		11.09		0.09		0.24
6 meses	1	47 5 3	18.3	60 60 5	41.6	0,81 1,02 1,11	0.98	1,51 1,59 1,85	1.65
	2	40 4 4	16	29 10 3	14	1,18 1,50 1,61	1.43	1,38 1,40 1,60	1.46
	3	7 5 2	4.6	7 8 8	7.6	1,23 1,66 1,96	1.61	1,06 1,13 1,16	1.11
	4	21 3 4	9.3	22 5 5	10.6	1,29 1,44 1,69	1.47	1,04 1,20 1,48	1.24
	5	51 9 5	21.6	57 17 5	26.3	1,17 1,29 1,42	1.29	1,33 1,36 1,49	1.39
	6	46 7 2	18.3	42 35 25	34	1,01 1,07 1,55	1.21	1,17 1,38 1,49	1.34
	7	52 6 5	21	55 13 10	26	0,93 1,08 1,20	1.07	1,44 1,51 1,53	1.49
	8	8 8 7	7.6	19 7 5	10.3	0,98 1,01 1,04	1.01	1,17 1,18 1,49	1.28
	9	60 6 3	23	58 3 34	31.6	0,97 1,05 1,06	1.02	0,78 0,79 0,83	0.8
	Média		15.5		22.4		1.23		1.3
	Desv pad		6.70		12.20		0.23		0.25

Tabela 3. Geração $mdx^{129}F2$:

30 dias	Número	Barra 2 membros (s)	Média	Barra 4 membros (s)	Média	Grip anteriores (N)	Média	Grip posteriores (N)	Média
	5	60 60 60	60	60 60 60	60	0,99 1,02 1,15	1.05	0,91 0,92 0,96	0.93
	7	60 60 60	60	60 60 60	60	0,93 0,95 0,98	0.95	0,91 0,93 0,97	0.93
	14	36 31 02	23	60 60 60	60	1,13 1,15 1,29	1.15	1,28 1,36 1,37	1.33
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,12 1,15 1,17	1.14	0,94 1,28 1,49	1.23
	17	60 60 60	60	60 60 60	60	1,13 1,14 1,22	1.16	1,01 1,01 1,10	1.04
	18	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,92 0,94	0.9	0,94 0,96 1,02	0.97
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,84 0,88 0,97	0.89	0,91 0,99 1,13	1.01
	23	60 60 60	60	31 60 60	50.3	0,83 0,88 0,91	0.87	0,85 0,94 1,01	0.93
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	0,76 0,85 0,91	0.84	0,90 0,93 1,00	0.94
	26	60 60 60	60	60 60 60	60	1,02 1,05 1,06	1.04	0,89 0,94 1,14	0.99
	28	60 60 60	60	60 60 60	60	1,08 1,12 1,17	1.12	0,99 1,14 1,16	1.09
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,10 1,16 1,19	1.15	1,23 1,28 1,72	1.41
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,93 0,94	0.9	1,04 1,17 1,54	1.25
	Média		57.15		59.25		1.01		1.08
	Desv pad		10.26		2.69		0.12		0.17
2 meses	5	60 60 60	60	60 60 60	60	0,81 0,83 0,87	0.83	1,19 1,47 1,48	1.38
	7	60 60 60	60	60 60 60	60	1,03 1,04 1,23	1.01	1,30 1,31 1,50	1.37
	14	60 60 60	60	50 60 29	46.3	0,31 0,31 0,42	0.34	1,56 1,58 1,78	1.64
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,22 1,29 1,44	1.31	1,62 1,74 1,75	1.7
	17	60 60 60	60	60 60 60	60	1,23 1,33 1,35	1.3	1,40 1,44 1,50	1.44
	18	60 60 60	60	60 60 60	60	0,83 0,86 1,03	0.9	1,29 1,31 1,40	1.33
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,78 0,88 0,97	0.87	1,15 1,15 1,51	1.27
	23	60 60 60	60	60 60 60	60	0,70 0,80 0,94	0.81	0,94 1,05 1,31	1.1
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	1,06 1,11 1,22	1.13	1,06 1,12 1,22	1.13
	26	60 60 60	60	60 60 60	60	1,01 1,04 1,06	1.03	1,30 1,33 1,60	1.41
	28	60 60 60	60	60 60 60	60	1,09 1,31 1,34	1.24	1,10 1,23 1,28	1.2

	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,22 1,27 1,49	1.32	1,48 1,56 1,88	1.64
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	0,59 0,63 0,71	0.64	1,41 1,47 1,48	1.45
	Média		60.00		58.95		0.98		1.39
	Desv pad		0.00		3.80		0.29		0.19
3 meses	5	60 60 60	60	60 60 60	60	0,93 0,97 1,08	0.99	1,30 1,47 1,49	1.42
	7	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,99 1,20	1.01	1,73 1,88 1,89	1.83
	14	35 25 2	20.6	60 3 3	22	0,85 0,86 1,15	0.95	1,63 1,71 1,71	1.68
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,14 1,17 1,88	1.39	1,66 1,66 1,76	1.69
	17	60 60 60	60	60 60 60	60	1,41 1,49 1,62	1.5	1,50 1,77 1,89	1.72
	18	60 60 60	60	34 60 60	51.3	0,95 1,14 1,31	1.13	1,39 1,40 1,47	1.42
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	1,17 1,22 1,27	1.22	1,35 1,46 1,54	1.45
	23	60 60 60	60	60 60 60	60	1,09 1,09 1,13	1.1	1,43 1,53 1,69	1.55
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	1,00 10,6 1,10	1.05	1,17 1,23 1,26	1.22
	26	60 60 60	60	60 60 60	60	0,88 1,21 1,35	1.14	1,27 1,49 1,49	1.41
	28	60 60 60	60	60 60 60	60	1,35 1,64 1,65	1.54	1,55 1,56 1,58	1.56
	29	60 60 60	60	60 50 42	50.6	1,40 1,45 1,52	1.45	1,54 1,68 1,73	1.65
	30	60 47 1	36	60 28 3	30.3	0,74 0,81 0,88	0.81	1,15 1,32 1,71	1.39
	Média		55.12		53.40		1.18		1.54
	Desv pad		12.31		12.66		0.23		0.17
4 meses	5	60 60 60	60	60 60 60	60	1,10 1,42 1,74	1.42	1,20 1,26 1,41	1.29
	7	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 1,08 1,24	1.05	1,32 1,39 1,71	1.47
	14	49 7 1	19	9 3 2	4.6	0,94 0,96 0,99	0.96	1,35 1,38 1,47	1.4
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,22 1,27 1,31	1.26	1,81 1,87 1,09	1.59
	17	60 60 60	60	60 60 60	60	1,11 1,12 1,22	1.15	1,24 1,40 1,72	1.45
	18	60 60 60	60	60 60 60	60	0,90 0,92 0,93	0.91	1,22 1,24 1,37	1.27
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	1,13 1,23 1,45	1.27	1,19 1,20 1,24	1.21
	23	60 60 60	60	60 60 60	60	1,33 1,37 1,47	1.39	1,01 1,14 1,31	1.15
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	0,66 0,67 0,84	0.72	1,29 1,52 1,67	1.49
	26	60 60 60	60	60 50 60	56.6	0,91 1,10 1,12	1.04	1,25 1,44 1,68	1.45
	28	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,99 1,19	1.01	1,28 1,47 1,51	1.42
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,31 1,42 1,47	1.4	1,34 1,43 1,47	1.41
	30	14 2 3	6.3	43 4 6	16.6	0,70 0,76 1,00	0.82	1,10 1,36 1,63	1.36
	Média		52.72		52.14		1.11		1.38
	Desv pad		17.97		18.62		0.23		0.12
5 meses	5	60 60 60	60	60 60 60	60	0,81 1,13 1,15	1.03	1,19 1,63 1,89	1.57
	7	60 60 60	60	60 60 60	60	0,72 0,82 0,99	0.84	1,44 1,45 1,78	1.55
	14	12 15 6	11	6 1 2	3	0,87 1,07 1,37	1.1	1,08 1,17 1,22	1.15
	16	60 46 4	36.6	60 60 60	60	1,06 0,09 1,24	0.79	1,70 1,74 1,77	1.73
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,99 1,01 1,19	1.06	1,42 1,43 1,52	1.45
	23	60 60 60	60	52 60 60	57.3	0,71 0,87 1,01	0.86	1,06 1,18 1,24	1.16
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	0,63 0,68 0,90	0.73	1,31 1,42 1,78	1.5
	26	60 60 60	60	60 60 60	60	0,81 0,83 0,99	0.87	1,24 1,37 1,40	1.33
	28	60 60 60	60	60 60 60	60	1,09 1,27 1,27	1.21	1,38 1,44 1,63	1.48
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,26 1,31 1,37	1.31	1,24 1,53 1,56	1.44
	30	11 6 2	6.3	7 5 7	6.3	0,44 0,51 0,65	0.53	1,26 1,27 1,49	1.34
	Média		60.00		49.69		0.94		1.43
	Desv pad		20.94		22.30		0.23		0.17
6 meses	5	60 60 60	60	60 60 60	60	0,88 0,92 0,99	0.93	1,37 1,58 2,01	1.65
	7	60 60 60	60	60 60 60	60	1,08 1,12 1,14	1.11	1,31 1,47 1,51	1.43
	14	39 20 10	23	23 3 10	12	1,44 1,60 1,71	1.58	1,19 1,62 1,64	1.48
	16	60 60 60	60	60 27 60	49	1,19 1,47 1,62	1.42	1,71 1,87 1,88	1.82
	17	60 60 60	60	60 60 60	60	1,51 1,51 1,80	1.6	1,14 1,41 1,53	1.36
	18	60 60 60	60	60 34 60	51.3	0,88 1,07 1,18	1.04	1,04 1,14 1,39	1.32
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,89 0,98 1,25	1.04	1,12 1,37 1,63	1.37
	23	60 60 60	60	52 60 60	57.3	1,01 1,33 1,45	1.26	0,97 1,07 1,08	1.04
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	0,76 1,01 1,05	0.94	1,46 1,65 1,68	1.59
	26	60 60 60	60	60 60 60	60	0,76 0,78 0,85	0.79	0,99 1,26 1,58	1.27
	28	60 60 60	60	60 60 60	60	1,19 1,20 1,42	1.27	1,45 1,49 1,50	1.48
	29	60 47 13	40	60 60 60	60	0,96 1,18 1,36	1.16	1,24 1,50 1,65	1.46
	30	22 6 5	11	7 5 3	5	1,15 1,18 1,41	1.24	0,96 1,11 1,16	1.07
	Média		51.85		50.35		1.18		1.41

	Desv pad		16.60		18.98		0.25		0.22
--	----------	--	-------	--	-------	--	------	--	------

Tabela 4. Geração $mdx^{129}F3$:

30 dias	Número	Barra 2 membros (s)	Média	Barra 4 membros (s)	Média	Grip anteriores (N)	Média	Grip posteriores (N)	Média
	1	60 60 60	60	60 60 60	60	0,83 1,00 1,06	0.96	0,80 0,91 1,05	0.92
	2	60 25 60	48.3	60 60 60	60	0,68 0,71 0,81	0.73	0,82 0,96 1,00	0.92
	3	60 60 60	60	60 60 60	60	0,95 0,98 1,06	0.99	0,96 1,02 1,10	1.02
	4	60 60 60	60	60 60 60	60	0,74 0,76 0,76	0.75	0,53 0,69 0,83	0.68
	6	60 60 60	60	60 60 60	60	0,65 0,66 0,74	0.68	0,66 0,82 1,05	0.84
	8	60 60 60	60	60 60 60	60	1,18 1,26 1,35	1.26	0,94 1,04 1,19	1.05
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	0,69 0,77 0,96	0.8	0,67 0,76 0,83	0.75
	11	60 60 60	60	13 60 60	44.3	1,07 1,12 1,13	1.1	0,65 0,66 0,74	0.68
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,85 0,88	0.86	0,81 0,83 1,05	0.89
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,79 1,06 1,07	0.97	0,85 0,94 0,99	0.92
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	0,94 0,99 1,05	0.99	0,75 0,95 0,99	0.89
	27	60 60 60	60	60 60 60	60	0,69 0,84 0,84	0.79	0,98 1,00 1,01	0.99
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	0,69 0,77 0,80	0.75	0,76 0,76 1,05	0.85
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	0,93 0,94 1,00	0.95	0,87 0,88 1,02	0.92
	Média		59.16		58.88		0.90		0.88
	Desv pad		3.13		4.20		0.16		0.11
2 meses	1	60 60 60	60	60 60 60	60	1,19 1,27 1,40	1.28	1,45 1,50 1,88	1.61
	2	60 60 60	60	60 60 60	60	1,00 1,06 1,12	1.06	1,33 1,33 1,82	1.49
	3	60 60 60	60	60 60 60	60	0,99 1,22 1,39	1.2	1,19 1,45 1,57	1.4
	4	60 60 60	60	60 60 60	60	0,81 0,81 0,97	0.86	1,20 1,37 1,40	1.32
	6	60 60 60	60	60 60 60	60	0,84 0,84 1,21	0.99	1,38 1,52 1,66	1.52
	8	60 60 60	60	60 60 60	60	1,19 1,22 1,40	1.27	1,16 1,39 1,44	1.33
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	1,17 1,19 1,37	1.24	1,09 1,19 1,37	1.21
	11	60 60 60	60	60 60 60	60	0,90 0,92 1,16	0.99	1,32 1,37 1,71	1.46
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,15 1,31 1,50	1.32	1,24 1,53 1,67	1.48
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,92 1,28	1.01	1,24 1,53 1,67	1.55
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	1,03 1,14 1,19	1.12	1,08 1,17 1,23	1.16
	27	60 60 60	60	60 60 60	60	1,04 1,16 1,22	0.94	1,24 1,42 1,67	1.44
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	0,85 0,93 1,04	1.14	1,36 1,40 1,47	1.41
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	1,20 1,32 1,43	1.31	1,49 1,53 1,74	1.58
	Média		60.00		60.00		1.12		1.43
	Desv pad		0.00		0.00		0.15		0.13
3 meses	1	60 60 60	60	60 60 60	60	1,55 1,57 1,58	1.56	1,74 2,02 2,17	1.97
	2	60 60 60	60	60 60 60	60	1,13 1,32 1,62	1.35	1,50 1,73 2,16	1.79
	3	60 60 60	60	60 60 60	60	1,35 1,71 2,01	1.69	1,31 1,87 2,38	1.85
	4	60 60 60	60	60 60 60	60	1,09 1,18 1,24	1.17	1,60 2,41 2,60	2.2
	6	60 60 60	60	60 60 60	60	1,42 1,85 2,44	1.9	2,02 2,39 2,96	2.45
	8	60 60 60	60	60 60 60	60	1,71 1,71 2,14	1.85	1,74 1,60 2,28	1.87
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	1,78 1,92 1,93	1.87	1,63 1,96 2,36	1.98
	11	60 60 60	60	60 60 60	60	1,76 2,15 2,48	2.13	1,93 2,15 2,31	2.13
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	2,19 2,49 2,82	2.5	1,22 1,26 1,44	1.3
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	1,35 1,51 1,76	1.54	1,74 2,27 2,51	2.17
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	1,42 1,42 1,88	1.57	1,58 1,76 1,84	1.72
	27	60 60 60	60	60 50 42	60	1,25 2,04 2,17	1.82	1,60 1,83 1,97	1.8
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,24 1,37 1,85	1.48	1,60 1,69 1,78	1.69
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	1,40 1,62 2,05	1.69	1,92 2,05 2,15	2.04
	Média		60		60		1.72		1.93
	Desv		0.00		0.00		0.33		0.28

	pad								
4 meses	1	60 60 60	60	60 60 60	60	0,99 1,32 1,45	1.25	1,15 1,34 1,44	1.31
	2	60 60 60	60	60 60 60	60	0,83 1,19 1,27	1.09	1,17 1,40 1,48	1.35
	3	60 60 60	60	60 60 60	60	1,28 1,37 1,37	1.34	1,37 1,42 1,64	1.47
	4	60 60 60	60	60 60 60	60	0,76 0,78 1,01	0.85	1,01 1,21 1,23	1.15
	6	60 60 60	60	60 60 60	60	1,11 1,12 1,26	1.16	1,10 1,29 1,51	1.3
	8	60 60 60	60	60 60 60	60	1,04 1,13 1,23	1.13	1,35 1,36 1,44	1.38
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	1,35 1,56 1,65	1.52	1,13 1,19 1,40	1.24
	11	60 60 60	60	60 60 60	60	1,37 1,52 1,66	1.51	1,01 1,22 1,24	1.15
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,20 1,60 1,69	1.49	0,99 1,06 1,28	1.11
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	1,28 1,47 1,79	1.51	1,27 1,34 1,35	1.32
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	0,90 0,94 1,04	0.96	1,01 1,12 1,28	1.13
	27	60 60 60	60	60 60 60	60	1,08 1,15 1,56	1.26	1,22 1,23 1,25	1.23
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,04 1,09 1,21	1.11	1,19 1,22 1,26	1.22
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	0,99 1,17 1,59	1.25	1,15 1,26 1,33	1.24
	Média		60.00		60		1.25		1.26
	Desv pad		0.00		0		0.21		0.10
5 meses	1	60 60 60	60	60 60 60	60	1,24 1,37 2,03	1.54	1,63 1,82 2,13	1.86
	2	60 60 60	60	60 60 60	60	1,25 1,29 1,70	1.41	1,45 1,46 2,41	1.77
	3	60 60 60	60	60 60 60	60	1,23 1,44 2,49	1.72	1,20 1,31 1,57	1.36
	4	60 60 60	60	60 60 60	60	0,59 0,59 0,77	0.65	1,24 1,29 1,38	1.3
	6	60 60 60	60	60 60 60	60	1,47 1,54 1,69	1.56	1,90 2,39 2,65	2.31
	8	60 60 60	60	60 60 60	60	1,34 1,42 1,63	1.46	1,38 1,60 1,60	1.52
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	1,35 1,37 1,41	1.37	1,47 1,64 1,64	1.58
	11	60 60 60	60	60 60 60	60	1,48 1,74 2,27	1.83	1,49 1,56 2,04	1.69
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	2,00 2,03 2,26	2.09	1,58 1,90 1,92	1.8
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	1,24 1,37 2,03	1.54	1,55 1,55 1,67	1.59
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	1,24 1,29 1,67	1.4	1,82 1,92 2,18	1.97
	27	60 60 60	60	60 60 60	60	1,49 1,50 1,67	1.55	1,42 1,79 1,84	1.68
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	1,31 1,40 1,60	1.43	2,06 2,06 2,26	2.12
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	1,10 1,28 1,62	1.33	1,61 1,83 1,96	1.80
	Média		60		60		1.49		1.74
	Desv pad		0.00		0.00		0.32		0.28
6 meses	1	60 60 60	60	60 60 60	60	1,25 1,52 1,54	1.43	1,50 1,56 1,77	1.61
	2	60 60 60	60	60 60 60	60	0,91 0,93 1,50	1.11	1,51 1,67 1,78	1.65
	3	60 60 60	60	60 60 60	60	1,53 1,67 1,84	1.68	1,31 1,63 1,78	1.57
	4	60 60 60	60	60 60 60	60	1,15 1,42 1,42	1.33	1,401 1,53 1,66	1.53
	6	60 60 60	60	60 60 60	60	1,00 1,00 1,20	1.06	1,73 1,81 1,89	1.81
	8	60 60 60	60	60 60 60	60	1,44 1,56 1,58	1.52	1,35 1,52 1,80	1.55
	9	60 60 60	60	60 60 60	60	1,33 1,48 1,60	1.47	1,61 1,66 1,80	1.69
	11	60 60 60	60	60 60 60	60	0,97 1,10 1,56	1.21	1,35 1,51 1,54	1.46
	16	60 60 60	60	60 60 60	60	1,36 1,75 1,80	1.63	1,53 1,66 1,94	1.71
	21	60 60 60	60	60 60 60	60	0,86 0,97 1,30	1.04	1,26 1,26 1,33	1.28
	25	60 60 60	60	60 60 60	60	1,24 1,61 1,85	1.56	1,42 1,53 1,63	1.52
	27	60 60 60	60	60 60 60	60	1,27 1,36 1,36	1.33	1,58 1,72 1,96	1.75
	29	60 60 60	60	60 60 60	60	0,98 1,21 1,29	1.16	1,36 1,49 1,93	1.59
	30	60 60 60	60	60 60 60	60	0,98 0,99 1,20	1.05	1,69 1,74 1,78	1.73
	Média		60.00		60.00		1.32		1.60
	Desv pad		0.00		0.00		0.22		0.14

2. Resultados do microarray de expressão (genes destacados: filtro músculo)

Tabela 6. GDEs na análise C57BL x 129/Sv:

C57CL x 129/Sv		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-5,115	Ngp	neutrophilic granule protein
-5,041	XIST	X inactive specific transcript (non-protein coding)
-4,411	S100A8	S100 calcium binding protein A8
-4,178	Ahsp	alpha hemoglobin stabilizing protein
-3,695	Ppbp	pro-platelet basic protein
-3,629	S100A9	S100 calcium binding protein A9
-3,589	Ear2 (includes others)	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2
-3,330	LTF	lactotransferrin
-3,262	Gypa	glycophorin A
-3,180	Mup1 (includes others)	major urinary protein 1
-2,864	Snord116	small nucleolar RNA, C/D box 116
-2,589	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1
-2,381	Trim12a	tripartite motif-containing 12A
-2,356	Gm3579	predicted gene 3579
-2,241	RETN	resistin
-2,030	Snord118	small nucleolar RNA, C/D box 118
-2,024	CLEC4M	C-type lectin domain family 4, member M
-1,902	CYP4F22	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 22
-1,878	NEU2	sialidase 2 (cytosolic sialidase)
-1,868	Gm9780 (includes others)	predicted gene 9780
-1,867	UNC5A	unc-5 homolog A (C. elegans)
-1,777	Tgtp1/Tgtp2	T cell specific GTPase 1
-1,703	Gm10524	predicted gene 10524
-1,571	Trim30a/Trim30d	tripartite motif-containing 30A
-1,545	DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
-1,533	TAGAP	T-cell activation RhoGTPase activating protein
-1,514	C12orf73	chromosome 12 open reading frame 73
-1,491	NXPE4	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 4
-1,462	PRSS55	protease, serine, 55
-1,447	Clec2e/Clec2h	C-type lectin domain family 2, member h
-1,437	4933409K07Rik	RIKEN cDNA 4933409K07 gene
-1,421	Gm3893	predicted gene 3893
-1,343	RNU2-1	RNA, U2 small nuclear 1
1,797	PARK2	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
1,880	E330013P04Rik	RIKEN cDNA E330013P04 gene
2,062	RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
2,377	Mettl21e	methyltransferase like 21E
2,381	ACTR3B	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)
2,396	C7	complement component 7
2,658	HAL	histidine ammonia-lyase
2,778	SLC15A5	solute carrier family 15, member 5
2,973	OPN1LW	opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive
2,984	AKR1E2	aldo-keto reductase family 1, member E2
5,091	GDPD3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3

Tabela 6. GDEs na análise C57BL x *mdx*^{C57BL}:

C57BL x <i>mdx</i>		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-3,798	OSTN	osteocrin
-2,107	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1
-2,103	LGI1	leucine-rich, glioma inactivated 1
-2,028	CES1	carboxylesterase 1
-1,971	PLA2G5	phospholipase A2, group V
-1,874	PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A
-1,768	LRRCS2	leucine rich repeat containing 52
-1,753	FASN	fatty acid synthase
-1,716	ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6
-1,656	OTUB2	OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 2
-1,653	ASB4	ankyrin repeat and SOCS box containing 4
-1,605	ALAS2	aminolevulinate, delta-, synthase 2
-1,539	Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1
-1,472	HOMER2	homer homolog 2 (Drosophila)
-1,447	MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
-1,433	Orm1 (includes others)	orosomucoid 1
-1,418	DUSP26	dual specificity phosphatase 26 (putative)
-1,379	CYP4F22	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 22
-1,356	MSTN	myostatin
-1,352	Gm3893	predicted gene 3893
-1,331	RHOU	ras homolog family member U
-1,323	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1
-1,300	KAZALD1	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1
-1,298	PADI2	peptidyl arginine deiminase, type II
-1,295	Gm9780 (includes others)	predicted gene 9780
-1,281	RASD2	RASD family, member 2
-1,243	FRZB	frizzled-related protein
-1,242	HS3ST5	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5
-1,235	DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
-1,234	FAM213A	family with sequence similarity 213, member A
-1,214	PRSS55	protease, serine, 55
-1,173	ACSS1	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
-1,172	4933409K07Rik	RIKEN cDNA 4933409K07 gene
-1,166	BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1
-1,155	HOXD10	homeobox D10
-1,139	ALPK2	alpha-kinase 2
-1,139	EGF	epidermal growth factor
-1,135	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
-1,134	BC048679	cDNA sequence BC048679
-1,126	CDH4	cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal)
-1,106	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box containing 2
-1,098	LDHB	lactate dehydrogenase B
-1,075	FZD9	frizzled class receptor 9
-1,013	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
-1,010	DUSP8	dual specificity phosphatase 8
-1,006	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2

-1,004	STK40	serine/threonine kinase 40
-0,979	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3
-0,976	HNMT	histamine N-methyltransferase
-0,958	EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
-0,826	GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
0,716	RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
0,725	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like
0,759	DAP	death-associated protein
0,763	FKBP10	FK506 binding protein 10, 65 kDa
0,768	TBX4	T-box 4
0,771	ECM1	extracellular matrix protein 1
0,790	STEAP2	STEAP family member 2, metalloredutase
0,792	NPM1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
0,795	CCBE1	collagen and calcium binding EGF domains 1
0,798	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1
0,799	SCPEP1	serine carboxypeptidase 1
0,801	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
0,803	MAGED2	melanoma antigen family D, 2
0,804	KIAA1598	KIAA1598
0,812	CD63	CD63 molecule
0,824	FSTL1	folistatin-like 1
0,826	PDIA3	protein disulfide isomerase family A, member 3
0,826	GPR114	G protein-coupled receptor 114
0,833	P2RX7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
0,836	NOSTRIN	nitric oxide synthase trafficking
0,836	SLC29A3	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 3
0,836	VAT1	vesicle amine transport 1
0,837	CD80	CD80 molecule
0,837	RRAD	Ras-related associated with diabetes
0,838	FTL	ferritin, light polypeptide
0,842	ARL11	ADP-ribosylation factor-like 11
0,856	COL5A2	collagen, type V, alpha 2
0,858	CTSC	cathepsin C
0,860	CTSB	cathepsin B
0,864	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2
0,865	FTL	ferritin, light polypeptide
0,866	SLAMF8	SLAM family member 8
0,870	FTL	ferritin, light polypeptide
0,877	ANXA2	annexin A2
0,877	ARL14EP	ADP-ribosylation factor-like 14 effector protein
0,880	GAMT	guanidinoacetate N-methyltransferase
0,880	EGFR	epidermal growth factor receptor
0,881	KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
0,883	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
0,894	FAM129B	family with sequence similarity 129, member B
0,896	Nlrp1c-ps	NLR family, pyrin domain containing 1C, pseudogene
0,898	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1
0,900	SYTL2	synaptotagmin-like 2
0,904	CD14	CD14 molecule
0,905	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A

0,905	CDK14	cyclin-dependent kinase 14
0,905	TUBB2A	tubulin, beta 2A class IIa
0,906	CMTM3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
0,908	FAM49A	family with sequence similarity 49, member A
0,909	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
0,917	C1orf54	chromosome 1 open reading frame 54
0,918	GPR34	G protein-coupled receptor 34
0,923	THBS4	thrombospondin 4
0,925	SNORD35B	small nucleolar RNA, C/D box 35B
0,925	HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
0,934	MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
0,935	ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19
0,936	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
0,937	TGFB1	transforming growth factor, beta 1
0,938	Snora73a	small nucleolar RNA, H/ACA box 73a
0,940	DSE	dermatan sulfate epimerase
0,945	FTL	ferritin, light polypeptide
0,948	CCDC109B	coiled-coil domain containing 109B
0,954	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1
0,955	COTL1	coactosin-like F-actin binding protein 1
0,957	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)
0,963	PLEKHO2	pleckstrin homology domain containing, family O member 2
0,964	SGPL1	sphingosine-1-phosphate lyase 1
0,965	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
0,971	Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
0,974	ACER3	alkaline ceramidase 3
0,975	VASH2	vasohibin 2
0,975	Snora73b	small nucleolar RNA, H/ACA box 73b
0,982	BMPER	BMP binding endothelial regulator
0,992	CLEC6A	C-type lectin domain family 6, member A
0,994	PLAU	plasminogen activator, urokinase
0,998	TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3
0,998	INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa
1,001	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
1,002	CD109	CD109 molecule
1,007	SERPINB6	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6
1,007	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
1,008	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
1,010	MYOG	myogenin (myogenic factor 4)
1,012	ADAP2	ArfGAP with dual PH domains 2
1,013	Zim1	zinc finger, imprinted 1
1,017	CFB	complement factor B
1,021	GALNT5	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5
1,022	IL1RL2	interleukin 1 receptor-like 2
1,025	F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide
1,025	APBB1IP	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein
1,026	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family
1,030	FN1	fibronectin 1
1,032	PI15	peptidase inhibitor 15
1,033	A630033H20Rik	RIKEN cDNA A630033H20 gene

1,035	PTPRJ	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
1,039	CTSZ	cathepsin Z
1,039	TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3
1,045	Nxpe5	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 5
1,050	GUSB	glucuronidase, beta
1,061	CYSLTR1	cysteinyl leukotriene receptor 1
1,063	TM6SF1	transmembrane 6 superfamily member 1
1,074	LAYN	layilin
1,084	LY9	lymphocyte antigen 9
1,086	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
1,087	CAPG	capping protein (actin filament), gelsolin-like
1,089	TMEM176B	transmembrane protein 176B
1,090	PLXNB2	plexin B2
1,090	SH2D1B	SH2 domain containing 1B
1,097	PDPN	podoplanin
1,100	DAB2	Dab, mitogen-responsive phosphoprotein, homolog 2 (Drosophila)
1,104	RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4
1,106	TBXAS1	thromboxane A synthase 1 (platelet)
1,106	Naip5 (includes others)	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5
1,107	Bcl2a1c	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1c
1,107	PLTP	phospholipid transfer protein
1,108	VCAN	versican
1,110	MAP1B	microtubule-associated protein 1B
1,111	CYP4F2	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2
1,116	CD200R1L	CD200 receptor 1-like
1,119	ZNF616	zinc finger protein 616
1,119	THEMIS2	thymocyte selection associated family member 2
1,123	LPCAT2	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
1,126	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
1,127	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
1,131	HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
1,132	CD200R1	CD200 receptor 1
1,137	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3
1,139	LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
1,140	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
1,141	PTPLAD2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
1,160	FOLR2	folate receptor 2 (fetal)
1,160	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
1,165	AIF1	allograft inflammatory factor 1
1,167	MYH8	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal
1,167	DOCK2	dedicator of cytokinesis 2
1,168	ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
1,172	SLC9A9	solute carrier family 9, subfamily A (NHE9, cation proton antiporter 9), member 9
1,175	FAM105A	family with sequence similarity 105, member A
1,175	LPXN	leupaxin
1,181	LACC1	laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1
1,184	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1
1,185	RENBP	renin binding protein
1,187	ANPEP	alanine (membrane) aminopeptidase
1,188	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B

1,190	CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide
1,195	Trim30a/Trim30d	tripartite motif-containing 30A
1,198	B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6
1,203	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1
1,205	SPI1	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene
1,208	SLC25A24	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24
1,210	ANXA4	annexin A4
1,217	Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B, pseudogene
1,223	PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
1,227	EMB	embigin
1,231	MYO1F	myosin IF
1,235	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
1,236	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
1,240	CSTB	cystatin B (stefin B)
1,242	PLEKHO1	pleckstrin homology domain containing, family O member 1
1,243	CAPN6	calpain 6
1,246	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4
1,248	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
1,261	LRRRC17	leucine rich repeat containing 17
1,266	APOE	apolipoprotein E
1,267	SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1
1,271	SLFN13	schlafen family member 13
1,272	Mt1	metallothionein 1
1,283	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
1,285	TUBB2B	tubulin, beta 2B class IIb
1,291	DCLK1	doublecortin-like kinase 1
1,294	SLC37A2	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 2
1,295	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
1,296	Gm5431	predicted gene 5431
1,314	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
1,315	RGS10	regulator of G-protein signaling 10
1,324	CHRNA1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)
1,329	Tmsb4x (includes others)	thymosin, beta 4, X chromosome
1,330	C5AR1	complement component 5a receptor 1
1,331	CD48	CD48 molecule
1,334	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
1,334	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
1,334	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
1,334	SIRPA	signal-regulatory protein alpha
1,340	LOX	lysyl oxidase
1,340	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
1,345	P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4
1,350	IRF7	interferon regulatory factor 7
1,350	RUNX1	runt-related transcription factor 1
1,356	SLC15A3	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 3
1,357	UNC93B1	unc-93 homolog B1 (C. elegans)
1,360	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
1,373	CCDC141	coiled-coil domain containing 141
1,374	LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5
1,381	MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)

1,383	LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
1,384	GRN	granulin
1,387	MMP19	matrix metalloproteinase 19
1,397	Serpinc6b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b
1,399	GPR65	G protein-coupled receptor 65
1,400	HEXB	hexosaminidase B (beta polypeptide)
1,404	LYZ	lysozyme
1,406	TMEM106A	transmembrane protein 106A
1,408	FBLN7	fibulin 7
1,413	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
1,418	FYB	FYN binding protein
1,424	CD300LD	CD300 molecule-like family member d
1,425	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
1,431	HPSE	heparanase
1,433	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
1,437	MRC1	mannose receptor, C type 1
1,441	Snord116	small nucleolar RNA, C/D box 116
1,443	CLEC12A	C-type lectin domain family 12, member A
1,443	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
1,445	CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase
1,447	Olfir1372-ps1	olfactory receptor 1372, pseudogene 1
1,449	STAB1	stabilin 1
1,452	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha
1,455	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
1,455	CD53	CD53 molecule
1,462	CYTH4	cytohesin 4
1,463	Fcrls	Fc receptor-like 5, scavenger receptor
1,473	SLC11A1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 1
1,492	NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2
1,505	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
1,507	Milr1	mast cell immunoglobulin like receptor 1
1,512	CTXN3	cortexin 3
1,515	CTSH	cathepsin H
1,522	PTAFR	platelet-activating factor receptor
1,522	ZDBF2	zinc finger, DBF-type containing 2
1,526	TTC9	tetratricopeptide repeat domain 9
1,526	MYOF	myoferlin
1,529	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
1,546	RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B
1,550	PEG3	paternally expressed 3
1,558	ADAM8	ADAM metalloproteinase domain 8
1,561	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
1,564	BCL2A1	BCL2-related protein A1
1,573	FCGR3A/FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)
1,577	PLD4	phospholipase D family, member 4
1,583	TLR1	toll-like receptor 1
1,590	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
1,590	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A
1,592	LAT2	linker for activation of T cells family, member 2
1,600	RAB7B	RAB7B, member RAS oncogene family

1,600	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
1,603	S100A4	S100 calcium binding protein A4
1,613	C14orf37	chromosome 14 open reading frame 37
1,628	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
1,643	C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain
1,651	NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
1,663	LIPA	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
1,673	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)
1,673	HPGDS	hematopoietic prostaglandin D synthase
1,677	CD300C	CD300c molecule
1,682	LGMN	legumain
1,693	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30
1,698	MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic
1,704	P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
1,706	DPEP2	dipeptidase 2
1,725	C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain
1,728	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16
1,732	TUBB6	tubulin, beta 6 class V
1,735	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6
1,741	IL7R	interleukin 7 receptor
1,781	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1
1,818	TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
1,819	ZNF705A	zinc finger protein 705A
1,819	SLAMF7	SLAM family member 7
1,833	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
1,837	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
1,895	ATP6VOD2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
1,900	Mt2	metallothionein 2
1,901	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
1,956	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
1,965	POSTN	perostin, osteoblast specific factor
1,966	C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
1,974	CD84	CD84 molecule
1,981	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
2,007	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3
2,020	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)
2,022	CD180	CD180 molecule
2,026	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3
2,057	C7	complement component 7
2,064	GAL	galanin/GMAP prepropeptide
2,069	LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4
2,075	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
2,092	Ms4a4b (includes others)	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B
2,095	TMEM8C	transmembrane protein 8C
2,098	Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)
2,100	APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
2,116	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
2,131	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
2,140	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)
2,164	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C

2,187	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
2,211	Tlr13	toll-like receptor 13
2,236	LY86	lymphocyte antigen 86
2,246	Wfdc17	WAP four-disulfide core domain 17
2,252	PCBD1	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha
2,260	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
2,289	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
2,300	PRUNE2	prune homolog 2 (Drosophila)
2,364	EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
2,433	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
2,446	CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
2,488	Ms4a14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14
2,520	MPEG1	macrophage expressed 1
2,534	CD68	CD68 molecule
2,600	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
2,603	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
2,809	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8
2,831	MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
2,902	CTSS	cathepsin S
2,952	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
2,966	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
3,004	GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
3,159	MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
3,311	AKR1E2	aldo-keto reductase family 1, member E2
3,422	C3AR1	complement component 3a receptor 1

Tabela 6. GDEs na análise 129/Sv x *mdx*¹²⁹F1:

129/Sv x F1		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-3,126	OPN1LW	opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive
-2,763	SLC15A5	solute carrier family 15, member 5
1,430	GAS5	growth arrest-specific 5 (non-protein coding)
1,477	Zim1	zinc finger, imprinted 1
1,479	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D
1,535	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
1,543	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
1,558	PLAC8	placenta-specific 8
1,586	F630028O10Rik	RIKEN cDNA F630028O10 gene
1,599	Gm5150	predicted gene 5150
1,607	TLR1	toll-like receptor 1
1,616	THBS4	thrombospondin 4
1,619	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
1,632	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
1,650	LGMN	legumain
1,655	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
1,668	ARPC5	actin related protein 2/3 complex, subunit 5, 16kDa
1,670	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
1,687	PEG3	paternally expressed 3

1,694	RGS18	regulator of G-protein signaling 18
1,702	MYH8	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal
1,713	FYB	FYN binding protein
1,713	CD48	CD48 molecule
1,718	HPGDS	hematopoietic prostaglandin D synthase
1,734	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1
1,737	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
1,739	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3
1,755	DCLK1	doublecortin-like kinase 1
1,775	TUBB2B	tubulin, beta 2B class IIb
1,778	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
1,781	CD300C	CD300c molecule
1,803	Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B, pseudogene
1,804	MYO1F	myosin IF
1,811	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
1,818	D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5
1,822	MMP19	matrix metalloproteinase 19
1,824	SLC37A2	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 2
1,831	SLAMF7	SLAM family member 7
1,839	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
1,847	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4
1,857	Tmsb4x (includes others)	thymosin, beta 4, X chromosome
1,858	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
1,861	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
1,880	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
1,885	RGS10	regulator of G-protein signaling 10
1,887	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma
1,903	Duxbl1 (includes others)	double homeobox B-like 1
1,907	C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
1,910	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
1,924	ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1
1,928	RPS3	ribosomal protein S3
1,935	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
1,950	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
1,976	LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5
1,977	SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1
1,981	CTSH	cathepsin H
1,984	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
1,996	Vmn2r32 (includes others)	vomer nasal 2, receptor 32
2,015	TNC	tenascin C
2,029	CCDC141	coiled-coil domain containing 141
2,030	GPR65	G protein-coupled receptor 65
2,052	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1
2,057	Ear2 (includes others)	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2
2,086	GAL	galanin/GMAP prepropeptide
2,086	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6
2,101	Milr1	mast cell immunoglobulin like receptor 1
2,114	TUBB6	tubulin, beta 6 class V
2,143	ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
2,144	PRUNE2	prune homolog 2 (Drosophila)

2,145	CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A
2,147	PLEK	pleckstrin
2,155	ANLN	anillin, actin binding protein
2,163	Mt2	metallothionein 2
2,167	ZDBF2	zinc finger, DBF-type containing 2
2,172	CTXN3	cortexin 3
2,173	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
2,176	Trim12a	tripartite motif-containing 12A
2,180	BCL2A1	BCL2-related protein A1
2,189	CTSK	cathepsin K
2,194	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
2,221	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
2,225	DPEP2	dipeptidase 2
2,238	CLEC4M	C-type lectin domain family 4, member M
2,240	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8
2,241	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
2,261	CD300LD	CD300 molecule-like family member d
2,268	PCBD1	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha
2,279	TMEM8C	transmembrane protein 8C
2,279	TM4SF19	transmembrane 4 L six family member 19
2,308	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
2,311	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6
2,312	STAP1	signal transducing adaptor family member 1
2,331	CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase
2,347	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)
2,350	C14orf37	chromosome 14 open reading frame 37
2,363	ANXA1	annexin A1
2,378	CCNA2	cyclin A2
2,391	EMB	embigin
2,447	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
2,492	MKI67	marker of proliferation Ki-67
2,494	CD180	CD180 molecule
2,518	Gm3579	predicted gene 3579
2,523	S100A4	S100 calcium binding protein A4
2,559	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A
2,561	Cd52	CD52 antigen
2,570	NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
2,580	LYZ	lysozyme
2,588	Ms4a14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14
2,592	EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
2,613	CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
2,616	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
2,623	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
2,634	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)
2,639	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
2,650	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
2,653	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
2,661	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
2,697	CD53	CD53 molecule
2,707	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A

2,720	MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic
2,728	IL7R	interleukin 7 receptor
2,784	CLEC12A	C-type lectin domain family 12, member A
2,863	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
2,874	CD68	CD68 molecule
2,892	APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
2,989	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
3,066	LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4
3,093	C3AR1	complement component 3a receptor 1
3,132	Tlr13	toll-like receptor 13
3,223	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
3,245	MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
3,252	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3
3,254	CD84	CD84 molecule
3,260	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
3,282	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
3,295	LY86	lymphocyte antigen 86
3,416	MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
3,595	MPEG1	macrophage expressed 1
3,622	CTSS	cathepsin S
3,716	POSTN	periostin, osteoblast specific factor
3,718	GNPMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
3,824	SPP1	secreted phosphoprotein 1
3,826	Snord116	small nucleolar RNA, C/D box 116
4,341	ATP6V0D2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
5,572	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)

Tabela 13. GDEs na análise 129/Sv x *mdx*¹²⁹F2:

129/Sv x F2		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-3,071	SLC15A5	solute carrier family 15, member 5
-3,011	OPN1LW	opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive
-2,665	KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
-2,647	ODF3L2	outer dense fiber of sperm tails 3-like 2
-2,373	MSTN	myostatin
-2,170	PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A
-2,130	C9orf50	chromosome 9 open reading frame 50
1,361	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
1,386	PLXNC1	plexin C1
1,397	FSTL1	folliculin-like 1
1,413	CERS6	ceramide synthase 6
1,416	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
1,426	TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3
1,438	HPSE	heparanase
1,443	COL5A2	collagen, type V, alpha 2
1,447	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
1,456	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha
1,472	HIST2H3A	histone cluster 2, H3a

1,473	CYP4F2	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2
1,474	MAN2B1	mannosidase, alpha, class 2B, member 1
1,475	S100A6	S100 calcium binding protein A6
1,478	NCF1	neutrophil cytosolic factor 1
1,488	NOX4	NADPH oxidase 4
1,490	GPR65	G protein-coupled receptor 65
1,490	DCLK1	doublecortin-like kinase 1
1,491	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
1,507	FAM129B	family with sequence similarity 129, member B
1,522	GRN	granulin
1,523	Mt2	metallothionein 2
1,530	TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3
1,530	SLC25A24	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24
1,537	FN1	fibronectin 1
1,537	TUBB2B	tubulin, beta 2B class IIb
1,540	CD200R1	CD200 receptor 1
1,541	Gm5150	predicted gene 5150
1,542	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
1,542	PRKCB	protein kinase C, beta
1,546	CDK6	cyclin-dependent kinase 6
1,553	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
1,555	SLA	Src-like-adaptor
1,555	P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4
1,559	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family
1,559	VAV1	vav 1 guanine nucleotide exchange factor
1,566	C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain
1,570	MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
1,573	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
1,575	UNC93B1	unc-93 homolog B1 (C. elegans)
1,576	CD300LB	CD300 molecule-like family member b
1,579	ANPEP	alanine (membrane) aminopeptidase
1,584	D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5
1,595	TMEM106A	transmembrane protein 106A
1,596	P4HA3	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide III
1,601	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30
1,603	GUSB	glucuronidase, beta
1,604	BST1	bone marrow stromal cell antigen 1
1,605	C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain
1,605	PLAC8	placenta-specific 8
1,613	HEXB	hexosaminidase B (beta polypeptide)
1,616	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma
1,617	Fcrls	Fc receptor-like S, scavenger receptor
1,625	Ear2 (includes others)	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2
1,632	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1
1,637	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D
1,643	LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
1,646	LGMN	legumain
1,649	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
1,651	RAB7B	RAB7B, member RAS oncogene family
1,652	TNC	tenascin C

1,652	SLC11A1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 1
1,660	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
1,667	CFB	complement factor B
1,671	SIRPA	signal-regulatory protein alpha
1,685	COL1A1	collagen, type I, alpha 1
1,688	TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
1,688	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
1,690	ZDBF2	zinc finger, DBF-type containing 2
1,692	CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide
1,694	PEG3	paternally expressed 3
1,696	ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1
1,696	HPGDS	hematopoietic prostaglandin D synthase
1,713	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
1,713	CTSH	cathepsin H
1,716	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3
1,720	PLD4	phospholipase D family, member 4
1,725	CCDC141	coiled-coil domain containing 141
1,734	MMP19	matrix metalloproteinase 19
1,737	MYOF	myoferlin
1,742	LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
1,759	CAPG	capping protein (actin filament), gelsolin-like
1,762	THBS4	thrombospondin 4
1,775	UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
1,777	FBLN7	fibulin 7
1,797	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
1,801	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3
1,801	ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
1,810	CYTH4	cytohesin 4
1,812	ITGAM	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
1,821	FYB	FYN binding protein
1,833	LAT2	linker for activation of T cells family, member 2
1,845	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
1,857	SPI1	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene
1,866	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4
1,868	DOCK2	dedicator of cytokinesis 2
1,870	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
1,871	CD300C	CD300c molecule
1,891	C14orf37	chromosome 14 open reading frame 37
1,895	GAL	galanin/GMAP prepropeptide
1,896	ATP1A3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide
1,896	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
1,902	ANLN	anillin, actin binding protein
1,912	CD48	CD48 molecule
1,914	HVCN1	hydrogen voltage-gated channel 1
1,914	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)
1,917	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1
1,924	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6
1,942	ANXA1	annexin A1
1,953	Tmsb4x (includes others)	thymosin, beta 4, X chromosome
1,957	LIPA	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase

1,959	C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
1,960	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
1,963	PCBD1	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha
1,972	CLEC4M	C-type lectin domain family 4, member M
1,981	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
1,983	CCNA2	cyclin A2
2,031	TUBB6	tubulin, beta 6 class V
2,034	RUNX1	runt-related transcription factor 1
2,042	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1
2,043	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
2,049	Milr1	mast cell immunoglobulin like receptor 1
2,055	SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1
2,057	CTXN3	cortexin 3
2,059	Wfdc17	WAP four-disulfide core domain 17
2,075	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
2,085	ADAM8	ADAM metalloproteinase domain 8
2,086	CD300LD	CD300 molecule-like family member d
2,105	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
2,146	MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic
2,154	PRUNE2	prune homolog 2 (Drosophila)
2,154	LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5
2,163	CD180	CD180 molecule
2,167	CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A
2,173	Ms4a14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14
2,178	MYO1F	myosin IF
2,185	RGS18	regulator of G-protein signaling 18
2,199	SLC37A2	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 2
2,205	TMEM8C	transmembrane protein 8C
2,215	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6
2,234	MKI67	marker of proliferation Ki-67
2,248	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
2,255	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
2,297	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
2,298	BCL2A1	BCL2-related protein A1
2,306	RGS10	regulator of G-protein signaling 10
2,335	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
2,336	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
2,340	PLEK	pleckstrin
2,356	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
2,359	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A
2,365	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
2,382	Gm3579	predicted gene 3579
2,389	EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
2,433	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
2,444	CTSK	cathepsin K
2,445	LYZ	lysozyme
2,465	EMB	embigin
2,482	CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
2,488	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
2,499	CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase

2,503	NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
2,508	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)
2,509	STAP1	signal transducing adaptor family member 1
2,543	ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
2,582	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
2,598	S100A4	S100 calcium binding protein A4
2,598	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
2,617	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
2,646	CD53	CD53 molecule
2,647	LY86	lymphocyte antigen 86
2,665	Cd52	CD52 antigen
2,669	TM4SF19	transmembrane 4 L six family member 19
2,684	DPEP2	dipeptidase 2
2,714	MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
2,720	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
2,736	APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
2,841	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
2,847	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3
2,880	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
2,904	CLEC12A	C-type lectin domain family 12, member A
2,904	CD68	CD68 molecule
2,930	CD84	CD84 molecule
2,951	MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
2,966	C3AR1	complement component 3a receptor 1
2,978	LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4
2,999	Tlr13	toll-like receptor 13
3,071	IL7R	interleukin 7 receptor
3,170	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
3,170	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8
3,262	POSTN	periostin, osteoblast specific factor
3,384	Snord116	small nucleolar RNA, C/D box 116
3,393	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
3,437	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
3,605	CTSS	cathepsin S
3,613	MPEG1	macrophage expressed 1
4,117	GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
4,301	SPP1	secreted phosphoprotein 1
5,192	ATP6V0D2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
5,491	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)

Tabela 14. GDEs na análise 129/Sv x *mdx*¹²⁹F3:

129/Sv x F3		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-2,993	SLC15A5	solute carrier family 15, member 5
-2,836	OPN1LW	opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive
-2,684	ODF3L2	outer dense fiber of sperm tails 3-like 2
-2,650	KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
-2,230	PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A

-2,146	C9orf50	chromosome 9 open reading frame 50
-2,034	MSTN	myostatin
1,417	COL5A2	collagen, type V, alpha 2
1,435	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)
1,509	MAGED2	melanoma antigen family D, 2
1,529	THBS4	thrombospondin 4
1,531	SIRPA	signal-regulatory protein alpha
1,542	HVCN1	hydrogen voltage-gated channel 1
1,546	DCLK1	doublecortin-like kinase 1
1,591	DCSTAMP	dendrocyte expressed seven transmembrane protein
1,631	TLR1	toll-like receptor 1
1,634	HIST2H3A	histone cluster 2, H3a
1,645	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
1,665	CTSH	cathepsin H
1,688	DOCK2	dedicator of cytokinesis 2
1,704	C14orf37	chromosome 14 open reading frame 37
1,726	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma
1,727	D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5
1,733	FYB	FYN binding protein
1,736	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1
1,736	LAT2	linker for activation of T cells family, member 2
1,759	ADAM8	ADAM metalloproteinase domain 8
1,762	PEG3	paternally expressed 3
1,766	Tmsb4x (includes others)	thymosin, beta 4, X chromosome
1,776	LIPA	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
1,783	P4HA3	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide III
1,798	MYH8	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal
1,798	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D
1,801	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
1,818	GPR65	G protein-coupled receptor 65
1,825	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3
1,838	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4
1,839	Gm5150	predicted gene 5150
1,847	Bcl2a1c	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1c
1,856	RUNX1	runt-related transcription factor 1
1,863	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
1,885	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1
1,895	CCDC141	coiled-coil domain containing 141
1,896	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
1,909	TAF1D	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, D, 41kDa
1,923	C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
1,931	RGS10	regulator of G-protein signaling 10
1,946	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
1,974	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist
1,976	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
1,976	SLAMF7	SLAM family member 7
1,986	MYO1F	myosin IF
1,986	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
1,990	CLEC6A	C-type lectin domain family 6, member A
1,994	CD48	CD48 molecule

1,999	LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5
2,001	CD300C	CD300c molecule
2,010	TUBB6	tubulin, beta 6 class V
2,013	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
2,015	SLC37A2	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 2
2,025	MMP19	matrix metalloproteinase 19
2,039	Mt2	metallothionein 2
2,059	TMEM8C	transmembrane protein 8C
2,064	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
2,079	PCBD1	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha
2,118	CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A
2,121	ANLN	anillin, actin binding protein
2,138	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
2,140	PRUNE2	prune homolog 2 (Drosophila)
2,162	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
2,204	MKI67	marker of proliferation Ki-67
2,208	CTSK	cathepsin K
2,220	CTXN3	cortexin 3
2,228	TNC	tenascin C
2,231	SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1
2,265	CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase
2,281	RGS1	regulator of G-protein signaling 1
2,291	Ms4a14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14
2,340	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)
2,347	NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
2,351	EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
2,362	ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
2,373	BCL2A1	BCL2-related protein A1
2,380	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
2,382	CD180	CD180 molecule
2,385	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
2,389	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
2,418	DPEP2	dipeptidase 2
2,423	PLEK	pleckstrin
2,427	MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic
2,444	CCNA2	cyclin A2
2,451	TM4SF19	transmembrane 4 L six family member 19
2,453	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6
2,501	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A
2,521	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
2,537	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
2,547	ZDBF2	zinc finger, DBF-type containing 2
2,574	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)
2,590	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8
2,594	LY86	lymphocyte antigen 86
2,604	CD68	CD68 molecule
2,624	LYZ	lysozyme
2,642	S100A4	S100 calcium binding protein A4
2,651	IL7R	interleukin 7 receptor
2,651	Snord118	small nucleolar RNA, C/D box 118

2,686	ITGAX	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
2,713	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
2,715	STAP1	signal transducing adaptor family member 1
2,772	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
2,812	Cd52	CD52 antigen
2,820	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
2,822	CLEC12A	C-type lectin domain family 12, member A
2,850	CD53	CD53 molecule
2,854	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
2,878	APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
2,902	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
2,956	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
3,008	CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
3,010	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
3,053	C3AR1	complement component 3a receptor 1
3,058	MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
3,060	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
3,114	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
3,126	CD84	CD84 molecule
3,135	Tlr13	toll-like receptor 13
3,176	LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4
3,199	MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
3,238	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3
3,472	CTSS	cathepsin S
3,516	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
3,577	MPEG1	macrophage expressed 1
3,836	GNPMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
3,857	POSTN	periostin, osteoblast specific factor
4,076	Snord116	small nucleolar RNA, C/D box 116
4,588	SPP1	secreted phosphoprotein 1
4,718	ATP6V0D2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
5,551	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)

Tabela 6. GDEs na análise *mdx* x *mdx*¹²⁹F1:

<i>mdx</i> x F1		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-2,187	Snora33	small nucleolar RNA, H/ACA box 33
-2,152	Snord49b	small nucleolar RNA, C/D box 49B
-2,118	RNY1	RNA, Ro-associated Y1
-1,885	Snord47	small nucleolar RNA, C/D box 47
1,288	SLC38A4	solute carrier family 38, member 4
1,343	FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like
1,353	NDUFB3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3, 12kDa
1,415	ESCO1	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1
1,444	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
1,465	HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
1,472	TNNC1	troponin C type 1 (slow)
1,489	ligp1	interferon inducible GTPase 1

1,544	MT-ND6	NADH dehydrogenase, subunit 6 (complex I)
1,583	LDHB	lactate dehydrogenase B
1,702	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C
1,867	LGI1	leucine-rich, glioma inactivated 1
1,912	Ifi202b	interferon activated gene 202B
2,469	Mettl21e	methyltransferase like 21E
3,278	HAL	histidine ammonia-lyase
3,732	GDPD3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3

Tabela 7. GDEs na análise *mdx* x *mdx*¹²⁹F2:

<i>mdx</i> x F2		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-3,180	Mup1 (includes others)	major urinary protein 1
-2,177	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16
-2,028	Trim12a	tripartite motif-containing 12A
-2,002	Snord118	small nucleolar RNA, C/D box 118
-1,821	Trim30a/Trim30d	tripartite motif-containing 30A
-1,508	SLAMF7	SLAM family member 7
-1,472	Gm10524	predicted gene 10524
-1,340	Snora33	small nucleolar RNA, H/ACA box 33
-1,330	Wfdc17	WAP four-disulfide core domain 17
-1,310	UNC5A	unc-5 homolog A (C. elegans)
-1,207	RAB6B	RAB6B, member RAS oncogene family
-1,003	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
1,137	IFI44L	interferon-induced protein 44-like
1,238	PARK2	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
1,267	MT-ND6	NADH dehydrogenase, subunit 6 (complex I)
1,340	MAMDC2	MAM domain containing 2
1,459	ESCO1	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1
1,522	GBP3	guanylate binding protein 3
1,741	HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
1,779	ELOVL7	ELOVL fatty acid elongase 7
1,995	RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
2,747	Ifi202b	interferon activated gene 202B
3,390	KLK3	kallikrein-related peptidase 3
3,824	HAL	histidine ammonia-lyase
4,348	GDPD3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3

Tabela 8. GDEs na análise *mdx* x *mdx*¹²⁹F3:

<i>mdx</i> x F3		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-3,621	Mup1 (includes others)	major urinary protein 1
-2,993	Trim12a	tripartite motif-containing 12A
-2,461	CLEC4M	C-type lectin domain family 4, member M
-2,413	Trim30a/Trim30d	tripartite motif-containing 30A
-1,787	Wfdc17	WAP four-disulfide core domain 17
-1,752	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1

-1,645	Gm10524	predicted gene 10524
-1,504	UNC5A	unc-5 homolog A (C. elegans)
-1,360	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
-1,343	Gm3579	predicted gene 3579
-1,330	Nlrp1c-ps	NLR family, pyrin domain containing 1C, pseudogene
-1,281	Gm4841	predicted gene 4841
-1,280	DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
-1,207	NXPE4	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 4
-1,154	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8
-1,099	5330426P16Rik	RIKEN cDNA 5330426P16 gene
-1,091	C12orf73	chromosome 12 open reading frame 73
1,132	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3
1,255	GBP3	guanylate binding protein 3
1,288	ANGPT1	angiopoietin 1
1,369	FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like
1,386	Gm10021	predicted gene 10021
1,520	BEND6	BEN domain containing 6
1,531	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
1,596	ELOVL7	ELOVL fatty acid elongase 7
1,616	BC018473	cDNA sequence BC018473
1,650	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C
1,803	ESCO1	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1
1,837	Ifi202b	interferon activated gene 202B
1,979	OSTN	osteocrin
2,101	LGI1	leucine-rich, glioma inactivated 1
2,133	TECRL	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like
2,265	RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
3,547	KLK3	kallikrein-related peptidase 3
3,805	HAL	histidine ammonia-lyase
4,240	GDPD3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3

Tabela 9. GDEs na análise mdx^{129} F1 x mdx^{129} F2:

F1 x F2		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-1,663	Vmn2r32 (includes others)	vomeroneural 2, receptor 32
-1,590	Vmn1r181 (includes others)	vomeroneural 1 receptor 181
-1,585	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C

Tabela 10. GDEs na análise mdx^{129} F1 x mdx^{129} F3:

F1 x F3		
Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name
-2,249	Trim12a	tripartite motif-containing 12A
-2,087	Gm3579	predicted gene 3579
-1,941	CLEC4M	C-type lectin domain family 4, member M
3,578	KLK3	kallikrein-related peptidase 3

OF.CEUA/IB/015/2014

São Paulo, 21 de março 2014

Prezada Senhora,

Dirijo-me a V.Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 20 de março de 2014, **APROVOU** o Projeto "Avaliação dos efeitos da mutação mdx no background 129/Sv", **Protocolo 201/2014**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Priscila Clara Calyjur).

A pesquisadora responsável deverá comunicar a esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa.

Lembramos que deverão ser apresentados os relatórios anuais ou final, conforme modelo disponível no link desta Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Mariz Vainzof
Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilma. Sra.

Prof. Dra. MARIZ VAINZOF

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - IB

Referências bibliográficas

AMARO, A. et al. Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel. **Cancer Metastasis Rev**, v. 33, n. 2-3, p. 657-71, Sep 2014. ISSN 1573-7233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477410> >.

ANDERSEN, J. L.; SCHJERLING, P.; SALTIN, B. Muscle, genes and athletic performance. **Sci Am**, v. 283, n. 3, p. 48-55, Sep 2000. ISSN 0036-8733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976466> >.

BEGGS, A. H. et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. **Am J Hum Genet**, v. 49, n. 1, p. 54-67, Jul 1991. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2063877> >.

BOER, J. M. et al. Expression profiling in stably regenerating skeletal muscle of dystrophin-deficient mdx mice. **Neuromuscul Disord**, v. 12 Suppl 1, p. S118-24, Oct 2002. ISSN 0960-8966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206806> >.

BULFIELD, G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 4, p. 1189-92, Feb 1984. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6583703> >.

CHAKKALAKAL, J. V. et al. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **FASEB J**, v. 19, n. 8, p. 880-91, Jun 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923398> >.

CHEN, J. C.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, p. 101, Nov 2003. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614776> >.

CHIAVEGATTO, S. et al. A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. **Exp Neurol**, v. 166, n. 2, p. 227-34, Dec 2000. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085888> >.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 10, p. 1456-71, Oct 2000. ISSN 0148-639X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11003781> >.

DUBOWITZ, V. Enigmatic conflict of clinical and molecular diagnosis in Duchenne/Becker muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 16, n. 12, p. 865-6, Dec 2006. ISSN 0960-8966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118656> >.

EMERY, A. E. H. **Duchenne Muscular Dystrophy**. Oxford: Oxford University Press, 1993.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 809-23, Aug 1993. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8349731> >.

GIACOPELLI, F. et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. **Physiol Genomics**, v. 20, n. 1, p. 87-96, Dec 2004. ISSN 1531-2267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479859> >.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-31, Sep 2011. ISSN 1097-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949456> >.

HACK, A. A.; GROH, M. E.; MCNALLY, E. M. Sarcoglycans in muscular dystrophy. **Microsc Res Tech**, v. 48, n. 3-4, p. 167-80, 2000 Feb 1-15 2000. ISSN 1059-910X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679964> >.

HAN, R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. **Skelet Muscle**, v. 1, n. 1, p. 10, 2011. ISSN 2044-5040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798087> >.

HASLETT, J. N.; KUNKEL, L. M. Microarray analysis of normal and dystrophic skeletal muscle. **Int J Dev Neurosci**, v. 20, n. 3-5, p. 359-65, 2002 Jun-Aug 2002. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175874> >.

HASLETT, J. N. et al. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 23, p. 15000-5, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415109> >.

_____. Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. **Neurogenetics**, v. 4, n. 4, p. 163-71, Aug 2003. ISSN 1364-6745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698323> >.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol (1985)**, v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457764> >.

HE, B. et al. Enhancing muscle membrane repair by gene delivery of MG53 ameliorates muscular dystrophy and heart failure in δ -Sarcoglycan-deficient hamsters. **Mol Ther**, v. 20, n. 4, p. 727-35, Apr 2012. ISSN 1525-0024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314291> >.

HEYDEMANN, A. et al. Genetic background influences muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 15, n. 9-10, p. 601-9, Oct 2005. ISSN 0960-8966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084087> >.

HIRATA, A. et al. Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. **Am J Pathol**, v. 163, n. 1, p. 203-15, Jul 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819025> >.

HIROKI, E. et al. A comparative study of myostatin, follistatin and decorin expression in muscle of different origin. **Anat Sci Int**, v. 86, n. 3, p. 151-9, Sep 2011. ISSN 1447-073X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21416223> >.

HUI, X. et al. Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. **J Biol Chem**, v. 284, n. 21, p. 14050-7, May 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336396> >.

JUNG, D. et al. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 27305-10, Nov 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592992> >.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHURANA, T. S.; DAVIES, K. E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 5, p. 379-90, May 2003. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750741> >.

KOENIG, M. et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. **Am J Hum Genet**, v. 45, n. 4, p. 498-506, Oct 1989. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491009> >.

KOENIG, M.; MONACO, A. P.; KUNKEL, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. **Cell**, v. 53, n. 2, p. 219-28, Apr 1988. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3282674> >.

KORTHAGEN, N. M. et al. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study. **Immunogenetics**, v. 64, n. 5, p. 371-7, May 2012. ISSN 1432-1211. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22322675> >.

KUMAR, V. et al. Sexual attractiveness in male rats is associated with greater concentration of major urinary proteins. **Biol Reprod**, v. 91, n. 6, p. 150, Dec 2014. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359898> >.

LIMA, B. L. et al. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e14136, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152435> >.

MCGEACHIE, J. K. et al. Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. **J Neurol Sci**, v. 119, n. 2, p. 169-79, Nov 1993. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8277331> >.

MCNALLY, E. M. et al. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. **Am J Hum Genet**, v. 59, n. 5, p. 1040-7, Nov 1996. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900232> >.

MOJUMDAR, K. et al. Inflammatory monocytes promote progression of Duchenne muscular dystrophy and can be therapeutically targeted via CCR2. **EMBO Mol Med**, v. 6, n. 11, p. 1476-92, Nov 2014. ISSN 1757-4684. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312642> >.

MUNTONI, F.; TORELLI, S.; FERLINI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **Lancet Neurol**, v. 2, n. 12, p. 731-40, Dec 2003. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636778> >.

NADEAU, J. H. Modifier genes in mice and humans. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 3, p. 165-74, Mar 2001. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256068> >.

O'REGAN, A.; BERMAN, J. S. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. **Int J Exp Pathol**, v. 81, n. 6, p. 373-90, Dec 2000. ISSN 0959-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298186> >.

PAGEL, C. N. et al. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. **J Cell Commun Signal**, v. 8, n. 2, p. 95-103, Jun 2014. ISSN 1873-9601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24318932> >.

PEGORARO, E. et al. SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 76, n. 3, p. 219-26, Jan 2011. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178099> >.

PESCATORI, M. et al. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 1210-26, Apr 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264171> >.

PORTER, J. D. et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 3, p. 263-72, Feb 2002. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823445> >.

REDDY, A.; CALER, E. V.; ANDREWS, N. W. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 157-69, Jul 2001. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511344> >.

RESHEF, R.; MAROTO, M.; LASSAR, A. B. Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. **Genes Dev**, v. 12, n. 3, p. 290-303, Feb 1998. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450925> >.

ROIG, M. et al. Longitudinal pathologic study of the gastrocnemius muscle group in mdx mice. **Acta Neuropathol**, v. 107, n. 1, p. 27-34, Jan 2004. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530991> >.

RYBAKOVA, I. N.; AMANN, K. J.; ERVASTI, J. M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. **J Cell Biol**, v. 135, n. 3, p. 661-72, Nov 1996. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8909541> >.

SAINI, A. et al. Powerful signals for weak muscles. **Ageing Res Rev**, v. 8, n. 4, p. 251-67, Oct 2009. ISSN 1872-9649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716529> >.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1447-531, Oct 2011. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013216> >.

SERRA, F. et al. Inflammation in muscular dystrophy and the beneficial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Muscle Nerve**, v. 46, n. 5, p. 773-84, Nov 2012. ISSN 1097-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847332> >.

SHIN, J. H. et al. Genotyping mdx, mdx3cv, and mdx4cv mice by primer competition polymerase chain reaction. **Muscle Nerve**, v. 43, n. 2, p. 283-6, Feb 2011. ISSN 1097-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254096> >.

SICINSKI, P. et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science**, v. 244, n. 4912, p. 1578-80, Jun 1989. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2662404> >.

STROBER, J. B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. **NeuroRx**, v. 3, n. 2, p. 225-34, Apr 2006. ISSN 1545-5343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554260> >.

SWAGGART, K. A. et al. Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 16, p. 6004-9, Apr 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717843> >.

TEDESCO, F. S. et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **J Clin Invest**, v. 120, n. 1, p. 11-9, Jan 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051632> >.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, n. 6, p. 707-13, Nov 2005. ISSN 1040-8711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16224247> >.

TKATCHENKO, A. V. et al. Large-scale analysis of differential gene expression in the hindlimb muscles and diaphragm of mdx mouse. **Biochim Biophys Acta**, v. 1500, n. 1, p. 17-30, Jan 2000. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564714> >.

TORRES, L. F.; DUCHEN, L. W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**, v. 110 (Pt 2), p. 269-99, Apr 1987. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3567525> >.

TURK, R. et al. Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. **BMC Genomics**, v. 6, p. 98, 2005. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011810> >.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 9, p. 5116-21, Apr 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309499> >.

VETRONE, S. A. et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1583-94, Jun 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451692> >.

VIDAL, B. et al. Amelioration of Duchenne muscular dystrophy in mdx mice by elimination of matrix-associated fibrin-driven inflammation coupled to the α M β 2 leukocyte integrin receptor. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 9, p. 1989-2004, May 2012. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381526> >.

WAKELAND, E. et al. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). **Immunol Today**, v. 18, n. 10, p. 472-7, Oct 1997. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357138> >.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 7, p. 657-62, Jul 2006. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789936> >.

YOSHIDA, M.; OZAWA, E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. **J Biochem**, v. 108, n. 5, p. 748-52, Nov 1990. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081733> >.

ZATZ, M.; VAINZOF, M.; PASSOS-BUENO, M. R. **Muscular Dystrophies**. Springer New York, 2001.

ZUCCONI, E. et al. Ringo: discordance between the molecular and clinical manifestation in a golden retriever muscular dystrophy dog. **Neuromuscul Disord**, v. 20, n. 1, p. 64-70, Jan 2010. ISSN 1873-2364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944604> >.