Maria Denise Fernandes Carvalho

**EFEITOS DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NA EVOLUÇÃO DA
DOENÇA DISTRÓFICA DO MODELO MURINO *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J***

São Paulo

2009

Maria Denise Fernandes Carvalho

**EFEITOS DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NA EVOLUÇÃO DA
DOENÇA DISTRÓFICA DO MODELO MURINO *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J***

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

Orientador(a): Profa. Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Denise

C 331e Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na
evolução da doença distrófica do modelo Murino
B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J / Denise Carvalho .

-- São Paulo : D. C., 2009.

207 p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva, 2009.

1. Hormônio do Crescimento 2. Distrofia
muscular 3. Citocina TGFbeta-1 4. Camundongos anões
distróficos I.Universidade de São Paulo.

Instituto de Biociências. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva. II. Título.

LC QH 431

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos
pacientes portadores de
Distrofias Musculares. Razão
principal e estímulo incansável à
procura científica de uma
terapia.*

EPÍGRAFE

“Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida”.

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus, aquele que faz a sua obra pelas mãos dos homens e que não privilegia os capacitados e sim capacita os privilegiados.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mayana Zatz, pelo exemplo de ciência e luta, oportunidade e suporte em seu laboratório para execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Paolo Bartolini pelas sugestões e apoio.

A Nanci Nascimento e Luiz Augusto Correa Passos pelos ensinamentos de como lidar com os camundongos.

A Profa. Dra. Mariz, pelas sugestões e ajudas.

Ao Prof. Dr. Krishnamurti Carvalho pelo carinho, sensibilidade e apoio científico farmacológico no momento certo.

Ao Prof. Dr. Rui Curi pelo apoio inestimável ao meu crescimento científico.

Aos colegas Carlos Roberto Bueno Junior, Raquel Fontenele, Mariane Secco, Marcos Valadares, Eder Zucconi, Miguel Mitne pelas sugestões e ajudas e aos demais colegas do laboratório.

Aos colegas Carlos Hermano e Kaio pelas inestimáveis sugestões.

Ao meu filho Davi Kurti M. Carvalho que com sua pouca idade, me aguardava todos os dias, sem ainda ter noção da grandeza que isso representava para nós.

A minha família, meu pai Krishnamurti, minha mãe Dóris e minhas irmãs Anna Elise, Isabella e Ellaine pelo incentivo e apoio constantes como prova de amor maior. Minha célula Mater. Ao meu cunhado Paulo Tarcio, continuação real da nossa família, pelo apoio e carinho sempre presentes. A tia Gisela (primeira pessoa que me mostrou o currículo da Dra. Mayana).

A amiga tia Sílvia Raquel de Mesquita Dummar.

Ao Manuel Ribeiro Junior pelo apoio certo no momento certo, com carinho e zelo.

À Mirian, Neide e a todos os amigos do IPEN.

À Constancia Gotto, Marta, Antônia Cerqueira, Roberto Rivelino, Sr. Walter, Sr. Siqueira, Sr. Carlos e todos os demais funcionários do Departamento de Genética e do Genoma.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

RESUMO

As distrofias musculares (DM) se caracterizam por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Dentre estas, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), constitui doença letal ligada ao cromossomo X, caracterizada pela ausência de distrofina na membrana das fibras musculares, afetando um em cada 3.000 meninos nascidos vivos, sendo que a maioria será confinada à cadeira de rodas a partir dos 6 anos de idade e com sobrevida, sem cuidados especiais, em torno dos 25. Apesar do uso de técnicas modernas de diagnóstico, ainda não existe tratamento eficaz para essas doenças. Alguns trabalhos das décadas de 70 e 80 sugeriram que a inibição do hormônio do crescimento (GH) poderia retardar a evolução do processo distrófico de pacientes com DMD. Entretanto, como essas observações não foram comprovadas cientificamente até a presente data, neste trabalho estudamos os efeitos do excesso e da inibição do GH na evolução do quadro distrófico em modelo murino de distrofia muscular: i) administrou-se GH (10µg/ camundongo/dia, i.p., por 10 dias) em camundongos: a) distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*^{dy-2J}/J) com fenótipo, resultando na aceleração dos sintomas da doença, traduzida pela piora das performances de 17% no teste de deambulação (TD), 64% no teste de sustentação (TS), 28% no teste da esteira (TE) e 55% no teste de força máxima (TFM), em relação aos distróficos que não tomaram GH; apenas no teste de resistência à inclinação (TRI) não houve diferença significativa; entretanto, cortes histológicos do músculo gastrocnêmico desses camundongos, não mostraram alterações significativas em relação aos distróficos que não tomaram a droga; quanto aos marcadores de degeneração e regeneração (MDR) na musculatura desses animais, o GH não alterou os níveis de Pax7, MyoD, Laminina e Desmina, mas aumentou de 90% os níveis de TGFβ-1, uma citocina inflamatória que induz fibrose; b) já nos camundongos normais, o GH, ao contrário dos resultados acima, aumentou as performances de 13% no TD e de 28% TS, e ligeiramente, de forma não significativa, em outros dois testes; cortes histológicos revelaram que o GH aumentou de 16,5% a área de secção transversal dos músculos desses animais, o que poderia explicar os resultados descritos acima; já os níveis dos MDR, incluindo o de TGFβ-1, estavam semelhantes aos dos animais controles; ii) desenvolveu-se um novo modelo experimental resultante de cruzamentos de camundongos geneticamente deficientes em GH (*Ghrh*^{lit}) com os distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*^{dy-2J}/J), mostrando um retardo na evolução da doença: as performances dos anões distróficos em relação aos anões normais foram melhores que aquelas dos distróficos em relação aos animais normais, ou sejam, 14% maior TD, 71% maior no TS, 18% maior no TE, 5,5% maior no TRI e 102% maior no TFM; cortes histológicos mostraram que a área do interstício nos músculos dos anões distróficos foi 29% menor que a dos distróficos não anões; os níveis de TGFβ-1 nestes animais, foram os únicos entre aqueles dos MDR estudados, que encontravam-se diminuídos de 36% em relação àqueles dos distróficos não anões; iii) a inibição da liberação do GH pela octreatida, análogo da somatostatina, mostrou também uma relativa melhora ou uma estabilização na evolução do quadro distrófico, traduzido pelo aumento, após 60 dias de tratamento, das performances nos testes funcionais da musculatura em relação àquelas dos animais distróficos sem tratamento: foi 12% maior no TD enquanto os distróficos controles diminuíram em 14%; foi 27% maior no teste de Rota Rod, enquanto os distróficos controles diminuíram em 32%; mantiveram a mesma performance no TE, enquanto os distróficos controles pioraram em 23%, e foram 29% maiores no TS, e 43% no teste de força de preensão, enquanto os distróficos controles não melhoram as suas performances nestes testes. Esses resultados sugerem um efeito patológico do GH na musculatura distrófica, com seu excesso levando a uma piora da doença, possivelmente através do aumento dos níveis de TGFβ-1. A diminuição do GH, conseqüentemente, poderia levar a um retardo da evolução da doença. Estes estudos experimentais abrem perspectivas bastante promissoras para se testar inibição dos efeitos do GH na evolução das doenças distróficas humanas.

ABSTRACT

ABSTRACT

Muscular dystrophies (DM) are characterized by progressive and irreversible degeneration of the skeletal muscles. Among them, Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) constitutes a lethal disease linked to chromosome X, distinguished by the absence of dystrophin in the muscular fibers membrane, affecting one in each 3,000 boys born alive, who, most of them, will be confined to wheel chairs since the age of 6 and with life expectancy, without special care, of 25 years. Despite modern diagnosis techniques, there is not an efficient treatment for these diseases. Some works from the 1970's and 1980's suggested that the inhibition of the growth hormone (GH) could retard the dystrophy process evolution in DMD patients. Nevertheless since this observation has not been proven scientifically, in the present work, the GH excess and inhibition effects on a murine model of muscular dystrophy, were studied: i) GH (10µg/mouse/day, i.p., for 10 days) was given to mice: a) dystrophic *dy/dy* (B6.WK-Lama^{2dy-2J}/J), with phenotype, resulting in the acceleration of the disease symptoms, confirmed by the performance worsening by 17% in the deambulation test (DT), 64% in the sustaining test (S), 28% in the mat test and 55% in the maximum strength test (MST), in relation to dystrophic mice which had not taken GH; only in the inclination resistance test (IRT) there was no significant difference; however, histological cuts of the gastrocnemius muscle of these mice did not show significant alterations, comparing to dystrophic mice which had not taken the drug: as to degeneration and regeneration markers (DRM) in these animals' muscles, the GH did not alter Pax7, MyoD. Laminin and Desmin levels, although it increased by 90% the TGFβ-1 levels, an inflammatory cytokine, that induces fibrosis b) in normal mice, the GH, opposite to the results above, increased the performances by 13% in the DT and by 28% in the ST, and slightly, not significantly, in the other two tests; histological cuts revealed that the GH increased by 16.5% the transversal section area of these animals' muscles, what could explain the results described above; as to the DRM levels, including those of the TGFβ-1, they were similar to the control animals; ii) a new experimental model, resulting from the crossing of GH genetically deficient mice (*Ghrh^{fl}*) with dystrophic *dy/dy* (B6.WK-Lama^{2dy-2J}/J), showing retardation in the disease evolution; the performances of the dystrophic dwarfs, compared to the normal dwarfs, were better than those of the dystrophic compared to normal animals, namely, 14% larger DT, 71% superior in the ST, 18% larger in the MT, 5.5% larger in the IRT and 102% superior in the MST; histological cuts showed that the interstice area in the dystrophic dwarfs' muscles was 29% smaller than that of non-dwarfs dystrophic; the TGFβ-1 levels in these animals were the only DRM studied, which were found to be diminished by 36%, compared to those of the non-dwarfs dystrophic; the GH release inhibition by octreotide, somatostatin analogous, also showed a relative improvement or stabilization in the dystrophy evolution, demonstrated by the increase, after 60 days treatment, of the performances in the muscle functional tests, compared to those of the dystrophic animals, without treatment: it was 12% larger in the DT, while the control dystrophic animals worsened by 32%; they maintained the same performance in the ST, and 43% in the seizing strength test, while the control dystrophic did not improve their performances in these tests. These results suggest a GH pathologic effect, possibly through the TGFβ-1 levels increase. The GH diminishing, consequently, could lead to the retardation in the disease evolution. These experimental studies open promising perspectives to test the GH effects inhibition in human dystrophic diseases evolution.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 01: Interações de IGF-I com diferentes IGFBPs nas células musculares-

-----015

Tabela 02: Superfamília TGFbeta -----029

Gráfico 01: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles,

controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-}*

2^J/J) antes e depois da administração de GH^(**)-----058

Gráfico 02: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles,

controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-}*

2^J/J) antes e depois da administração de GH^(**)-----059

Gráfico 03: Teste da esteira nos camundongos *C57Black6*: controles,

controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-}*

2^J/J) antes e depois da administração de GH^(**)-----061

Gráfico 04: Teste de força máxima nos camundongos *C57Black6*: controles,

controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-}*

2^J/J) antes e depois da administração de GH^(**)-----063

Gráfico 05: Teste de resistência a inclinação nos camundongos *C57Black6*:

controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-*

Lama 2^{Dy-2J}/J) antes e depois da administração de GH^(**)-----064

Gráfico 06: Área da secção transversa do músculo gastrocnêmio nos

camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados

GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----067

Gráfico 07: Área do interstício em % no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----068

Gráfico 08: Número de fibras com núcleo central no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----070

Gráfico 09: Conteúdo do Pax7 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----072

Gráfico 10: Conteúdo do MyoD no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----073

Gráfico 11: Conteúdo da Laminina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----075

Gráfico 12: Conteúdo da Desmina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----076

Gráfico 13: Conteúdo do TGFβ-1 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, controles em que foram administrados GH^(**) e distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) antes e depois da administração de GH^(**)-----078

Gráfico 14: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -
-----083

Gráfico 15: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -
-----084

Gráfico 16: Teste de inclinação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -
-----085

Gráfico 17: Teste de esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -
-----087

Gráfico 18: Teste de força máxima sob eletroestimulação do nervo ciático nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----089

Gráfico 19: Área de secção transversa do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----092

Gráfico 20: Área do interstício em % do músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----093

Gráfico 21: Número de fibras com núcleo central no músculo gastrocnêmio nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----095

Gráfico 22: Conteúdo do Pax7 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----098

Gráfico 23: Conteúdo do MyoD no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----099

Gráfico 24: Conteúdo da Laminina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----**100**

Gráfico 25: Conteúdo da Desmina no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*). -----**103**

Gráfico 26: Conteúdo do TGFβ-1 no músculo dos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*), anões (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) e anões distróficos (*little/little C57Bl/6J-Ghrhr^{lit}/J*) x (*dy/dy-B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) -----**104**

Gráfico 27: Teste de deambulação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***) -----**106**

Gráfico 28: Teste da esteira nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***) -----**109**

Gráfico 29: Teste de sustentação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***) -----**110**

Gráfico 30: Teste de força de preensão nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***)-----**111**

Gráfico 31: Teste de Rota rod nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***)-----**113**

Gráfico 32: Teste de resistência à inclinação nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***)-----**114**

Gráfico 33: Medidas dos pesos nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***)-----**116**

Gráfico 34: Medidas dos comprimentos nos camundongos *C57Black6*: controles, distróficos (*B6.WK-Lama 2^{Dy-2J}/J*) e distróficos em que foram administrados octreotida ^(***)-----**118**

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complexo de proteínas associadas a distrofina e laminina e doenças relacionadas -----	003
Figura 2: Exemplos de quatro modelos de camundongos para doenças neuromusculares mostrando suas respectivas alterações histopatológicas no músculo ressaltando aqui o modelo Dy^{2J}/Dy^{2J} -----	010
Figura 03: Musculatura esquelética com micrografia eletrônica e representação esquemática de um sarcômero, a unidade básica de contração do músculo esquelético-----	012
Figura 04: Coloração hematoxilina-eosina (HE); músculo distrófico humano (400X); lesões musculares primárias em vermelho em contraste às secundárias-----	012
Figura 05: Modelo de ativação de GHR-----	016
Figura 06: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos-----	017
Figura 07: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos via IGF-I-- -----	017
Figura 08: Vias ativadas pela ligação do IGF-I no receptor do músculo esquelético Modificado-----	020
Figura 09: Genes de desenvolvimento muscular: regeneração-----	023
Figura 10: Mecanismo de ação de $TGF\beta$ -----	028
Figura 11: Resumo simplificado da coordenação entre a inflamação e regeneração crucial para recuperação muscular após injúria-----	030
Figura 12: Representação da octreotida, um análogo sintético da Somatostatina-----	036

Figura 13: Sequenciamento do DNA dos camundongos *little*. O DNA genômico foi extraído do rabo dos camundongos e amplificado por PCR. Os amplicons gerados foram submetidos a seqüenciamento. A seta indica a presença da mutação (GGT) de troca de base (A→G)-----044

Figura 14: Genotipagem dos Camundongos *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*. O DNA genômico foi extraído do rabo dos camundongos e amplificado por PCR. Os amplicons gerados foram digeridos com a enzima *NdeI*, capaz de reconhecer o sítio mutado no gene da laminina, submetido à eletroforese e visualizado após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo. As bandas selvagem e mutante são indicadas com as setas. -----045

Figura 15: Teste de deambulação-----048

Figura 16: Teste de resistência à inclinação-----048

Figura 17: Teste de sustentação-----049

Figura 18: Teste de corrida em esteira rolante-----050

Figura 19: Teste de eletroestimulação-----052

Figura 20: Teste de preensão palmar (Grip) -----053

Figura 21: : Rotarod-----053

Figura 22: Histologia do gastrocnêmio para análise: da área das fibras musculares, da área do interstício e da proporção de fibras musculares com a presença de núcleos centrais. Histologia do Músculo em HE (Hematoxilina-Eosina) a) Controle b) Controle com GH^(***) c) Distrófico d) Distrófico com GH^(***)-----065

Figura 23: Camundongos *C57Black6*: a) anão/distrófico (duplo homozigoto) b) anão c) controle-----080

Figura 24: Camundongos *C57Black6*: a) anão/distrófico (duplo homozigoto) b) controle c) distrófico-----**080**

Figura 25: Histologia do gastrocnêmio para análise: da área das fibras musculares, da área do interstício e da proporção de fibras musculares com a presença de núcleos centrais. Histologia do Músculo em HE (Hematoxilina-Eosina) a) Anão b) Anão Distrófico c) Controle d) Distrófico-----**090**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de Siglas e Abreviaturas

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	proteínas morfogenéticas do osso
C57black6	camundongo normal (controle)
cDNA	DNA codificante total
CMD	distrofia muscular congênita
C – terminal	região carboxi terminal
CS	células satélites
CT	células-tronco
DGC	complexo de glicoproteínas associadas a
distrofina	
DL₅₀	dose letal média
DMB	distrofia muscular de becker
DMD	distrofia muscular de duchenne
DMP	distrofia muscular progressiva
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	dinucleotídeo
dy/dy (B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J)	camundongos distróficos com fraqueza evidente
FGF	fator de crescimento de Fibroblastos
GEP	sistema endócrino gastro-entero-pancreático
GDF	fatores de diferenciação e crescimento
GH	hormônio do crescimento

GH1	gene do hormônio do crescimento
GHBP	GH <i>binding protein</i>
GHR	receptor do hormônio do crescimento
GHRH	hormônio liberador de GH
GHRH	hormônio inibitório da liberação do GH
HE	coloração hematoxilina-eosina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HLH	família protéica <i>helix-loop-helix</i>
IGF-I e IGF-2	fatores de crescimento insulina- <i>like</i> I e II
IL-6	interleucina 6
i.p.	injeção intra-peritoneal
JAK	<i>janus kinase 2</i>
l/kg	litros por quilo
<i>Litlit (Ghrhr^{lit})</i>	camundongo anão
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
MAPKs/ERK	cascata de quinases ativadas por mitógenos
MB	megabases
Mdx	camundongos distróficos sem fraqueza evidente
mg/kg	miligramas por quilo
mg/ml	miligramas por mililitros
ml/min	mililitros por minutos

MPC	células precursoras musculares
mRNA	RNA mensageiro
Myf4	miogenina
Myf5	proteína chave na diferenciação muscular
MyoD	antígeno de diferenciação miogênico
ng/mL	nanogramas por mililitros
N – terminal	região amino terminal
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
Pax7	<i>paired box transcription factor 7</i>
PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação da polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PEG-hGH G120K	pegvisomante
PKB	<i>protein kinase B</i>
rhIGF-1	fator de crescimento humano recombinante
insulina- <i>like</i> I	
RNA	ácido ribonucléico
R-SMAD	<i>receptor regulated Smads</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<i>protein</i>	
s.c	injeção subcutânea
TBE	tampão tris-borato EDTA
TGF-β1	fator de crescimento transformador β

TNF	fator de necrose tumoral
TSH	hormônio estimulante da tireóide
Xp21	braço curto do cromossomo X

SUMÁRIO

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO-----	001
I.1 Distrofias Musculares-----	001
I.1.1 A Organização Molecular da Proteína Laminina-----	004
I.1.2 Mutações em CMD-----	005
I.2 Modelos murinos de distrofia muscular-----	006
I.2.1 Camundongo <i>mdx</i> (<i>C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J</i>) -----	006
I.2.2 Camundongo <i>dy/dy</i> (<i>B6.WK- Lama2^{dy-2J}/J</i>) -----	008
I.3 Músculo e GH-----	013
I.3.1 GH-----	013
I.3.1.1 Produção e Liberação do GH -----	013
I.3.1.2 Mecanismo de Ação do GH e Estrutura do Receptor (GHR) -----	015
I.3.1.3 Genética do GH-----	018
I.3.1.4 Eixo GH/IGF-I -----	018
I.3.1.5 GH e seu papel no músculo esquelético-----	019
I.4 Processo de degeneração–regeneração muscular-----	021
I.4.1 Fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na regeneração e diferenciação muscular-----	023

I.4.2 TGF β -1-----	025
I.5. Deficiência de GH-----	032
1.5.1 Inibidores do GH-----	032
1.5.1.1 Pegvisomante-----	033
1.5.1.2 Sandostatina: derivado sintético da Somatostatina e inibidor da liberação do GH -----	034
1.5.1.2.1 Farmacodinâmica da droga-----	036
1.5.1.2.2 Farmacocinética -----	037
1.5.1.2.3 Dados de Segurança pré-clínicos-----	037
1.5.1.2.4 Principais Indicações -----	039
1.5.2 Modelo Animal de deficiência de GH: Camundongo <i>little (Ghrhr^{lit})</i> -----	039
II – JUSTIFICATIVA-----	040
III – OBJETIVOS -----	041
IV – METODOLOGIA-----	042
IV.1 Animais -----	042
IV.1.1 Considerações Éticas-----	042
IV.1.2 Estabelecimento de Linhagens Animais-----	042
IV.1.3 Genotipagem dos camundongos -----	043
IV.1.3.1 Genotipagem dos camundongos <i>little/little</i> -----	043
IV.1.3.2 Genotipagem dos camundongos B6.WF-Lama 2dy2J-----	044

IV.1.4 Alojamento-----	045
IV.1.5 Acasalamentos programados-----	046
IV.1.5.1 Resumo dos esquemas de acasalamento -----	046
IV.1.6 Avaliação Funcional -----	046
IV.1.6.1 Testes comportamentais e funcionais da musculatura esquelética apendicular-----	046
Teste de Deambulação-----	047
Teste de Resistência a inclinação-----	048
Teste de Sustentação-----	049
Teste de Corrida em Esteira Rolante-----	049
IV.1.7 Testes de funcionalidade da musculatura esquelética apendicular com eletroestimulação-----	050
IV.1.8 Teste do Grip-----	052
IV.1.9 Teste do Rotarod-----	053
IV.1.10 Técnica de <i>Western Blotting</i> -----	054
IV.2 Administração do inibidor da liberação do GH. -----	055
IV.3 Análise Estatística -----	055
V- RESULTADOS-----	057
V.1 PARTE 1: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO GH (10µg/camundongo/dia, i.p., por 10 dias consecutivos) SOBRE A MUSCULATURA DOS ANIMAIS <i>C57Black6</i> CONTROLES e DISTRÓFICOS <i>dy/dy</i> (<i>B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J</i>) -----	057
Teste de Deambulação-----	057

Teste de Sustentação-----	057
Teste da Esteira-----	060
Teste da Força Máxima sob Eletroestimulação do Nervo Ciático-----	062
Teste de Resistência à Inclinação-----	062
Área da secção transversal -----	066
Área do interstício-----	066
Número de fibras com núcleo central -----	069
Pax7 -----	071
MyoD-----	071
Laminina-----	074
Desmina-----	074
TGFβ-1-----	077

V. 2PARTE 2: AVALIAÇÃO DO QUADRO DISTRÓFICO DE CAMUNDONGOS OBTIDOS PELO CRUZAMENTO DE ANIMAIS *C57Black6* DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*^{dy-2J}/J) COM ANÕES COM DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr*^{lit}/J). -----

Teste de Deambulação-----	081
Teste de Sustentação-----	081
Teste de Resistência à Inclinação-----	082
Teste da Esteira-----	086
Teste da Força Máxima sob Eletroestimulação do Nervo Ciático-----	088
Área da secção transversal -----	091
Área do interstício-----	091
Número de fibras com núcleo central -----	094

Pax7-----	096
MyoD-----	096
Laminina-----	097
Desmina-----	101
TGFβ-1-----	101

V.3 PARTE 3:ESTUDO DOS EFEITOS DA OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA INIBIDOR DA LIBERAÇÃO DO GH, SOBRE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA DOS CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2^{dy-2J}*/J) -----

Teste de Deambulação-----	105
Teste da Esteira-----	107
Teste de Sustentação-----	107
Teste de Força de Preensão -----	108
Teste de Rota Rod-----	112
Teste de Resistência à Inclinação-----	112
Peso-----	115
Comprimento-----	117

VI – DISCUSSÃO-----

PARTE 1: ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO GH SOBRE A MUSCULATURA DOS ANIMAIS DISTRÓFICOS *dy/dy* (B6.WK-*Lama2^{dy-2J}*/J) -----

PARTE 2: GH E PAPEL DO TGF-β1 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DOS MÚSCULOS INJURIADO E DISTRÓFICO-----

PARTE 3: OCTREOTIDA, UM DERIVADO SINTÉTICO DA SOMATOSTATINA, UMA ESPERANÇA DE MELHORA PARA O QUADRO DISTRÓFICO DE DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS ? -----	137
VII – CONCLUSÕES-----	140
VII – REFERÊNCIAS-----	142

I – INTRODUÇÃO

I.1 Distrofias Musculares

As distrofias musculares progressivas (DMPs) podem ocorrer em qualquer idade constituindo um grupo heterogêneo de doenças genéticas que se caracterizam por degeneração irreversível da musculatura esquelética. Já foram mapeados genes responsáveis por mais de 30 formas de distrofias, cuja herança pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X (ZATZ *et al.*, 2000). Em biópsia muscular, os achados histológicos característicos consistem em variação no tamanho das fibras, infiltração do músculo por tecido conjuntivo e adiposo, e áreas de necrose, provocado por repetidos ciclos de regeneração e degeneração muscular com uma eventual falha em sua regeneração (GARDER-MEDWIN, 1980; BUSHBY & BECKMANN, 1995; ZATZ *et al.*, 2000).

Dentre as diferentes miopatias, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), de herança recessiva ligada ao cromossomo X, é a mais comum, com uma incidência de 1 em cada 3.000 nascimentos do sexo masculino. Já a Distrofia Muscular de Becker (BMD), alélica a DMD, é aproximadamente 10 vezes mais rara. A diferença entre estas duas formas está na idade de início da doença e velocidade de progressão (ZATZ *et al.*, 2001). Na DMD, os sinais clínicos iniciam-se entre três e cinco anos de idade, com quedas freqüentes, dificuldades 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 25 anos sem cuidados especiais. Já na BMD, os sintomas iniciam-se em geral, na segunda década: os afetados sempre andam após os

16 anos, e a velocidade de progressão é extremamente variável (McNALLY & PYTEL, 2007)

O gene responsável pela DMD/BMD localiza-se no braço curto do cromossomo X, na banda Xp21. Com 2,3 megabases (Mb), o gene DMD é o maior gene humano já caracterizado. É constituído por 79 exons, sendo transcrito em um mRNA de 14 kilobases (Kb). (ZATZ *et al.*, 1981; VERELLEN-DUMOULIN *et al.*, 1984; FRANCKE *et al.*, 1985; BLAKE *et al.*, 2002).

Após a sua localização que levou a clonagem em 1987 (HOFFMAN *et al.*, 1987), descobriu-se que o produto do gene DMD/DMB é uma proteína de 427-kDa, denominada distrofina, localizada no citoesqueleto das fibras musculares esqueléticas e cardíacas. A função da distrofina seria a de manter a estabilidade da membrana da célula muscular, garantindo assim, o tráfego de informações através da membrana da célula muscular (HOFFMAN & DRESSMAN, 2001). Estudos de solubilização da distrofina a partir de frações do sarcolema mostraram que esta proteína está associada a um complexo de proteínas e glicoproteínas da membrana sarcolemal denominado Complexo Glicoproteína-Distrofina (DGC) (ERVASTI & CAMPBELL, 1991), que também teriam um papel fundamental na manutenção da estrutura da fibra muscular e liga o citoesqueleto miofibrilar com a matriz extracelular. Mutações em outros componentes desse complexo podem acarretar no aparecimento de tipos diferentes de distrofias como a Distrofia Muscular Congênita (CMD) (ZATZ *et al.*, 2001).

doenças relacionadas (VAINZOF & ZATZ, 2003)

As Distrofias Musculares Congênitas formam um grupo de doenças musculares clinicamente heterogêneas, caracterizadas pela presença de fraqueza muscular difusa no período neonatal, grau variável de contratura nas articulações e possível associação com anormalidades no sistema nervoso central ou nos olhos. A biópsia muscular invariavelmente apresenta alterações histopatológicas distróficas. A doença costuma ser lentamente progressiva ou não progressiva, e eventualmente, pode ocorrer melhora funcional (DUBOWITZ, 1996, 1997, 1999). Em aproximadamente 50% dos casos classificados como forma clássica de CMD, a doença é causada por mutações em um gene mapeado em 6q2 (HILLAIRES *et al.*, 1994). Em 1994, Tomé *et al.* identificaram a proteína merosina ou laminina $\alpha 2$ como a responsável pela

patogênese da doença. A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Forma um heterotrímero em forma de cruz com as cadeias $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$. A laminina 2 liga-se ao citoesqueleto subsarcolemal por um grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. O bom funcionamento do complexo seria responsável por um correto mecanismo de contração muscular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993) Assim como a deficiência de distrofina leva às distrofias de Duchenne e Becker, a deficiência da proteína merosina leva a uma das formas de distrofia muscular congênita. O camundongo *dy/dy* é o modelo animal para a CMD-merosina-deficiente, pois também apresenta deficiência da proteína no músculo associada a uma significativa fraqueza muscular. O desenvolvimento de modelos animais merosina deficientes com comprometimento clínico poderá contribuir para a melhor compreensão da patogênese da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

I.1.1 A Organização Molecular da Proteína Laminina

A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Forma um heterodímero em forma de cruz com as cadeias $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$. A laminina liga-se ao citoesqueleto subsarcolemal por um grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. O bom funcionamento do complexo seria responsável por um correto mecanismo de contração muscular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993). Portanto, assim como a deficiência de distrofina leva às distrofias de Duchenne e Becker, a deficiência de merosina leva a uma das formas de CMD. A cadeia $\alpha 2$ da laminina, originalmente com 400 kDa, sofre uma clivagem pós-tradução, originando os

fragmentos de 80 e 300 KDa. A maioria dos estudos imuno-histoquímicos utiliza um anticorpo monoclonal comercial que reage com o fragmento de 80 kDa da região C-terminal. Aproximadamente 95% dos pacientes com mutações no gene em 6q apresentam deficiência total da proteína enquanto os restantes 5% apresentam deficiências parciais, relacionadas às mutações de sentido trocado, ou deleções que não alteram o quadro de leitura (HAYASHI *et al.*, 1997; ALLAMAND *et al.*, 1997). A laminina está presente também nas células de Schwann, trofoblasto e membrana basal de queratócitos da epiderme, o que permite o seu estudo em tecidos de obtenção mais fácil, como biópsia de pele, e a realização de diagnóstico pré-natal. Clinicamente, o grupo de pacientes merosina-negativos apresenta um fenótipo mais grave, e a maioria dos pacientes é incapaz de adquirir marcha independente. (TOMÉ *et al.*, 1994; VAINZOF *et al.*, 1995; ALLAMAND *et al.*, 1997).

I.1.2 Mutações em CMD

O gene LAMA2 é composto por 260 Kb organizados em 64 éxons, e o cDNA tem cerca de 9,5 Kb. O estudo de mutações no gene LAMA2 mostrou grande heterogeneidade, com presença de deleções e mutações de sentido trocado levando a códons de parada (HELBLING-LECLERC *et al.*, 1995; GUICHENEY *et al.*, 1997). A mutação mais freqüente, encontrada em cerca de 23% dos pacientes, é uma deleção de 2pb (2096-2097). Mutações de sentido trocado e pequenas deleções que não alteram o quadro de leitura levam a formação de uma proteína truncada e à deficiência parcial da merosina no músculo. A maioria das mutações leva à formação de uma proteína truncada em um dos domínios que formam o braço curto da cadeia $\alpha 2$ da laminina. O

mRNA formado é provavelmente muito instável, e mesmo em caso de formação de polipeptídio, acredita-se que este não teria o domínio globular G (C-terminal) e os domínios I e II do braço longo da cadeia, e, portanto, não poderia participar da formação do heterodímero normal da laminina (TOMÉ *et al.*, 1999). Não foi identificado um *hot spot* de mutações no gene LAMA2. Entretanto, ocorre um efeito fundador para algumas das mutações encontradas (GUICHENEY *et al.*, 1998). Dado o grande tamanho do gene e a variabilidade de mutações (grande parte dos pacientes são heterozigotos compostos e as mutações pontuais são muito freqüentes), a triagem de mutações não é feita rotineiramente nos grandes centros do mundo.

I.2 Modelos murinos de distrofia muscular

Recentes avanços em biologia molecular têm indicado que muitos modelos mutantes de animais com distrofia muscular apresentam alterações genéticas e protéicas semelhantes às encontradas nas doenças humanas. Homólogos de DMD, por exemplo, têm sido identificados em vários animais incluindo cães, gatos, ratos, peixes e invertebrados (COLLINS & MORGAN, 2003).

Apresentaremos a seguir alguns dos mais importantes modelos de distrofias em camundongos que apresentam alterações protéicas e genéticas semelhantes às vistas em pacientes com distrofias musculares e que têm sido extensivamente utilizados para examinar os efeitos da terapia gênica e da administração de fatores farmacológicos e tróficos.

I.2.1 Camundongo *mdx* (C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J)

Um exemplo de modelo de distrofia muscular de Duchenne (DMD) bastante estudado é o camundongo *mdx*, apesar dele não apresentar sinais clínicos evidentes de distrofia muscular (SICINSKI *et al.*, 1989).

A mutação do gene da distrofina ligado ao cromossomo X (*Dmd*) do camundongo *mdx* é recessiva e fêmeas heterozigotas são visualmente indistinguíveis do camundongo tipo selvagem. Fêmeas homozigóticas e machos hemizigóticos para o alelo *Dmd^{mdx}* possuem uma expectativa de vida normal e podem sobreviver acima de dois anos. Assim como os pacientes que sofrem de DMD, os mutantes *Dmd^{mdx}* não expressam distrofina e, embora tenham sido rotineiramente utilizados como um modelo animal de doença, a miopatologia resultante é muito menos grave, comparada ao curso da doença humana (SICINSKI *et al.*, 1989).

O músculo de mutantes *Dmd^{md}* é histologicamente normal no início do desenvolvimento pós-natal, mas, em torno de três semanas, a necrose muscular se inicia com leves sinais de fraqueza muscular. Análises bioquímicas incluem elevados níveis séricos de creatinoquinase e piruvatoquinase, juntamente com acúmulo de macrófagos, ambos marcadores precoces de degeneração muscular. Enquanto os membros do músculo esquelético são caracterizados por degeneração e necrose persistentes e progressivas, este quadro é compensado por uma resposta regenerativa ativada por células satélites e hipertrofia muscular. As fibras regeneradas são morfologicamente tipificadas por fibras nucleadas centrais de pequeno calibre e o camundongo apresenta comportamento normal. Os músculos dos mutantes *Dmd^{mdx}* apresentam uma redução geral de elasticidade, tornando-os mais suscetíveis à

injúria. O fenótipo comparativamente leve do camundongo *Dmd^{mdx}* tem sido atribuído por alguns pesquisadores (TINSLEY *et al.*, 1996, 1998; SQUIRE *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2008) a utrofina, uma proteína relacionada à distrofina, a qual está aumentada nas fibras musculares regeneradas em adultos mutantes *Dmd^{mdx}*. Isto porque foi demonstrado que camundongos duplamente mutantes para distrofina e utrofina tinham um fenótipo muito mais severo e morte prematura. Em contraste com os músculos dos membros, o diafragma não apresenta uma fase de regeneração à medida que a distrofia avança com a idade, comprometendo progressivamente a sua fisiologia contrátil (SICINSKI *et al.*, 1989). O *locus* da distrofina *Dmd* está localizado na parte central do braço curto do cromossomo X. A proteína distrofina é codificada por um gene extremamente grande com transcrição completa de 14 kb. Ela está abundantemente expressa em fibras musculares cardíacas e esqueléticas, e menos expressa em neurônios e nas células da glia do sistema nervoso central (RIDER-COOK *et al.*, 1988).

1.2.2 Camundongo *dy/dy* (B6.WK- *Lama2^{dy-2J}*/J)

Um outro modelo, também bastante conhecido e extensivamente estudado, é o camundongo *dy/dy*, que apresenta ausência de merosina (laminina alpha 2), uma subunidade da proteína de membrana básica, a laminina. Devido ao fato de que aproximadamente metade de todos os pacientes com a forma clássica de distrofia muscular congênita também apresentarem ausência de merosina, este modelo animal tem despertado inestimável interesse no estudo do mecanismo patológico de fibras necróticas resultantes deste defeito de membrana.

Camundongos homozigotos para a mutação espontânea de distrofia muscular *Lama2^{dy-2J}* são caracterizados por paralisia e fraquezas progressivas iniciando em torno de três semanas e meia de idade. Os membros traseiros são afetados primeiramente, seguido dos axiais e da musculatura dianteira. A morte usualmente ocorre antes dos seis meses de idade, e os camundongos mutantes são usualmente estéreis. A doença é transmitida como um traço autossômico recessivo e os animais heterozigotos são assintomáticos. O músculo esquelético mostra alterações degenerativas com proliferação do núcleo sarcolêmico, aumento na quantidade de tecido intersticial, e variação de tamanho das fibras musculares individuais (MEIER & SOUTHARD, 1970).

O camundongo mutante para esta distrofia muscular apresenta uma mudança de pares de bases no gene da laminina alpha 2 (merosina), *Lama2*. A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Elas apresentam um papel na adesão celular, migração, proliferação, e diferenciação. Humanos com distrofia muscular congênita causada por deficiência de merosina têm mutações no gene LAMA 2 que resulta em uma cadeia laminina alpha 2 truncada. Os camundongos mutantes *Lama2^{dy-2J}* apresentam uma deficiência parcial da cadeia semelhante àquela encontrada no homem (SUNADA *et al.*, 1995). O primeiro modelo descrito para *dy* apresenta ausência total da merosina com fenótipo mais grave (MICHELSON *et al.*, 1955; VILQUIN *et al.*, 2000).

Figura 02: Exemplos de quatro modelos de camundongos para doenças neuromusculares mostrando suas respectivas alterações histopatológicas no músculo ressaltando aqui o modelo Dy^{2J}/Dy^{2J} (Modificado de VAINZOF *et al.*, 2008).

O camundongo *dy/dy* é o modelo animal para a CMD-merosina deficiente, pois também apresenta deficiência da proteína no músculo associada a uma significativa fraqueza muscular (SUNADA *et al.*, 1994). O desenvolvimento de modelos animais merosina-deficientes com diferentes

mutações tem contribuído para a melhor compreensão da patogênese da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas em humanos através da utilização de terapias hormonais, celulares, gênicas e farmacológicas (COHN *et al.*, 2007; MILLAY *et al.*, 2008).

Uma das *estratégias* mais utilizadas na busca de tentativas terapêuticas para as distrofias musculares envolve o Hormônio do Crescimento (GH). ZATZ *et al.* (1981) relataram o caso de um menino afetado por DMD e que apresentava deficiência de GH cuja evolução clínica era benigna. Lynch *et al.* (2000) mostraram que a administração exógena de rhIGF-1 (Fator de Crescimento humano recombinante Insulina-*like* I e principal efector endócrino do GH) melhorou a patologia distrófica em camundongos mdx. Apesar dos resultados controversos, inúmeros trabalhos tentam correlacionar os efeitos do GH no músculo normal (Figura 3) e na evolução do quadro distrófico (Figura 4) nas doenças neuromusculares.

Figura 03: Musculatura esquelética com micrografia eletrônica e representação esquemática de um sarcômero, a unidade básica de contração do músculo esquelético (modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005)

Figura 04: Coloração hematoxilina-eosina (HE); músculo distrófico humano (400X); lesões musculares primárias em vermelho em contraste às secundárias (modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005)

I.3 Músculo e GH

1.3.1 GH

O GH é um polipeptídeo de cadeia única de 191 aminoácidos contendo duas pontes dissulfeto e produzido em maior quantidade pela hipófise anterior. Constitui o principal regulador do crescimento pós-natal e um importante regulador metabólico (BENGTSSON, 1999). O GH humano tem um alto grau de homologia de sequência com o GH de outras espécies, mas somente o GH humano ou de outros primatas é ativo no ser humano, apresentando uma meia-vida de 20 min. Ele age através de seu receptor de GH (GHR) para estimular elementos sinalizadores chave: JAK2, STAT5, PI3K, MAPK, STAT3 e PKC (HERRINGTON & CARTER-SU, 2001). A ausência de GH ou GHR em humanos resulta em baixa estatura, massa muscular reduzida, aumento do estoque lipídico, diminuição da densidade mineral do osso cortical e diminuição da fertilidade em fêmeas (BENGTSSON, 1999). A deficiência do GH pode ser resultado de mutação genética, mas, é também consequência normal do envelhecimento. Os níveis de GH e de seu principal mediador, IGF-I, têm diminuído com a idade e a terapia de reposição com GH mostrou reverter parcialmente os déficits mencionados acima (RUDMAN *et al.*, 1990).

1.3.1.1 Produção e Liberação do GH

As células somatotróficas produtoras de GH estão localizadas na hipófise anterior e são responsáveis por aproximadamente 50% da população celular local. A secreção de GH depende de diversos reguladores intra e extra-hipotalâmicos. A secreção é regulada primariamente por dois hormônios

peptídicos liberados por células neurosecretoras: Hormônio Liberador de GH (GHRH) e Hormônio Inibitório da liberação do GH (GHRIH) ou Somatostatina. O equilíbrio da produção destes dois fatores conduz a secreção de GH pelos somatotrofos. O aumento de secreção de GH inibe, *per si*, a secreção de GHRH e estimula a secreção de GHRIH, que inibe a secreção de GHRH. A secreção de GH também estimula a síntese e secreção de IGF-I no organismo e principalmente no fígado. Este último, por sua vez, também inibe a secreção de GHRH e estimula a secreção de GHRIH. A secreção de GH promove uma série de efeitos fisiológicos. As principais ações fisiológicas do eixo GH/IGF-I descritos na literatura são: aumento da lipólise, produção de IGF-I pelo fígado, aumento da massa muscular magra, aumento do tamanho dos órgãos e do crescimento linear. Na circulação sanguínea, cerca de metade do GH encontra-se ligado com alta afinidade à proteína de ligação GHBP (*GH binding protein*), cuja estrutura química é homóloga à porção extracelular do GHR. Em algumas espécies, como nos roedores, a GHBP tem origem de um processamento alternativo do RNA mensageiro do gene do GHR. Na espécie humana, a porção extracelular do GHR ancorado na membrana celular sofre a ação de uma protease e, a partir desta clivagem, surge a GHBP circulante (LICHANSKA & WATERS, 2008)

IGFBPs	Expressão de IGFBPs	Papéis relatados no músculo esquelético
IGFBP1	-	Age como mediador do catabolismo muscular
IGFBP2	-	-
IGFBP3	Alta expressão no músculo neonatal, principalmente em macrófagos envolvidos com a regeneração muscular	Suporte para a diferenciação de mioblastos Aumentado durante a fase primária de regeneração muscular Níveis diminuídos no músculo sóleo durante o envelhecimento
IGFBP4	Alta expressão no músculo neonatal, expresso em tecido conectivo em regeneração muscular	Envolvido na proliferação de mioblastos Aumenta durante a fase tardia da regeneração muscular
IGFBP5	Alta expressão no músculo adulto, expresso em células musculares em regeneração	Controla a diferenciação muscular Aumenta durante a fase tardia da regeneração muscular Níveis diminuídos no músculo sóleo durante o envelhecimento Aumentado durante a atrofia muscular
IGFBP6	Alta expressão no músculo neonatal, expresso em células musculares, tecido conectivo e endotélio	Regula a fase quiescente do programa miogénico Aumenta durante a fase tardia da regeneração muscular
IGFBP7^b	-	-

Tabela 1: Interações de IGF-I com diferentes IGFBPs nas células musculares (modificada de MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005).

^aDados não disponíveis

^b O IGFBP-7 foi identificado recentemente

1.3.1.2 Mecanismo de Ação do GH e Estrutura do Receptor (GHR)

Para exercer os seus efeitos biológicos, o GH provoca dimerização do seu receptor. Para tanto, a molécula de GH possui dois sítios de ligação na sua

estrutura, sendo que cada um deles vai se ligar de modo seqüencial a duas moléculas de GHR. Na fase inicial deste processo, o sítio 1 de ligação do GH se liga a uma molécula de GHR formando um complexo 1:1 inativo, isto é, incapaz de provocar dimerização do GHR. Em seguida, o sítio 2 de ligação do GH se liga a uma segunda molécula de GHR, constituindo assim o complexo ativo 2:1, que provoca dimerização do GHR e que inicia uma cascata de eventos intracelulares envolvendo as proteínas das famílias JAK e STAT, assim como a cascata de quinases ativadas por mitógenos (MAPKs/ERK), e a via de fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Sugere-se que Akt (PKB; protein kinase B), uma quinase de serina-treonina efetora da via de PI3K, é essencial para a conversão miogênica, estando também envolvida em processos relacionados com sobrevivência celular. Quando ativada, Akt modula a expressão dos genes codificadores de p21, MyoD, MEF2 e miogenina e inibe proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 (HERRINGTON & CARTER-SU, 2001).

Figura 05: Modelo de ativação de GHR (LICHANSKA & WATERS, 2008)

Figura 07: Mecanismo de ação do GH em humanos e camundongos via IGF-I (modificado de LICHANSKA & WATERS, 2008)

1.3.1.3 Genética do GH

A produção de GH inicia-se com a transcrição do gene GH1 (que possui cinco éxons na sua estrutura). O principal produto do gene GH1 (~90%) origina-se da remoção de todos os seus introns, formando um mRNA que codifica uma molécula de GH com 191 aminoácidos e peso molecular de 22kDa. Um processamento alternativo do gene GH1, em que ocorre uma perda de 45 nucleotídeos do éxon 3, leva a produção de uma molécula de GH com 176 aminoácidos e peso molecular de 20kDa. Além destes dois peptídeos, outras isoformas e fragmentos da molécula de GH estão presentes em quantidades variáveis na circulação devido agregação e proteólise. O GHR é codificado por nove éxons do gene GHR numerados de 2 a 10, sendo que a parte extracelular do GHR (correspondente a GHBP) é proveniente dos éxons 3 a 7, a parte transmembrana do éxon 8 e porção intracelular dos éxons 9 e 10.

O funcionamento inadequado de algum dos genes que respondem pela produção dos diferentes componentes do eixo GH/IGF-I pode levar ao quadro clínico de retardo de crescimento. O GH está aumentado no final da vida fetal e durante as primeiras semanas de vida, mas logo cai a valores normais em repouso de 2 a 5 ng/mL (LICHANSKA & WATERS, 2008).

1.3.1.4 Eixo GH/IGF-I

IGF-I constitui o principal efector do GH produzido principalmente pelo fígado. O IGF-I está relacionado à regulação do *turnover* de proteínas e exerce potentes efeitos mitogênicos e de diferenciação na maioria dos tipos celulares. As ações biológicas de IGF-I são mediadas pelo receptor de IGF-I formado de

2 α -subunidades extracelulares. IGF-I estimula a síntese protéica, o aumento no tamanho e número de células culminando com o crescimento dos órgãos e o crescimento linear propriamente dito.

1.3.1.5 GH e seu papel no músculo esquelético

GH age diretamente e concomitante com IGF-I no músculo diminuindo a captação da glicose, aumentando a captação dos aminoácidos e aumentando a síntese protéica culminando com o aumento da massa magra muscular. A sinalização de IGF-I no músculo esquelético ocorre em três diferentes níveis (via proteína quinase mitógeno ativada; Inositol trifosfato e na via do Cálcio) após a ligação do IGF-I induzir a fosforilação do mesmo culminando e hipertrofia do músculo (Figura 08) (MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005).

IGF-I no Músculo Esquelético

Figura 08: Vias ativadas pela ligação do IGF-I no receptor do músculo esquelético Modificado de MOURKIOTI & ROSENTHAL, 2005

O GH é produzido em maior quantidade pela hipófise anterior, mas sua produção ectópica tem sido observada em outros tipos celulares, tais como células-tronco (CT). Em mioblastos C2C12 superexpressando GHR, a ativação aumentada de Akt e MAPK sobre a estimulação de GH, resultou na inibição da diferenciação, indução da proliferação celular e prevenção da apoptose. IGF-I também realiza suas funções através da ativação das vias MAPK e PI3K. Alguns trabalhos demonstram que ele promove a diferenciação muscular esquelética através da via PI3K/Akt, como já mencionado anteriormente no caso do GH, enquanto em outras situações a diferenciação de mioblastos C2C12 induzida por este fator é correlacionada com a indução da via

MAPK/p38. Estes dados em conjunto, sugerem que os papéis desempenhados por cada fator dependem do tipo celular e do estímulo utilizado.

O papel do eixo GH/IGF-I também tem sido documentado em casos patológicos. A administração de GH por três meses em indivíduos afetados por DMD e DMB, acarretou em melhora da função sistólica cardíaca (CITTADINI *et al.*, 2003) Além disso, tem sido sugerido que a falta de IGF-I contribui para o catabolismo de proteínas musculares. Neste sentido, o papel terapêutico de GH tem sido proposto, por causa de suas propriedades anabólicas. Pacientes com DMD apresentaram uma inesperada resposta catabólica ao invés do efeito anabólico usual. Existem vias adicionais às quais contribuem para o crescimento pós-natal uma vez que, camundongos resultantes de cruzamentos entre camundongos IGF-1 $-/-$ com GHR $-/-$ são menores que IGF-1 $-/-$ sozinhos (LICHANSKA & WATERS, 2008), e estas vias podem ser vias de sinalização de citocinas.

1.4 Processo de degeneração–regeneração muscular

Mamíferos adultos possuem músculos esqueléticos com uma grande capacidade de se adaptarem a demandas, como crescimento e injúria. Os processos responsáveis por essas adaptações são atribuídos a uma pequena população de células que são residentes no músculo denominadas células satélites (CS) ou células precursoras miogênicas. Essas células são mononucleadas e localizam-se na periferia dos miotubos maduros entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares. Não ocorrendo nenhuma perturbação, essas células encontram-se em um estado não proliferativo (quiescente). Entretanto, quando ocorre um estímulo, seja uma injúria ou uma

resposta a uma demanda aumentada de trabalho, as CS tornam-se ativadas, começam a proliferar e expressam os marcadores miogênicos (CS expressando marcadores miogênicos são também denominadas mioblastos). Finalmente, elas se fundem a fibras musculares já existentes ou fusionam-se para formar novas miofibras multinucleadas, em um processo que recapitula os eventos fundamentais do desenvolvimento muscular (HAWKE & GARRY, 2001) (Figura 09).

A população de células precursoras musculares pode tolerar inúmeros ciclos de degeneração e regeneração, entretanto, essa capacidade é finita. A exaustão do *pool* de células precursoras é um importante fator que contribui com a deterioração muscular gradual observada em pacientes com distrofias musculares. A ausência de laminina resulta em uma deficiência secundária no grande complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. (OHLENDIECK & CAMPBELL, 1993) e como consequência a instabilidade deste complexo, as fibras musculares ficam mais susceptíveis ao estresse mecânico causado pela contração muscular, levando ao processo de degeneração em pacientes CMD. A regeneração muscular é caracterizada por duas fases: degenerativa e regenerativa (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004). A morte das fibras musculares ou de fragmentos de fibras seja por apoptose ou necrose, acontece em consequência dos defeitos bioquímicos primários causados pela doença. A morte de células ativas varia dependendo do músculo examinado, da idade do paciente e da espécie que manifesta a patogenia. Esse evento é marcado pelo rompimento do sarcolema das miofibrilas, resultando em um aumento na permeabilidade refletido por uma elevação do nível sérico de proteínas

musculares como a creatina quinase, que é geralmente restrita ao citosol da célula muscular. Nessa fase ocorre a ativação de células mononucleadas, principalmente células inflamatórias e CS. A regeneração muscular que segue a morte celular reflete as mudanças secundárias, caracterizadas pela substituição do músculo por tecido adiposo ou conectivo, logo após a perda de sua capacidade regenerativa.

Genes de desenvolvimento muscular: regeneração

Figura 09: Genes de desenvolvimento muscular: regeneração

1.4.1 Fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na regeneração e diferenciação muscular

O processo regenerativo muscular constitui evento complexo que requer uma modulação harmoniosa entre as células satélites, fatores de crescimento, citocinas, respostas inflamatórias, componentes vasculares e da matriz extracelular (GOETSCH *et al.*, 2003). Os fatores de transcrição miogênicos

pertencem à família protéica *helix-loop-helix* (HLH) e têm papel fundamental na miogênese e na regeneração: as células onde eles não são expressos não se diferenciam em músculo (SEALE & RUDNICKI, 2000).

O MyoD (Antígeno de Diferenciação Miogênico – *Myf3*) atua na regulação da expressão de genes em tempos diferentes durante a miogênese e é essencial no reparo de lesões musculares, uma vez que participa da ativação das CS no intervalo de 6 horas depois da injúria (HAWKE & GARRY, 2001). O *Myf5* está estruturalmente relacionado ao MyoD e também atua na determinação dos mioblastos durante o desenvolvimento embrionário, auxiliando na proliferação das CS (HAWKE & GARRY, 2001). Não existe nenhuma patologia associada ao *Myf5* e ao *MyoD*, porém a sua expressão pode estar aumentada em DMD/DMB e em miopatias inflamatórias. Quando a inativação do gene *MyoD* é induzida em camundongos, observa-se atraso no desenvolvimento da musculatura dos membros. Entretanto, quando ocorre inibição do *MyoD* concomitante com inibição de *Myf5*, há ausência total de mioblastos e não há formação de tecido muscular. O MyoD desempenha um papel na regulação da diferenciação celular, sendo expressado em células satélites ativadas, mas não nas quiescentes. (MUNTONI *et al.*, 2002).

Outro fator de transcrição que influencia a atividade das células satélites é o Pax7 (*paired box transcription factor 7*), expresso em células quiescentes e em proliferação. A presença de mutações neste gene causa ausência total de progenitores miogênicos no músculo (HAWKE & GARRY, 2001; MUNTONI *et al.*, 2002). Esses dados suportam a hipótese de que Pax7 é essencial para a especificação das CS. As células satélites quiescentes expressam o Pax7 e

quando ativadas, co-expressam Pax7 e MyoD. O Pax7 é capaz de induzir transcrição em células satélites, estando envolvido na manutenção da proliferação e prevenção da diferenciação precoce.

Os Fatores de Crescimento Insulina-like I e II (*IGF-I* e *IGF-II*) participam da regulação da regeneração, pois aumentam a proliferação, a diferenciação e a fusão das CS *in vitro*, provocando aumento da massa muscular e da quantidade de células (HAWKE & GARRY, 2001; MUNTONI *et al.*, 2002; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

IGF é um fator produzido por vários tecidos, envolvido na regulação de diversos caminhos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação e diferenciação. A produção de IGF-I é positivamente regulada pelo GH, seu maior efector endócrino. Embora tenha sido postulado que o estímulo de síntese e secreção de IGF-I pelo GH ocorra no fígado, atualmente sabe-se que esta função pode ser exercida em outros tecidos periféricos, incluindo a musculatura esquelética (ISAKSSON *et al.*, 1982; ISAKSSON *et al.*, 1987) Adicionalmente, Sacco *et al.* (2005) demonstraram que o IGF-I é suficiente para aumentar a fusão de células derivadas da medula óssea com o músculo esquelético adulto. Além disso, camundongos *mdx* transgênicos super expressando este fator mostravam uma melhora da força e massa muscular reforçando seu papel terapêutico (DE LUCA *et al.*, 1999; BARTON *et al.*, 2002).

1.4.2 TGF β -1

O Fator de Crescimento Transformador β (TGF β) é uma importante citocina regulatória do crescimento celular (CHARGÉ & RUDNICK, 2004). Os

mecanismos precisos levando a fibrose no músculo distrófico não são conhecidos mas certamente envolvem a ação de várias citocinas inflamatórias, tais como TGF- β 1 (GOSSELIN *et al.*, 2004).

A família do TGF-Beta, que inclui o peptídeo TGF- β 1 e suas isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3, pertencem à superfamília TGF-Beta que também inclui vários outros ligantes, tais como, proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fatores de diferenciação e crescimento (GDFs), hormônio anti-mullerino, Activina e Nodal. O TGF- β 1, e outros membros da sua família, estão envolvidos em muitos processos celulares, tanto no adulto como no embrião, incluindo o crescimento e diferenciação celular, apoptose, homeostase celular e outras funções celulares.

A via de sinalização do TGF- β 1 é relativamente simples e compreende: 1) a ligação com o receptor tipo II, o qual recruta e fosforila o receptor tipo I; 2) o receptor tipo I, por sua vez, fosforila o R-SMADs que liga-se ao coSMAD; 3) este complexo R-SMADs/coSMAD se acumula no núcleo onde age como fatores de transcrição, participando da regulação da expressão de genes alvos (Figura 10). As vias de sinalização dos outros membros da superfamília TGF Beta são semelhantes à do TGF- β 1 e encontram-se ilustradas na Tabela 2 (WRANA *et al.*, 1992).

Em células normais, TGF- β 1 age através da sua via de sinalização, para o ciclo celular no estágio G1 para parar a proliferação, induzir diferenciação ou promover apoptose. Entretanto, quando uma célula é transformada em um câncer, partes da via de sinalização do TGF- β 1 são mutadas e este peptídeo

não mais pode controlar estas células que aumentam sua proliferação sem controle.

No músculo distrófico, TGF- β 1 age como uma citocina inflamatória envolvida no processo de fibrose muscular e o aumento do colágeno, um componente da matriz extracelular, tendo sido considerado como um marcador de degeneração celular (YAMAZAKI *et al.*, 1994).

Figura 10: Mecanismo de ação de TGFβ

Superfamília TGFβ ligantes	Receptor tipo II	Receptor tipo I	R-SMADS	coSMAD	Ligantes inibidores
Activina A	ACVR2A	ACVR1B (ALK4)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	Follistatina
GDF1	ACVR2A	ACVR1B (ALK4)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	
GDF11	ACVR2B	ACVR1B (ALK4), TGFβRI (ALK5)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	
Proteínas Morfogenéticas do osso	BMPR2	BMPR1A (ALK3), BMPR1B (ALK6)	SMAD1 SMAD5, SMAD9	SMAD4	Noggin, Chordin, DAN
Nodal	ACVR2B	ACVR1B (ALK4), ACVR1C (ALK7)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	Lefty
TGFβs	TGFβRII	TGFβRI (ALK5)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	LTBP1, THBS1, Decorina

Tabela 2: Superfamília TGFbeta (modificado de MASSAGUÉ *et al.*, 1992)

Portanto, o processo de regeneração-degeneração muscular é coordenado por inúmeros fatores, sincronizado temporalmente e dependentes de concentração adequada. Mesmo com muitos aspectos da genética molecular sendo desvendados, ainda não existe uma cura efetiva para qualquer uma das distrofias musculares e vários trabalhos contraditórios sobre o efeito do GH nas distrofias musculares. Existem, no entanto, diversas técnicas experimentais desenvolvidas como terapia gênica, terapia farmacológica e terapia celular na tentativa de elucidar os efeitos do GH no músculo distrófico (CHAKKALAKAL *et al.*, 2005).

Figura 11: Resumo simplificado da coordenação entre a inflamação e regeneração crucial para recuperação muscular após injúria.

Inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de analisar os efeitos do Hormônio do Crescimento (GH) no músculo de animais e humanos, tentando esclarecer se o seu papel é direto ou mediado pela produção de Fator

de Crescimento Insulina-like I (IGF-I) (HALEVY *et al.*, 1996; SADOWSKI *et al.*, 2001; BARTON *et al.*, 2002; SEGARD *et al.*, 2003; SCHERTZER *et al.*, 2006; SOTIROPOULOS *et al.*, 2006; SCHERTZER *et al.*, 2007). Embora a presença do receptor de GH (GHR) em células musculares seja difícil de ser detectada, evidências apontam para um papel direto deste hormônio no tecido muscular. Lynch *et al.* (2000) mostraram previamente que administração exógena de rhIGF-1 melhorou a patologia distrófica em camundongos mdx. Apesar dos efeitos da administração de rhIGF-1 na regeneração muscular esquelética terem sido bem caracterizados, o papel da administração de rhGh na regeneração muscular esquelética permanece pouco compreendida.

ZATZ *et al.* (1981) relataram o caso de um menino afetado por DMD que apresentava deficiência de GH cuja evolução clínica era benigna e sugeriram que o GH endógeno poderia estar envolvido na patogênese da doença. Aos 18 anos de idade, o paciente ainda conseguia andar pequenas distâncias sem ajuda (ZATZ & BETTI, 1986). Mais recentemente, o relato de um paciente com DMD e deficiência de GH que não apresentava nenhuma evidência de fraqueza muscular antes do início da terapia de reposição com GH foi documentado corroborando esta hipótese. O tratamento com GH resultou no aparecimento de sintomas de fadiga fácil e fraqueza muscular proximal (GHAFOOR *et al.*, 2003).

Diante desses resultados, surgiram várias propostas de utilização de inibidores de GH para tentar retardar a progressão do processo distrófico na DMD, entre eles o mazindol, um inibidor de apetite, parecia atuar como inibidor de GH cujo mecanismo de ação ainda não foi estabelecido por completo,

entretanto, demonstrou-se que esta droga não era efetiva na inibição da secreção do GH por um período de tempo superior a um ano e que pacientes com DMD que fizeram o seu uso ininterrupto apresentaram uma extensa variabilidade individual de resposta, com diminuição não significativa dos níveis médios de GH após 9 a 12 meses de tratamento (Zatz *et al.*, 1988).

Com o surgimento de novas drogas inibidoras do GH e a presença de modelos carregando a mutação espontânea *little (Ghrhr^{lit})*, caracterizados por deficiência de GH, ressurgiu o interesse de estudo dos efeitos de uma inibição efetiva do GH nas distrofias musculares.

1.5 Deficiência do GH

1.5.1 Inibidores do GH

Os agonistas dopaminérgicos foram os primeiros medicamentos terapêuticos utilizados com pacientes com excesso de secreção de GH (acromegalia). Eles se ligam aos receptores D2 e aumentam a liberação do GH em indivíduos normais, mas na maioria dos pacientes com acromegalia, paradoxalmente, suprime a secreção de GH (WASS *et al.*, 1977). De maneira geral, as terapias com agonistas dopaminérgicos é de eficácia limitada em pacientes com acromegalia ativa, mas devido a via de administração ser oral e seu relativo baixo custo, um teste com agonistas terapêuticos é frequentemente empregado antes do uso dos análogos da Somatostatina serem considerados.

A introdução dos análogos da Somatostatina significou um avanço no manejo do tratamento da acromegalia, como a Sandostatina e a Somatulina. Entretanto há uma proporção de pacientes (aproximadamente 50%) que não

respondem a estas drogas sozinhas ou combinadas sendo incapazes de atingir controle bioquímico satisfatório.

O surgimento do Pegvisomante, o primeiro antagonista do receptor do GH (GHR) para uso clínico abriu perspectivas de tratamento para estes pacientes não responsivos às outras drogas.

1.5.1.1 Pegvisomante

Pegvisomante, uma droga inibidora do GH, pertencente a uma classe terapêutica totalmente diferente (antagonistas do receptor de GH) com um mecanismo de ação completamente diferente dos demais inibidores. Cunningham e Wells (1989) identificaram oito resíduos de aminoácidos em GH que, quando alterados, aumentam a afinidade de ligação do sítio I deste hormônio ao GHR. Produziu-se, então, uma molécula contendo nove substituições de aminoácidos combinada com PEG (polietilenoglicol). A molécula resultante, conhecida como PEG-hGH G120K, demonstrou manter sua ligação ao receptor e propriedades antagônicas. Ela age aumentando a afinidade ao sítio I e bloqueando a ligação ao sítio II, impedindo a dimerização funcional do receptor de GH, assim como a ação do GH e a indução da síntese e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) (MULLER *et al.*, 2004).

Semelhante ao GH, este antagonista é um análogo do hormônio que apresenta na posição 120 uma substituição de aminoácido gerando o antagonista e possui um tamanho relativamente pequeno (~22 kDa). O GH tem uma meia-vida de aproximadamente 15 minutos e é normalmente depurado

pelos rins e/ou internalizado pelo receptor. Para aumentar a meia-vida do Pegvisomante, quatro ou cinco resíduos de polietilenoglicol (PEG) foram adicionadas à sua estrutura. Estas moléculas PEG estão covalentemente ligadas aos resíduos de lisina produzindo uma molécula com uma massa de 42-46 kDa. Isto levou a um aumento da meia-vida sérica de aproximadamente 30 min para mais de 100 horas (PARKINSON *et al.*, 2003; MULLER *et al.*, 2004).

PEG-hGH G120K (cujo nome genérico é Pegvisomante) está disponível nos Estados Unidos para o tratamento da acromegalia. Os ensaios clínicos para seu uso na acromegalia foram iniciados em 1997, a droga foi aprovada nos Estados Unidos em março de 2003 e na Europa em novembro do mesmo ano. Pegvisomante é capaz de normalizar as concentrações séricas do fator de crescimento *insulin-like* (IGF-I) em 97% dos pacientes com acromegalia ativa e a terapia está associada com uma melhora significativa nos sinais e sintomas do excesso de GH (PAISLEY *et al.*, 2004). Entretanto, até a presente data, inexistem estudos realizados com essa nova droga, o Pegvisomante, em pacientes com DMD ou em modelos animais de distrofia muscular progressiva.

1.5.1.2 Sandostatina: derivado sintético da Somatostatina e inibidor da liberação do GH

Análogos da Somatostatina têm sido usados há 20 anos para tratamento de pacientes nos quais a cirurgia e/ou radioterapia não respondeu adequadamente, e também como primeira linha de terapia quando outras modalidades estão contra-indicadas ou não são efetivas no controle dos

excessos de secreção do GH e IGF-I. A Somatostatina medeia numerosas ações, incluindo a regulação da secreção de muitos hormônios tais como insulina, glucagon e hormônio estimulante da tireóide (TSH), através de uma extensa família de receptores específicos de superfície celular (REICHLIN, 1983; REUBI *et al.*, 1990). Cinco subtipos de receptores de Somatostatina foram clonados todos possuindo sete domínios transmembranares (YAMADA *et al.*, 1992, BRUNO *et al.*, 1992; O' CARROLL *et al.*, 1993) que são funcionalmente ligados a adenilato ciclase através do acoplamento de mecanismos envolvendo a proteína G (YASUDA *et al.*, 1992; RAYNOR *et al.*, 1993; PATEL *et al.*, 1994).

Atualmente, tem se procurado desenvolver novos análogos de Somatostatina (SAs) com diferentes seletividades de receptores e moléculas quiméricas capazes de se ligar tanto a receptores de somatostatina como dopamina (COLAO *et al.*, 2003; GÓTH *et al.*, 2002; CHANSON, 2008). O octapeptídeo octreotida (Sandostatina), análogo sintético da Somatostatina, se liga com alta afinidade aos receptores responsáveis pela regulação da secreção do GH. Formulações de longa duração, requerem apenas uma injeção por mês, trazendo grande melhora para aderência e conveniência do tratamento. Três estudos têm sugerido o uso da Sandostatina de longa duração (LAR) na supressão dos níveis séricos de GH e IGF-I comparado a Somatulina (TURNER *et al.*, 1999; COZZI *et al.*, 1999; CHANSON *et al.*, 2000).

Figura 12: Representação da octreotida, um análogo sintético da Somatostatina (CHANSON *et al.*, 2000)

1.5.1.2.1 Farmacodinâmica da droga

O octapeptídeo sintético da somatostatina octreotida (Sandostatin) é um derivado com efeitos farmacológicos similares, mas com duração de ação consideravelmente prolongada. Inibe a secreção patologicamente aumentada do hormônio de crescimento (GH), dos peptídeos glucagon e insulina e da serotonina. Em animais, a octreotida é um inibidor mais potente que a somatostatina na liberação do hormônio de crescimento, glucagon e insulina, com maior seletividade para a supressão de GH e glucagon. A administração prolongada (26 semanas) de doses de até 1 mg/kg ao dia (via intraperitoneal) no rato e de até 0,5 mg/kg ao dia (via intravenosa) no cão é bem tolerada.

Em pacientes acromegálicos (incluindo os que não responderam à cirurgia, irradiação ou tratamento com agonistas da dopamina) Sandostatin reduz os níveis plasmáticos do hormônio de crescimento e/ou somatomedina C em doses de 0,1 mg a cada 8 ou 12 horas SC. Na maioria dos pacientes a dose diária ideal será de 0,3 mg. Ocorre redução clinicamente relevante do GH (cerca de 50% ou mais) em quase todos os pacientes e pode ser alcançada

normalização (GH plasmático < 2,5 mg/ml) em cerca de metade dos casos. Na maioria dos pacientes, Sandostatin reduz acentuadamente os sintomas clínicos da doença, tais como cefaléia, edema da pele e tecidos moles, hiper-hidrose, artralgia, parestesia. Em pacientes com um grande adenoma pituitário, o tratamento com Sandostatin pode resultar em alguma diminuição da massa tumoral. Em pacientes com tumores do sistema endócrino gastro-entero-pancreático Sandostatin, devido aos seus diferentes efeitos endócrinos, modifica diversas características clínicas. Ocorre melhora clínica e benefício sintomático em pacientes que ainda apresentam sintomas relacionados aos seus tumores, apesar das terapias anteriores, que podem incluir cirurgia, embolização da artéria hepática e várias quimioterapias, por exemplo, estreptozotocina e 5-fluorouracil (CHANSON, 2008)

1.5.1.2.2 Farmacocinética

Após injeção subcutânea, Sandostatin é rápida e completamente absorvido. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas dentro de 30 minutos. A meia-vida de eliminação após administração subcutânea (SC) é de 100 min comparada com a da somatostatina natural que é de apenas 2 min. Deve ser administrada 2 ou 3 vezes ao dia SC. Após injeção endovenosa (EV) a eliminação é bifásica, com meias-vidas de 10 a 90 minutos respectivamente. O volume de distribuição é 0,27 l/kg e o "clearance" orgânico total é 160 ml/min. A ligação protéica no plasma totaliza 65%. A quantidade de Sandostatin ligada às células sanguíneas é insignificante.

1.5.1.2.3 Dados de Segurança pré-clínicos

Estudos de toxicidade aguda com octreotida em camundongos revelaram valores de DL_{50} de 72mg/Kg por via intravenosa e de DL_{50} de 470mg/Kg por via subcutânea. Em ratos, o valor agudo da DL_{50} por via intravenosa foi determinado em 18mg/Kg. O acetato de octreotida foi bem tolerado em cachorros que receberam mais que 1mg/Kg do peso corpóreo por injeção *bolus* intravenosa.

A octreotida e seus metabólitos foram isentos de potencial mutagênico quando investigados *in vitro* em sistemas celulares e bacterianos de testes validados.

Não foram observadas lesões neoplásicas em camundongos que receberam diariamente injeções subcutâneas de octreotida em doses superiores de 2 mg/Kg por 98 semanas, nem em cachorros tratados diariamente por 52 semanas com doses subcutâneas da droga. Em ratos que receberam acetato de octreotida em doses diárias superiores a 1,25 mg/Kg de peso corpóreo, foram observados fibrosarcomas, predominantemente em animais machos no local da injeção subcutânea após 52, 104 e 113/116 semanas. Tumores locais também ocorreram em ratos controles, entretanto o desenvolvimento destes tumores foi atribuído a desordens de fibroplasia produzida pelos efeitos irritantes contínuos nos locais da injeção. O estudo de carcinogênese também em ratos tratados por 116 semanas com injeções subcutâneas de octreotida também revelaram adenocarcinomas uterinos endometriais. Sua incidência só alcança significado estatístico em doses subcutâneas altas de 1,25mg/Kg por dia. As informações disponíveis indicam claramente que a descoberta de tumores mediados pelo sistema endócrino em

ratos são espécies específicas e não são relevantes para o uso de drogas em humanos.

1.5.1.2.4 Principais Indicações

A octreotida é indicada no controle sintomático e redução dos níveis plasmáticos do hormônio de crescimento e somatomedina C em pacientes com acromegalia, inadequadamente controlados por cirurgia, radioterapia ou tratamento com agonistas da dopamina. O tratamento com Sandostatin é também indicado para pacientes acromegálicos inaptos a, ou que não desejem, se submeter à cirurgia; ou ainda no período de intervalo até que a radioterapia se torne completamente eficaz (JAWIARCZYK *et al.*, 2008)

1.5.2 Modelo Animal de deficiência de GH: Camundongo *little* (*Ghrhr^{lit}*)

Os camundongos homozigotos para a mutação espontânea *little* (*Ghrhr^{lit}*) são caracterizados por uma deficiência no GH, na prolactina e retardo do crescimento. Os camundongos machos têm fertilidade reduzida e as fêmeas mostram um atraso na lactação. A mutação consiste em uma mudança simples de base que altera (*Asp 60* → *Gly*) no receptor do fator de liberação do GH (LIN *et al.*, 1993; GODFREY *et al.*, 1993). Além dos camundongos *little*, surgiram também abordagens farmacológicas para a inibição do GH, como as novas drogas inibidoras da liberação do GH.

II - JUSTIFICATIVA

A ação do GH nas distrofias tem sido controversa na literatura, necessitando de novos estudos. Recentemente, com o surgimento de novas drogas que bloqueiam o efeito ou a liberação de GH e a possibilidade de desenvolvimento de novos modelos animais simulando geneticamente as distrofias humanas, novas perspectivas para estudos experimentais dos efeitos do GH na evolução das doenças distróficas foram abertas.

III – OBJETIVOS

Geral: Estudar os efeitos do excesso e da inibição do GH na evolução de doença distrófica em modelos murinos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2^{dy-2J}*/J).

Específicos:

1. Estudar os efeitos da administração de GH na evolução da doença dos camundongos distróficos com clínica *dy/dy* (B6.WK-*Lama2^{dy-2J}*/J);
2. Desenvolver um modelo de camundongos mutantes com distrofias musculares e deficiência de GH, obtidos pelo cruzamento dos camundongos distróficos *dy/dy* com aqueles deficientes em GH *little/little* (C57BL/6J-*Ghrhr^{lit}*/J), e avaliar a evolução das distrofias durante o desenvolvimento desses animais;
3. Estudar os efeitos da inibição da secreção do Gh pela octreotida, um derivado da somatostatina, sobre a evolução da doença dos camundongos distróficos com clínica *dy/dy* (B6.WK-*Lama2^{dy-2J}*/J);

VII CONCLUSÕES

1.Os efeitos do excesso de GH em camundongos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*^{dy-2J}/J) causaram:

a) piora na evolução do quadro distrófico, traduzida pela diminuição das performances desses animais nos testes de funcionalidade da musculatura esquelética utilizados em relação aos camundongos normais: teste de deambulação, teste de sustentação, teste da esteira e teste de força máxima; apenas no teste de resistência à inclinação não houve diferença significativa;

b) aumento significativo dos níveis da citocina inflamatória TGFβ-1 na musculatura dos animais distróficos, que poderia explicar os efeitos do GH descritos acima; não houve alteração significativa dos níveis de outros marcadores de degeneração e regeneração, como Pax7, MyoD e das proteínas laminina e desmina;

c) ausência de alterações histológicas significativas na musculatura desses animais em relação aos controles distróficos não tratados;

2.Os efeitos do excesso de GH em camundongos normais causaram:

a) aumento significativo das performances desses animais, em relação aos animais não tratados, nos testes de deambulação e sustentação, e leve aumento, de forma não significativa, em outros dois testes, o da esteira e de força máxima; não havendo alteração apenas no teste de resistência à inclinação;

b) aumento significativo da área de secção transversal das fibras musculares em relação aos controles, o que poderia explicar, pelo menos parcialmente, os resultados descritos acima;

c) ausência de alterações nos níveis de TGFβ-1, Pax7, MyoD, Laminina e Desmina;

3. O desenvolvimento do novo modelo experimental resultante de cruzamentos de camundongos geneticamente deficientes em GH (*Ghrhr*^{lit}) com modelos distróficos *dy/dy* (B6.WK-*Lama2*^{dy-2J}/J), mostrou:

a) um significativo retardo na evolução da doença distrófica, traduzido pelas melhores performances dos anões distróficos (em relação aos anões normais) que aquelas dos distróficos (em relação aos animais normais), nos testes de deambulação, sustentação, da esteira, de resistência à inclinação e de força máxima;

b) nos cortes histológicos, a área do interstício foi menor que a dos distróficos não anões, sugerindo um quadro distrófico mais brando nesses animais;

c) níveis diminuídos de TGFβ-1 em relação àqueles dos distróficos não anões, sugerindo menores níveis da inflamação nos músculos desses animais;

4. A inibição da liberação do GH pela octreotida, análogo da somatostatina, mostrou:

a) uma relativa melhora ou uma estabilização na evolução do quadro distrófico, traduzido pelo aumento, após 60 dias de tratamento, das performances nos testes funcionais da musculatura, em relação às daquelas dos animais distróficos sem tratamento

neste mesmo período: foram maiores nos testes de deambulação e Rota Rod, enquanto aquelas dos distróficos controles diminuíram; mantiveram as mesmas performances no teste da esteira, enquanto as dos distróficos controles pioraram; foram maiores no teste de sustentação, enquanto as dos distróficos controles não melhoraram, e finalmente, as performances no teste da força de preensão palmar foram maiores que aquelas dos camundongos distróficos, que mantiveram suas performances sem alterações significativas.

5. Esses resultados, em conjunto, sugerem um efeito patológico do GH na musculatura distrófica, com seu excesso levando a uma piora da doença, possivelmente através do aumento dos níveis de TGF β -1. A diminuição do GH, consequentemente, poderia levar a um retardo da evolução da doença.

6. Estes estudos experimentais, abordando pela primeira vez na literatura, em um único momento, os efeitos do GH envolvendo um modelo distrófico por três diferentes ângulos, excesso exógeno do hormônio, inibição endógena por produção de modelo inédito duplo homozigoto e inibição exógena farmacológica, abrem perspectivas bastante promissoras para se testar inibição dos efeitos do GH na evolução das doenças distróficas humanas.

VIII – Referências

- Allamand V, Sunada Y, Salih MA, Straub V, Ozo CO, Al-Turaiki MH, Akbar M, Kolo T, Colognato H, Zhang X, Sorokin LM, Yurchenco PD, Tryggvason K, Campbell KP (1997). Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. **Hum Mol Genet** **6(5)**:747-52.
- Allen RE, Boxhorn LK. (1987) Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. **J Cell Physiol.** **Dec;133(3)**:567-72.
- Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. (2002) Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in *mdx* mice. **J Cell Biol.** **Apr 1;157(1)**:137-48.
- Bellini MH, Peroni CN, Bartolini P (1992). Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes. **FASEB J** **17(15)**:2322-4. Epub 2003 Oct 2.
- Bengtsson BA, Koppeschaar HP, Abs R, Bennmarker H, Hernberg-Ståhl E, Westberg B, Wilton P, Monson JP, Feldt-Rasmussen U, Wüster C (1999). Growth hormone replacement therapy is not associated with any increase in mortality. KIMS Study Group. **J Clin Endocrinol Metab** **84(11)**:4291-2.
- Blake DJ, Weir A, Newey,SE, Davies KE (2002) Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle **Physiol Rev** **82**: 291-329

- Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS (2002) **Nature** **420**: 418-21
- Brooks SV, Faulkner JA (1988). Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. **J Physiol** **404**:71-82.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1992). Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** **89(23)**:11151-5.
- Bushby KM, Beckmann JS (1995). The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. **Neuromuscul Disord** **5(4)**:337-43.
- Chakkalakal JV, Thompson J, Parks RJ, Jasmin BJ. (2005). Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **FASEB J** **19(8)**:880-891.
- Chanson P (2008). Emerging drugs for acromegaly. **Expert Opin Emerg Drugs** **13(2)**:273-93.
- Chanson P, Boerlin V, Ajzenberg C, Bachelot Y, Benito P, Bringer J, Caron P, Charbonnel B, Cortet C, Delemer B, Escobar-Jiménez F, Foubert L, Gaztambide S, Jockenhoevel F, Kuhn JM, Leclere J, Lorcy Y, Perlemuter L, Prestele H, Roger P, Rohmer V, Santen R, Sassolas G, Scherbaum WA, Schopohl J, Torres E, Varela C, Villamil F, Webb SM (2000). Comparison of octreotide acetate LAR and lanreotide SR in patients with acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** **53(5)**:577-86.

- Chargé SBP, Rudnicki M A (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** **84**:209– 238.
- Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK (2003) **J Cell Biol.** **2003 Dec 8;163(5)**:1133-43.
- Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC. (2007) Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. **Nat Med.** **Apr;13(4)**:204-10.
- Colao A, Pivonello R, Cappabianca P, Auriemma RS, De Martino MC, Ciccarelli A, de Divitiis E, Lombardi G (2003). The use of a GH receptor antagonist in patients with acromegaly resistant to somatostatin analogs. **J Endocrinol Invest** **26(10 Suppl)**:53-6.
- COLLINS, C.A.; MORGAN, J.E.(2003) Duchenne' s muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International J of Experimental Pathology**, v. **84**, p. 165-172.
- Cozzi R, Dallabonzana D, Attanasio R, Barausse M, Oppizzi G (1999). A comparison between octreotide-LAR and lanreotide-SR in the chronic treatment of acromegaly. **Eur J Endocrinol** **141(3)**:267-71.
- CUNNINGHAM B.C; WELLS J.A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. **Science**, v. **244**, p. 1081-1085.

- De Luca A, Liantonio A, Pierno S, Desaphy JF, Leoty C, Camerino DC (1999). Potential targets for skeletal muscle impairment by hypogravity: basic characterization of resting ionic conductances and mechanical threshold of rat fast- and slow-twitch muscle fibers. **J Gravit Physiol** 5(1):P75-6.
- Dubowitz V (1996). 41st ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy 8-10 March 1996, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord** 6(4):295-306.
- Dubowitz V (1997). 50th ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy. 28 February 1997 to 2 March 1997, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord** 7(8):539-47.
- Dubowitz V (1999). 68th ENMC international workshop (5th international workshop): On congenital muscular dystrophy, 9-11 April 1999, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord** 9(6-7):446-54.
- Ervasti JM, Campbell KP (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. **Cell** 66(6):1121-31.
- Ervasti JM, Campbell KP (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol** 122(4):809-23.
- Ervasti JM, Campbell KP (1993). Dystrophin and the membrane skeleton. **Curr Opin Cell Biol** 5(1):82-7.

- Ervasti JM, Campbell KP (1993). Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Mol Cell Biol Hum Dis Ser 3**:139-66.
- Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol 34(8)**:760-5.
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocr Rev 17(5)**:481-517.
- Francke U, Ochs HD, de Martinville B, Giacalone J, Lindgren V, Distèche C, Pagon RA, Hofker MH, van Ommen GJ, Pearson PL (1985). Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. **Am J Hum Genet 37(2)**:250-267.
- Frost SJ, Simpson DJ, Farrel WE (2001) Decreased proliferation and cell cycle arrest in neoplastic rat pituitary cells is associated with transforming growth factor-beta-1-induced expression of p15/INK4B. **Mol Cell Endocrinol May 15;176 (1-2)**: 29-37
- Gardner-Medwin D (1980). Clinical features and classification of the muscular dystrophies. **Br Med Bull 36(2)**:109-15.
- Ghafoor T, Mahmood A, Shams S (2003). Duchenne muscular dystrophy with associated growth hormone deficiency. **J Coll Physicians Surg Pak 13(12)**:722-3.

- Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE (1993). GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. **Nat Genet** **4(3)**:227-32.
- Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. **Physiol Genomics** **14(3)**:261-71.
- Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA (2004). Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve** **30(5)**:645-53.
- Góth M, Hubina E, Kovács L, Szabolcs I (2002). Novel pharmacologic therapies in acromegaly. **Orv Hetil** **143(19 Suppl)**:1057-62.
- Grounds MD (2002) Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-I signaling. **Biogerontology** **3**: 19-24.
- Guicheney P, Vignier N, Helbling-Leclerc A, Nissinen M, Zhang X, Cruaud C, Lambert JC, Richelme C, Topaloglu H, Merlini L, Barois A, Schwartz K, Tomé FM, Tryggvason K, Fardeau M (1997). Genetics of laminin alpha 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. **Neuromuscul Disord** **7(3)**:180-6.
- Guicheney P, Vignier N, Zhang X, He Y, Cruaud C, Frey V, Helbling-Leclerc A, Richard P, Estournet B, Merlini L, Topaloglu H, Mora M, Harpey JP, Haenggeli CA, Barois A, Hainque B, Schwartz K, Tomé FM, Fardeau M, Tryggvason K (1998). PCR based mutation screening of the laminin alpha2

chain gene (LAMA2): application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. **J Med Genet** **35(3)**:211-7.

Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E (2003) Laminin α 2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. **Neuromuscular Disorders** **13**: 2007-15.

Halevy O, Hodik V, Mett A (1996). The effects of growth hormone on avian skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. **Gen Comp Endocrinol** **101(1)**:43-52.

Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, **91**: 534-51

Hayashi YK, Ishihara T, Domen K, Hori H, Arahata K (1997) A benign allelic form of laminin alpha 2 chain deficient muscular dystrophy. *Lancet* Apr 19; 349 (9059): 1147.

Herrington J, Carter-Su C (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends Endocrinol Metab** **12(6)**:252-7.

Hillaire D, Leclerc A, Fauré S, Topaloglu H, Chiannikulchai N, Guicheney P, Grinas L, Legos P, Philpot J, Evangelista T, et al (1994). Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping. **Hum Mol Genet** **3(9)**:1657-61.

Hoffman E P, Brown R H Jr, Kunkel L M (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell** **51(6)**:919-928.

- Hoffman EP, Dressman D (2001). Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends Pharmacol Sci** **22(9)**:465-70.
- Hoffman AR, Strasburger CJ, Zagar A, Blum WF, Kehely A, Hartman ML (2004) Efficacy and tolerability of an individualized dosing regimen for adult growth hormone replacement therapy in comparison with fixed body weight-based dosing. *J Clin Endocrinol Metab* Jul; 89 (7): 3224-33.
- Hawke TJ, Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol** **91(2)**:534-51.
- Helbling-Leclerc A, Topaloglu H, Tomé FM, Sewry C, Gyapay G, Naom I, Muntoni F, Dubowitz V, Barois A, Estournet B (1995). Readjusting the localization of merosin (laminin alpha 2-chain) deficient congenital muscular dystrophy locus on chromosome 6q2. **C R Acad Sci III** **318(12)**:1245-52.
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tomé FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, *et al* (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. **Nat Genet** **11(2)**:216-8.
- Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. (2003) **Cell**. May **16**; **113(4)**:483-94.
- Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am**. May; **84-A(5)**:822-32.
- Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. **Science** **216(4551)**:1237-9.

Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J (1987). Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. **Endocr Rev** 8(4):426-38.

Jawiarczyk A, Kałuzny M, Bolanowski M, Bednarek-Tupikowska G (2008). Additional metabolic effects of adding GH receptor antagonist to long-acting somatostatin analog in patients with active acromegaly. **Neuro Endocrinol Lett** 29(4):571-6.

JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J (2005) *Biologia Celular e Molecular* Ed. 8 p 125.

Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H.Scand (2000) Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair **J Med Sci Sports Dec**;10(6):332-7.

Karpati G (2002) *Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases* Neuropath Press, Basel

Kuang W, Xu H, Vachon PH, Liu L, Loechel F, Wewer UM, Engvall E (1998)

Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models. **J Clin Invest** 102: 844-52.

Kennel PF, Fonteneau P, Martin E, Schmidt JM, Azzouz M, Borg J, Guenet JL, Schmalbruch H, Warter JM, Poindron P (1996). Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. **Neurobiol Dis** 3(2):137-47.

- Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. **Proc Natl Acad Sci U S A** **82(14)**:4778-4782.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001) The Somatomedin Hypothesis. **Endocr Rev** **22**: 53-74.
- Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **Am J Pathol Mar**; **164 (3)**: 1007-19.
- Lichanska AM, Waters MJ (2008). New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. **Horm Res** **69(3)**:138-45. Epub 2008 Jan 8.
- Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, Roberts R, Marian AJ. (2001) Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy . **Circulation. Feb 13**;103(6):789-91.
- Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusk AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG (1993). Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. **Nature** **364(6434)**:208-13.
- Lynch GS, Rafael JA, Chamberlain JS, Faulkner JA (2000). Contraction-induced injury to single permeabilized muscle fibers from mdx, transgenic mdx, and control mice. **Am J Physiol Cell Physiol** **279(4)**:C1290-4.

- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. **Dev Biol** **229(1)**:141-62.
- Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casillas F, Ohtsuki M, Wrana JL (1992) TGF-beta receptors. **Mol Reprod Dev. Jun;32 (2)**: 99-104.
- McNally EM, Pytel P (2007). Muscle diseases: the muscular dystrophies. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis** **2**:87-109.
- Meier H, Southard JL (1970). Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy-locus. **Life Sci** **9(3)**:137-144.
- Michelson AM, Russel ES, Harman PJ (1955). Dystrophia muscularis: a hereditary primary myopathy in the house mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** **41(12)**:1079-1084.
- Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD. (2008) Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. **Nat Med. Apr;14(4)**:442-7.
- Mourkioti F, Rosenthal N (2005). IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. **Trends Immunol** **26(10)**:535-42.
- MULLER A.F, KOPCHICK JJ, FLYVBJERG A, van der LELY AJ Clinical review 166: Growth Hormone Receptor Antagonists. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. **89**, n. **4**, p. 1503-1511, 2004.

- Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S, Brown SC (2002). Defective glycosylation in muscular dystrophy. **Lancet** **360(9343)**:1419-21.
- Muntoni F, Bertini E, Bönnemann C, Brockington M, Brown S, Bushby K, Fiszman M, Körner C, Mercuri E, Merlini L, Hewitt J, Quijano-Roy S, Romero N, Squarzoni S, Sewry CA, Straub V, Topaloglu H, Haliloglu G, Voit T, Wewer U, Guicheney P (2002). 98th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD), 7th Workshop of the International Consortium on CMD, 2nd Workshop of the MYO CLUSTER project GENRE. 26-28th October, 2001, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscul Disord** **12(9)**:889-96.
- Muntoni F, Brown S, Sewry C, Patel K (2002). Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. **Neuromuscul Disord** **12(5)**:438-46.
- Musaro A, Rosenthal N (2002). The role of local insulin-like growth factor-1 isoforms in the pathophysiology of skeletal muscle. **Curr Genomics** **3**:149-162
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome **Nat Genet Mar**; **33(3)**:407-11.
- O'Carroll AM, Lolait SJ, König M, Mahan LC (1993). Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. **Mol Pharmacol** **42(6)**:939-46.

- Ohlendieck K, Campbell KP (1991). Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. **FEBS Lett** **283(2)**:230-4.
- Olson EN, Sternberg E, Hu JS, Spizz G, Wilcox C. (1986) Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. **J Cell Biol. Nov;103(5)**:1799-805.
- Onofre PC (2009). Avaliação do padrão de degeneração e regeneração muscular em diferentes modelos murinos para distrofias musculares progressivas. São Paulo. Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo.
- Paisley AN, Trainer P, Drake W (2004). Pegvisomant: a novel pharmacotherapy for the treatment of acromegaly. **Expert Opin Biol Ther** **4(3)**:421-5.
- Parkinson C, Scarlett JA, Trainer PJ (2003). Pegvisomant in the treatment of acromegaly. **Adv Drug Deliv Rev** **55(10)**:1303-14.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB (1994). All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. **Biochem Biophys Res Commun** **198(2)**:605-12.
- Prisk V, Huard J (2003). Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histol. Histopathol.** 18: 1243-56.
- Raynor K, O'Carroll AM, Kong H, Yasuda K, Mahan LC, Bell GI, Reisine T (1993). Characterization of cloned somatostatin receptors SSTR4 and SSTR5. **Mol Pharmacol** **44(2)**:385-92.
- Reichlin S (1983). Somatostatin. **N Engl J Med** **309(24)**:1495-501.

- Reubi JC, Kvols L, Krenning E, Lamberts SW (1990). Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. **Metabolism 39(9 Suppl 2):78-81.**
- Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE (1990). Effects of human growth hormone in men over 60 years old. **N Engl J Med 323(1):1-6.**
- Ryder-Cook AS, Sicinski P, Thomas K, Davies KE, Worton RG, Barnard EA, Darlison MG, Barnard P J (1988). Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. **EMBO J 7(10):3017-21.**
- Sacco A, Doyonnas R, LaBarge MA, Hammer MM, Kraft P, Blau HM (2005) IGF-I increase bone marrow contribution to adult skeletal and enhances the fusion of myelomonocytic precursors **J Cell Biol Nov 7; 171 (3): 483-92.**
- Sadowski CL, Wheeler TT, Wang LH, Sadowski HB (2001). GH regulation of IGF-I and suppressor of cytokine signaling gene expression in C2C12 skeletal muscle cells. **Endocrinology 142(9):3890-900.**
- Seale P, Rudnicki MA (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Dev Biol 218(2):115-24.**
- Segard, H. B., Moulin, S., Boumard, S., Crémiers C. A., Kelly, P. A (2003) Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. **Cellular Signalling 15: 615-623.**
- Serway, R. A., Jewett, Jr. J. W. (2003). **Physics for Scientists and Engineers.** 6th Ed. Brooks Cole. [ISBN 0-53440-842-7](https://www.brookscole.com/9780534408427).

Shavlakadze T, White J, Hoh JF, Rosenthal N, Grounds MD (2005). Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. **Mol Ther** **10(5)**:829-43.

Schertzer, J.D., Ryall, J.G., Lynch, G.S. Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2006 Sep;291(3):E499-505. Epub 2006 Apr 18.

Schertzer JD, Gehrig SM, Ryall JG, Lynch GS. (2007) Modulation of Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein Interactions Enhances Skeletal Muscle Regeneration and Ameliorates the Dystrophic Pathology in mdx Mice **The Am J of Pathology** **171**: 1180-1188.

Shibuya S, Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, Oniki H (2003) Merosin (laminin-2) localization in basal lamina of normal skeletal muscle fibers and changes in plasma membrane of merosin-deficient skeletal muscle fibers. **Med Electron Microscop** **36**: 213-20.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science** **244(4912)**:1578-80.

Silveira L, Hirabara S M, Alberici L C, Lambertucci R H, Peres C M, Takahashi H K, Pettri A, Alba-Loureiro T, Luchessi A D, Cury-Boaventura M F, Vercesi A E, Curi R (2007). Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. **Cell Physiol Biochem** **20(1-4)**:213-26.

- Sotiropoulos A, Ohanna M, Kedzia C, Menon RK, Kopchick JJ, Kelly PA, Pende M (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A** **103(19)**:7315-20. Epub 2006 May 2.
- Squire S, Raymackers JM, Vandebrouck C, Potter A, Tinsley J, Fisher R, Gillis JM, Davies KE (2002) Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. **Hum Mol Genet** **Dec 15;11 (26)**: 3333-44.
- Sunada Y, Bernier SM, Utani A, Yamada Y, Campbell KP (1995). Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. **Hum Mol Genet** **4(6)**:1055-1061.
- Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, Campbell KP (1994). Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. **J Biol Chem** **269(19)**:13729-32.
- Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. **Nat Genet** **9(2)**:184-90.
- Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** **288**: R345-53.
- Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE (1996). Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. **Nature** **384(6607)**:349-53.

Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, Davies K (1998).

Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice.

Nat Med 4(12):1441-4.

Tomé FM, Matsumura K, Chevallay M, Campbell KP, Fardeau M (1994).

Expression of dystrophin-associated glycoproteins during human fetal muscle development: a preliminary immunocytochemical study.

Neuromuscul Disord 4(4):343-8.

Tomé FM (1999) The Peter Emil Becker Award lecture 1998. The saga of

congenital muscular dystrophy. **Neuropediatrics Apr; 30 (2): 55-65.**

Turner HE, Vadivale A, Keenan J, Wass JA (1999). A comparison of lanreotide

and octreotide LAR for treatment of acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)**

51(3):275-80.

Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PC, Martins PC, Lopes VF, Zilberztajn D,

Maia LS, Sell K, Yamamoto LU (2008). Animal models for genetic neuromuscular diseases. **J Mol Neurosci 34(3):241-8.** Epub 2008 Jan 18.

Vainzof M, Zatz M (2003). Protein defects in neuromuscular diseases. **Braz J**

Med Biol Res 36(5):543-55. Epub 2003 Apr 22.

Vainzof M, Marie SK, Reed UC, Schwartzman JS, Pavanello RC, Passos-

Bueno MR, Zatz M (1995). Deficiency of merosin (laminin M or alpha 2) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. **Neuropediatrics 26(6):293-7.**

Vedsted P, Larsen AH, Madsen K, Sjøgaard G (2003). Muscle performance

following fatigue induced by isotonic and quasi-isometric contractions of rat

- extensor digitorum longus and soleus muscles in vitro. **Acta Physiol Scand** **178(2)**:175-86.
- Verellen –Dumoulin CH, Freund M, De Meyer R, Laterre CH, Frederic J, Thompson MW, Markovic VD, Worton RG. (1984). Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. **Hum Genet** **67**: 115-19.
- Vilquin JT, Vignier N, Tremblay JP, Engvall E, Schwartz K, Fiszman M (2000). Identification of homozygous and heterozygous dy^{2J} mice by PCR. **Neuromuscul Disord** **10(1)**:59-62.
- Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E (1994) Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin $\alpha 2$ (*Lama2*) gene. **Nature Genetics** **8**: 297-302.
- Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ (2002) Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. **Ann Neurol** **52**: 832-36.
- Wass JA, Thorner MO, Morris DV, Rees LH, Mason AS, Jones AE, Besser GM (1977). Long-term treatment of acromegaly with bromocriptine. **Br Med J** **1(6065)**:875-8.
- Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, Richter EA (1996). Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol** **81(4)**:1501-9.
- Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. **Cell** **Dec 11;71(6)**: 1003-14.

Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S (1992). Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. **Proc Natl Acad Sci U S A** **89**(1):251-5.

Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M (1994) Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. **Am J Pathol** **144**: 221-26.

Yasuda K, Rens-Domiano S, Breder CD, Law SF, Saper CB, Reisine T, Bell GI (1992). Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. **J Biol Chem** **267**(28):20422-8.

Zatz M, Betti RT, Levy JA (1981). Benign Duchenne Muscular Dystrophy in a Patient with Growth Hormone Deficiency. **Am J Med Genet** **10**(3):301-304.

Zatz M, Betti RT (1986). Benign Duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency: a five years follow-up. **Am J Med Genet** **24**(3):567-72.

ZATZ M, RAPAPORT D, VAINZOF M, PAVANELLO RCM, ROCHA JML, BETTI RTB, OTTO PA (1998) Effect of Manzidol and growth hormone levels in patients with Duchenne Muscular Dystrophy. **Am Journal of Medical Genetics**, v. **31**, p. 821-833, 1988.

- Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR (2000). Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. **Curr Opin Neurol** 13(5):511-7.
- Zatz M, Distrofias Musculares Progressivas. In: CARAKUSHANSKY, G., Ed. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro, Guanabara – Koogan, 2001. p. 245-60.
- Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ (1981). Translocation (X;6) in female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localizations of the DMD locus. *J Med Gen* 18 (6): 442-47.
- Zhou L, Rafael-Fortney JA, Huang P, Zhao XS, Cheng G, Zhou X, Kaminski HJ, Liu L, Ransohoff RM (2008) Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. **J Neuro Sci Jan 15; 264 (1-2):** 106-11. Epub 2007 Sep 24.
- Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AH, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. **Nature** 333(6172):466-9.