VANESSA FERREIRA LOPES

**Caracterização funcional das diferentes linhagens de modelos murinos
para distrofias musculares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2010

VANESSA FERREIRA LOPES

**Caracterização funcional das diferentes linhagens de modelos murinos
para distrofias musculares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Mariz Vainzof

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lopes, Vanessa Ferreira.

Caracterização funcional das diferentes linhagens de modelos murinos para distrofias musculares / Vanessa Ferreira Lopes. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Mariz Vainzof.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Modelos animais

Versão do título para o inglês: Functional characterization of different strains of murine model for muscular dystrophies.

Descritores: 1. Modelos animais 2. Testes funcionais 3. Distrofias musculares progressivas I. Vainzof, Mariz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. III. Título.

ICB/SBIB0216/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Vanessa Ferreira Lopes

Título da Dissertação: Caracterização funcional das diferentes linhagens de modelos murinos para distrofias musculares.

Orientador(a): Mariz Vainzof

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a...../...../.....,

() Aprovado

() Reprovado

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/047/2008
Ref. 2008.1.343.41.1

São Paulo, 06 de agosto de 2008.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que foi **APROVADO** "Ad-Referendum" da Comissão de Ética em uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB o Projeto "Caracterização clínica e histopatológica de modelos murinos para doenças neuromusculares" (**Protocolo 061/2008**), sob sua responsabilidade.

Atenciosamente.

Profa. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Profa. Dra. MARIZ VAINZOF

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP

Dedico este trabalho a meus pais,
pelo constante apoio, incentivo e confiança;
A minha mais que especial amiga Carolina,
que esteve presente nos momentos fáceis e difíceis;
A minha grande filhinha e companheira Mel,
pela alegria diária e por sempre me receber calorosamente;
A todos meus familiares e amigos,
porque parte do sucesso da minha formação também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Mariz Vainzof, que tem um papel fundamental no desenvolvimento deste trabalho e crescimento acadêmico.

Agradeço também à Dra. Lydia Yamamoto e Marta Canovas, que contribuíram para meu aprendizado ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada do Centro de Estudos do Genoma Humano (GEGH) e ao Instituto de Biologia (IB) pelo inestimável auxílio e convivência.

Aos professores, amigos e colegas pela dedicação e incentivo, auxílio, convívio, ensinamentos e amizade.

Aos meus pais Olga e Abílio, minha irmã Ângela, meu sobrinho João Vitor e meu cunhado Raul pelo carinho, apoio e confiança.

A Carolina pelo companheirismo, confiança, otimismo e alegrias.

Aos meus “pais” Luiza e Edvaldo pelo carinho e pelas conversas sinceras.

Aos meus queridos amigos Lucas, Priscila e Bruno pela amizade verdadeira, respeito e apoio em todas as ocasiões.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento dessa pesquisa.

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

LOPES, V. F. **Caracterização funcional das diferentes linhagens de modelos murinos para distrofias musculares.** 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas, caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Modelos murinos tornaram-se uma ferramenta importante para o estudo de doenças genéticas. O camundongo *mdx* é o modelo murino da Distrofia de Duchenne, o camundongo *SJL/J* é o modelo da distrofia das Cinturas 2B. Para o defeito de glicosilação existe o camundongo *Large^{myd}* e para a DM Congênita 1A tem-se o modelo *Lama2^{dy-2J}/J*. Estes modelos apresentam padrões variados de fraqueza muscular. Tendo-se em vista a crescente importância do uso destes para testes terapêuticos, faz-se necessário estabelecer parâmetros de avaliação funcional para as doenças neuromusculares, que visem a sua utilização para avaliar os benefícios clínicos de futuras terapias. Para tanto, foram avaliados grupos de camundongos das diferentes linhagens para distrofias musculares, comparados com o camundongo normal *C57Black6*. Os testes padronizados foram: 1) nado forçado em piscina padronizada, com contagem de tempo dos atos de nadar, flutuar e submergir; 2) avaliação de resistência/equilíbrio pelos membros anteriores e pelos quatro membros, com contagem de tempo de suspensão em barra de metal; 3) caminhar em plataforma estreita suspensa, para avaliação de equilíbrio e facilidade de utilização dos membros ao longo dela; 4) suspensão dos animais pela cauda para observação dos padrões de movimentos dos membros e dos demais grupamentos musculares; 5) medidas de maior força muscular dos membros anteriores e posteriores em aparelho *grip strength* e 6) *rota rod* que evidenciou a coordenação, o balanço motor e a resistência a fadiga dos animais em um sistema de rotor cilíndrico acelerado. Ao longo das avaliações funcionais realizadas, foi possível verificar diferenças evidentes entre as linhagens estudadas, o que reflete os diferentes mecanismos patofisiológicos envolvidos. O teste de resistência por fixação na barra foi informativo para as linhagens *mdx*, e *Large^{myd}*, o teste de suspensão pela cauda auxiliou a verificar fraqueza nas linhagens *SJL/J*, *Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{my.d}*, e o teste do nado forçado permitiu uma avaliação diferencial das linhagens *SJL/J* e *mdx*. Verificou-se também que as avaliações através de equipamentos específicos tais como o *Grip strength* e do *Rota rod* produziram resultados paramétricos mais precisos. A partir dos testes utilizados, comprovou-se a existência de diferentes padrões de força, resistência, coordenação motora e aprendizagem/memória ao longo do tempo de vida de cada linhagem.

Portanto, estes testes funcionais foram de suma importância para traçar linhas de pesquisas que visem analisar terapias celulares e/ou farmacológicas por implantar os mesmos como auxílio na busca de resultados satisfatórios.

Palavras-chaves: Modelos animais. Testes funcionais. Distrofias musculares progressivas.

ABSTRACT

LOPES, V. F. **Functional characterization of different strains of murine model for muscular dystrophies.** 2010. 63 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Muscular dystrophies are a heterogeneous group of genetic diseases characterized by a progressive and irreversible degeneration of skeletal muscles. Murine dystrophic models are important tools for studying these diseases. Among them, the *mdx* is the murine model for Duchenne dystrophy, the *SJL / J* mouse is the model for limb-girdle muscular dystrophy 2B, the *Large^{myd}* mouse presents a defect of glycosylation, and the *Lama2^{dy-2J / J}* mouse is a model for Congenital DM 1A . These models show varying patterns of muscular weakness. Considering the growing importance of their use for therapeutic trials, it is necessary to establish parameters of their functional performance, which are intended to be used to evaluate the clinical benefits of future therapies. For this, groups of mice of different strains for muscular dystrophy were evaluated compared to normal *C57Black6* mice. The standardized tests were: 1) forced swimming in standardized pool, timing the acts of swimming, floating and sinking, 2) evaluation of resistance / balance by forelimb and four members, timing the suspension in a metal bar, 3) walk in narrow suspended platform, to evaluate the balance and limb use easiness along it, 4) animal suspension by the tail to observe the patterns of limb movements and other muscle groups; 5) measures of greater muscle strength of forelimbs and hindlimbs in grip strength apparatus and 6) rota rod coordination, balance and motor fatigue resistance of the animals in an accelerated cylindrical rotor system. Over the performed functional evaluations, we observed clear differences between strains, reflecting the different pathophysiological mechanisms involved. The endurance test by setting on the bar was informative for the strains *mdx* and *Large^{myd}*, the tail suspension test helped to verify weakness in strains *SJL / J*, *Lama2dy-2J / J* and *Large^{myd}*, and the forced swimming test allowed a differential evaluation of strains *SJL / J* and *mdx*. It was also noted that the evaluations by special equipment such as Grip strength and Rota rod produced more accurate parametric results. From the tests used, we proved the existence of different patterns of strength, endurance, coordination and learning / memory over the lifetime of each dystrophic strain. Therefore, these functional tests allowed tracing parameters to be used in future studies of cell and/or pharmacology therapies.

Keywords: Animal models. Functional tests. Progressive muscular dystrophies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Complexo distrofina glicoproteínas associadas.....	18
Figura 2 - Esquema das diversas proteínas musculares e modelos animais disponíveis.....	20
Figura 3 - Genotipagem do camundongo <i>Lama2^{dy-2J}/J</i> após digestão.....	28
Figura 4 - Genotipagem do camundongo <i>Large^{myd}</i>	29
Figura 5 - Plataforma.....	30
Figura 6 - Barra para membros anteriores.....	30
Figura 7 - Barra para os quatro membros.....	31
Figura 8 - Imagem do levantamento pela cauda.....	31
Figura 9 - Nado forçado.....	32
Figura 10 - Imagem do equipamento <i>Grip strenght</i>	33
Figura 11 - Imagem do equipamento <i>Rota Rod</i>	33
Figura 12 - Gráfico comparativo entre as quatro diferentes linhagens de camundongos modelos para distrofias musculares analisadas no teste da barra para os membros anteriores.....	36
Figura 13 - Gráfico comparativo entre as quatro diferentes linhagens de camundongos modelos para distrofias musculares analisadas no teste da barra para os membros anteriores e posteriores.....	37
Figura 14 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos <i>mdx</i>	39
Figura 15 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos <i>SJL/J</i>	39
Figura 16 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos <i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	39
Figura 17 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos <i>Large^{myd}</i>	40
Figura 18 - Gráfico comparativo entre as quatro diferentes linhagens de camundongos modelos para distrofias musculares analisadas no teste do nado para o ato de submersão.....	40
Figura 19 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (<i>Grip strenght</i>) para a linhagem <i>c57Black6</i>	42
Figura 20 – Gráfico dos valores obtidos no teste de força (<i>Grip strenght</i>) para a linhagem <i>mdx</i>	42
Figura 21 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (<i>Grip strenght</i>) para a linhagem <i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	42

Figura 22 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (<i>Grip strength</i>) para a linhagem <i>Large^{myd}</i>	43
Figura 23 - Gráfico comparativo das médias obtidas no teste de força (<i>Grip strength</i>) para as quatro linhagens.....	43
Figura 24 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (<i>Rota Rod</i>) para a linhagem <i>C57Black6</i>	44
Figura 25 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (<i>Rota Rod</i>) para a linhagem <i>mdx</i>	44
Figura 26 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (<i>Rota Rod</i>) para a linhagem <i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	44
Figura 27 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência(<i>Rota Rod</i>) para a linhagem <i>Large^{myd}</i>	44
Figura 28 - Gráfico comparativo das médias obtidas no teste de resistência (<i>Rota Rod</i>) para as quatro linhagens.....	44
Figura 29 - Animal <i>Lama2^{dy-2J}/J</i> na posição típica de equilíbrio na barra suspensa – patas dianteiras, apoiando o tórax e utilizando a cauda para se equilibrar.....	50
Figura 30 - Animal <i>Large^{myd}</i> com aproximadamente sete meses de idade, exibindo uma película translúcida ao redor do globo ocular.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequencia de nucleotídeos e local de digestão da enzima de restrição NDE1 para genotipagem dos camundongos da linhagem <i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	27
Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos utilizados para genotipagem dos camundongos da linhagem <i>Large^{myd}</i>	28
Tabela 3 - Avaliação dos membros anteriores nas diferentes idades no teste da barra. Valores de significância <i>p</i> obtidos na comparação entre as linhagens pelo teste de Mann-whitney.....	37
Tabela 4 - Avaliação dos quatro membros nas diferentes idades no teste da barra. Valores de significância <i>p</i> obtidos na comparação entre as linhagens pelo teste de Mann-whitney.....	38
Tabela 5 - Soma do número de movimentos realizados durante o tempo de 1 minuto por cada linhagem no teste de suspensão pela cauda.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -DG	Alfa-distroglicana
DMB	Distrofia Muscular de Becker
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMC1D	Distrofia Muscular de Cinturas – Forma 1D
DMC2I	Distrofia Muscular de Cinturas – Forma 2I
CMD1A	Distrofia Muscular Congênita – Forma 1A
CMD1D	Distrofia Muscular Congênita – Forma 1D
DGC	Complexo glicoproteína-distrofina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>FKRP</i>	<i>Fukutin-related protein</i>
kDA	Unidade de Medida - Quilo Dalton
NDE1	Enzima de Restrição para a distribuição nuclear da proteína nudE homólogo 1
pb	Pares de Bases Nitrogenadas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>POMGnT1</i>	Protein O-linked mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
<i>POMT1</i>	Protein O-manosyl-transferase 1
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
TE	Tris EDTA
<i>TGFβ-1</i>	Fator Beta de Transformação de Crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Distrofia muscular de Duchenne e distrofia muscular de Becker.....	14
1.2 Distrofia muscular congênita.....	14
1.3 Distrofia muscular de cinturas.....	16
1.4 Estrutura do músculo.....	17
1.5 Degeneração muscular.....	19
1.6 Modelos animais	19
1.7 Dos testes funcionais.....	22
1.8 Classificação de esforço físico.....	23
1.9 Aprendizagem e memória.....	24
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Camundongos	26
3.1.1 Linhagens utilizadas	26
3.1.2 Genotipagem dos camundongos	27
3.2 Avaliações funcionais	29
3.2.1 Locomoção.....	29
3.2.1.1 <i>Plataforma</i>	<i>29</i>
3.2.2 Resistência/equilíbrio	30
3.2.2.1 <i>Resistência nos membros anteriores</i>	<i>30</i>
3.2.2.2 <i>Resistência/equilíbrio nos quatro membros.....</i>	<i>30</i>
3.2.3 Movimentos musculares realizados sob estresse/cansaço	31
3.2.3.1 <i>Levantamento pela cauda</i>	<i>31</i>
3.2.4 Nado	32
3.2.4.1 <i>Nado forçado.....</i>	<i>32</i>
3.3 Avaliações funcionais com equipamentos eletrônicos	32
3.3.1 Força – Grip strength.....	32
3.3.2 Resistência – Rota rod.....	33
3.4 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Caracterização funcional nos testes padrões	35
4.1.1 Análise qualitativa da postura, padrão de caminhada e equilíbrio sobre superfície plana/plataforma.....	35

4.1.2 <i>Análise funcional no teste de resistência nos membros anteriores e quatro membros</i>	36
4.1.3 <i>Análise de aptidão ao nado forçado</i>	38
4.1.4 <i>Análise do padrão de movimentos no teste de suspensão pela cauda</i>	41
4.2 <i>Análise de força/resistência nos equipamentos eletrônicos</i>	41
4.2.1 <i>Grip strength</i>	42
4.2.2 <i>Rota Rod</i>	43
 5 DISCUSSÃO	45
5.1 Testes funcionais na linhagem mdx	46
5.1.1 <i>Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros</i>	46
5.1.2 <i>Análise no nado forçado</i>	47
5.1.3 <i>Análise no teste de suspensão pela cauda</i>	48
5.1.4 <i>Análise no teste de força pelo Grip strength</i>	48
5.1.5 <i>Análise no teste de resistência pelo Rota rod</i>	48
5.2 Testes funcionais na linhagem SJL/J	49
5.2.1 <i>Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros</i>	49
5.2.2 <i>Análise no nado forçado</i>	49
5.2.3 <i>Análise no teste de suspensão pela cauda</i>	49
5.3 Testes funcionais na linhagem Lama2^{dy-2J}/J	50
5.3.1 <i>Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros</i>	50
5.3.2 <i>Análise no nado forçado</i>	51
5.3.3 <i>Análise no teste de suspensão pela cauda</i>	51
5.3.4 <i>Análise no teste de força pelo Grip strength</i>	51
5.3.5 <i>Análise no teste de resistência pelo Rota rod</i>	51
5.4 Testes funcionais na linhagem Large^{myd}	52
5.4.1 <i>Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros</i>	52
5.4.2 <i>Análise no nado forçado</i>	53
5.4.3 <i>Análise no teste de suspensão pela cauda</i>	53
5.4.4 <i>Análise no teste de força pelo Grip strength</i>	53
5.4.5 <i>Análise no teste de resistência pelo Rota rod</i>	54
 6 CONCLUSÕES	55
 REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética (VAINZOF e ZATZ, 2003). Foram mapeados genes responsáveis por mais de 30 formas de distrofia, cuja herança pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao cromossomo X. No entanto, sabe-se que existem formas ainda não identificadas (ZATZ, 2001).

1.1 Distrofia muscular de Duchenne e distrofia muscular de Becker

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é caracterizada por fraqueza muscular progressiva, iniciada na infância e com morte precoce na juventude (EMERY, 2002a).

A DMD afeta 1 em cada 3.500 meninos nascidos vivos, enquanto sua forma alélica, a Distrofia Muscular de Becker (DMB), afeta aproximadamente 1 em cada 30.000 indivíduos. Ambas apresentam padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X, e são causadas por mutações no gene DMD que codifica a proteína distrofina. O gene DMD se localiza no cromossomo Xp21, é composto por 79 exons distribuídos ao longo de 2 milhões de pares de bases, e transcreve um RNA mensageiro de 14 kb (ZATZ, 2001; HOFFMAN et al., 2001). A proteína distrofina é composta por 3650 aminoácidos e com peso molecular de 427 kDa.

Sabe-se que a grande maioria das mutações encontradas nos pacientes com DMD E DMB são deleções de DNA em cerca de 60% dos casos (GARDNER-MEDWIN, 1968; NAWROTZKI, 1996). A diferença entre as deleções que causam a DMD e a DMB é explicada pela manutenção ou não do quadro de leitura do RNA mensageiro, ou seja, na DMD a deleção é fora de fase, o quadro de leitura não é mantido levando a uma proteína truncada que é destruída pela célula; já na DMB a deleção mantém o quadro de leitura do RNAm e leva a produção de uma proteína reduzida quantitativamente ou qualitativamente, porém semi/funcional (ZATZ, 2001).

1.2 Distrofias musculares congênitas

As distrofias musculares congênitas formam um grupo heterogêneo de doenças musculares caracterizado clinicamente pela presença de hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento motor, grau variável de contraturas articulares, e possível associação com anormalidades no sistema nervoso central ou olhos. O quadro clínico tende a ficar estável,

mas alguns pacientes apresentam uma evolução clínica lenta e progressiva. Pode ocorrer também comprometimento respiratório e da deglutição (DUBOWITZ, 1995).

Nas últimas duas décadas, as diferentes variantes de distrofia muscular congênita foram organizadas em categorias específicas, com base nas principais características clínicas e, mais atualmente, também em função dos defeitos genéticos e bioquímicos primários. Foram identificados dez genes que causam formas específicas de distrofias congênitas, mas se acredita em uma heterogeneidade ainda maior.

Atualmente, a classificação internacional reconhece as seguintes categorias de genes responsáveis pela doença:

1. Genes codificadores das proteínas estruturais da membrana basal ou matriz extracelular das fibras musculares esqueléticas: cadeia α -2 laminina, alfa-7 integrina e colágeno VI,
2. Genes codificadores de glicosiltransferases demonstram-se candidatos por afetar a glicosilação da alfa-distroglicana (α -DG), uma proteína de membrana externa da membrana basal: genes *POMT1*, *POMGnT1*, fukutin, *fukutin-related protein (FKRP)*, *Large*.

Uma das formas conhecidas é a distrofia muscular congênita do tipo Fukuyama, mais comumente encontrada no Japão. Essa doença provoca intensa fraqueza dos músculos faciais e dos membros, hipotonia muscular generalizada, contraturas articulares, e geralmente se manifesta antes dos nove meses de idade. A maioria das crianças apresenta retardo mental, distúrbios de fala e convulsões. O gene responsável por esta forma foi localizado no cromossomo 9.

Na chamada “**forma clássica**” ou “**forma ocidental**”, os pacientes com distrofia congênita têm sintomas semelhantes aos do tipo Fukuyama, mas geralmente não apresentam comprometimento da inteligência. Em cerca de 50% destes casos clássicos ou ocidentais a doença é causada por mutações em um gene localizado no cromossomo 6, que codifica a cadeia α 2 da laminina muscular. Mutações neste gene resultam na deficiência desta proteína e provável ruptura da ligação com o complexo Complexo Distrofina-Glicoproteínas (DGC). Esses pacientes apresentam alterações da substância branca do cérebro (região com presença de grande quantidade de um material esbranquiçado denominado mielina, que envolve certos prolongamentos dos neurônios – os axônios) observadas por exames tomográficos ou por ressonância magnética. A maioria dos pacientes com distrofia muscular congênita causada pela deficiência de merosina (distrofia congênita merosina-negativa) nunca chega a andar. O

diagnóstico da distrofia muscular congênita merosina-negativa é estabelecido por biópsia muscular (EMERY, 2002b).

Novas formas de distrofias musculares foram recentemente associadas a mutações em genes que codificam enzimas glicosiltransferases, que contribuem para a glicosilação da proteína α -DG. Interessantemente, a análise de proteínas em biópsias musculares destes pacientes mostra uma hipoglicosilação da α -DG e redução significativa de numerosos ligantes da matriz extracelular (MUNTONI et al., 2002a).

Dentro deste grupo de doenças, nota-se a forma congênita 1C (CMD-1C), causada por mutações no gene FKR_P (*fukutin-related protein*) que codifica uma possível glicosiltransferase (BROCKINGTON et al., 2001). Além disso, uma nova forma de distrofia muscular congênita, a CMD-1D, foi associada a mutações no gene LARGE (LONGMAN et al., 2003). Este gene está envolvido na glicosilação da proteína α -DG, membro essencial na formação e funcionamento do complexo DGC muscular. Portanto, o estudo da via de glicosilação de proteínas musculares se tornou muito importante na compreensão de novos mecanismos causadores de doenças neuromusculares humanas (GREWAL e HEWITT, 2003; BARRESI et al., 2004).

1.3 Distrofia muscular de cinturas

As distrofias musculares das cinturas (DMCs) ou em inglês, *Limb-girdle muscular dystrophies* (LGMD), representam um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças musculares degenerativas, uma vez que formas distintas então mapeadas em diferentes regiões do genoma (BUSHBY et al., 1995a, 1995b, 1996; BECKMANN et al., 1999). O padrão de herança das diferentes formas pode ser autossômico dominante ou recessivo.

A DMC caracteriza-se por uma fraqueza proximal das cinturas dos membros (cinturas pélvica e escapular) e do tronco (ZATZ, 2001). Já foram identificadas mutações em 15 diferentes genes responsáveis por esse quadro clínico. As formas autossômicas dominantes são muito raras (encontradas em cerca de 10% dos casos) e, em geral menos graves que as formas recessivas. Muitas dessas doenças estão associadas a envolvimento cardíaco com significância clínica, como observado nas formas 1B, 1D, 2C, 2E e 2F (EMERY, 2002a).

As mutações genéticas responsáveis pelas diferentes formas de DMC levam à deficiência de proteínas específico-musculares, como: Sarcoglicanas (α -SG-DMC2D, β -SG-DMC2E, γ -SG-DMC2C e δ -SG-DMC2F), Calpaína (DMC2A), Disferlina (DMC2B),

Teletonina (DMC2G), FKRP (*fukutin-relate-protein*), entre outras (VAINZOF e ZATZ, 2003).

A forma 2B de herança autossômica recessiva está associada a mutações no gene que codifica a proteína disferlina, localizada na membrana do músculo esquelético (BANSAL e CAMPBELL, 2004). O gene situa-se na região 2p12-p14, é formado por 55 exons e é transcrito em um RNAm de 8,5kb. A disferlina apresenta um domínio transmembrana e seis domínios citoplasmáticos C2 Ca^{2+} dependentes, que se ligam a fosfolipídios e proteínas da membrana citoplasmática, cuja função é de mediar a fusão de membranas e transdução de sinais das células musculares (DAVIS et al., 2000).

Fazendo parte também desse grupo de doenças, a DMC2I é causada por mutações no gene FKRP. Seu produto gênico compreende uma proteína de membrana tipo II que, apesar de ter função ainda desconhecida, de acordo com estudos comparativos da sequência de aminoácidos dessa proteína, ela deve provavelmente ser uma fosfoligante-transferase, assim como a proteína fukutina (GREWAL et al, 2003).

1.4 Estrutura do músculo

O tecido muscular é constituído por células de morfologia alongada e que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos altamente organizados, responsáveis pela contração muscular. Este pode ser dividido em liso, estriado esquelético ou estriado cardíaco, conforme a sua morfologia e função.

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas longas e multinucleadas, que apresentam estriações transversais. As fibras musculares possuem contração rápida, vigorosa e sujeita ao controle voluntário. Estas fibras se originam da fusão de mioblastos e, a observação por microscopia eletrônica revela que as listras se originam da estrutura em bandas de miofibrilas múltiplas, compostas principalmente por actina e miosina (JUNQUEIA e CARNEIRO, 1995).

As miofibrilas, de diâmetro de 1 a 2 μm , correm longitudinalmente à fibra muscular e apresentam repetição de unidades iguais, os sarcômeros. Cada sarcômero é formado principalmente por filamentos de actina e miosina, dispostos longitudinalmente, organizados numa distribuição simétrica e paralela. Intercaladas com a actina, situam-se as moléculas de tropomiosina e troponina, que auxiliam na organização e na ativação da cascata contrátil, pela ligação com cálcio e pela exposição dos sítios de ligação da actina às cabeças de miosina.

O conjunto de miofibrilas é, por sua vez, ligado à membrana plasmática da célula muscular por meio de diversas proteínas que têm afinidade pelos miofilamentos e por proteínas da membrana plasmática. A distrofina, por exemplo, é uma proteína de localização sub-sarcolema, que se liga aos filamentos de actina e a um complexo de proteínas integrais da membrana plasmática – denominado complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DAG ou DGC) (ERVASTI et al., 2001a).

O DGC é um complexo oligomérico, formado pelos sub-complexos distroglicano (α - e β -DG), sarcoglicano (α , β -, γ -, δ - e ϵ -SG), sintrofina, e distrobrevina. A associação da distrofina ao complexo DGC é feita através de sua ligação à proteína β -DG. A proteína β -DG está associada ao complexo transmembranoso sarcoglicano, e também à proteína periférica de membrana α -DG. A proteína α -DG é altamente glicosilada e estudos relacionados a este processo sugerem que este mecanismo teria importante função na ligação e interação da α -DG na matriz extracelular, através da proteína laminina 2. A laminina 2 é composta por três cadeias, sendo uma delas a cadeia $\alpha 2$. Desta forma, o DGC promove a ligação entre as proteínas internas da fibra muscular (ligação actina-distrofina), e a matriz extracelular (associação α -DG-laminina 2) (Figura1) (MUNTONI e VOIT, 2004).

O bom funcionamento destas proteínas e do complexo DGC seria responsável pelo correto mecanismo de contração muscular (ERVASTI e CAMPBELL, 1993b), visto que mutações nos genes que codificam as diversas proteínas causam doenças neuromusculares no homem.

Figura 1 - Complexo distrofina glicoproteínas associadas (BYRNE et al., 2003).

1.5 Degeneração muscular

A degeneração muscular é o processo de perda das características estruturais da musculatura esquelética, como resultado de lesões ou como consequência de mutações nas proteínas componentes da fibra muscular. O desequilíbrio causado por estes fatores leva à instabilidade do sarcolema e danos causados pelo movimento de contração (ALDERTON e STEINHARDT, 2000). Após o dano ao sarcolema, um aumento no influxo de cálcio foi observado (ALDERTON e STEINHARDT, 2000), o que, por sua vez, pode tornar as fibras musculares mais suscetíveis a necrose, uma das principais características patológicas das distrofias musculares. Com a necrose ocorre o rompimento da fibra muscular e extravasamento do seu citoplasma, que leva ao grande aumento de algumas enzimas sarcoplasmáticas, como a creatinina quinase, no soro de pacientes portadores de distrofia muscular (COHN e CAMPBELL, 2000).

Quanto ao processo de degeneração muscular, Zanotti e colaboradores (2007) procuraram investigar se os componentes da matriz extracelular contribuem para a fibrose observada nas distrofias musculares, principalmente DMD. Foram quantificados transcritos e proteínas em culturas de miotubos de pacientes com DMD e controles. Os autores analisaram *TGFβ-1*, decorina, metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, TIMP 1, 2 e 3, colágeno 1 e 6 e miostatina. Estes concluíram que a expressão dos transcritos e proteínas de vários componentes da matriz extracelular está alterada nas células musculares DMD *in vitro*, indicando que estas células contribuem para o processo patológico, já que a inflamação e degeneração características de DMD *in vivo* estão presumivelmente ausentes em cultura. Também observaram que a miostatina (potente inibidor de ativação de células-satélite e renovação muscular) está aumentada, e que a decorina (ligante e inibidor de *TGFβ-1* e miostatina) estão reduzidas, o que pode ter implicações nas terapias que buscam reduzir a fibrose muscular.

1.6 Modelos animais

Estudos clínicos e neurológicos em animais com fraqueza muscular têm ajudado a identificar alguns modelos animais tais como camundongos, cães e gatos, deficientes para diferentes proteínas musculares. Os estudos realizados nestes animais são cruciais para aumentar nossos conhecimentos a respeito de doenças genéticas humanas e para a investigação de terapias experimentais. A facilidade com que o genoma murino pode ser

manipulado faz do camundongo uma ferramenta bastante utilizada em testes moleculares e na avaliação de complexos protéicos musculares (SCINSKI et al., 1989; MEER e RABER, 2005). Diversos modelos murinos para doenças neuromusculares já são conhecidos e utilizados (Figura 2).

Figura 2 - Esquema das diversas proteínas musculares e modelos animais disponíveis, mostrando a variedade de possíveis genes e fenótipos relacionados. Modificado de (DUBOWITZ e SEWRY, 2007).

Para o estudo da distrofia muscular de Duchenne, é possível fazer uso do modelo murino *mdx* (TURK et al., 2005b), linhagem que exibe naturalmente deficiência da distrofina no músculo resultante de uma mutação pontual no exon 23 do gene por inserção de um códon de parada prematuro (BULDIELF, 1984). Este é um bom modelo genético mas não apresenta o mesmo fenótipo dos pacientes, por exibirem poucos sinais de fraqueza muscular e possuem um tempo de vida próximo ao normal. Essa “recuperação” é resultante de uma substancial regeneração. Os músculos esqueléticos se ajustam a degeneração com uma expansão da população de células satélites e hipertrofia muscular (DURBEEJ e CAMPBELL, 2002). O músculo diafragma, por outro lado, é o músculo mais afetado que reproduz o processo degenerativo da distrofia muscular humana. Neste, a força específica de contração, a força específica tetânica e a máxima potência são significativamente reduzidas (STEVENS e FAULKNER, 2000). A análise de distrofina no camundongo *mdx* revela a presença de cerca de 2 a 3% de fibras revertentes, que são fibras isoladas que passam a expressar novamente a distrofina (PASTORET et al., 1995).

O camundongo *Large*^{myd} - modelo natural para o defeito de glicosilação - identificado em 1963 pelo laboratório da Jackson nos Estados Unidos - portador de uma deleção em três exons no gene da *Glycosyltransferase-like Large 1*, que causa um códon de parada prematuro e perda de função do gene. *Large* é um dos cinco genes com importante papel na via de glicosilação enzimática que atua de maneira direta na via de glicosilação da proteína α -distroglicana, e implica em várias formas de distrofia muscular, como é o caso da distrofia muscular congênita (CMD). O modelo para esta mutação miodistrófica exibe um movimento irregular de patas, uma progressão difusa da miopatia com áreas de necrose aguda e focos de degeneração em homozigotos afetados, o que resulta em comprometimento do coração, sistema nervoso e reprodutivo (BROWNING et al., 2005).

Alterações na expressão dessa proteína geram deficiências na glicosilação da proteína α -distroglicana de modo a desestruturar o complexo distrofina-glicoproteínas associadas, impossibilitando a sua correta ligação aos componentes da matriz extracelular e às proteínas internas da fibra muscular, o que gera o padrão miopático. Desta maneira este modelo é utilizado para investigação dos mecanismos moleculares, bioquímicos e clínicos das distroglicanopatias (BROWNING et al., 2005).

Outros modelos murinos disponíveis para as distrofias musculares congênitas relacionados com defeitos em proteínas da lâmina basal são os *dy/dy* e sua variante alélica *Lama2*^{dy-2J}/*J*. Muitas mutações distintas no gene codificante da cadeia $\alpha 2$ da laminina 2 (*LAMA2*) foram caracterizadas, algumas das quais levam a ausência total da proteína, enquanto outras levam a deficiência parcial (STRAUB et al., 1997; VILQUIN et al., 1999; VILQUIN et al., 2000). Em ambos os casos, há presença de uma distrofia muscular com comprometimento muscular variando de grave a extremamente severo. Existem inúmeras linhagens de camundongos com mutações espontâneas no gene *Lama2*, incluindo os tipos *dy/dy* e *Lama2*^{dy-2J}/*J* citados acima, identificados em 1955 e 1970, respectivamente. O camundongo *dy/dy* expressa um polipeptídeo de laminina- $\alpha 2$ de tamanho aparentemente normal, porém em quantidade muito pequena e o animal sofre de uma forma bastante grave de distrofia muscular, com fraqueza acentuada e reduzido tempo de vida (GUO et al., 2002). A mutação neste camundongo ainda não foi localizada. No caso do camundongo *Lama2*^{dy-2J}/*J*, foi possível detectar que a mutação no gene *Lama2* ocorre de tal forma que o *splicing* acontece de modo anormal, produzindo uma molécula de $\alpha 2$ -laminina onde falta o domínio VI N-terminal (XU et al., 1994; SUNADA et al., 1995). A proteína truncada aparece em quantidade substancial no músculo esquelético do animal. Embora desenvolvam uma paralisia dos membros posteriores, passando a arrastar-los a partir de 3 a 4 semanas de vida, e

apresentam alterações no sistema nervoso periférico, com atraso na mielinização (JACSON LABORATORIES DATABASE, 2009), seu quadro funcional é menos grave do que no camundongo *dy/dy* (GUO, 2002). Pelo fato de apresentar um fenótipo diferencial e grave estes camundongos são importantes no estudo do sucesso de terapias, já que um aumento na expectativa de vida, por exemplo, pode constituir um resultado significativo.

Outro modelo murino de interesse para o estudo da degeneração muscular, é o *SJL/J*, modelo para a DMC-2B, portador de uma deleção de 171pb no gene que codifica a proteína sarcolemal disferlina,, que leva a redução de aproximadamente 85% dos níveis de disferlina no músculo, quando comparado a animais normais (BITTNER et al., 1999).

Exames histopatológicos do *SJL/J* revelam características compatíveis com distrofia muscular progressiva, incluindo variações degenerativas e regenerativas das fibras musculares e uma fibrose progressiva. As primeiras variações ocorrem por volta da terceira semana de idade. Mudanças distróficas levam ao aparecimento de tecido fibroso e focos de inflamação. Este animal apresenta alterações morfológicas associadas a manifestações de uma leve fraqueza muscular (BITTNER et al., 1999).

O papel crucial destes modelos animais estudados no estabelecimento de terapias vem crescendo. Eles são amplamente utilizados em testes farmacológicos, e foram importantes em diversos experimentos de terapia gênica. Mais recentemente, modelos animais com deficiências de proteínas específicas são muito informativos para verificar o potencial terapêutico de células tronco de diferentes origens.

1.7 Dos testes funcionais

Como forma de se testar novas terapias, pesquisadores centram seus esforços no desenvolvimento de metodologias e equipamentos que permitam medir as características funcionais de modelos animais, de modo a poder avaliar o grau de gravidade e progressão da doença.

Para tanto, determinam-se protocolos eficientes de treinos funcionais para cada estudo, onde se utilizam medidas em aparelhos específicos, podendo atuar na avaliação de comportamento, percepção espacial, força máxima e resistência, conforme objetivo.

Diversos trabalhos em modelos murinos exemplificam o uso dos testes comportamentais e funcionais. Como exemplo, o estudo do nado forçado e o da suspensão pela cauda, são utilizados na análise da eficácia e seleção de antidepressivos (PORSOLT et al., 2001); o teste do *grip strength* para análise da disfunção motora em modelos murinos para Síndrome de

Down (COSTA; WALSH; DAVISSON, 1999), bem como para estudo em camundongos modelos de esclerose lateral amiotrófica (VAN DAMME et al., 2003) e até mesmo na demonstração de que, a inibição da miostatina em camundongos adultos, aumenta a massa e a força muscular (WHITTEMORE et al., 2003).

É descrito também, o uso de equipamentos para teste físicos como, o *grip strength* e o *rota rod* que evidenciam força e resistência (respectivamente). A análise da atividade comportamental pode ser realizada através do teste de campo aberto, que em uma das linhagens aqui estudadas, os camundongos *mdx*, foi utilizada como forma de avaliar graus de sensibilidade em experimentação de triagem pré-clínica de drogas (SPURNEY et al., 2009).

1.8 Classificações de esforço físico

- Força muscular: traduz a capacidade de a musculatura produzir tensão, ou seja, contração muscular quando se opõe ou vence uma resistência exterior (HERTOHG et al., 1994). Do ponto de vista fisiológico, a maior ou menor capacidade de produção de força estabelece uma relação direta com o número de pontes cruzadas de miosina que inter-relacionam com os filamentos de actina, com o número de sarcômeros, com o comprimento e o tipo de fibras musculares e com os fatores inibidores ou facilitadores da atividade muscular (VERMEIL e HELLAND, 1997).
- Resistência muscular: é a capacidade de um grupamento muscular executar contrações repetidas por um período de tempo suficiente para causar a fadiga muscular ou manter-se estaticamente numa porcentagem específica de contração voluntária muscular por um período de tempo prolongado.
- Fadiga muscular: causa a redução temporária da força muscular, potência e resistência. A fadiga muscular coincide com um acúmulo de ácido láctico nas células do músculo, assim, quanto maior a atividade muscular, mais ácido láctico se acumula na musculatura, tornando-a fatigada e incapaz de contrair-se, o que produz cansaço e até câibras. A recuperação não estará completa até que o ácido láctico seja processado através do sistema.

1.9 Aprendizado e memória

Aprendizagem é quantificada experimentalmente como a probabilidade que um organismo responda da mesma forma a um estímulo quando esse é repetido. Essa alteração da probabilidade seria baseada na memória do organismo do que foi aprendido (MECHAN et al., 2009).

Assim, para o melhor entendimento dos mecanismos da maquinaria muscular e, conseqüentemente possibilitar melhor avaliar as terapias propostas para as diferentes distrofias musculares, é importante o estabelecimento de parâmetros de avaliações funcionais que possam sinalizar os possíveis benefícios das terapias em teste.

2 OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Estabelecer parâmetros de avaliação funcional em modelos murinos para doenças neuromusculares, visando a sua utilização para avaliar benefícios clínicos de futuras terapias.

Objetivos específicos:

- Caracterização funcional das diferentes linhagens: *mdx*, *SJL/J*, *Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{myd}* através de análise de força, resistência e equilíbrio motor.
- Estabelecer parâmetros funcionais nas diferentes idades correlacionando com o grau de progressão das doenças
- Verificar e correlacionar possíveis diferenças no padrão de distribuição de fraqueza muscular nas diferentes linhagens e mutações gênicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Todos os animais foram acomodados em biotério convencional com barreiras onde receberam todos os cuidados requeridos para uma boa saúde no que se refere à criação, manutenção e manejo, tendo à sua disposição água e comida a vontade. A manutenção de condições ambientais estáveis, como ciclo noturno e diurno, controle da temperatura e de ruídos inesperados ou alterações nas intensidades de sons, buscaram assegurar a reprodução dos resultados experimentais

Utilizou-se gaiolas de policarbonato contendo cerca de 6 animais em cada uma, sendo que, cada gaiola foi identificada conforme a linhagem, idade dos animais e data de formação dos grupos; nos casos em que ocorreram perda dos animais por morte natural pelo avanço da idade, houve também marcação. Estes foram analisados ao longo de seu tempo de vida até o momento do sacrifício realizado por eutanásia em câmara de CO₂.

Camundongos das diversas linhagens, em diferentes tempos, e de acordo com o objetivo de cada experimento foram sacrificados e dissecados. Foram coletados tecidos para futuras análises histológicas, imunohistoquímicas e *western blot*.

Os experimentos aqui descritos foram aprovados pela comissão de ética do Instituto de Biociências.

3.1.1 Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens de camundongos *mdx* (BULFIELD et al., 1984), *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J* (MEIER e SOUTHARD, 1970), *SJL/J* (WELLER et al., 1997), *Large^{myd}* (GREWAL e HEWITT, 2002) e *C57Black6* (camundongo normal).

Os camundongos *Lama2^{dy-2J}/J* (000524), *SJL/J* (000686) e *Large^{myd}* (000226) foram importados do laboratório Jackson (www.jaxmice.org). Os animais *mdx* e *C57Bl6* já eram criados em nosso centro. Todos os camundongos são atualmente mantidos em nosso próprio biotério e nos biotérios do IPEN e da Faculdade de Veterinária da USP (departamento de Patologia).

O número de animais utilizados variou em cada teste, conforme descrito em cada protocolo.

3.1.2 Genotipagem dos camundongos das linhagens *Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{myd}*

Para a genotipagem, os animais foram identificados por marcações nas orelhas, e um pequeno fragmento da cauda foi cortado. Este foi utilizado para a extração do DNA utilizando-se de incubação com solução de extração, que consiste em 100mM Tris HCl, pH8,5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl; a este é adicionado proteinase K, o tubo contendo a cauda junto as soluções permanece em banho seco *overnight*, no dia seguinte centrifuga-se as amostras a 3000 rpm por 10 minutos e mantém-se o sobrenadante, a este adiciona-se isopropanol, o tubo é agitado por inversão e então levado a centrifugação por mais 15 minutos a 12000rpm, em seguida o sobrenadante é descartado e permanece-se com o pellet, a este é adicionado solução TE (volume a depender do tamanho do pellet), centrifuga-se por mais 10 minutos a 12000 rpm e mantém-se o sobrenadante. Com este sobrenadante este foi feita a dosagem da concentração do DNA no nanodrop e a partir de então se preparou as soluções de uso para as reações de PCR a 20ng/μl.

No caso da linhagem *Lama2^{dy-2J}/J*, o DNA extraído foi submetido a um PCR que amplifica um fragmento de 170pb, contendo a região com a mutação. Nesta linhagem a mutação cria um sítio de restrição para a enzima NDE1, assim, após a amplificação pela reação de PCR os fragmentos foram digeridos. Caso o animal seja homozigoto normal, não há digestão (amplificação do fragmento com 377pb); caso o animal seja heterozigoto, aparecem três bandas, uma referente ao alelo normal, não-digerido e duas referentes ao alelo alterado, digerido em dois fragmentos; no caso do animal ser afetado, portanto homozigoto para o alelo mutante aparecem duas bandas menores, uma de 213pb e outra de 164pb, já que todas as moléculas resultantes do PCR são digeridas (VILQUIN et al., 2000).

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos (oligos) e local de digestão da enzima de restrição NDE1

Primer maior	TCC TGC TGT CCT GAA TCT TG
Primer menor	CTC TAT TAC TGA ACT TTG GAT G
Sítio de restrição NDE1	CATATG

Caso o animal seja homozigoto normal, não há digestão (amplificação do fragmento com 377pb); caso o animal seja heterozigoto, aparecem três bandas, uma referente ao alelo normal, não-digerido e duas referentes ao alelo alterado, digerido em dois fragmentos; no caso do animal ser afetado, portanto homozigoto para o alelo mutante aparecem duas bandas

menores, uma de 213pb e outra de 164pb, já que todas as moléculas resultantes do PCR são digeridas (Figura 3) (VILQUIN et al., 2000).

Figura 3- Genotipagem do camundongo *Lama2^{dy-2J/J}* após digestão. Gel de acrilamida corado com brometo de etídio. 1- camundongo normal; 2- camundongo heterozigoto ; 3- camundongo afetado.

No caso da linhagem *Large^{myd}*, ela apresenta uma deleção em três exons no gene da *Glycosyltransferase-like Large 1*, que causa um codon de parada prematuro e perda de função do gene já descritos anteriormente. Para a avaliação molecular deste modelo foram construídos dois pares de primers; os primers GT4F e GT4R que reconhecem um produto de 162pb presente somente no alelo selvagem, uma vez que estes estão localizados dentro do exon 6 e intron 6 respectivamente. Esta região é deletada nos camundongos *Large^{myd}*. Foram utilizados também os primers MydF3 e MydR2 que amplificam um produto de 421pb somente no alelo *Large^{myd}*, já que estes primers estão separados por 100kb no alelo selvagem. Para uma genotipagem direta desse camundongo, um PCR multiplex foi padronizado combinando os pares de primers em uma única reação (Figura 4) (BROWNING et al., 2005).

Tabela 2- Sequência de nucleotídeos (oligos)

Wild-type/GT4F	GGC CGT GTT CCA TAA GTT CAA
Wild-type/GT4R	GGC ATA CGC CTC TGT GAA AAC
Mutant/MydF3	ATC TCA GCT CCA AAG GGT GAA G
Mutant/MydR2	GCC AAT GTA AAA TGA GGG GAA A

Figura 4 - Genotipagem do camundongo *Large^{myd}*. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1-camundongo afetado; 2- camundongo heterozigoto; 3- camundongo normal.

3.2 Avaliações funcionais

Dos equipamentos construídos segundo Chiavegatto et al. (2000):

Baterias de testes foram efetuadas de modo que a maioria dos animais da mesma linhagem fossem observados no mesmo dia, como forma de se manter o padrão estatístico para sexo e idade. Os experimentos tentaram seguir tempos específicos de análise nos seguintes tempos de vida: 21 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias, 120 dias, 150 dias e 180 dias, variações nesses períodos surgiram devido à disponibilidade ou não dos camundongos.

Foram utilizados 13 animais da linhagem *mdx*, 9 animais da linhagem *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*, 5 animais da linhagem *SJL/J*, 18 animais da linhagem *Large^{myd}* e 4 animais *C57Black6* (para os testes de resistência nos membros anteriores e quatro membros, e para o de levantamento pela cauda).

3.2.1 Locomoção

3.2.1.1 Plataforma

Dois retângulos de madeira com 15 cm X 10 cm são unidos a uma plataforma com 2cm de largura por 50cm de comprimento. Esta fica suspensa a 50 cm de altura de uma base forrada com algodão. O camundongo, quando colocado sobre a plataforma, caminha até a área mais larga. Neste teste foi possível analisar a capacidade de marcha, a sua facilidade de locomoção e o padrão de uso dos membros anteriores e posteriores (Figura 5) (CHIAVEGATTO et al., 2000).

Figura 5 – Plataforma. Animal da linhagem *C57Black6*

3.2.2 Resistência/equilíbrio

3.2.2.1 Resistência nos membros anteriores

Suspensão dos animais pelas patas dianteiras em uma barra de metal com três milímetros de espessura, para verificar o tempo em que os mesmos se conservam fixos a ela. Consiste em três tentativas sucessivas. Evidencia resistência, aprendizagem e equilíbrio (Figura 6) (CHIAVEGATTO et al., 2000).

Figura 6 – Barra para membros anteriores. Animal da linhagem *Large^{myd}*

3.2.2.2 Resistência/equilíbrio nos quatro membros

Suspensão dos animais pelos quatro membros em uma barra de metal, para verificar o tempo em que os mesmos se conservam fixos a ela. Consiste também em três tentativas sucessivas. Evidencia resistência, aprendizagem, equilíbrio e capacidade de enrolar a cauda (Figura 7) (CHIAVEGATTO et al., 2000).

Nestes dois testes (no de resistência nas patas dianteiras e no de quatro membros) efetuou-se uma média dos resultados obtidos por idade em cada linhagem.

Figura 7 – Barra para os quatro membros.
Animal da linhagem *mdx*

3.2.3 Movimentos musculares realizados sob estresse/cansaço

3.2.3.1 Levantamento pela cauda

Ao longo das avaliações realizadas nos tempos determinados, efetuaram-se filmagens dos animais mantidos suspensos pela cauda no tempo de 1 minuto. Estes registros foram observados e analisados conforme os padrões de movimentos, sendo estes classificados em: movimento de flexão dos membros posteriores juntos aos anteriores, extensão e flexão dos membros anteriores, extensão e flexão dos membros posteriores, flexão lateral $< 90^\circ$, elevação total do corpo, rotação ao redor do eixo da cauda e número de pausas pós- movimentos.

Neste foi possível avaliar qualitativamente a força e mobilidade dos diferentes grupamentos musculares (Figura 8). No caso desse teste houve exceção quanto ao número de animais utilizados, assim tiveram-se dois animais controles e cinco animais das demais linhagens para análise em uma única idade – três meses. Realizou-se a contagem total de cada movimento realizado, isto é, a soma dos movimentos efetuados dentro do número de animais total de cada linhagem, como consta na tabela 5.

Figura 8 – Imagem do levantamento pela cauda. Animal da linhagem *SJL/J*. Flexão dos membros posteriores junto aos anteriores.

3.2.4 Nado

3.2.4.1 Nado forçado

Consta em tubo de PVC com 30 cm de diâmetro e aproximadamente 60 cm de comprimento foi fechado e vedado em um dos lados. Este é cheio de água morna com cerca de 30 cm da altura e os camundongos foram colocados em “nado forçado” já que não há apoio possível para os mesmos (sua cauda não encosta o fundo). O animal permaneceu por cinco minutos, nos quais se realizou contagens de tempo dos atos de natação, flutuação e submersão. Neste teste é possível avaliar a resistência muscular, a capacidade de memória e, indiretamente, é também possível avaliar a percepção espacial (Figura 9).

Figura 9 – Nado forçado. Animal da linhagem *mdx*

3.3 Avaliações funcionais com equipamentos eletrônicos

Realizou-se uma análise nas quatro diferentes linhagens de camundongos estudadas para verificar possíveis alterações de força e resistência entre elas quando comparadas com os animais controles.

Foram utilizados 3 animais de cada linhagem com aproximadamente três meses de idade, sendo elas: *mdx*, *B6.WK-Lama2^{dy-2J}/J*, *SJL/J* e *Large^{myd}*.

3.3.1 Força - Grip strength

Método de quantificar a habilidade dos camundongos se prenderem pelos membros anteriores e posteriores, o que reflete a função motora, uma vez que prender-se requer uso da musculatura distal (flexores digitais) (BLANCO; ANDERSON; STEWARD, 2007). Os animais foram colocados inicialmente apenas com os membros anteriores sobre o *grip* mantendo seu dorso levemente elevado para não tocar o mesmo e puxados, de modo que, ao

serem gentilmente conduzidos da extremidade superior a inferior, o sensor medirá apenas a maior força realizada (em Newton) na tentativa dos animais se prenderem a uma das pequenas barras que compõe o *grip*. O mesmo procedimento foi utilizado para os membros posteriores, no entanto, fez-se necessário envolver com um pequeno pedaço de fita adesiva os membros anteriores (individualmente) de modo a se evitar que estes se prendam também a barra e interfira na análise. Os animais foram avaliados em três medições consecutivas, das quais os valores obtidos realizou-se uma média para o cálculo da força absoluta. Evidencia medida direta de força (Figura 10) (ANDERSON; MARIM; STEWARD, 2004).

Figura 10 – Imagem do equipamento *Grip strength* (San Diego Instruments).

3.3.2 Resistência - Rota rod

Evidencia a coordenação, o balanço motor e a resistência a fadiga dos animais em um sistema de rotor cilíndrico acelerado com cerca de 3 centímetros de diâmetro (situado 15 centímetros acima da base). O sistema é eletronicamente controlado e sofre aumento de velocidade de 4 a 40 rpm. Após um pequeno período de treino, os camundongos foram colocados sobre o cilindro e iniciaram-se as rotações com a velocidade aumentando gradualmente. A velocidade, o tempo de permanência sobre o rotor e a distância percorrida exatos a partir dos quais cada animal sofreu queda são registrados automaticamente pelo equipamento, exibidos na tela, isso permite que os dados sejam anotados para posterior análise (Figura 11) (VAN-MEER e RABER, 2005; SERRADJ e JAMON, 2007; LI et al., 2008).

Figura 11 – Imagem do equipamento *Rota rod* (IITC Life Science Inc)

3.4 Análises estatísticas

Utilizou-se como método estatístico o teste de Mann-Whitney para as avaliações realizadas, por se não paramétrico, isto é, de livre distribuição (não se faz suposição de normalidade ou igualdade de variância) para comparar dois grupos independentes de dados amostrais. Os valores são considerados significantes se p for igual ou menor que 0,05 (VETRONE et al., 2009).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização funcional nos testes padrões

4.1.1 *Análise qualitativa da postura, padrão de caminhada e equilíbrio sobre superfície plana/plataforma*

Os camundongos controles *C57Black6*, e os animais da linhagem *mdx* foram capazes de realizar o percurso completo na plataforma sem sofrerem perda de equilíbrio em todas as idades avaliadas.

Os animais da linhagem *SJL/J* mostraram equilíbrio e capacidade exploratória desejáveis até cerca dos cinco meses de vida, a partir desse período eles começaram a apresentar uma diminuição exploratória e uma leve perda de equilíbrio.

Os animais da linhagem *Lama2^{dy-2J}/J* não exibiram perda de equilíbrio ao longo do trajeto, embora sua percepção e capacidade exploratória sejam dificultadas pelo comprometimento motor nos membros posteriores com o avanço da idade, sendo mesmo assim capazes de realizar todo o percurso da plataforma.

Já os animais da linhagem *Large^{myd}* adquirem ao longo da vida uma acentuada perda da percepção espacial e de equilíbrio, levando a um maior numero de quedas ao longo da plataforma, principalmente a partir dos cinco meses de idade.

Quanto ao padrão de posicionamento dos membros tanto os animais da linhagem *mdx* como os animais da linhagem *SJL/J* exibem um padrão de normal de locomoção sobre a superfície plana, tanto dos membros anteriores e posteriores.

Os animais da linhagem *Lama2^{dy-2J}/J* exibem alteração no padrão de movimento dos membros, desencadeado pelo grave comprometimento nos membros posteriores, assim, ao percorrer uma determinada distância, eles realizam um arrete das mesmas, sendo conduzidos então pelos membros anteriores; esse padrão de caminhada é gradativamente dificultado com o avanço da idade.

Os animais da linhagem *Large^{myd}* possuem um posicionamento de membros anormal durante a locomoção, seu padrão de caminhada revela que seus membros posteriores são detidos próximo ao corpo e realizam baixa flexão dos mesmos durante o movimento, assim, a ponta da cauda toca o solo.

4.1.2 Análise funcional no teste de resistência nos membros anteriores e quatro membros

Com base na média obtida em três tentativas sucessivas, observou-se que, a linhagem *mdx* permaneceu por um tempo curto, cerca de 10 segundos, fixa a barra até cerca dos 30 dias de vida, a partir desse período o tempo de permanência se eleva até atingir um pico de 40 segundos, decrescendo novamente em seguida até o período final da análise.

A linhagem *SJL/J* foi capaz de permanecer por uma média de tempo superior a um minuto nos teste de permanência na barra bem como os animais normais mostrando, no entanto, um pequeno decréscimo a partir dos quatro meses de vida.

A linhagem *Lama2^{dy-2J}/J* permaneceu por uma média de tempo elevada nos testes de resistência à permanência na barra. Na avaliação dos membros anteriores, por exibirem bom senso de equilíbrio, os camundongos afetados conseguem se erguer e se posicionar na barra através de apoio no tórax, permanecendo nesta posição por tempos mais longos. No teste de avaliação dos quatro membros, os camundongos dessa linhagem conseguiram utilizar a mesma habilidade para se manter seguros na barra. Eles puderam assim, realizar um movimento de rotação do corpo, que possibilitou a sua colocação na posição descrita para os membros anteriores e assim permaneceu por uma média de tempo alta fixos a barra. Por fim, a linhagem *Large^{myd}* exibiu uma grande fraqueza nos músculos proximais e distais, sendo mais acentuada nestes últimos, o que a faz permanecer por um pequeno período de tempo fixa a barra, inferior a dez segundos. Muitas vezes, estes animais foram incapazes de se prender a barra, não sendo possível realizar a contagem de tempo, fato este que se agrava com o aumento da idade (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Gráfico comparativo entre as cinco diferentes linhagens de camundongos modelos para distrofias musculares analisadas no teste da barra para os membros anteriores.

Figura 13 - Gráfico comparativo entre as cinco diferentes linhagens de camundongos modelos para distrofias musculares analisadas no teste da barra para os membros anteriores e posteriores.

Considerando-se todas as idades, com exceção da linhagem SJL/J, todas as outras três linhagens apresentaram desempenho inferior ao normal estatisticamente significativo desde os 30 dias de idade ($P < 0,05$). A linhagem SJL/J começou a apresentar maior fraqueza a partir dos 120 dias (Tabela 3). O mesmo se observou para o teste da avaliação dos quatro membros. (Tabela 4).

Tabela 3 - Avaliação dos membros anteriores nas diferentes idades. Valores de significância p obtidos na comparação entre as seguintes linhagens pelo teste de Mann-whitney

Membros anteriores	<i>C57Black6</i> x <i>mdx</i>	<i>C57Black6</i> x <i>SJL/J</i>	<i>C57Black6</i> x <i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	<i>C57Black6</i> x <i>Large^{myd}</i>
30 dias	0,0016	1	0,0122	0,0081
60 dias	0,0016	1	0,0034	0,0022
90 dias	0,0016	1	0,0027	0,0008
120 dias	0,0016	0,0601	0,0034	0,0008
150 dias	0,0016	0,0122	0,0034	0,0008
180 dias	0,0016	0,0758	0,0034	0,0009

Tabela 4 - Avaliação dos quatro membros nas diferentes idades. Valores de significância *p* obtidos na comparação entre as seguintes linhagens pelo teste de Mann-whitney

Membros anteriores	<i>C57Black6</i> x <i>mdx</i>	<i>C57Black6</i> x <i>SJL/J</i>	<i>C57Black6</i> x <i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	<i>C57Black6</i> x <i>Large^{myd}</i>
30 dias	0,0016	0,5309	0,0122	0,0081
60 dias	0,0016	1	0,0034	0,0022
90 dias	0,0016	1	0,0034	0,0008
120 dias	0,0016	0,0122	0,0034	0,0008
150 dias	0,0016	0,0122	0,0034	0,0008
180 dias	0,0016	0,2101	0,0034	0,0009

4.1.3 Análise de aptidão ao nado forçado

Os animais da linhagem *mdx* (Figura 14) foram capazes de permanecer na água ao longo do tempo completo da análise, exceto nos períodos entre 60 e 90 dias, nos quais se faz necessária a retirada da maior parte dos animais antes do término da contagem do tempo por submergirem. Após esse período o tempo de flutuação se elevou acima de 60%, o que pode indicar um maior cansaço físico ou reconhecimento da ausência de saída no ambiente em que se encontra.

Os animais da linhagem *SJL/J* (Figura 15) apresentaram ainda um menor desempenho no nado forçado, cuja retirada se fez necessária a todos os animais do grupo a partir dos noventa dias de idade.

Os animais da linhagem *Lama2^{dy-2J}/J* (Figura 16) permaneceram ao longo do tempo completo da contagem na água com alternância de nado e flutuação. Até cerca dos noventa dias, realizam movimento de nado em uma porcentagem superior a 50, decrescendo com o avanço da idade, o que elevou a porcentagem da flutuação no decorrer dos tempos de avaliação.

Os animais da linhagem *Large^{myd}* (Figura 17) por sua vez, exibiram nos primeiros meses de vida uma maior porcentagem de flutuação, que decresceu um pouco ao longo da idade.

Figura 14 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos *mdx*.

Figura 15 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos *SJL/J*.

Figura 16 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos *Lama2^{dy-2J}/J*.

Figura 17 - Gráfico de médias do teste de nado forçado para os camundongos *Large^{myd}*.

A análise do tempo de submersão foi significativa para as linhagens mdx e SJL. (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico comparativo entre as quatro diferentes linhagens de camundongos modelos para distrofias musculares analisadas no teste do nado para o ato de submersão.

4.1.4 Análise do padrão de movimentos no teste de suspensão pela cauda

Tabela 5 - Soma do número de movimentos realizados durante o tempo de 1 minuto por cada linhagem

Movimentos/Linhagens	<i>C57Black6</i>	<i>mdx</i>	<i>SJL/J</i>	<i>Lama2^{dy-2J}/J</i>	<i>Large^{myd}</i>
Flexão dos membros posteriores juntos aos anteriores	0	0	20 *	0	18*
Extensão e flexão dos membros anteriores	25	15	38 *	12 *	10 *
Extensão e flexão dos membros posteriores	32	3 *	26	0 *	8 *
Flexão lateral < 90°	144	21 *	39 *	8 *	11 *
Elevação total do corpo	3	0 *	0 *	0 *	0 *
Rotação ao redor do eixo da cauda	0	20 *	0	4	13 *
Número de pausas pós-movimentos	33	22 *	10 *	14 *	12 *

* = p <0,05 – comparação com controles normais

Os animais da linhagem *C57Black6* realizam os movimentos padrões esperados dentro do teste, exibindo um dos movimentos mais complexos como o da elevação e subida pela cauda, conseguindo se re-posicionar nas quatro patas na mão do avaliador. Já as linhagens *SJL/J* e *Large^{myd}* mostram movimentos padrões de fraqueza como o encolhimento dos membros posteriores junto aos anteriores, os animais *mdx* e *Large^{myd}* realizaram em grande parte do tempo giros ao redor do eixo da cauda, e por fim a linhagem *Lama2^{dy-2J}/J* apresentou, maior parte do tempo, em repouso. A análise comparativa de cada grupo com o grupo controle mostrou diferenças estatisticamente significativas para grande parte dos movimentos avaliados (Tabela 5).

4.2 Análise de força/resistência nos equipamentos eletrônicos

Poucos animais foram avaliados por estas metodologias, visto que os aparelhos foram adquiridos no final do presente projeto.

4.2.1 Grip strength

Ao se fazer uma análise preliminar por meio de gráficos de barras é possível observar que: os animais normais da linhagem *C57Black6* apresentaram um padrão de força maior (Figura 19), como é esperado, quando comparados com as demais linhagens portadoras de distrofias. Assim, os animais da linhagem *Large^{myd}* (Figura 22) registraram cerca de metade da força obtida pelos camundongos normais, e os animais das linhagens *mdx* (Figura 20) e *Lama2^{dy-2J}/J* (Figura 21) mostraram força reduzida de acordo com seu grave comprometimento muscular.

Figura 19 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (*Grip strength*) para a linhagem *C57Black6*

Figura 20 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (*Grip strength*) para a linhagem *mdx*.

Figura 21 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (*Grip strength*) para a linhagem *Lama2^{dy-2J}/J*.

Figura 22 - Gráfico dos valores obtidos no teste de força (*Grip strength*) para a linhagem *Large^{myd}*.

Sequencialmente mostram-se os gráficos comparativos das médias obtidas por cada grupo que compreende uma determinada linhagem (Figura 23).

Figura 23 - Gráfico comparativo das médias obtidas no teste de força (*Grip strength*) para as quatro linhagens $p > 0,05$ em todas as comparações.

Pela análise estatística no teste de Mann-whitney a força exibida pelos camundongos normais não se mostra significativa quando comparada as demais linhagens, bem como quando a comparação se dá entre os animais modelos de distrofias.

4.2.2 Rota rod

Neste teste também, a linhagem controle *C57Black6* (Figura 24) foi a que percorreu uma maior distância, permanecendo assim uma média de tempo maior sobre o cilindro em comparação as outras linhagens. Os animais *mdx* (Figura 25) mantiveram-se sobre o eixo cerca de metade do tempo em relação aos camundongos normais; e as duas demais linhagens (*Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{myd}*) (Figuras 26 e 27) resistiram menos tempo sobre a movimentação do cilindro o qual levou a queda dos mesmos em um curto período de tempo.

Figura 24 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (*Rota rod*) para a linhagem C57Black6.

Figura 25 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (*Rota rod*) para a linhagem mdx.

Figura 26 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (*Rota rod*) para a linhagem $Lama2^{dy-2J/J}$.

Figura 27 - Gráfico dos valores obtidos no teste de resistência (*Rota rod*) para a linhagem $Large^{myd}$.

Figura 28 - Gráfico comparativo das médias obtidas no teste de resistência (*Rota rod*) para as quatro linhagens.

A média de tempo obtida pela linhagem controle não revelou significância quando se faz correlação com as demais linhagens, bem quando se faz a comparação entre os modelos distróficos. A análise estatística preliminar pelo teste de Mann-whitney não mostrou grau de significância com $p > 0,05$.

5 DISCUSSÃO

As técnicas moleculares têm melhorado dramaticamente o estudo em modelos murinos como referência para compreensão das condições fisiológicas e patológicas humanas. Estes modelos estão agora disponíveis para estudos de avaliações funcionais visando à compreensão da função de genes específicos ou sistemas biológicos.

Os estudos em modelos animais envolvem diversos aspectos a serem considerados. Cada uma das linhagens possui características próprias que facilitam ou dificultam sua manutenção em laboratório, manejo e reprodução. Três das linhagens utilizadas no presente estudo (*SJL/J*, *Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{myd}*) foram introduzidas em nosso biotério recentemente. Com isto, parte dos experimentos foi realizada em paralelo à sua implantação e padronização de manejo, genotipagem e análises.

Os animais *mdx* são mantidos em homozigose. As fêmeas com mutações nos dois alelos foram geradas em laboratório através de cruzamentos específicos e os afetados de ambos os sexos são capazes de se reproduzir. No entanto, é descrita uma redução na fertilidade desta linhagem (JACSON LABORATORIES DATABASE, 2009). Muito freqüentemente são formados casais que não procriam, sem motivo aparente. Estes animais são também extremamente sensíveis a oscilações de temperatura e outras alterações no ambiente, o que os leva a uma parada na produção de novas ninhadas, principalmente no inverno.

Os animais *SJL/J* também são mantidos em homozigose. A dificuldade no seu manejo se dá pela agressividade dos machos, que após certa idade param de se reproduzir e começam a agredir as fêmeas, chegando até mesmo a matá-las, o que torna necessária a formação de novos casais periodicamente (PAGE e GLENNER, 1972).

As linhagens *Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{myd}*, por sua vez, são dóceis e pouco sensíveis a mudanças de temperatura e outras alterações ambientais, porém são mantidas em heterozigose, pois os afetados não se reproduzem. Os casais de heterozigotos têm, portanto, ninhadas com aproximadamente ¼ de afetados. Assim, a obtenção de grupos experimentais grandes, com muitos animais afetados da mesma idade, se torna difícil. Na linhagem *Large^{myd}* existe a vantagem da produção de ninhadas grandes, em média 8 filhotes, o que torna possível a obtenção de um grupo experimental maior.

Desta forma, os experimentos foram planejados utilizando-se o máximo de animais de mesma idade e linhagem que foi possível de se obter no período de análise.

Tendo-se em vista que os animais controles *C57black6* foram analisados em todos os equipamentos, traçou-se uma curva de normalização para os mesmos e, uma vez que, no

equipamento construído eles exibiram sempre o mesmo padrão eles não entraram nos resultados diretos, porém atuarão como base comparativa desses resultados nessa discussão. Ressalta-se que, no equipamento como nado forçado, estes animais demonstram ter adquirido uma resposta condicionada ao realizar treinamentos repetitivos durante uma seção inicial de treinamento, o que indicaria a ocorrência do aprendizado e da memória de curta-duração na tarefa executada. A repetição do exercício aprendido numa segunda e demais seções de treinos realizados semanas mais tarde constitui evidência da formação de memória de longa-duração.

Um ponto importante a ser considerado é que o experimentador exerce grande influência sobre todos os aspectos práticos, desde manejo, características emotivas, a modo de colocação dos animais em cada aparelho. Assim, uma vez manipulado por um único experimentador, as variabilidades observadas tendem a ser reduzidas e destinadas em parte pela individualidade do animal – pois se sabe também, que por mais que haja determinados cuidados a fim de se evitar qualquer tipo de interferências, fatores externos atuam ao longo da experimentação. Assim, o desempenho pode ser influenciado por determinados fatores que devem ser cuidadosamente consideradas na concepção e interpretação dos experimentos.

Nas análises a seguir é importante ressaltar a variação observada entre os animais dentro da própria linhagem e nas mesmas idades, o que reflete a variabilidade individual que existe nestas distrofias exibidas pelos animais, e que se assemelham às formas humanas (SEWRY et al., 1996; MERCURI et al., 2003; MERCURI et al., 2006).

5.1 Testes funcionais na linhagem *mdx*

5.1.1 Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros

Como já descrito em literaturas, essa linhagem não exhibe alterações significativas quando observados seu livre padrão de caminhada e locomoção em comparação a linhagem normal.

O teste de permanência na barra através das patas dianteiras avalia basicamente a força e a resistência destes membros. O teste na barra utilizando as quatro patas, por sua vez, além da força muscular também avalia outros parâmetros tais como equilíbrio, capacidade de utilizar a cauda para se manter preso e utilização de movimento de rotação do corpo para atingir a barra, como mencionados anteriormente (KRAMER et al., 1998; CHIAVEGATTO

et al., 2000). Neste, a linhagem exibiu um baaixo desempenho nas primeiras semanas de teste. Isto é em parte um efeito de aprendizagem, mas também pode ser devido a diminuição da força que se relaciona com os ciclos de regeneração e degeneração que estão presentes por volta da idade de 4 semanas (VAN-PUTTEN et al., 2010). Essa falta de resistência é evidenciada quando se realiza o teste estatístico, o qual aponta em todas as idades um valor p igual a 0,0016, ao comparar com camundongos controles. Ressalta-se, como aspecto observável, a curva de melhora exibida ao redor dos três meses de vida, período que coincide com a máxima regeneração muscular, cuja ocorrência já descrita se dá ao redor dos 55 dias e continua alternando-se com degeneração em um curso até 12 semanas de idade. Os camundongos *mdx* mostram um declínio em sua capacidade de regeneração em idade avançada (> 65 semanas), enquanto processos de necrose persistem. Uma vez que os processos de degeneração são semelhantes aos observados na patologia humana, as diferenças na regeneração podem ser um dos indícios de recuperação da função muscular adequada (TURK et al., 2005a).

5.1.2 Análise no nado forçado

Neste teste avaliou-se não só a força muscular, mas também outras características tais como percepção espacial, ansiedade e depressão (MEER, 2005). Os camundongos normais iniciam o teste efetuando na maior parte do tempo movimentos de natação, como forma de explorar o ambiente. Posteriormente, passam a flutuar sobre a água cerca a 85 a 90% do tempo, pois com a exposição ao teste, adquirem a capacidade de aprendizagem da ausência de saída no ambiente, não fazendo esforço físico desnecessário.

Animais *mdx* submetidos ao nado exibiram maior cansaço físico no período de 60 a 90 dias que culminaram com sua submersão. Isto pode ocorrer por causa da falta de noção de espaço, que os levam a nadar por um período maior de tempo. Curiosamente, esta mesma fase, ao redor dos três meses de idade, coincide com a máxima regeneração observada na linhagem, mostrando uma melhora no teste da barra. É possível que uma pequena melhora física faça com que tentem nadar mais, e apresentar maior cansaço/fadiga ao realizar tal esforço, o que os levam a submergir na água.

5.1.3 Análise no teste de suspensão pela cauda

Animais da linhagem *mdx* submetidos ao teste realizam maiores movimentos de rotação ao redor do eixo da cauda. Tal movimento pode estar associado à tentativa de escalar sua cauda (como ocorre com os camundongos normais) e posicionar-se sobre a mão 47 pesquisador, como não alcançam esse objetivo permanecem exercendo apenas a flexão lateral, que, após estresse e cansaço físico tendem a permanecer em repouso. Esta exibe também variações significantes em relação aos animais normais quando se observa os movimentos de extensão e flexão dos membros posteriores, flexão lateral (realizados em um grande número pelos camundongos *C57black6*) e repouso.

5.1.4 Análise no teste de força pelo Grip strength

Como nesse teste é possível determinar a força máxima desenvolvida pelos camundongos quando o operador tenta puxá-los para fora da grade, ele permitiu estudar a funções musculares dos mesmos. Assim, animais *mdx* apresentaram uma força menor comparada aos animais normais, porém, o teste estatístico de Mann-Whitney não mostrou significância estatística, o que pode ser devido ao reduzido tamanho da amostra.

Tais resultados confirmam os apresentados por Grounds e colaboradores (2008), os quais evidenciaram força menor tanto nos membros anteriores como nos posteriores, na idade de quatro semanas, quando comparados com os camundongos controles. Já com oito semanas, foi registrado que a força nos membros anteriores permanece inferior, enquanto que os membros posteriores exibem força próxima ao normal. Isto reflete a progressão da fase de necrose muscular aguda em camundongos *mdx* jovens.

5.1.5 Análise no teste de resistência pelo Rota rod

As esteiras *Rota Rod* foram projetadas para medir com precisão a coordenação motora e fadiga dos animais. Dentre os modelos distróficos aqui apresentados, a linhagem *mdx* foi a que exibiu cerca da metade da resistência apresentada pelo controle normal, permanecendo sobre o rotor cilíndrico acelerado gradativamente, com queda ao redor dos 50 segundos após início do teste, período no qual se observou desgaste físico e cansaço. Estatisticamente este tempo não pode ser considerado significativo em relação aos controles normais, porém vale ressaltar que o número de animais utilizado no experimento é pequeno.

5.2 Testes funcionais na linhagem *SJL/J*

5.2.1 Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros

Essa linhagem não exhibe alterações morfológicas quando observados seu livre padrão de caminhada e locomoção em comparação a linhagem normal nos primeiros meses de vida, isto é, até cerca dos quatro meses de vida; a partir dessa idade começa a se observar uma leve fraqueza muscular evidenciada por uma redução da capacidade exploratória e uma ligeira perda de equilíbrio.

Nos testes da barra suspensa, dentre as linhagens em estudos, estes animais são os que exibem resultados mais próximos aos animais normais, sendo capazes de permanecerem fixos a barra mesmo após cerca de 1 minuto e meio. Somente ao redor dos quatro meses de idade é que ocorre uma progressiva redução desse período de tempo em sua performance funcional (RAYAVARAPU et al., 2010).

5.2.2 Análise no nado forçado

A miopatia espontânea que acomete essa linhagem é caracterizada por uma perda progressiva de massa muscular e força correspondente a um aumento da patologia muscular. Embora sua fraqueza possa ser detectada após três semanas de idade (a partir de testes físcos que evidenciem força total), a maior patologia ocorre ao redor dos seis meses de vida.

Nesse teste pôde-se observar que, estes animais após um ligeiro acréscimo no tempo do ato de flutuação, a partir dos três meses de idade, eles passam a submergir na piscina. Tal sinal clínico pode estar associado a alterações cerebrais, uma vez que, este modelo foi também utilizado em estudos de encefalomielite, esclerose múltipla e epilepsia, cabendo assim tentativas de análise futura com evidências de registros encefalográficos para tentar identificar alterações que possam levar os mesmos a submergirem na água ao longo do avanço da idade. Desta forma, este é um bom teste para a avaliação deste modelo.

5.2.3 Análise no teste de suspensão pela cauda

Animais da linhagem *SJL/J*, embora não exibam visivelmente características funcionais de comprometimento muscular, apresentam neste teste um padrão que comprova a sua

fraqueza, que é evidenciada pela flexão dos membros posteriores junto aos anteriores, movimento esse ainda mais freqüente que nos animais da linhagem *Large^{myd}*.

5.3 Testes funcionais na linhagem *Lama2^{dy-2J}/J*

5.3.1 *Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros*

O camundongo *Lama2^{dy-2J}/J* apresenta uma atrofia e enrijecimento evidente dos membros posteriores com a progressão da doença desenvolvendo cifose (curvatura da coluna que promove o seu arqueamento).

Na avaliação dos membros anteriores, os camundongos *Lama2^{dy-2J}/J* conseguem permanecer na barra por uma média de tempo considerável apesar de sua proeminente fraqueza. Isso porque a grande maioria dos animais *Lama2^{dy-2J}/J* exibem um bom senso de equilíbrio, ao se erguer e se posicionar na barra através de apoio e sustentação pelo tórax, permanecendo nesta posição típica por tempos mais longos. Provavelmente esta posição exige menos força muscular para ser mantida, conforme se pode observar na Figura 29.

Figura 29 – Animal *Lama2^{dy-2J}/J* na posição típica de equilíbrio na barra suspensa – patas dianteiras, apoiando o tórax e utilizando a cauda para se equilibrar.

Portanto, este teste não reflete a sua fraqueza e não é recomendado para a avaliação funcional desta linhagem.

No teste de avaliação dos quatro membros, os camundongos *Lama2^{dy-2J}/J* conseguem utilizar a mesma habilidade para se manter seguros na barra. Eles podem realizar um movimento de rotação do corpo, que os coloca na posição descrita para os membros anteriores. Neste caso, permanecem por períodos maiores de tempo seguros na barra (20 a 60

segundos). Se o movimento de rotação não é feito com sucesso, estes animais não conseguem se prender e caem após 1 a 5 segundos.

5.3.2 *Análise no nado forçado*

Estes animais exibem com a progressão da idade aumento do ato de flutuar sobre a água o que pode significar memória, reconhecimento do ambiente e percepção do espaço como observado nos camundongos controles *C57black6*. Pacientes portadores de mutações em *LAMA2* não apresentam comprometimento cognitivo (TOME et al., 1994).

5.3.3 *Análise no teste de suspensão pela cauda*

Animais da linhagem *Lama2^{dy-2J}/J* por exibirem um grande comprometimento e atrofia da musculatura esquelética que leva retração e perda de mobilidade nos membros posteriores, são impossibilitados de realizarem flexão dos mesmos, bem como a união destes aos anteriores. Assim permanecem em repouso na maior parte do tempo de suspensão pela cauda.

5.3.4 *Análise no teste de força pelo Grip strength*

Este estudo mostrou que a força absoluta evidenciada nos membros anteriores e posteriores é inferior quando comparados com controles pareados por idade, embora não possa ser considerada significativa frente ao teste estatístico de Mann-Whitney. Trabalhos demonstram que os camundongos com deficiência de laminina- $\alpha 2$ no músculo esquelético produzem menos força (STEWART; ANTHONY; GEORGIOS, 2004). Esta distrofia é caracterizada por grande infiltração de tecido conjuntivo quando o músculo esquelético se degenera e o aumento de tecido não-contrátil resultara em decréscimo de força.

5.3.5 *Análise no teste de resistência pelo Rota rod*

Neste teste de resistência, a fraqueza desta linhagem é evidentemente observada. Muitos não conseguiram se posicionar sobre o rotor, demonstrando já uma perda de equilíbrio e estresse e, quando o mesmo é acionado rapidamente eles são levados a queda. Contudo, assim como no teste de força pelo *grip strength*, o teste estatístico não mostra que a variação dos

valores seja significativa quando comparada aos animais controles, isto é justificável pelo número amostral ser pequeno (apenas três animais).

5.4 Testes funcionais na linhagem *Large^{myd}*

5.4.1 Análise na locomoção, caminhada em plataforma suspensa e de resistência nos membros anteriores e quatro membros

O camundongo *Large^{myd}* apresenta uma fraqueza generalizada, abrangendo as quatro patas, o rabo e musculatura da coluna vertebral, desenvolvendo escoliose. Além disso, o diafragma aparece mais severamente afetado pelo processo distrófico que os membros, já nos animais jovens, a partir de 3 semanas de idade (HOLZFEIND et al., 2002).

No teste de caminhada sobre plataforma suspensa, esta linhagem exibiu uma perda de equilíbrio significativa com o avanço da idade, levando muito dos animais à queda. Isto pode ser resultante do crescente comprometimento da musculatura esquelética, associado a alterações neurológicas.

Estes animais, apesar de não perderem o movimento de membros dianteiros nem traseiros, se mantêm seguros na barra por tempos bem reduzidos comparados aos demais modelos distróficos. Isto pode sugerir que essa linhagem não possui a mesma agilidade e capacidade de utilização de outros músculos do corpo para tal; e, praticamente não conseguem se fixar na barra utilizando as quatro patas. Na maior parte das vezes os animais caem imediatamente ao serem colocados na posição ou raramente permanecem na barra por mais que 10 segundos.

Vale-se ressaltar que o fenótipo dessa linhagem não é restrito apenas a distrofia muscular, mas também inclui defeitos oftalmológicos e do sistema nervoso central (HOLZFEIND et al., 2002). No manejo desta linhagem, nos de fato observamos que a partir dos seis meses de idade, os animais desenvolvem uma película gelatinosa ao redor do globo ocular, que mesmo após assepsia, forma-se novamente rapidamente, como é possível se observar na Figura 30.

Figura 30 – Animal *Large^{myd}* com aproximadamente sete meses de idade, exibindo uma película translúcida ao redor do globo ocular.

5.4.2 *Análise no nado forçado*

Estes apresentaram baixa percepção espacial, uma vez que permaneceram a maior parte do período nadando. A baixa percepção espacial pode estar relacionada com a presença de alterações neurológicas no camundongo *Large^{myd}*, pois diversas alterações cerebrais e retardo mental são encontradas em pacientes humanos com doenças neuromusculares associadas a defeitos de glicosilação (MUNTONI et al., 2002b). Tem sido também relatado que esses animais exibem deficiência neurosensorial (auditiva e visual) e defeitos na mielinização da raiz dos nervos da coluna vertebral; tais manifestações clínicas refletem as características já observadas na literatura (HOLZFEIND et al., 2002).

5.4.3 *Análise no teste de suspensão pela cauda*

Animais dessa linhagem exibem uma fraqueza generalizada que se agrava com o avanço da idade. Essa evolução da patologia é caracterizada por necrose das fibras musculares e regeneração, proliferação endomisial de tecido conjuntivo e adiposo (HOLZFEIND et al., 2002). Dessa forma, um dos movimentos típicos efetuado pela mesma é o encolhimento do corpo, fazendo com que os membros posteriores aproximem-se dos anteriores e o de rotação ao redor do eixo da cauda. Neste teste é possível observar significância para o número de posições realizadas que difere em comparação aos animais normais

5.4.4 *Análise no teste de força pelo Grip strength*

Camundongos *Large^{myd}* apresentam força absoluta menor, aproximadamente metade da apresentada pelos animais normais, no entanto quando se faz a análise estatística para valores

de significância, esta não exibe variações consideráveis, justificável pelo reduzido número de animais.

5.4.5 Análise no teste de resistência pelo Rota rod

Ao se analisar diretamente medida de resistência nessa linhagem, foi possível observar que a mesma apresenta um valor reduzido quando comparada ao controle normal; os animais posicionam-se sobre o cilindro móvel, permanecem sobre ele, mas quando o mesmo inicia movimento de rotação eles são conduzidos a queda. Devido ao número pequeno de animais utilizados no teste ao se aplicar análise esta não se mostra significativa em nenhuma das comparações realizadas.

6 CONCLUSÕES

De modo geral, os testes utilizados apresentaram diferenças evidentes entre as linhagens estudadas, o que reflete os diferentes mecanismos patofisiológicos envolvidos.

Ao longo do tempo de estudo, foi possível traçar a história natural dos modelos animais estudados, bem como acompanhar a crescente acentuação de suas fraquezas e comprometimentos musculares; visualizar aspectos clínicos que apenas puderam ser observados em idade muito avançada.

O teste de resistência por fixação na barra foi informativo para as linhagens *mdx*, e *Large^{myd}*, uma vez que serviu como base para demonstrar e comprovar os graus variáveis de resistência e coordenação desses quando presos a uma fina barra, por verificar a agilidade de posicionamento e tempo de fixação.

O teste de suspensão pela cauda auxiliou a verificar fraqueza nas linhagens *SJL/J*, *Lama2^{dy-2J}/J* e *Large^{my,d}*, por evidenciar o encolhimento dos membros posteriores à região ventral, quando comparado com a mobilidade e presteza de movimentos dos animais *C57black6*.

O teste do nado forçado permitiu uma avaliação diferencial das linhagens *SJL/J* e *mdx*, por demonstrar a debilidade em exercer esforço físico, levando-os a submersão.

Verificou-se também que as avaliações através de equipamentos específicos tais como o *Grip strength* e do *Rota rod* que avaliam a força máxima e a manutenção do equilíbrio, coordenação motora e condicionamento físico respectivamente, produziram resultados paramétricos mais precisos.

Através dos testes utilizados, comprovou-se a existência de diferentes padrões de força, resistência, coordenação motora e aprendizagem/memória ao longo do tempo de vida de cada linhagem. Portanto, estes testes funcionais foram de suma importância para traçar linhas de pesquisas que visem analisar terapias celulares e farmacológicas por implantar os mesmos como auxílio na busca de resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS*

- ALDERTON, J. M. E.; STEINHARDT, R. A. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 10, p. 268-272, 2000.
- ANDERSON, K. D.; MARIM, A.; STEWARD, O. Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. **Experimental Neurology**, v. 190, p. 184-191, 2004.
- BANSAL, D.; CAMPBELL, K. P. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular. **Trends Cell Biol.**, v. 14, p. 206-213, 2004.
- BARRESI, R.; MICHELE, D. E.; KANAGAWA, M.; HARPER, H. A.; DOVICO, S. A.; SATZ, J. S.; MOORE, S. A.; ZHANG, W.; SCHACHTER, H.; DUMANSK, J. P. LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defect in distinct congenital muscular dystrophy. **Nat. Med.**, v. 10, p. 696-703, 2004.
- BECKMANN, J. S.; BROWN, H.; MUNTONI, F.; URTIZBEREA, A. BONNEMANN, C.; BUSHBY, K. M. D. 66th 67th ENMC sponsored international workshop: the limb-girdle muscular dystrophies. **Neuromuscul. Disord.**, v. 9, p. 436-445, 1999.
- BLANCO, J. E.; ANDERSON, K. D.; STEWARD, O. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, p. 333-348, 2007.
- BITTNER, R. E.; ANDERSON, V. B.; BURKHARD, E.; BASHIR, R.; VAFIADAKI, E.; IVANOVA, S.; RAFFELSBERG, T.; MAERK, I.; HOGER, H.; JUNG, M.; KARBASIYAN, M.; STORCH, M.; LASSMANN, H.; MASS, J.A.; DAVISON, K.; HARRISON, R.; BUSHBY, K. M. D.; REIS, A. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. **Nature Genetics**, v. 23, p. 141-142, 1999.
- BROCKINGTON M, YUVA Y, PRANDINI P, BROWN S. C, TORELLI S, BENSON M. A, HERRMANN R, ANDERSON L. V, BASHIR R, BURGUNDER J. M, FALLET S, ROMERO N, FARDEAU M, STRAUB V, STOREY G, POLLITT C, RICHARD I, SEWRY C. A, BUSHBY K, VOIT T, BLAKE D. J, MUNTONI F. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. **Hum. Mol. Genet.**, v. 25, p. 2851-2859, 2001.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROWNING, C. A.; GREWAL, P. K.; MOORE, C. J.; HEWITT, J. E. A rapid PCR method for genotyping the Large^{myd} mouse, a model of glycosylation – deficient congenital muscular dystrophy. **Neuromuscul. Disord.**, v. 15, p. 331-335, 2005.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A.; MOORE, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 1189-1192, 1984.

BUSHBY, K. M. D.; BAKKER, E.; BECKMANN, J.; BEN, H. M.; CHAMBERLAIN, J.; CLARKE, A.; DUBOWITZ, V.; EMERY, A.; FARDEAU, M.; GARDNER-MEDWIN, D.; GRIMM, T.; HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, I.; JACKSON, C.; JACOBSEN, J.; KAPLAN, J. C.; KRESS, W.; MAHJNEH, I.; MARCONI, G.; MARTIN, J.; MECHLER, F.; NASHEF, L.; NICHOLSON, L.; PASSOS-BUENO, M. R.; SOMER, H.; SPEER, M.; STROMME P.; SUTHERS, G.; TOMÉ, F.; UDD, B.; VAN OMMEN, G. J.; VIOT, T.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; ZAT, M. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophy: report of the ENMC consortium on lib-girdle dystrophies. **Neuromuscul. Disord.**, v. 5, p. 71-74, 1995a.

BUSHBY, K. M. D.; BECKMANN, J. S. The limb-girdle muscular dystrophies – proposal for a new nomenclature. **Neuromuscul. Disord.**, v. 5, p. 337-343, 1995b.

BUSHBY, K. M. D. Towards the classification of the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. **Neuromuscul. Disord.**, v. 6, p. 439-441, 1996.

CHIAVEGATTO, S.; SUN, J.; NELSON, R. J.; SCHNAAR, R. L. A Functional Role for Complex Gangliosides: Motor Deficits in GM2/GD2 Synthase Knockout Mice. **Experimental Neurology**, v. 166, p. 227-234, 2000.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 23, p. 1456-1471, 2000.

COSTA, A. C.; WALSH, K.; DAVISSON, M. T. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. **Physiol. Behav.**, v. 68, p. 211-220, 1999.

DAVIS, D. B.; DELMONTE, A. J.; LY, C. T.; MC-NALLY, E. M. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. **Hum. Mol. Gen.**, v. 9, p. 217-226, 2000.

DUBOWITZ, V.; FADEAU, M. Workshop report: twenty-seventh ENMC-sponsored workshop on congenital muscular dystrophy, 1994, The Netherlands. **Neuromusc. Disord.**, v. 5, p. 253-258, 1995.

DUBOWITZ, V.; SEWRY, C. A. **Muscle biopsy: a practical approach**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. P. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, p. 349-361, 2002.

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

EMERY, A. E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – A world survey. **Neuromuscul. Disord.**, v. 1, p. 343-349, 2002b.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. Membrane organization of dystrophin-glycoprotein complex. **Cell**, v. 66, p. 1121-1131, 1991a.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J. Cell. Biol.**, v. 122, p. 809-823, 1993b.

GARDNER-MEDWIN, D. Mutation rate in Duchenne type of muscular dystrophy. **J. Med. Genet.**, v. 7, p. 334, 1968.

GREWAL, P. K.; HEWITT, J. E. Mutation of Large, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy. **Biochim. Biophys Acta**, v. 3, p. 216-224, 2002.

GREWAL, P. K.; HEWITT, J. E. Glycosylation defects: A new mechanism for muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 259-264, 2003.

GROUND, M. D.; RADLEY, H. G.; LYNCH, G. S.; NAGARAJU, K.; DE LUCA, A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol. Dis.**, v. 31, p. 1-19, 2008.

GUO, L. T.; ZHANG, X. U.; KUANG, W.; XU, H.; LIU, L. A.; VILQUIN, T. J.; MYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; RUEGG, M. A.; WEWER, U. M.; ENGVALL, E. Laminin alpha 2 deficiency and muscular dystrophy: genotype-phenotype correlation in mutant mice. **Neuromuscul. Disord.**, v. 13, p. 207-215, 2002.

HERTOGH, C.; CHAVET, P.; GAVIRIA, M.; BERNARD, P.; MELIN, B.; JIMENEZ, C. Méthodes de Mesure et Valeurs de Référence de la Puissance Maximale Développée lors D'Efforts Explosifs. **Cinesiologie**, v. 157, p. 133-140, 1994.

HOFFMAN, E. P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 465-470, 2001.

HOLZFEIND, P. J.; GREWAL, P. K.; REITSAMER, H. A.; KECHVAR, J.; LASSMANN, H.; HOEGER, H.; HEWITT, J. E.; BITTNER, R.E. Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large(myd) mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. **Hum. Mol. Genet.**, v. 11, p. 2673-2687, 2002.

JACSON LABORATORIES DATABASE. Disponível em: <<http://www.jax.org/index.html>>. Acesso em: 19 fev. 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KRÄMER, R.; LOCHMÜLLER, H.; ABICHT, A.; RÜDEL, R.; BRINKMEIER, H. Myotonic ADR-MDX mutant mice show less severe muscular dystrophy than MDX mice. **Neuromuscul. Disord.**, v. 8, p. 542-550, 1998.

LI, ZHI-FANG; WU, X.; JIANG, Y.; LIU, J.; WU, C.; INAGAKI, M.; IZAWA, I.; MIZISIN, A. P.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. **Neurological Science**, v. 264, p. 77-86, 2008.

LONGMAN, C.; BROCKINGTON, M.; TORELLI, S.; JIMENEZ-MALLEBRERA, C.; KENNEDY, C.; KHALIL, N.; FENG, L.; SARAN, R. K.; VOIT, T.; MERLINI, L.; SEWRY, C. A.; BROWN, S. C.; MUNTONI, F. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 2853-5861, 2003.

MECHAN, A. O.; WYSS, A.; RIEGER, H.; MOHAJERI, M. H. A comparison of learning and memory characteristics of young and middle-aged wild-type mice in the IntelliCage. **J. Neurosci. Methods**, v. 180, p. 43-51, 2009.

MEER, P. T.; RABER, J. Mouse behavioural analysis in systems biology. **Biochemistry Journal**, v. 389, p. 593-610, 2005.

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

MERCURI, E.; CINI, C.; PICCHIECCHIO, A.; ALLSOP, J.; COUNSELL, S.; ZOLKIPLI Z; MESSINA, S.; KINALI, M.; BROWN, S. C.; JIMENEZ, C.; BROCKINGTON, M.; YUVA, Y.; SEWRY, C. A.; MUNTONI, F. Muscle magnetic resonance imaging in patients with congenital muscular dystrophy and Ullrich phenotype. **Neuromuscul. Disord.**, v. 13, p. 554-558, 2003.

MERCURI, E.; TOPALOGLU, H.; BROCKINGTON, M.; BERARDINELLI, A.; PICCHIECCHIO, A.; SANTORELLI, F.; RUTHERFORD, M.; TALIM, B.; RICCI, E.; VOIT, T.; MUNTONI, F. Spectrum of brain changes in patients with congenital muscular dystrophy and FKRP gene mutations. **Arch. Neurol.**, v. 63, p. 251-257, 2006.

MUNTONI, F.; BROWN, S.; SEWRY, C; PATEL, K. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. **Neuro. Dis.**, v. 12, p. 438-446, 2002a.

MUNTONI, F.; BROCKINGTON, M.; BLAKE, D. J.; TORELLI, S.; BROWN, S. C. Defective glycosylation in muscular dystrophy. **Lancet**, v. 360, p. 1419-1421, 2002b.

MUNTONI, F.; VOIT, T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. **Neuromuscul. Disord.**, v. 10, p. 635-649, 2004.

NAWROTZKI, R.; BLAKE, D. J.; DAVIES, K. E. The genetic basis of the neuromuscular disorders. **TIG**, v. 12, p. 294-298, 1996.

PAGE, D. L.; GLENNER, G. G. Social interaction and wounding in the genesis of "spontaneous" murine amyloidosis. **Am. J. Pathol.**, v. 67, p. 555-67, 1972.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J. Neurol. Sci.**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PORSOLT, R. D.; BROSSARD, G.; HAUTOBOIS, C.; ROUX, S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr. Protoc. Neurosci.**, v. 8, p. 10-14, 2001.

RAYAVARAPU, S.; VAN DER MEULEN, J. H.; GORDISH-DRESSMAN, H.; HOFFMAN, E. P.; NAGARAJU, K.; KNOBLACH, S. M. Characterization of Dysferlin Deficient *SJL/J* Mice to Assess Preclinical Drug Efficacy: Fasudil Exacerbates Muscle Disease Phenotype. **Plosone**, v. 5, p. 1-10, 2010.

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

SERRADJ, N.; JAMON, M. Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j. **Behavioural brain research**, v. 177, p. 80-89, 2007.

SEWRY, C. A.; TAYLOR, J.; ANDERSON, L. V.; OZAWA, E.; POGUE, R.; PICCOLO, F.; BUSHBY, K.; DUBOWITZ, V.; MUNTONI, F. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. **Neuromuscul. Disord.**, v. 6, p. 467-474, 1996.

SPURNEY, C. F.; GORDISH-DRESSMAN, H.; GUERRON, A. D.; SALI, A.; PANDEY, G. S.; RAWAT, R.; VAN DER MEULEN, J. H.; CHA, H. J.; PISTILLI, E. E.; PARTRIDGE, T. A.; HOFFMAN, E. P.; NAGARAJU, K. Preclinical drug trials in the *mdx* mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. **Muscle Nerve**, v. 39, p. 591-602, 2009.

STEVENS E. D.; FAULKNER J. A. The capacity of *mdx* mouse diaphragm muscle to do oscillatory work. **J. Physiol.**, v. 1, p. 457-466, 2000.

STEWART, I. H.; ANTHONY, J. B.; GEORGIOS, L. EDL and soleus muscles of the C57BL6J/*dy*^{2j} laminin- α_2 -deficient dystrophic mouse are not vulnerable to eccentric contractions. **Experimental Physiology**, v. 89, p. 531-539, 2004.

STRAUB, V.; RAFAEL, J. A.; CHAMBERLAIN, J. S.; CAMPBELL, K. P. Animal Models for Muscular Dystrophy Show Different Patterns of Sarcolemmal Disruption. **J. Cell. Biol.**, v. 139, p. 3758-385, 1997.

SUNADA, Y.; BERNIER, S. M.; UTANI, A.; YAMADA, Y.; CAMPBELL, K. P. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in *dy*^{2j} mice. **Hum. Mol. Genet.**, v. 4, p. 1055-1061, 1995.

TOMÉ, F. M.; EVANGELISTA, T.; LECLERC, A.; SUNADA, Y.; MANOLE, E.; ESTOURNET, B.; BAROIS, A.; CAMPBELL, K. P.; FARDEAU, M. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 4, p. 351-3577, 1994.

TURK, R.; STERRENBURG, E.; MEIJER, E. J.; VAN-OMMEN, G. J. B.; DENDUNNEN, J. T.; HOEN, P. A. C. Muscle regeneration in dystrophin-deficient *mdx* studied by gene expression profiling. **BMC Genomics**, v. 6, p. 1-15, 2005a.

TURK, R.; STERRENBURG, E.; VAN DE WEES, C. G. C.; MEIJER, E. J.; MENESES, R. X.; GROH, S.; CAMPBELL, K. P.; NOGUCHI, S.; VAN OMMEN, G. J. B.; DEN DUNNEN, J. T.; HOEN, P. A. C'T. Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. **FASEB**, v. 20, p. 127-129, 2005b.

VAN-MEER, P.; RABER, J. Mouse behavioural analysis in systems biology. **Biochemistry Journal**, v. 389, p. 593-610, 2005.

VAN-PUTTEN, M.; WINTER, C.; ROON-MOM, W.; VAN-OMMEN, G. J.; HOEN, P. A. C.; AARTSMA-RUS, A. A 3 months mild functional test regime does not affect disease parameters in young *mdx* mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, p. 273-280, 2010.

VAINZOF, M.; ZUBRZYCKA-GAARN, E. E.; RAPAPORT, D.; PASSOS-BUENO, M. R.; PAVANELLO, R. C.; PAVANELLO-FILHO I.; ZATZ, M. Immunofluorescence dystrophin study in Duchenne dystrophy through the concomitant use of two antibodies directed against the carboxy-terminal and the amino-terminal region of the protein. **J. Neurol. Sci.**, v. 101, p. 141-147, 1991.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 543-553, 2003.

VAN DAMME, P.; LEYSSEN, M.; CALLEWAERT, G.; ROBBERECHT, W.; VAN DEN BOSCH, L. The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci. Lett.**, v. 343, p. 81-84, 2003.

VERMEIL, A.; HELLAND, E. La metodologia corretta. **Coaching and Sport Science Journal**, v. 2, p. 49-55, 1997.

VETRONE, S. A.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; KUDRYASHOVA, E.; KRAMEROVA, I.; HOFFMAN, E. P.; LIU, S. D.; MICELI, M. C.; SPENCER, M. J. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. **J. Clin. Invest.**, v. 6, p. 1583-1594, 2009.

VILQUIN, J. T.; GUÉRETTE, B.; PUYMIRAT, J.; YAFFE, D.; TOMÉ, F. M.; FARDEAU, M.; FISZMAN, M.; SCHWARTZ, K.; TREMBLAY, J. P. Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. **Nature**, v. 5, p. 792-800, 1999.

VILQUIN, J. T.; VIGNIER, N.; TREMBLAY, J. P.; ENGVALL, E.; SCHWARTZ, K. FISZMAN, M. Identification of homozygous and heterozygous dy2J mice by PCR. **Neuromuscular disorders**, v. 10, p. 59-62, 2000.

WELLER, A. H.; MAGLIATO, S. A.; BELL, K. P.; ROSENBERG, N. L. Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss. **Muscle Nerve**, v. 20, p. 72-82, 1997.

WHITTEMORE, L. A.; SONG, K.; LI, X.; AGHAJANIAN, J.; DAVIES, M.; GIRGENRATH, S.; HILL, J. J.; JALENAK, M.; KELLEY, P.; KNIGHT, A.; MAYLOR, R.; O'HARA, D.; PEARSON, A.; QUAZI, A.; RYERSON, S.; TAN, X. Y.; TOMKINSON, K. N.; VELDMAN, G. M.; WIDOM, A.; WRIGHT, J. F.; WUDYKA, S.; ZHAO, L.; WOLFMAN, N. M. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 4, p. 965-971, 2003.

XU, H.; WU, X. R.; WEWER, U. M.; ENGVALL, E. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. **Nat. Genet.**, v. 8, p. 297-302, 1994.

ZANOTTI, S.; SAREDI, S.; RUGGIERI, A.; FABBRI, M.; BLASEVICH, F.; ROMAGGI, S.; MORANDI, L.; MORA, M. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. **Matrix Biol.** v. 26, p. 615-624, 2007.

ZATZ, M. Distrofias Musculares Progressivas. In: Carakushansky, G. **Doenças genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 245-260.