

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**LESÕES DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO E DA JUNÇÃO
MÚSCULO TENDÍNEA EM CÃES AFETADOS PELA DISTROFIA
MUSCULAR PROGRESSIVA**

Daniel Côrtes Beretta
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**LESÕES DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO E DA JUNÇÃO
MÚSCULO TENDÍNEA EM CÃES AFETADOS PELA DISTROFIA
MUSCULAR PROGRESSIVA**

Daniel Côrtes Beretta

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANIEL CÔRTEZ BERETTA – Filho de Carlos Alberto Beretta e Maria Esther Aun Côrtes, nasceu em 26 de setembro de 1978, em Jaboticabal, São Paulo, onde cursou ensino fundamental e médio, concluído em dezembro de 1996. Em 1997 após aprovação no vestibular, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, onde se graduou Médico Veterinário em julho de 2003. No ano de 2004, após seleção, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica e Cirurgia Animal, da Universidade Federal de Uberlândia sob orientação do Prof. Dr. Duvaldo Eurides. Obteve o título de Mestre em janeiro de 2006. No período de janeiro a dezembro do ano de 2004 foi professor colaborador da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia nas disciplinas de Técnica Operatória e Prática Anestésica. Realizou estágio de aperfeiçoamento de 8 meses em Patologia Animal no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp-Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes. No ano seguinte, em março de 2007, após seleção, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na mesma IES, e sob a mesma orientação. Obteve o título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal em fevereiro de 2011.

DEDICO

A Deus Pai que me orientou, iluminou e deu forças para que prosseguisse a cada dia na busca daquilo que amo.

A minha amada mãe pela sua intensa dedicação, constante oração e imenso amor.

A minha amada irmã, fiel amiga, pelo amor, apoio, encorajamento e conselhos constantes.

Ao meu pai pela confiança e incentivo.

Agradeço:

Agradeço a Deus pelo primeiro sopro de vida que me deu;
Agradeço a Deus por ter nascido em um lar onde há amor, paz, carinho e muita fé;
Agradeço a Deus pelos incansáveis exemplos de luta dados por minha mãe;
Agradeço a Deus pelas dificuldades, pois forjaram a paciência;
Agradeço a Deus pela fartura, enquanto muitos estão na miséria;
Agradeço a Deus pelas amizades, que são os verdadeiros tesouros de nossas vidas;
Agradeço a Deus pelo seu silêncio, para que falasse mais alto a fé de meu coração;
Agradeço a Deus pelos suaves conselhos e pela constante providência;
E finalmente, agradeço a Deus por mais uma etapa concluída em minha vida.

“One day at a time sweet Jesus
That's all I'm asking from you
Just give me the strength
To do everyday what I have to do
Yesterdays gone sweet Jesus
And tomorrow may never be mine
Lord help me today, show me the way
One day at a time”...
(Cristy Lane)

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes, pela amizade, apoio, encorajamento, dedicação, ajuda e ensinamentos.

A Sra. Edna Pupin presidente da Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular - AADM, Ribeirão Preto – SP, pelo material cedido a essa pesquisa e pela sua incansável busca na melhoria de vida de pacientes com Distrofia Muscular.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, consideração e confiança depositada através da bolsa de doutorado 07/58359-3 e auxílio pesquisa 07/58360-1.

A minha querida e amada namorada Camila pela ajuda, incentivo, conselhos e amor que trouxeram paz ao meu coração.

Ao querido amigo Eduardo Garrido pela constante presença, ajuda e grande cumplicidade.

A minha amiga e companheira de pesquisas Lígia Gomes Miyazato, pela amizade e ajuda.

Ao grande amigo sempre presente, Dr. Luiz Augusto Ruas Fernandes, por seu exemplo profissional.

Aos professores Danísio Prado Munari e Rosemeire O. Vasconcelos, pela grande amizade e constate ajuda.

Aos Professores Doutores Áureo Evangelista, Alessandre Hataka, Márcia Rita e Mirela Tinucci pelas excelentes correções e sugestões.

Aos dedicados e sempre queridos amigos, Mau, Ge, Déia, Ana, Re, Passarinho, Jozelita, Gabi, Márcio, Pan, Mari, Fer, Elaine, Carol, Anselmo, Zan, Ju, Tati, Fabi Bozzo, Jesus e Ana Sevarolli, que estiveram presentes durante a realização desse projeto.

Aos técnicos do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV, Mabel Aparecida Mastro Custodio, Marcos Tadeu Christoforo, Edgard Homem, Ronaldo Delvecchio, Narcizo Batista Tel, Francisca de Assis Adirson, Maria Ines Yamazaki de Campos, Moema Ogassawara, pelo acolhimento e grande auxílio durante o doutorado.

Aos animais que deram a vida por esse experimento.

Aos demais professores, colegas, funcionários e acadêmicos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros reconhecimentos e agradecimentos.

E ao meu estimado cão Max (*in memoriun*), amigo fiel e companheiro constante.

SUMÁRIO

| | Página |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | II |
| LISTA DE TABELAS..... | III |
| LISTA DE FIGURAS..... | IV |
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 8 |
| Participação de células imunes na patogenia das distrofinopatias..... | 11 |
| Vimentina no músculo distrófico..... | 13 |
| Objetivo..... | 14 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 14 |
| 2.1 Animais e colheita das amostras..... | 14 |
| 2.2 Histopatologia..... | 16 |
| 2.3 Enzimo-histoquímica e histomorfometria..... | 16 |
| 2.4 Imuno-histoquímica..... | 17 |
| 3. RESULTADOS..... | 19 |
| 3.1 Histopatologia..... | 19 |
| 3.2 Enzimo-histoquímica e histomorfometria..... | 23 |
| 3.3 Imuno-histoquímica..... | 26 |
| 3.3.1 Imunomarcção da Utrofina..... | 26 |
| 3.3.2 Imunomarcção de células CD4 e CD8..... | 28 |
| 3.3.3 Imunomarcção dos antígenos MHCI e MHCII..... | 28 |
| 3.3.4 Imunomarcção da Vimentina..... | 31 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 34 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 38 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ARS – Alizarina Red S
CK – Creatinaquinase
CD4 – Linfócito T expressando CD4
CD8 – Linfócito T expressando CD8
DMD – Distrofia Muscular de Duchenne
DMGR – Distrofia Muscular do Golden Retriever
EP – Erro padrão
FTI – Fibras musculares do tipo I
FTII - Fibras musculares do tipo II
HE - Hematoxilina-eosina
JMT – Junção músculo tendínea
LTC – Linfócito T citotóxico
mATPase - Miosina adenosina trifosfatase
MDX - X-linked muscular dystrophic
MG – Músculo gastrocnêmio
MHC – Complexo de histocompatibilidade maior
MHCI – Complexo de histocompatibilidade maior classe I
MHCII – Complexo de histocompatibilidade maior classe II
PBS – Tampão salina fosfato
PS – Picrosirius
TBST – Tampão tris salina tween 20
TGM – Tricrômio de Gomori modificado
Th1 – Células T auxiliares 1
Th2 - Células T auxiliares 2
TNF α – Fator de necrose tumoral

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabela 01. Identificação, idade e causa do óbito de cães afetados por distrofia muscular– Jaboticabal – SP – 2010..... | 15 |
| Tabela 02. Especificações dos anticorpos primários..... | 17 |
| Tabela 03. Porcentagem nos graus de lesões no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... | 19 |
| Tabela 04. Média e erro padrão do número de células CD4 e CD8 por 0,0052 mm ² no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... | 28 |
| Tabela 05. Escore médio, mínimo e máximo da imunexpressão do antígeno MHC I no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... | 28 |
| Tabela 06. Escore médio, mínimo e máximo da imunexpressão do antígeno MHC II no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... | 31 |
| Tabela 07. Escore médio, mínimo e máximo da imunexpressão da vimentina no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... | 31 |

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 01.** Lesões no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Miofibras com variações no diâmetro (setas), fibra necrótica (*), fibrose perimisial (FP), fibra hialinizada (H), HE. **B.** Calcificação da miofibras (setas), ARS. **C.** Fibras “ragged-red” (setas), fibrose perimisial (FP), TGM. Bar 10µm..... 20
- Figura 02.** Representação gráfica da porcentagem de fibras ARS positivas e negativas no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... 21
- Figura 03.** Reação de picrossirius sob luz polarizada. Corte longitudinal da junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Fibras colágenas organizadas e paralelas, interdigitações musculares entremeadas por colágeno (setas). Bar 5µm..... 22
- Figura 04.** Reação enzimo-histoquímica mATPase (pH 9,4) no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Músculo gastrocnêmio: grupamento de FTII (seta). **B.** Junção músculo tendínea: grupamento de FTI (seta). Bar 10µm..... 24
- Figura 05.** Representação gráfica da porcentagem de FTI e FTII no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... 25
- Figura 06.** Representação gráfica dos valores médios da área e do diâmetro mínimo em micrômetros de FTI e FTII no músculo gastrocnêmio de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... 25
- Figura 07.** Representação gráfica dos valores médios da área e do diâmetro mínimo em micrômetros de FTI e FTII na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010..... 26

- Figura 08.** Reação de imuno-histoquímica para utrofina. Miofibras atrofiadas. **A.** Junção músculo tendínea de controle: vaso sanguíneo (<), fraca imunoexpressão de utrofina no sarcolema (seta). **B.** Junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular: vaso sanguíneo (<), intensa imunoexpressão de utrofina no sarcolema. **C.** Músculo gastrocnêmio de cães afetados por distrofia muscular: fibras em regeneração (*); intensa imunoexpressão de utrofina no sarcolema. Bar 20µm..... 27
- Figura 09.** Reação imuno-histoquímica para células T no músculo gastrocnêmio de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Imunoexpressão de CD8 (setas). **B.** Imunoexpressão de CD4 (setas). Bar 5µm..... 29
- Figura 10.** Reação imuno-histoquímica para MHCI no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular, imunoexpressão no sarcolema (setas) e vasos sangüíneos (<). **A.** Músculo gastrocnêmio: imunomarcacão moderada. **B.** Junção músculo tendínea: imunomarcacão fraca. Bar 10µm..... 30
- Figura 11.** Reação imuno-histoquímica para MHCII no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Músculo gastrocnêmio: imunoexpressão em infiltrado mononuclear (setas). Bar 10µm. **B.** Junção músculo tendínea: imunoexpressão no sarcolema (seta) e em fibras necróticas (<). Bar 5µm..... 32
- Figura 12.** Reação imuno-histoquímica para vimentina no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Junção músculo tendínea: imunoexpressão em área de necrose (seta). Bar 10µm. **B.** Músculo gastrocnêmio: imunoexpressão em miofibras em regeneração (setas) e em vasos sanguíneos (<), Bar 5µm..... 33

LESÕES DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO E DA JUNÇÃO MÚSCULO TENDÍNEA EM CÃES AFETADOS PELA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

RESUMO - A Distrofia Muscular no Golden Retriever (DMGR) é doença muscular degenerativa hereditária que representa excelente modelo para o estudo da Distrofia Muscular de Duchene de humanos. Esta pesquisa objetivou estudar as lesões do músculo gastrocnêmio (MG) e da junção músculo tendínea (JMT), na ausência de distrofina em cães afetados por distrofia muscular. Foram utilizados seis cães distróficos para distrofia muscular e três cães controle que vieram a óbito por causas variadas que não afetavam o sistema músculo esquelético. Após necrópsia completa, setenta e cinco fragmentos musculares do MG e da JMT foram colhidos em duplicata. Metade destes foi fixada em solução de formol e o restante foi congelado em nitrogênio líquido. Seguiram-se as técnicas usuais para inclusão em parafina e coloração pelo método Picrosirius, HE e TGM para análise histopatológica. Reações imuno-histoquímicas para MHCII e vimentina foram realizadas nos cortes em parafina. Os fragmentos congelados foram processados para colorações especiais para cálcio, alizarina Red S; reações enzimo-histoquímicas de fibras do tipo I (FTI) e II (FTII), mATPase (pH 9,4); e imuno-histoquímicas para CD4, CD8, MHCI e utrofina. Resultados da análise histopatológica mostraram que as lesões no MG de distróficos foram mais pronunciadas que na JMT. A análise histomorfométrica no MG de distróficos revelou maior porcentagem de FTII e menores valores de diâmetro mínimo e área para FTI e FTII. Para os parâmetros supracitados, as FTII na JMT mantiveram-se morfológicamente iguais ao controle. Não houve diferença quanto ao tipo de colágeno na JMT de distróficos e controle. Nas reações imuno-histoquímica para os anticorpos CD4, CD8, MHCI, MHCII, vimentina e utrofina, somente o antígeno MHCI apresentou diferença significativa ($p < 0.07$), quando comparado ao controle, sendo a imunoexpressão mais intensa no MG de distróficos. Destes resultados concluiu-se que a preservação morfológica da JMT pode ter relação direta com a melhor estabilização de FTII; menor expressão do complexo MHCI, e menor ação citotóxica de CD8.

Palavras-chave: cão, distrofia muscular, Golden Retriever, imuno-histoquímica, músculo gastrocnêmio, junção músculo tendínea.

LESIONS IN GASTROCNEMIUS MUSCLE AND MYOTENDINOUS JUNCTION IN DOGS AFFECTED BY PROGRESSIVE MUSCULAR DYSTROPHY

ABSTRACT – The Muscular Dystrophy in Golden Retrievers (DMGR) is a hereditary degenerative muscle disease that represents an excellent model for the study of Duchenne Muscular Dystrophy. The aim of this study was to characterize the lesions in gastrocnemius muscle (GM) and myotendinous junction (MTJ) in absence of dystrophin in dogs affected by progressive muscular dystrophy. Six affected dogs and three control dogs, without musculoskeletal system diseases, were used. After necropsy, seventy-five myotendinous and muscle samples were cut and collected in duplicate. Half of them were fixed in formalin solution, and the other half were frozen in liquid nitrogen. After that, the samples were processed by usual techniques of paraffin embedding and stained by Picrosirius method, HE and TGM, for histopathological analysis. Immunohistochemical reactions for MHCII and vimentin were performed in paraffin samples. The frozen fragments were processed for special stains for calcium, Alizarin Red S, enzymohistochemical reactions of type I fibers (FTI) and II (FTII), mATPase (pH 9.4), and immunohistochemical for CD4, CD8, MHCI and utrophin. The results of histopathological analysis of the dystrophic dogs showed that the lesions in GM were more pronounced than MTJ. Histomorphometric analysis of the dystrophic GM showed the highest percentage of FTII, and lower values of minimum diameter and area for FTI and FTII. For the same parameters, the FTII in dystrophic MTJ remained morphologically similar to control. There was no difference in the type of collagen in MTJ of dystrophic and control. In immunohistochemical reactions to antibodies CD4, CD8, MHCI, MHCII, vimentin and utrophin, only the antigen MHCI showed a significant statistic difference ($p < 0.07$) compared to control, being the most intense immunostaining in GM dystrophic. From these results we can conclude that the preservation of morphological MTJ can be directly related to a better stabilization of FTII, lower expression of the MHCI complex, and less cytotoxic activity of CD8.

Key-words: dog, muscular dystrophy, Golden Retriever, immunohistochemistry, gastrocnemius muscle, myotendinous junction.

1. INTRODUÇÃO

Distrofia muscular é uma miopatia hereditária caracterizada por fraqueza e degeneração muscular progressiva (BAROHN, 2001; HAYS; ARMBRUSTMACHER, 2002). Existem pelo menos 30 formas diferentes de manifestação em humanos, cuja herança pode ser autossômica dominante ou recessiva ligada ao cromossomo X (ZATZ et al., 2000).

Dentre as principais distrofias encontram-se a distrofia muscular de Duchene (DMD) e a de Becker (DMB). A DMD é doença genética, classificada como distúrbio autossômico recessivo, ligada ao cromossomo X, acometendo frequentemente homens (OLIVEIRA et al., 2002). Em raríssimos casos, a doença pode se manifestar em mulheres com síndrome de Turner (XO) ou translocação X autossômica (SILVA et al., 2003). Entretanto, dois terços dos filhos de mães portadoras desenvolvem a doença, com incidência de 20 a 30 meninos para cada 100.000 nascimentos e prevalência de um em cada 18.000 homens (BAROHN, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

A causa da DMD é uma deleção no gene do cromossomo X, responsável pela síntese da distrofina (SILVA et al., 2003). A distrofina é uma proteína com formato de bastonete onde uma das extremidades está ligada a actina e outra a uma glicoproteína de membrana (HAYS; ARMBRUSTMACHER, 2002).

As fibras musculares deficientes em distrofina não possuem a interação normal entre o sarcolema e a matriz extracelular. Pela fraca ancoragem, sofrem ruptura sob o repetido estresse da contração (STEVENS; LOWE, 1998). Este fato leva ao aumento da fragilidade osmótica, com a liberação de enzimas musculares solúveis, como a creatina cinase (CK), e o influxo excessivo dos íons de cálcio, que ativam proteases intracelulares e o sistema complemento, provocando necrose das fibras musculares (BAROHN, 2001; COZZI et al., 2001; HAYS; ARMBRUSTMACHER, 2002).

Miopatias ligadas ao cromossomo X foram descritas em animais de laboratório como camundongos (WHITEHEAD et al., 2006) e de companhia como gatos e cães (BERGMAN et al., 2002; GASCHEN; BURGUNDER, 2001). Entretanto, modelos experimentais, como camundongos *mdx* (X-linked muscular dystrophic) e gatos, possuem características clínicas e morfofuncionais diferentes da DMD em humanos (BULFIELD et al., 1984; COLLINS; MORGAN, 2003). Nos cães da raça Golden Retriever com distrofia muscular (DMGR) a doença é fenotipicamente semelhante à DMD e isso faz deles o modelo experimental mais adequado para o estudo da doença (COOPER et al., 1988; COLLINS; MORGAN, 2003;

HOWELL et al., 1997; NGUYEN et al., 2002). Alterações como hipertrofia, atrofia, degeneração, necrose e fibrose no músculo esquelético são observadas tanto em cães DMGR quanto em pacientes com DMD (STEVENS; LOWE, 1998). Em ambos, o óbito é ocasionado por falha cardio-respiratória e agravamento progressivo dos sintomas (NGUYEN et al., 2002; VALENTINE et al., 1989).

O músculo distrófico na DMD e DMGR apresenta miofibras em degeneração, necrose e regeneração, de acordo com o grupo muscular e o estágio da doença (CULLEN; MASTAGLIA, 1980, MIYAZATO et al., 2010). As lesões degenerativas da miofibras ocorrem de forma segmentar. A porção remanescente pode regenerar dando origem a uma fibra de menor calibre. A necrose total da fibra ocorre pela perda da capacidade regenerativa, originada por lesões repetitivas e extensas (ADAMS, 1996; WERNECK, 1994). O estado terminal caracteriza-se pela perda quase completa das fibras musculares esqueléticas, com substituição fibroadiposa (HAYS; ARMBRUSTMACHER, 2002).

A hipertrofia dos músculos da panturrilha é referida como uma das lesões clínicas mais significativas da doença em humanos (DUCHENNE, 1868; GOWERS, 1879). Em DMGR os músculos mais degenerados são os da língua, trapézio, intercostal, diafragma, reto femoral e sartório seguidos pelos músculos gastrocnêmio, braquial, tríceps braquial e grácil (NGUYEN et al., 2002). O aumento de diâmetro observado no músculo gastrocnêmio é resultado da pseudo-hipertrofia ocasionada pela deposição de tecido conectivo fibroadiposo (EMERY, 1987). Em cães DMGR as alterações musculares incluem hialinização, hipertrofia, acúmulo de cálcio, necrose, regeneração, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e fibras "ragged red" (NGUYEN et al., 2002, MIYAZATO, 2005). Estas últimas caracterizam-se por miofibras com grânulos avermelhados no seu interior, quando coradas com tricrômio de Gomori modificado. Esse achado indica aumento no número e/ou tamanho das mitocôndrias, em mecanismo compensatório à lesão ocasionada por influxo excessivo de íons de cálcio (ENGEL; CUNNINGHAM, 1963; SHELTON et al., 2001).

A constituição morfológica das fibras musculares é demonstrada por sua atividade para a enzima Adenosina Trifosfatase Miosínica (mATPase) (CLOSE, 1972). Três tipos de fibras podem ser encontrados na musculatura esquelética de cães adultos, tipo I (FTI), tipo IIA (FTIIA) e tipo IIC (FTIIC); sendo FTI e FTIIA histoquímicamente semelhantes às encontradas no homem (DUBOWITZ, 1985).

No músculo gastrocnêmio, o número de FTI e FTII são proporcionalmente iguais, independente do peso do animal, não havendo diferença estatística significativa entre elas.

Observa-se também que após os seis meses de idade a porcentagem do tipo de fibras nos diferentes músculos se estabiliza, não havendo mudanças com o envelhecimento dos cães (BRAUNT et al., 1978; BRAUNT; LINCOLN, 1981, MIYAZATO et al., 2010).

A região situada entre o músculo esquelético e o tendão é denominada junção músculo tendínea (JMT) e é formada por fissuras longitudinais profundas em forma de dedos humanos e preenchidas por colágeno originado do tendão (KVIST et al., 1991). A conexão anatômica entre célula e substrato na JMT é adaptada para reduzir o estresse mecânico (JÄRVINEN et al., 1991; JÄRVINEN et al., 2002; LAW; TIDBALL, 1993). As FTII nessa região possuem interdigitações menores e mais finas que as observadas nas FTI, aumentando a área de contato de 30% a 40% (KANNUS et al., 1992; KVIST et al., 1991).

Lesões inflamatórias e degenerativas em graus variados foram observadas na JMT do músculo extensor longo do dedo, de camundongos *mdx* distróficos. Essas lesões fragilizaram a JMT tornando o músculo mais susceptível às injúrias relacionadas à atividade contrátil (LAW; TIDBALL, 1993). Em contraposto, foi observado que o aumento compensatório de duas proteínas de adesão, a integrina e a utrofina, na JMT do músculo gastrocnêmio de camundongos *mdx*, reduziu lesões musculares mostrando a importância dessas proteínas na preservação destas estruturas (MIOSGE et al., 1999; WELSER et al., 2009).

A utrofina é uma proteína que interage com as mesmas proteínas citoesqueléticas que a distrofina, mas liga-se a diferentes locais no filamento de actina. Essa paridade sugere que elas possam atuar de maneira semelhante na célula (PEARCE et al., 1996; WELSER et al., 2009). Em animais sadios, a utrofina pode ser encontrada expressando-se na junção neuromuscular, músculo tendínea, vasos e nervos, além de participar dos processos de formação e regeneração muscular (KARPATI et al., 1993; SHIM; KIM, 2003).

No músculo distrófico, observou-se que a ausência da distrofina ocasiona aumento compensatório da utrofina (BLAKE et al., 2002; KARPATI et al., 1993). Foi relatado que durante o processo regenerativo da DMD, as fibras do tipo I expressaram grandes quantidades de utrofina (BLAKE et al., 2002). Estudos com camundongos *mdx* revelaram que este mecanismo pode atenuar a extensão da lesão pela substituição de FTII por FTI (CHAKKALAKAL et al., 2004; CHAKKALAKAL et al., 2006). Por conta dessa atuação alguns autores sugerem que a oferta e regulação da utrofina endógena seriam terapias potenciais para a DMD (MUIR; CHAMBERLAIN, 2009).

A integrina é uma proteína de adesão expressa no sarcolema que tem por função unir a célula muscular às fibras tendíneas, ajudando na organização e manutenção da JMT

(MIOSGE et al., 1999). Esta proteína atua na miogênese e homeostase muscular, regulando a proliferação e fusão dos mioblastos e a formação dos sarcômeros (HIRSCH et al., 1998; SCHWANDER et al., 2003; VOLK et al., 1990). Normalmente, é encontrada na região músculo tendínea e sua deficiência está relacionada à baixa adesão e proliferação de mioblastos e com a ruptura da JMT (MAYER et al., 1997; MIOSGE et al., 1999).

Participação de células imunes na patogenia das distrofinopatias

Estudos na musculatura distrófica indicam que além da lesão mecânica causada no sarcoplasma pela ausência de distrofina, a ação de radicais livres, presença de células mielóides (macrófagos, eosinófilos e mastócitos) e a autoimunidade mediada pelas células T estão relacionados à morte celular (McDOUALL et al., 1990; CAI et al., 2000; GE et al., 2004; GOROSPE et al., 1994). O uso de imunossuppressores como a prednisona e bloqueadores de TNF α , em pacientes com DMD e no camundongo *mdx*, revelou que a autoimunidade tem função importante nas lesões do músculo distrófico. Entretanto, o papel central das células imunes, sua atuação e ativação não foi completamente elucidados (EVANS et al., 2009; TIDBALL, WELLING-HENRICKS, 2005; SPENCER; TIDBALL, 2001).

Dentre as principais células inflamatórias estudadas nas distrofinopatias encontram-se os linfócitos CD4 auxiliares e CD8 citotóxicos (ARAHATA; ENGEL, 1988; EMSLIE-SMITH et al. 1989; ENGEL; ARAHATA, 1986; EVANS et al., 2009; McDOUALL et al., 1990). O CD4 e CD8 são glicoproteínas, membros da superfamília das imunoglobulinas, com funções semelhantes, porém com estruturas diferentes.

O CD4 é uma célula auxiliar que se subdivide em dois tipos principais, células T auxiliares 1 (Th1) e auxiliares 2 (Th2) que produzem várias citocinas e desencadeiam reações de defesa celular via macrófagos e eosinófilos respectivamente. A interleucina 4 (IL4) e a interleucina 13 (IL13) liberadas por Th2 possuem potente ação fibrogênica, sugerindo que Th2 está envolvida nas fases finais da DMD (BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008). A liberação de citocinas pelas células Th1 e Th2 estimula a secreção de imunoglobulinas, proliferação e diferenciação de células B e a ativação de macrófagos e eosinófilos (ROBBINS, 2008; TIZARD, 2002).

As células CD8 citotóxicas (LTC) são responsáveis pela destruição das células alvo por apoptose ou necrose. Estudos em camundongos *mdx* revelaram que não é necessária a invasão das LTCs na célula alvo, mas apenas interação entre membranas celulares para que

haja liberação da perforina, uma proteína citotóxica e citolítica que associada às proteases (gram-enzimas) induzem apoptose (BERKE, 1995; KAGI et al., 1994ab; WALSH et al., 1994). Os mecanismos de morte celular por LTC não estão bem explicados, mas duas hipóteses foram geradas pelo estudo em camundongos *mdx*. A primeira seria que apoptose e necrose ocorrem juntas sob ação de um fator comum e desconhecido. A outra hipótese é que a apoptose precederia a necrose tecidual (TIDBALL et al., 1995; ZYCHLINSKY et al., 1991).

Estudos com camundongos distróficos indicaram que as células CD4 e CD8 possuem interação comum nos mecanismos imunológicos. Os resultados mostraram a ação da citocina IL-2, liberada por linfócitos CD4 agindo sobre a ativação das células CD8 (GONZÁLEZ-QUINTIAL et al., 1996; UTZ; McFARLAND, 1994). Em outro estudo, observou-se o aumento de células T somente no músculo distrófico e não nos tecidos linfóides, sugerindo a ativação intramuscular de CD4 e CD8 (SPENCER et al., 1997).

A depleção de CD4 e CD8 revelou diminuição de 61% e 75% respectivamente, nas lesões musculares de camundongos *mdx* (SPENCER et al., 2001). Sabe-se que a redução dessas células por processos imunossupressores tem apresentado bons resultados na terapêutica da DMD, e que estas observações reafirmam a participação do sistema imune na promoção das lesões no músculo distrófico (GRANATA et al., 1998; PAGEL; PARTRIDGE, 1999; SPENCER et al., 1997). Entretanto, a ação dessas células é dependente de uma série de fatores responsáveis por sua ativação (BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008; EVANS et al., 2009).

A tarefa de exibir antígenos para o reconhecimento dos linfócitos T é executada por proteínas especializadas que são codificadas por genes em um locus chamado de complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Existem dois tipos diferentes dos produtos do gene MHC, o MHC de classe I (MHCI) e o MHC de classe II (MHCII). As moléculas de MHCI e MHCII contêm sítios seletivos de ligação para as células CD8 e CD4 respectivamente (HALLORAN et al., 1986; HARRIS; GILL, 1986; MARTZ et al., 1983; McMICHAEL, 1980; PLOEGH et al., 1981).

Para que o complexo MHCI seja ativado, é necessária a presença de citocinas produzidas durante o processo inflamatório. Essa ativação permite que antígenos próprios e não próprios sejam apresentados às LTCs. Os mecanismos de ligação entre LTCs e MHCI é que são responsáveis pela tolerância às proteínas próprias (self) e destruição das não próprias (non-self) (TIZARD, 2002).

No músculo distrófico, durante a lesão muscular, altas quantidades de proteínas citosólicas são liberadas no espaço extracelular. Estas se ligam ao MHC de classe I (complexo peptídeo-MHCI), transformando a miofibrila em uma célula apresentadora de antígeno. As LTCs, por processos ainda não explicados, diminuem sua tolerância às próprias proteínas miofibrilares, passando a reconhecê-las como células alvo (SPENCER; TIDBALL, 2001). A auto-imunidade é uma resposta que se desenvolve em casos onde há grande quantidade de tecido danificado como, por exemplo, infarto do miocárdio, cardiomiopatias e miocardites (LATIF et al., 1993; MAISCH, 1989; NEU et al., 1993). Em estudos com cães DMGR verificou-se relação direta entre a intensidade da marcação de MHC I e a idade do animal, indicando ação promotora deste para ativação de linfócitos CD8 (MIYAZATO, 2010).

Os complexos MHC I e MHC II não são expressos em fibras musculares saudáveis ao contrário do observado no músculo distrófico (SPENCER; TIDBALL, 2001). Entretanto, alguns autores relataram a ausência de MHC II em fibras musculares distróficas (KARPATI et al., 1988; McDOUALL et al., 1989) e sua presença na superfície de vasos sanguíneos e capilares do tecido muscular sadio (APPLEYARD et al., 1985; EMSLIE-SMITH et al., 1989; KARPATI et al., 1988; McDOUALL et al., 1989; MIYAZATO, 2010).

Vimentina no músculo distrófico

A regeneração e a degeneração muscular são processos presentes na progressão da DMD, sendo que o primeiro ocorre logo após o segundo (KENYON; CURTES, 2006; NGUYEN et al., 2002). Na regeneração do músculo esquelético observa-se a expressão da vimentina, cuja função é ligar-se às miofibrilas adjacentes, por meio dos discos Z (LAZARIDES, 1980; STEINERT et al., 1984; TRAUB, 1985). Esta proteína é um filamento intermediário dos fibroblastos encontrada em muitas células de origem mesenquimal (FRANKE et al., 1978; GALLANTI et al., 1992; STEINERT et al., 1984). Sua localização e distribuição são estudadas em diferentes desordens neuromusculares dentre elas a DMD (BORNEMANN; SCHMALBRUCH, 1992; CULLEN et al., 1992; SARNAT, 1991). Foi demonstrado que embora ausente em músculos esqueléticos maduros, é expressa em fibras em regeneração e durante o desenvolvimento muscular sendo responsável pela migração, fusão e modelagem estrutural de células miogênicas (VAITTINEN et al., 2001; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

Estudos com músculos DMD demonstraram a presença da vimentina em 94% de fibras musculares distróficas com diâmetro inferior a 30 micrometros sugerindo tratar-se de células em regeneração (SHIM; KIM, 2003). Em outros estudos, além destas, a vimentina foi observada em miofibras degeneradas (GALLANTI et al., 1992; VATER et al., 1994) dentro de células fagocíticas ou em células satélites precursoras de miofibras (VATER et al., 1994). Pelo exposto, a vimentina é considerada uma proteína importante no processo de organização estrutural do sarcômero sendo recomendada como marcador confiável da regeneração de fibras musculares (GALLANTI et al., 1992).

Na literatura consultada, dados sobre alterações músculo tendíneas relacionadas à distrofia muscular, em humanos com DMD e em cães DMGR, são escassos. Não há relatos de estudos morfológicos sistemáticos ou imuno-histoquímicos que comparem e caracterizem as lesões e os processos de degeneração e ou regeneração músculo tendíneos.

Objetivo

Assim, o objetivo desta pesquisa foi o de estudar as lesões no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea, na ausência de distrofina em cães afetados por distrofia muscular progressiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e colheita das amostras

Este trabalho cumpre integralmente os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FCAV, Campus de Jaboticabal, protocolo nº 025486/09.

Os animais distróficos provenientes do canil da Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular - AADM, Ribeirão Preto - SP, Brasil, eram mantidos em canis individuais, onde recebiam água *ad libitum* e ração comercial duas vezes ao dia, em bebedouros e comedouros adaptados às necessidades especiais dos mesmos. Duas vezes ao dia, pelo período de duas horas, os animais eram levados a uma área de convívio comum, na qual ficavam livres para caminhadas e banhos de sol.

Após o óbito por agravamento progressivo da doença, seis cães machos afetados por distrofia muscular progressiva, com idade entre 10 e 21 meses, foram utilizados neste experimento (Tabela 01). A confirmação da distrofia muscular foi feita pela análise do DNA genômico (HOWELL et al., 1997), realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano-IB/USP-Brasil. Como controle, foram utilizados três cães mestiços, machos, de porte similar ao Golden Retriever, que vieram a óbito por causas variadas que não afetavam o sistema músculo esquelético.

Tabela 01. Identificação, idade e causa do óbito de cães afetados por distrofia muscular– Jaboticabal – SP – 2010.

| Animal | Idade | Causa do óbito |
|---------------|--------------|-----------------------------------|
| Cão 01 | 10 meses | Insuficiência cárdio-respiratória |
| Cão 02 | 11 meses | Insuficiência cárdio-respiratória |
| Cão 03 | 11 meses | Insuficiência cárdio-respiratória |
| Cão 04 | 15 meses | Insuficiência cárdio-respiratória |
| Cão 05 | 17 meses | Insuficiência respiratória |
| Cão 06 | 21 meses | Insuficiência cárdio-respiratória |

Os animais distróficos e controle foram acondicionados em câmara fria a 4°C até a realização das necropsias, concluídas no máximo em até 6 horas. A colheita e o processamento do material foram realizados no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp/Jaboticabal. Setenta e cinco fragmentos do músculo gastrocnêmio e da junção músculo tendínea foram colhidos em duplicata e cortados transversalmente. Metade destes foi fixada em solução tamponada de formol 10% em pH 7,4 pelo período de 24h, processados pelas técnicas usuais para inclusão em parafina e cortados a 5 µm de espessura. Os fragmentos restantes foram imersos em N-hexano (Labsynth Co, Diadema, SP, BR), congelados e mantidos em nitrogênio líquido à 120°C negativos. Posteriormente, cortados a 5 µm no criostato à 20°C negativos (Damon/IEC Division 3398 Microtome Cryostat), em secções seriadas transversais, alocados em lâminas adesivas eletricamente carregadas (Star Frost adhesive slides Cód. 9546 - Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, The Netherlands) e armazenados em freezer à 80°C negativos.

2.2 Histopatologia

Após processamentos usuais para histologia, os fragmentos musculares e músculo tendíneos foram alocados em lâminas histológicas, corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Gomori modificado (TGM). Seguiu-se análise qualitativa das lesões classificando-as progressivamente de acordo com a extensão da lesão muscular (NGUYEN et al., 2002). Grau 0: músculo normal sem a presença de anomalias; Grau 1: lesões discretas, distribuição aleatória afetando menos de 10% das fibras em cada fascículo muscular; Grau 2: lesões moderadas, distribuição multifocal afetando de 10-50% das fibras em cada fascículo muscular; Grau 3: lesões severas, distribuição difusa, afetando mais de 50% das fibras em cada fascículo muscular.

Foi utilizado o método histoquímico de coloração Picrosirius (MONTES, 1996) para identificação do tipo de colágeno existente na região músculo tendínea dos animais distróficos e controle. Os cortes parafinados foram corados com Sirius red (Cód. 35780 - Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) dissolvido em solução saturada de ácido pícrico. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz (lâmpada de halogênio) com filtro de polarização.

As lâminas com os cortes congelados foram coradas pela técnica Alizarina Red S (ARS), pH 4,3 específica para avaliação de cálcio. Na avaliação histopatológica duzentas fibras musculares e músculo tendíneas foram analisadas aleatoriamente aferindo-se a porcentagem de fibras ARS positivas e negativas.

Foi realizada análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância para a porcentagem de fibras ARS positivas e negativas. As análises estatísticas foram processadas utilizando o pacote estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

2.3 Enzimo-histoquímica e histomorfometria

Cortes congelados foram corados pela reação de enzimo-histoquímica com mATPase (Adenosine 5' - triphosphate Sigma - Aldrich Diagnostics, St. Louis, MO, USA) em pré-incubação alcalina (pH 9.4), e avaliados em termos de porcentagem e distribuição das fibras musculares do tipo I (FTI) e do tipo II (FTII) no MG e JMT de controle e distróficos.

A análise morfométrica do diâmetro mínimo e área das fibras musculares foi realizada pelo sistema analisador de imagens (KS 100 versão 3.0 – Kontron – Carls Zeiss). As imagens foram obtidas por uma câmera de vídeo (Color Vídeo Câmera TK-1070U-JVC), acoplada a um microscópio binocular (Jenaval - Carl Zeiss), conectados ao microcomputador. Foram analisadas aleatoriamente 100 fibras de cada tipo para os animais distróficos e controle. As variáveis, diâmetro mínimo e área, foram considerados pela média aritmética dos valores obtidos.

Foi realizada análise estatística pelo método dos quadrados mínimos ao nível de 5% de significância, para o diâmetro mínimo e área de FTI e FTII. Para a porcentagem do número de fibras utilizou-se o teste de Wilcoxon. As análises estatísticas foram processadas utilizando o pacote estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

2.4 Imuno-histoquímica

O método imuno-histoquímico empregado foi o complexo estreptoavidina-biotina peroxidase desenvolvido por HSU et al. (1981), com modificações. Seis anticorpos primários foram utilizados para avaliar a imunoexpressão de células CD4, CD8, MHC I, MHC II, utrofina e vimentina no músculo e junção músculo tendínea de animais distróficos e controle (Tabela 02).

Tabela 02. Especificações dos anticorpos primários.

| Anticorpo primário | Amostra | Diluição | Código | Marca | Controle |
|--------------------|------------|----------|----------|-------------|----------------------|
| Anti-CD4 | Congelada | 1/80 | DH29A | VRMD | linfonodo |
| Anti-CD8 | Congelada | 1/80 | CADO46A | VRMD | linfonodo |
| Anti-MHCI | Congelada | 1/240 | H 58 | VRMD | cólon |
| Anti-MHCII | Parafinada | 1/400 | M0746 | Dako | linfonodo |
| Anti-Utofina | Congelada | 1/200 | NCL-DRP2 | Novo Castra | junção neuromuscular |
| Anti-Vimentina | Parafinada | 1/200 | M7020 | Dako | útero |

Nos cortes parafinados as lâminas foram inicialmente mantidas por uma hora em estufa a 60°C seguindo-se a desparafinização em xilol, e hidratação em álcool etílico. Todos os passos a seguir foram precedidos por lavagem com solução tampão Tris HCl (pH 7,6).

Nas reações com os anticorpos anti-MHCII e anti-vimentina a recuperação antigênica dos cortes foi realizada em panela elétrica a vapor a temperatura de 97⁰ C (Steamer Cuis, T-Fal, Arno S.A.) com solução pré-aquecida de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0). No bloqueio da atividade endógena da peroxidase utilizou-se peróxido de hidrogênio 30 volumes, adicionado

a solução tampão de PBS (pH 7,4), com concentração final de 5%. Para bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se soro albumina bovina a 2% (A7030, Sigma). Os anticorpos primários foram diluídos em soro albumina bovina a 1% (A7030, Sigma) e incubados em câmara úmida por 16 horas à temperatura de 4°C. Para o controle negativo optou-se por excluir o anticorpo primário da reação.

Como complexo secundário, utilizou-se o polímero marcado EnVision (Kit EnVision + Duakl Link System HRP, Dako, cód. K4061). As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako K3468-1) e contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos com posterior lavagem em água corrente.

A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de álcool etílico seguida de diafanização em xilol. Para a montagem das lamínulas utilizou-se Permount (SP15-500, Fisher Scientific).

Nos cortes congelados, para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-MHCI e anti-utrofina, as lâminas foram fixadas em acetona gelada e em seguida lavadas com soluções tampão Tris Salina Tween (TBST – pH 7,6). A partir desta etapa, os demais procedimentos seguiram o protocolo realizado nos cortes parafinados, iniciando-se pelo bloqueio da atividade endógena da peroxidase.

Para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foram contadas todas as células imunomarcadas aleatoriamente em cinco campos de cada corte, com auxílio de um graticulo micrométrico (Nikon, Inc. – Japan), no aumento de 400x.

Para os demais anticorpos considerou-se a distribuição e a sua presença nos cortes. Escores: (0), sem imunomarcações; (1), escasso - imunomarcações isoladas e aleatoriamente distribuídas; (2), moderado - imunomarcações em grupos com distribuição multifocal e (3) acentuado - imunomarcações difusas por todo o corte muscular.

Foi realizada análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 7% de significância para as imunomarcações dos anticorpos anti-MHCII, anti-MHCI, anti-CD4, anti-CD8, anti-vimentina e anti-utrofina. As análises estatísticas foram processadas utilizando o pacote estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Histopatologia

Nos cães controle, o MG e a JMT apresentaram fibras musculares uniformemente distribuídas, arranjo celular com formato poliédrico e escasso espaço interfibrilar entremeado por tecido conectivo. Nos animais distróficos foram observados focos de células inflamatórias predominantemente mononucleares, próximos às fibras necróticas e debris celulares, aumento do espaço endomisial e perimisial com substituição fibrosa e pouca infiltração adiposa. As miofibras estavam alteradas na forma e no diâmetro, mostrando atrofia e/ou hipertrofia. Fibras hialinizadas apresentavam-se com o citoplasma hiperacidófilo, hipertrofiadas e claramente bem definidas. Fibras necróticas agrupadas com deformidade no citoplasma, sarcoplasma pálido e homogêneo, núcleo picnótico e presença de fagossomos com debris celulares foram mais evidentes no MG. Fibras com citoplasma basófilo e núcleo volumoso foram identificadas, tanto no MG quanto na JMT, sugerindo processo de regeneração. Foram observadas fibras "ragged-red" que se caracterizaram por apresentar aspecto granular vermelho-azulado em seu sarcoplasma pela coloração do TGM (Figura 01).

Foram observadas no músculo gastrocnêmio de 83% dos animais distróficos lesões moderadas que afetavam de 10-50% das miofibras em cada banda muscular (grau 2). Os demais apresentaram lesões severas com miofibras danificadas difusas que afetavam mais de 50% das fibras em cada banda muscular (grau 3) (Tabela 03).

Na JMT de todos os animais distróficos foram observadas lesões mais discretas. Miofibras danificadas encontravam-se isoladas ou randomicamente distribuídas (grau 1) em 50% dos animais. Nos demais foram observadas lesões moderadas (grau 2) (Tabela 02).

Tabela 03. Porcentagem nos graus de lesões no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

| Grau de lesão | Músculo gastrocnêmio | Junção músculo tendínea |
|---------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | 0,0% | 50,0% |
| 2 | 83% | 50,0% |
| 3 | 17% | 0,0% |

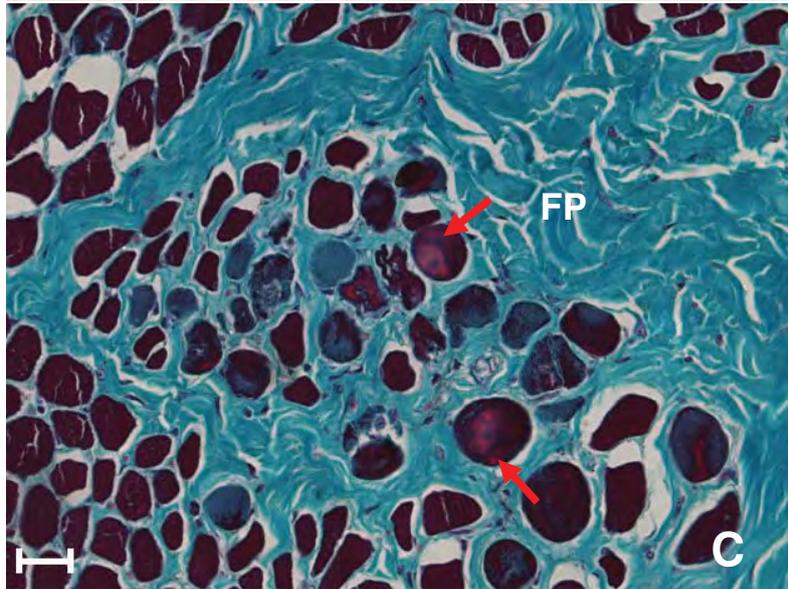
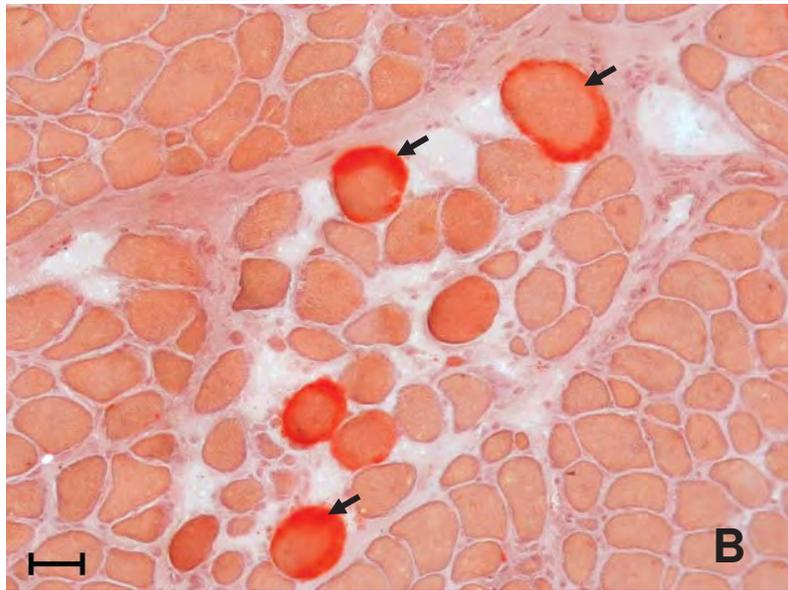
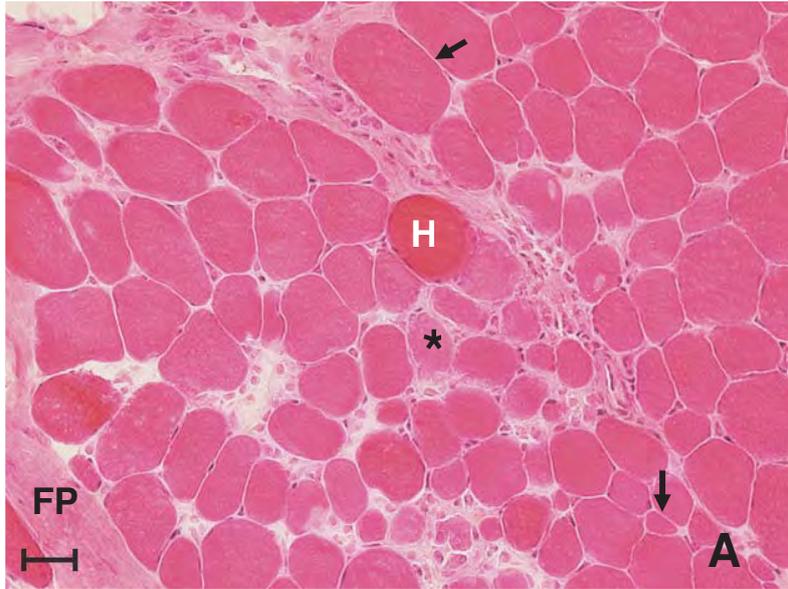


Figura 01. Lesões no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Miofibras com variações no diâmetro (setas), fibra necrótica (*), fibrose perimisial (FP), fibra hialinizada (H), HE. **B.** Calcificação da miofibra (setas), ARS. **C.** Fibras “ragged-red” (setas), fibrose perimisial (FP), TGM. Bar 10µm.

A calcificação distrófica de fibras musculares em regiões de necrose foi observada pela coloração ARS. O cálcio distribuiu-se na miofibrila de maneira homogênea pelo sarcoplasma. Foram visibilizadas fibras isoladas e/ou áreas de concentração cálcio positivas no MG e na JMT dos animais distróficos (Figura 01). Os resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância de pareamento das fibras ARS positivas e negativas no músculo gastrocnêmio e JMT de cães afetados por distrofia muscular, não mostraram correlação significativa (Figura 02). O que indica, que o influxo excessivo de íons de cálcio na miofibrila, não foi o fator responsável pela morte da mesma.

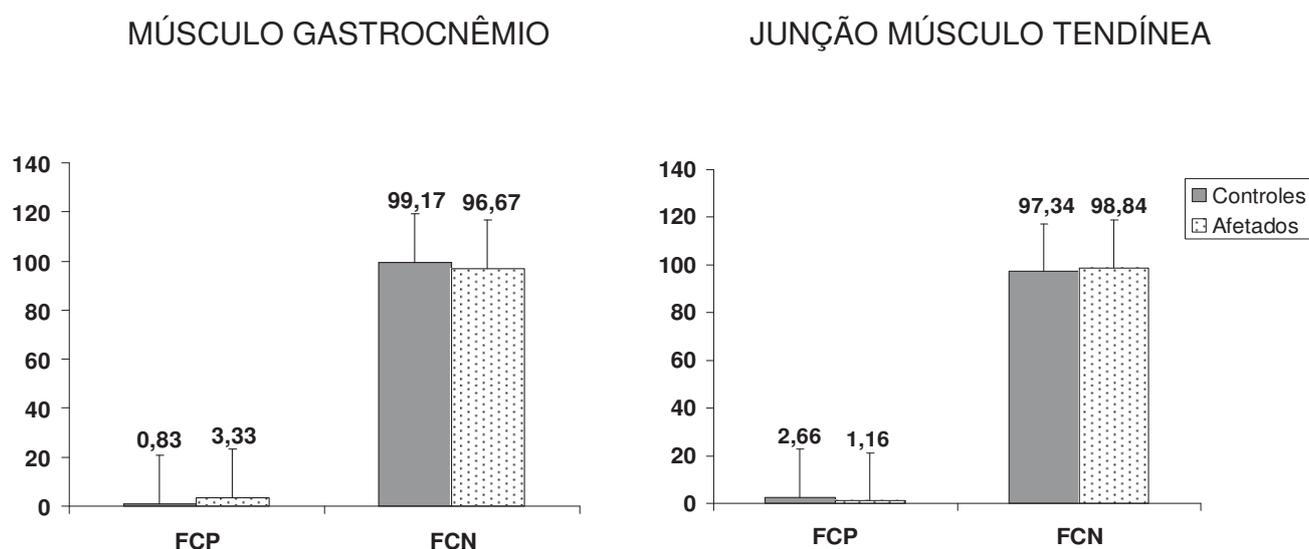


Figura 02. Representação gráfica da porcentagem de fibras ARS positivas e negativas no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

O colágeno foi identificado por luz polarizada na coloração de Picrosirius. Não houve diferença quanto ao tipo de colágeno na região músculo tendínea de animais distróficos e controle. Foram observadas interdigitações formadas por fissuras longitudinais profundas de tecido muscular entremeado por colágeno do tipo I, com feixes de fibras organizadas de coloração avermelhada proveniente do tendão. (Figura 03).

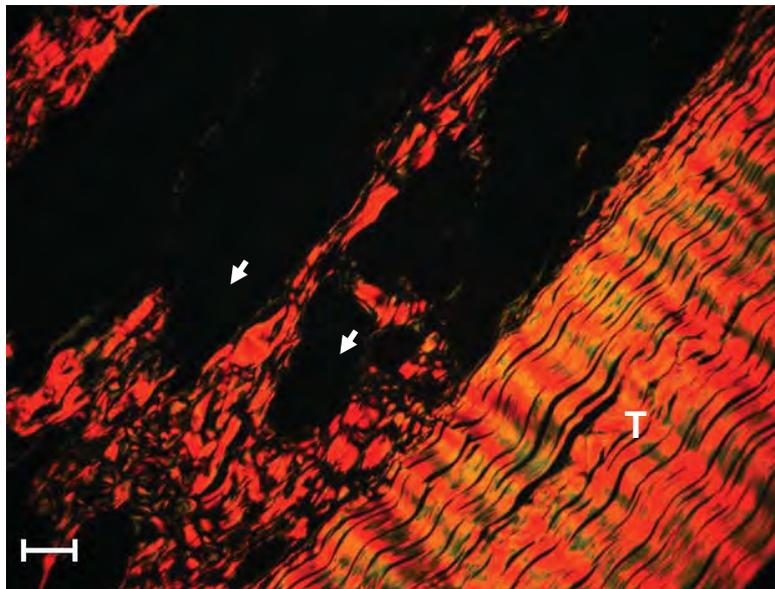


Figura 03. Reação de picrosirius sob luz polarizada. Corte longitudinal da junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Fibras colágenas organizadas e paralelas, interdigitações musculares entremeadas por colágeno (setas). Bar 5 μ m.

3.2 Enzimo-histoquímica e histomorfometria

As fibras musculares do MG e da JMT, nos animais controle, apresentaram padrão mosaico com distribuição homogênea de FTI e FTII. Entretanto, os distróficos apresentaram bordas irregulares, atrofia e hipertrofia, e agrupamentos de fibras do tipo I e II (Figura 04).

No MG de distróficos predominaram fibras do tipo II e no controle fibras do tipo I (Figura 05). Os valores médios de diâmetro mínimo e área de FTI e FTII foram menores nos distróficos; ($p < 0,05$) pelo método dos quadrados mínimos (Figura 06).

Na JMT de distróficos e controle não foi observada diferença significativa entre a proporção de FTI/FTII (Figura 05). Os valores médios de diâmetro mínimo e da área das FTI foram menores que às observadas nos controle, enquanto nas FTII estes valores foram iguais; ($p < 0,05$) pelo método dos quadrados mínimos (Figura 07).

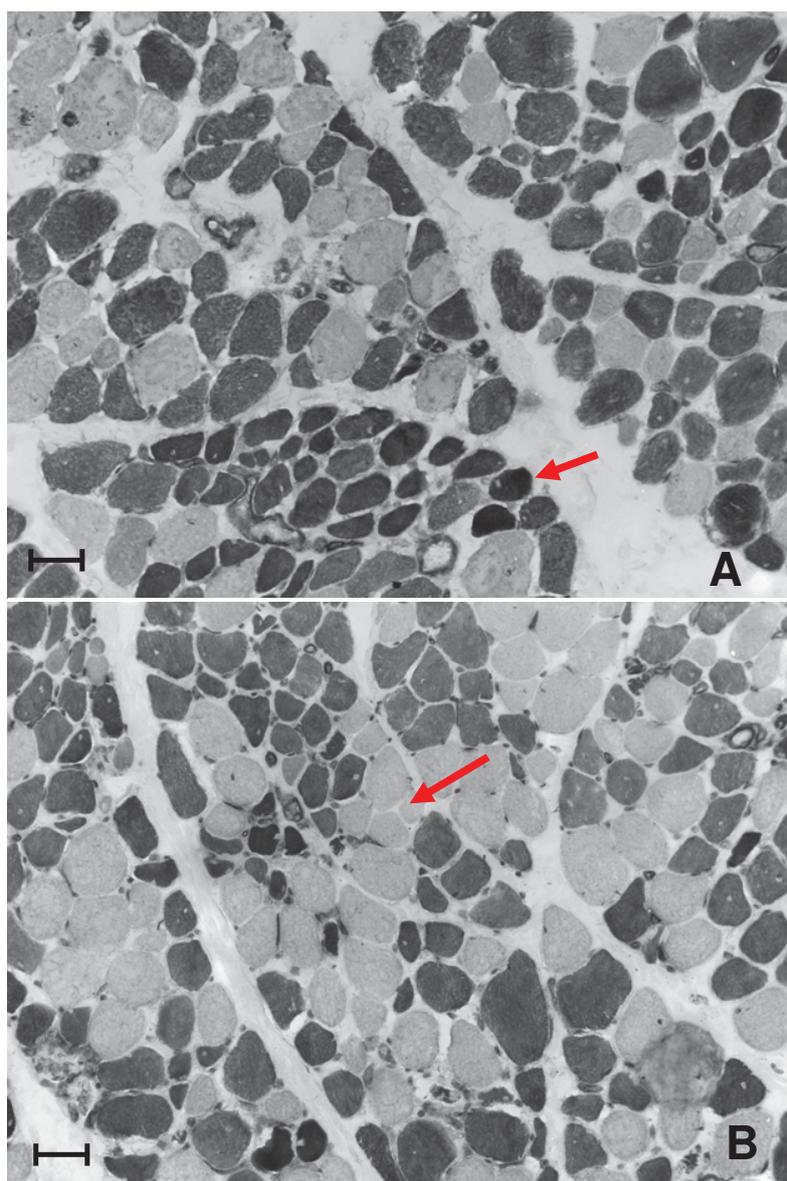


Figura 04. Reação enzimo-histoquímica mATPase (pH 9,4) no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Músculo gastrocnêmio: grupamento de FTII (seta). **B.** Junção músculo tendínea: grupamento de FTI (seta). Bar 10 μ m.

MÚSCULO GASTROCNÊMIO

JUNÇÃO MÚSCULO TENDÍNEA

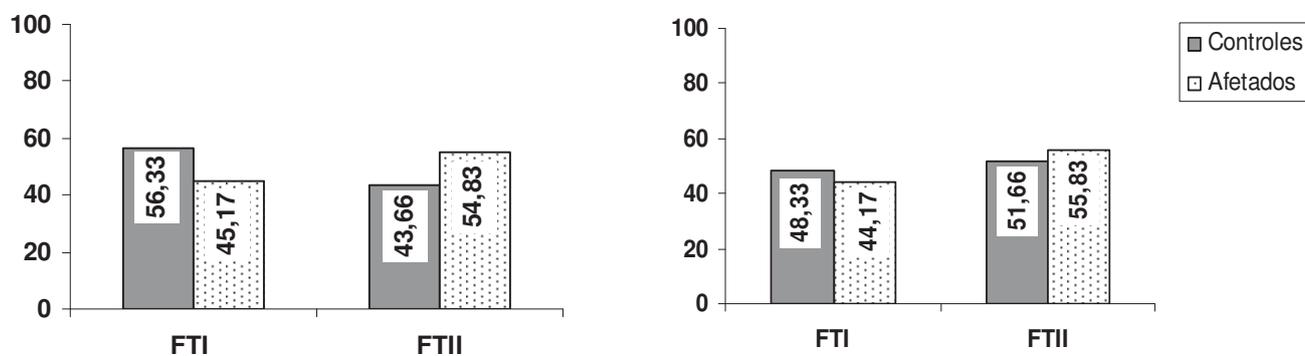
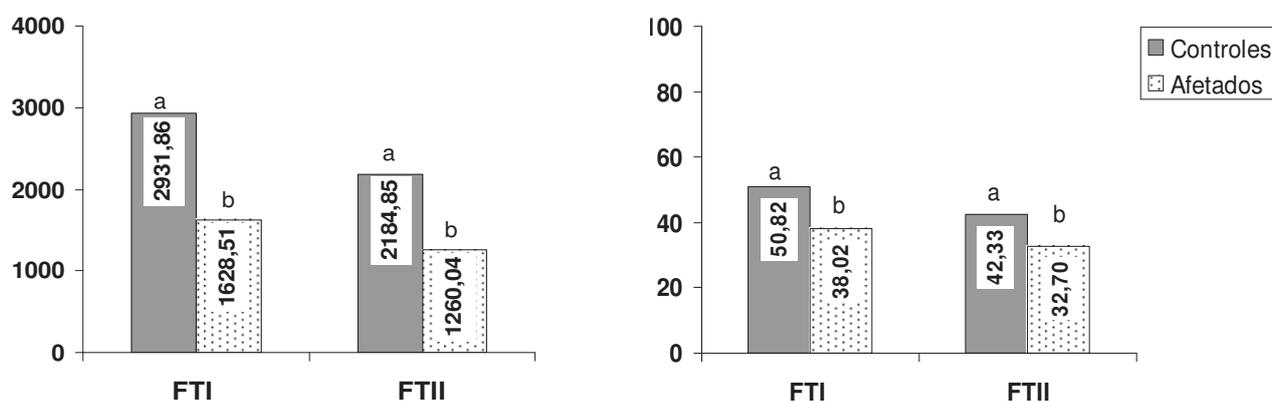


Figura 05. Representação gráfica da porcentagem de FTI e FTII no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

MÚSCULO GASTROCNÊMIO

ÁREA

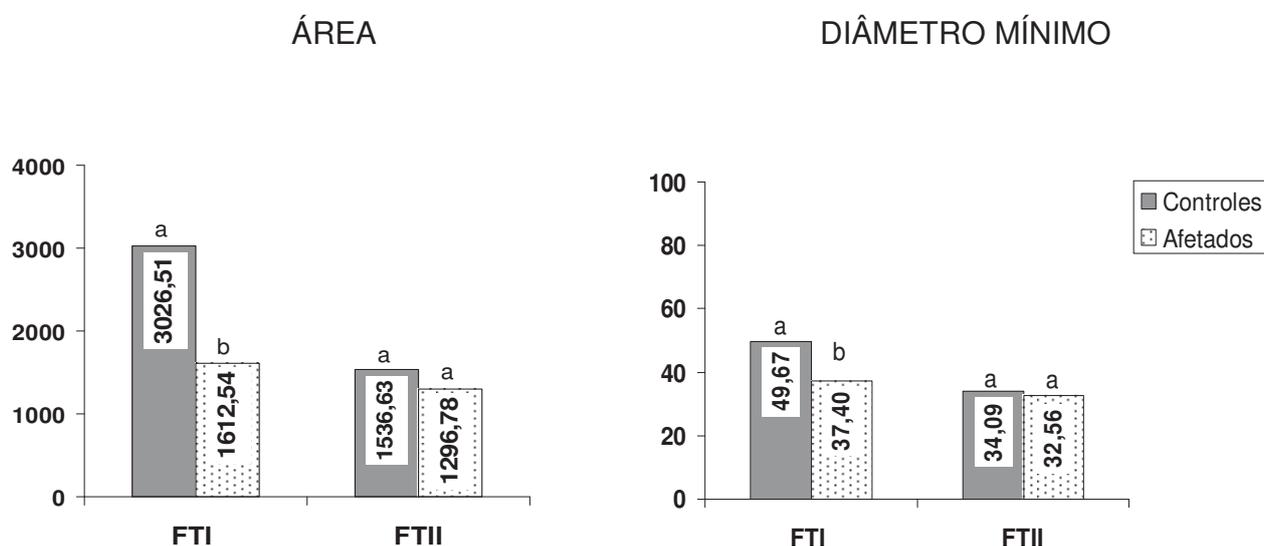
DIÂMETRO MÍNIMO



Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo método dos quadrados mínimos.

Figura 06. Representação gráfica dos valores médios da área e do diâmetro mínimo em micrômetros de FTI e FTII no músculo gastrocnêmio de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

JUNÇÃO MÚSCULO TENDÍNEA



Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo método dos quadrados mínimos.

Figura 07. Representação gráfica dos valores médios da área e do diâmetro mínimo em micrômetros de FTI e FTII na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

3.3 Imuno-histoquímica

3.3.1 Imunomarcção da Utrofina

Nos animais controle, a imunomarcção da utrofina foi intensa em vasos sanguíneos do MG, e além destes expressou-se com intensidade fraca na superfície das células musculares na JMT. Nos distróficos, o grau de marcação foi intenso (escore 3) na superfície das miofibras, vasos sanguíneos, e no sarcoplasma de algumas miofibras em regeneração, no MG e na JMT (Figura 08).

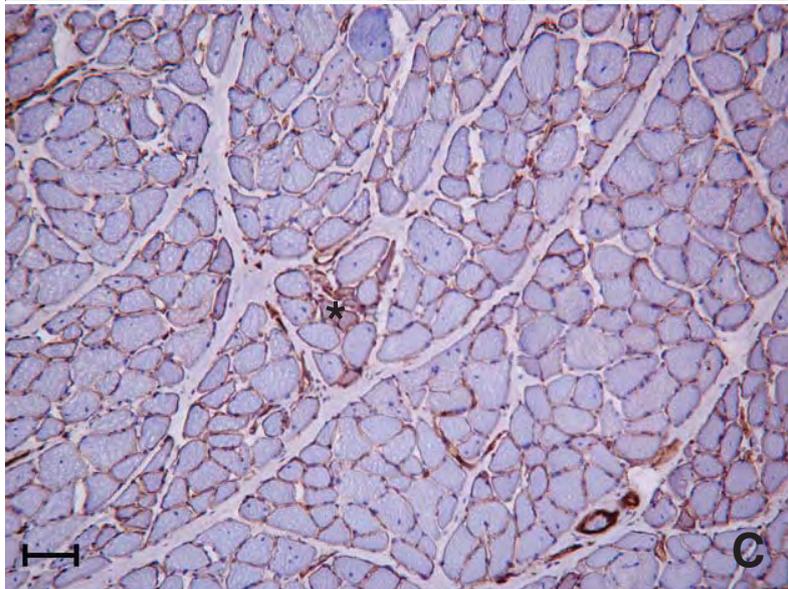
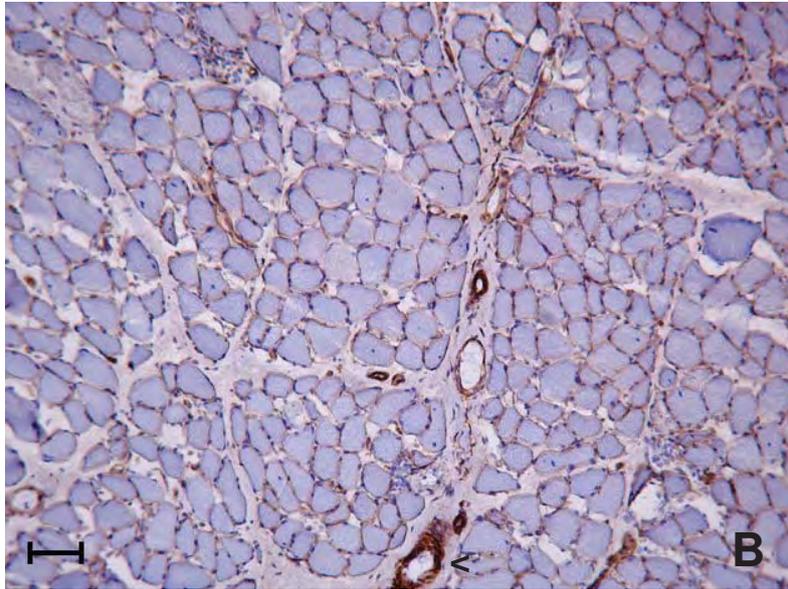
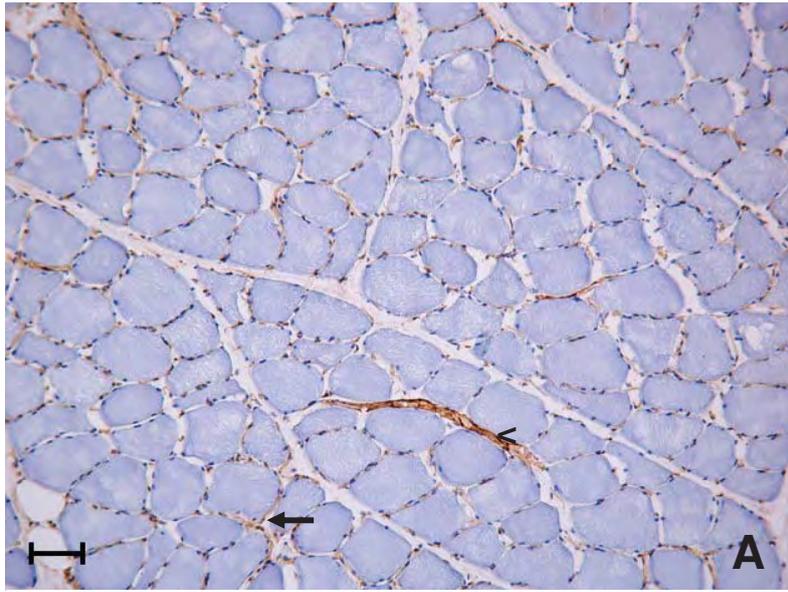


Figura 08. Reação de imuno-histoquímica para utrofina. Miofibras atrofiadas. **A.** Junção músculo tendínea de controle: vaso sanguíneo (<), fraca imunoexpressão de utrofina no sarcolema (seta). **B.** Junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular: vaso sanguíneo (<), intensa imunoexpressão de utrofina no sarcolema. **C.** Músculo gastrocnêmio de cães afetados por distrofia muscular: fibras em regeneração (*), intensa imunoexpressão de utrofina no sarcolema. Bar 20µm.

3.3.2 Imunomarcção de células CD4 e CD8

Células CD4 e CD8 apresentaram-se isolados e aleatoriamente distribuídos pelo endomísio, perimísio e ao redor de vasos, nos animais controle. Nos distróficos, estas foram observadas também nas áreas de degeneração e necrose (Figura 09). Foi observada diferença significativa no número de células marcadas entre os distróficos e controle, sendo a frequência de CD4 e CD8 significativamente maior ($p < 0.07$) nos primeiros. Não houve diferença significativa no número de células CD4 e CD8 observadas no MG e na JMT de distróficos (Tabela 04).

Tabela 04. Média e erro padrão do número de células CD4 e CD8 por 0,0052 mm², objetiva 40X, no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães controle e afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

| Grupos | Músculo gastrocnêmio | | Junção músculo tendínea | |
|---------------|----------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | CD4 | CD8 | CD4 | CD8 |
| Cães afetados | 31.66 ± 4.88 (a) | 35.50 ± 6.22 (a) | 27,33 ± 3.26 (a) | 31.33 ± 6.21 (a) |
| Controle | 1.66 ± 0.57 (b) | 2,00 ± 0,02 (b) | 1.33 ± 0.57 (b) | 2, 00 ± 1,00 (b) |

Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,07$) pelo método de Kruskal-Wallis

3.3.3 Imunomarcção dos antígenos MHCI e MHCII

A imunomarcção do antígeno MHCI ocorreu em capilares e vasos sanguíneos do endomísio e perimísio no MG e na JMT dos animais controle. Nos distróficos, expressaram-se também em áreas de inflamação, necrose, regeneração e na superfície das miofibras (Figura 10). Graus máximos de marcação (escore 3) predominaram no MG e graus moderados (escore 2) predominaram na JMT, sendo essa diferença significativa ($p < 0.07$) pelo método de Kruskal-Wallis (Tabela 05).

Tabela 05. Escore médio, mínimo e máximo da imunoexpressão do antígeno MHCI no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

| Amostra | Media ± EP | Mínimo | Máximo |
|-------------------------|-----------------|--------|--------|
| Músculo gastrocnêmio | 2,75 ± 0,27 (a) | 2 | 3 |
| Junção músculo tendínea | 2,33 ± 0,40 (b) | 2 | 3 |

Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,07$) pelo método de Kruskal-Wallis.
EP - erro padrão

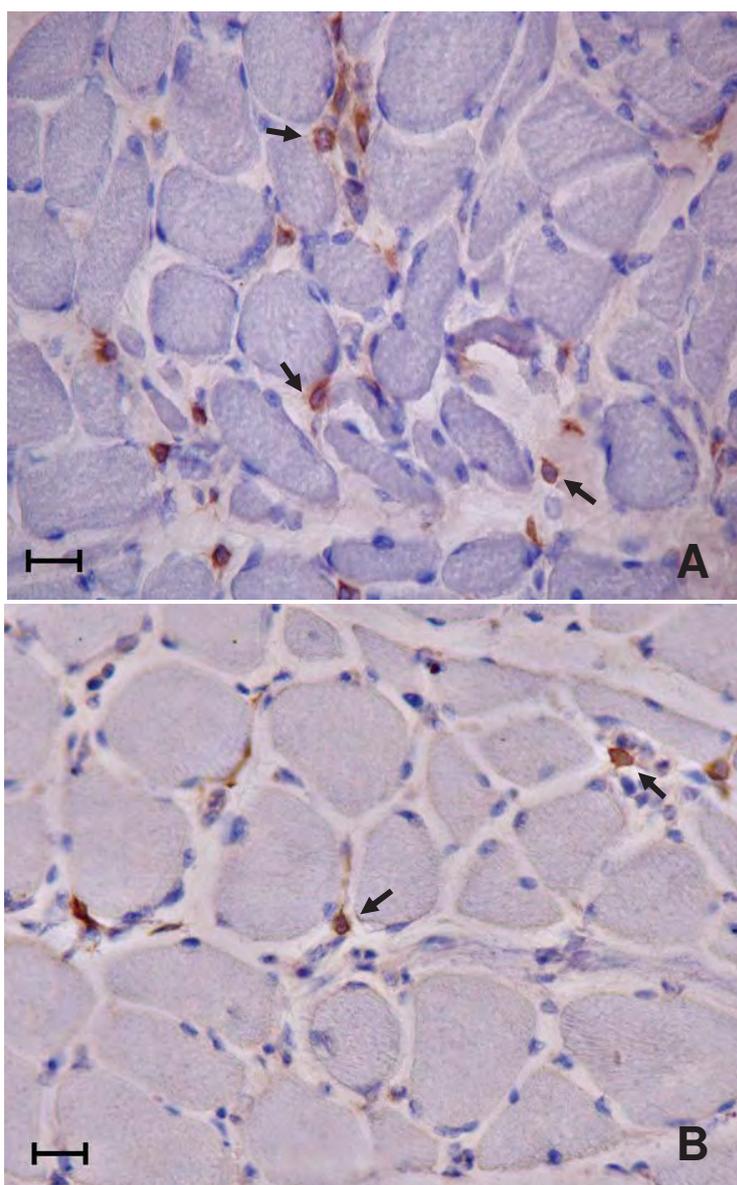


Figura 09. Reação imuno-histoquímica para células T no músculo gastrocnêmio de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Imunoexpressão de CD8 (setas). **B.** Imunoexpressão de CD4 (setas). Bar 5 μ m.

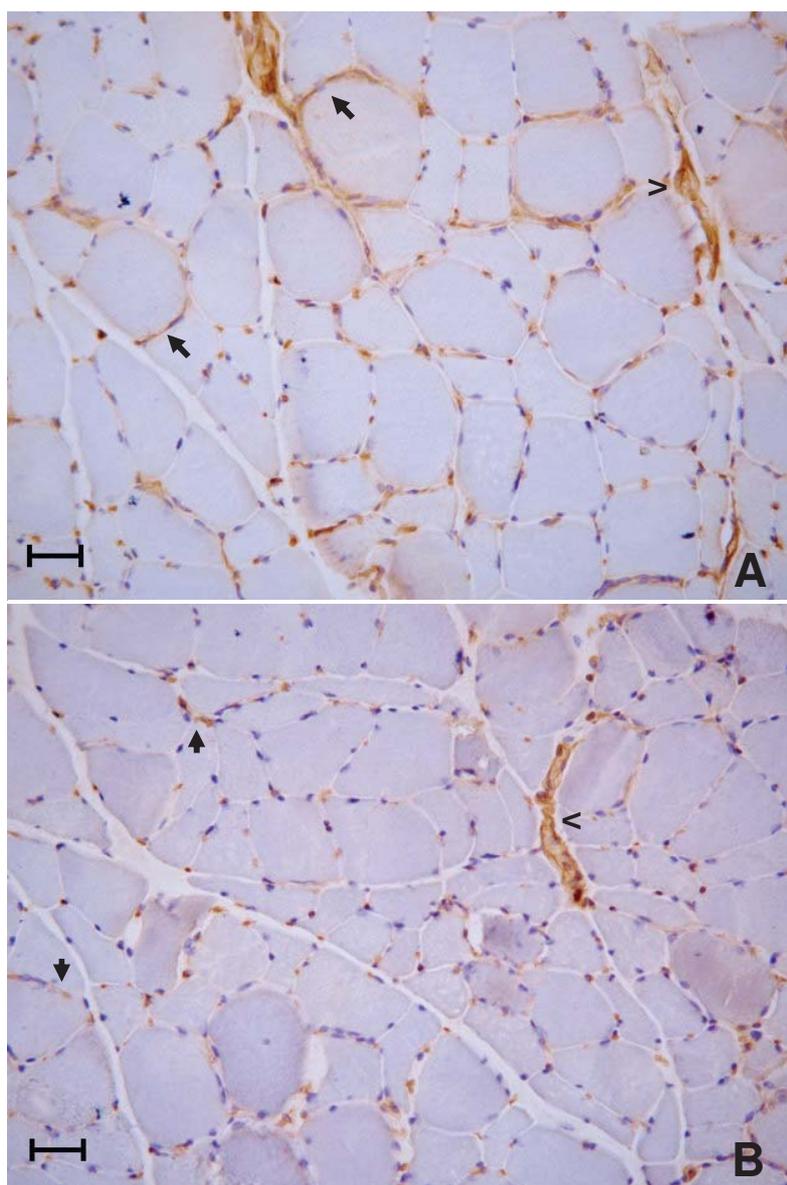


Figura 10. Reação imuno-histoquímica para MHC1 no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular, imunoposição no sarcolema (setas) e vasos sanguíneos (<). **A.** Músculo gastrocnêmio: imunomarcção moderada. **B.** Junção músculo tendínea: imunomarcção fraca. Bar 10µm.

Do mesmo modo que o observado para o MHC I, a imunomarcação do antígeno MHC II ocorreu em vasos sanguíneos e também nas células mononucleares do endomísio dos animais controle. Nos distróficos, expressaram-se também em macrófagos presentes nas regiões de inflamação, necrose e degeneração (Figura 11). A média das imunomarcações variou de escassa a moderada (escore 1 e 2), sendo mais intensa no MG. Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre eles; ($p < 0.07$) pelo método de Kruskal-Wallis (Tabela 06).

Tabela 06. Escore médio, mínimo e máximo da imunoexpressão do antígeno MHCII no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

| Amostra | Média ± EP | Mínimo | Máximo |
|-------------------------|-------------------|---------------|---------------|
| Músculo gastrocnêmio | 1,83 ± 0,60 (a) | 1 | 3 |
| Junção músculo tendínea | 1,33 ± 0,75 (a) | 1 | 3 |

Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,07$) pelo método de Kruskal-Wallis. EP - erro padrão

3.3.4 Imunomarcação da Vimentina

Nos animais controle, a expressão da vimentina foi acentuada em vasos sangüíneos e escassa no tecido conectivo. O grau de marcação foi intenso (escore 3) no MG, e moderado (escore 2) na JMT de distróficos. A vimentina expressou-se em grande parte nas miofibras em regeneração podendo ser observada em áreas de degeneração, necrose e inflamação (Figura 12). Não houve diferença estatística entre a marcação da vimentina na JMT e MG de distróficos (Tabela 07).

Tabela 07. Escore médio, mínimo e máximo da imunoexpressão da vimentina no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. Jaboticabal, SP, 2010.

| Amostra | Média ± EP | Mínimo | Máximo |
|-------------------------|-------------------|---------------|---------------|
| Músculo gastrocnêmio | 2,83 ± 0,40 (a) | 1 | 3 |
| Junção músculo tendínea | 2,33 ± 0,75 (a) | 1 | 3 |

Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,07$) pelo método de Kruskal-Wallis. EP - erro padrão

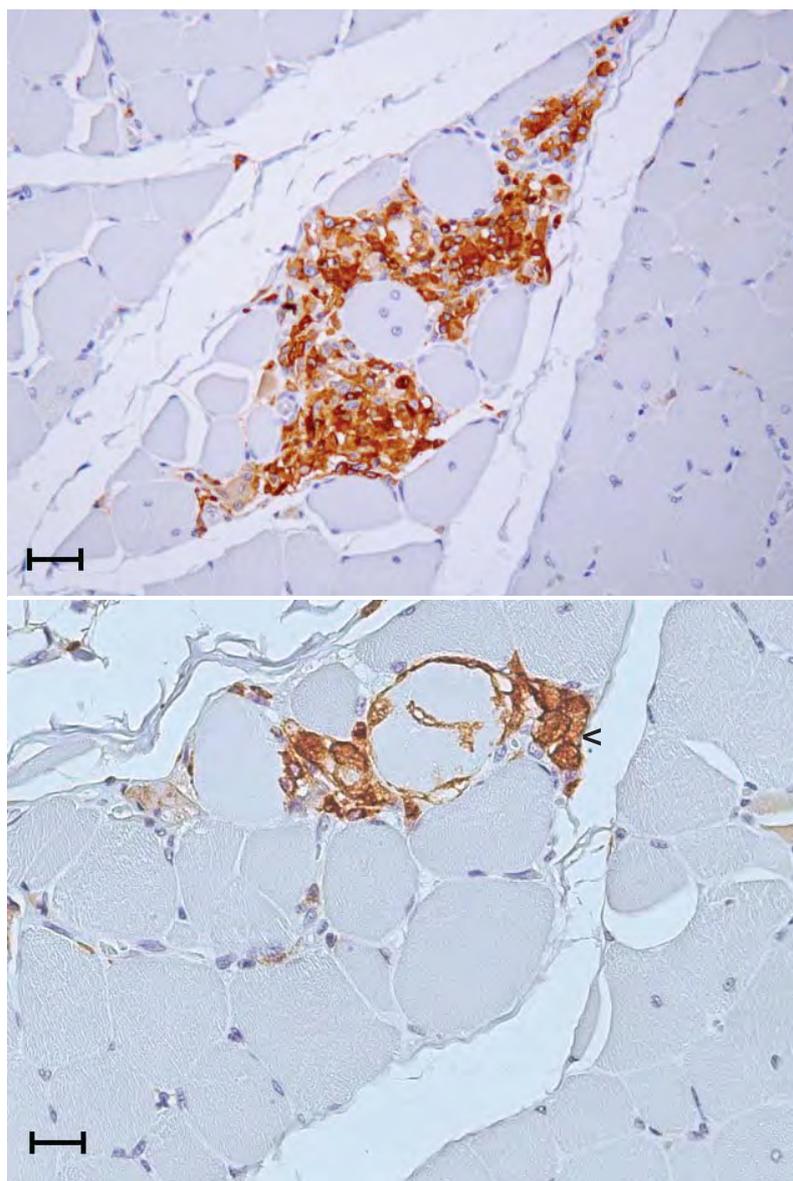


Figura 11. Reação imuno-histoquímica para MHCII no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Músculo gastrocnêmio: imunoexpressão em infiltrado mononuclear (setas). Bar 10 μ m. **B.** Junção músculo tendínea: imunoexpressão no sarcolema (seta) e em fibras necróticas (<). Bar 5 μ m.

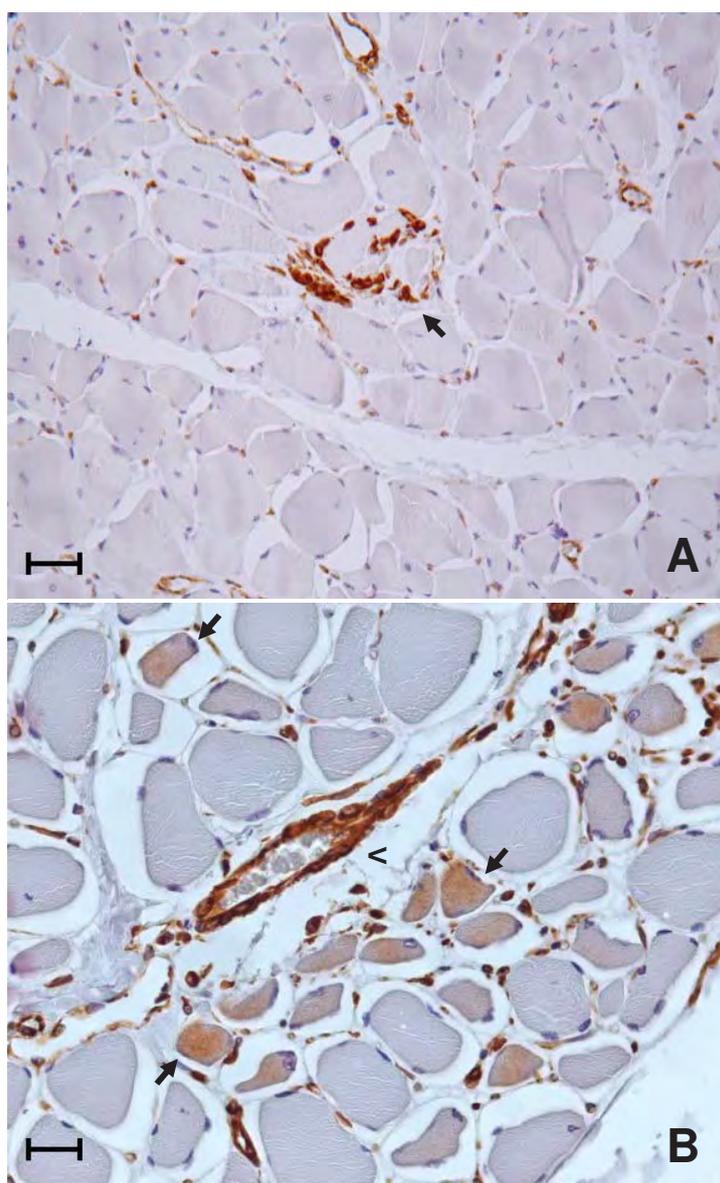


Figura 12. Reação imuno-histoquímica para vimentina no músculo gastrocnêmio e na junção músculo tendínea de cães afetados por distrofia muscular. **A.** Junção músculo tendínea: imunoexpressão em área de necrose (seta). Bar 10 μ m. **B.** Músculo gastrocnêmio: imunoexpressão em miofibras em regeneração (setas) e em vasos sanguíneos (<), Bar 5 μ m.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados histopatológicos mostraram que o MG e a JMT dos animais distróficos apresentaram lesões características da distrofia muscular como fibrose, hialinização, hipertrofia, fibras “ragged-red”, necrose, calcificação, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e regeneração. Estes resultados concordam com os descritos na literatura para cães distróficos por outros autores (BERGMAN et al., 2002; KORNEGAY et al., 1988; MIYAZATO, 2005; MIYAZATO et al., 2010; NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001; STEVENS; LOWE, 1998; VALENTINE et al., 1990). Os resultados mostraram, ainda, que o arcabouço morfológico da JMT estava mais preservado que a do músculo gastrocnêmio contrariando os achados que descreveram lesões inflamatórias e degenerativas intensas na JMT do músculo extensor longo do dedo em camundongos *mdx* (LAW; TIDBALL, 1993).

Não houve diferença quanto ao tipo de colágeno presente na JMT de distróficos e controle. Em ambos foram evidenciadas fibras colágenas de alta birrefringência com forte coloração avermelhada, típicas do colágeno do tipo I, observado normalmente nessa região (JUNQUEIRA et al., 1978; MONTES, 1996; RICH; WHITTAKER, 2005).

A formação de agrupamentos de FTI e FTII, observada no MG e na JMT de distróficos foi também descrita em cães DMGR por outros autores (KORNEGAY et al., 1988; MIYAZATO, 2005; VALENTINE et al., 1990), sendo este um tipo de lesão relatada apenas nesta espécie (VALENTINE et al., 1990).

No MG dos distróficos, as FTII foram prevalentes apresentando inversão no tipo de fibra quando comparado ao controle, à semelhança do observado nos músculos semitendinoso, diafragma e sartório de cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses (MIYAZATO, 2005). Essa prevalência está condicionada às lesões mais intensas, pois as FTI durante o período de regeneração produzem maiores quantidades de utrofina, responsável pela manutenção estrutural da miofibra (BLAKE et al., 2002). Na JMT a proporção FTI/FTII foi igual à observada para os animais controle.

Os valores médios de diâmetro mínimo e área das FTII na JMT, de distróficos, foram iguais aos observados no controle, sugerindo ausência de lesões atróficas ou hipertróficas aparentes. Tal fato sugere que a maior área de contato das FTII (KANNUS et al., 1992; KVIST et al., 1991) e a ligação entre as fibras musculares e tendíneas intermediada pela

integrina (MIOSGE et al., 1999), gere maior estabilidade na JMT, preservando-a do estresse da contração.

A utrofina expressou-se fortemente nos dois tecidos estudados corroborando com o descrito para os músculos sóleo e extensor longo dos dedos (CHAKKALAKAL et al., 2004; CHAKKALAKAL et al., 2006) e a JMT de camundongos distróficos (MIOSGE et al., 1999; PEARCE et al., 1996; WELSER et al., 2009). A JMT apresentou-se mais preservada morfológicamente que o MG. Este fato sugere que a utrofina não seja a única proteína estabilizadora agindo nessa região. Acredita-se então, que a ação conjunta com outra proteína, como a integrina, normalmente encontrada na JMT, desempenhe papel importante na organização e manutenção estrutural dessa região.

O aumento significativo de células CD4 e CD8 nos distróficos sugerem fortemente a ação do sistema imune no processo inflamatório na DMGR, apoiando outros estudos em pacientes humanos com DMD (BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008; McDOUALL et al., 1990) e cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses (MIYAZATO, 2010). Não foi observada diferença estatística entre o número de células CD4 e CD8 no MG e na JMT dos distróficos. Esses achados contrariam os estudos que descreveram a predominância de CD8 ou de CD4 no músculo de camundongos *mdx* (ARAHATA; ENGEL, 1988; EMSLIE-SMITH et al., 1989; ENGEL; ARAHATA, 1986; SPENCER et al., 1997); em cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses (MIYAZATO, 2010) e em humanos com DMD (McDOUALL et al., 1990). Entretanto, reforçam o fato de que os infiltrados linfocitários possuem localização e intensidade variáveis no músculo de cães distróficos (COOPER et al., 1988; SPENCER et al., 2001).

O número semelhante de células CD4 e CD8, observado neste estudo, indica ação conjunta destas células no músculo distrófico, sem que uma se sobreponha à outra. A interação entre CD4 e CD8 foi descrita em estudos com camundongos *mdx*, onde a ação da interleucina-2, liberada por CD4 agiu favoravelmente sobre a proliferação de células CD8 (GONZÁLEZ-QUINTIAL et al., 1996; UTZ; McFARLAND, 1994).

A imunoexpressão de MHCII nos distróficos variou de escassa a moderada. Foi observada em macrófagos e áreas de necrose e degeneração, confirmando os estudos que relataram sua expressão em cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses (MIYAZATO, 2010) e humanos com DMD (KARPATI et al., 1988; McDOUALL et al., 1989). O MHCII é responsável pela apresentação e ativação de células CD4 que associadas aos macrófagos ativam substâncias microbidas potentes que destroem patógenos fagocitados (SPENCER,

TIDBALL, 2001). Desse modo, neste estudo, há indícios de que células CD4 possam ativar macrófagos e induzir a migração de CD8, à semelhança do observado para outros músculos em cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses (MIYAZATO, 2010).

A expressão do antígeno MHC I foi evidenciada na superfície de miofibras distróficas e em áreas de necrose, regeneração e inflamação e corroboram com os descritos para os músculos vasto lateral, reto femoral, deltóide e quadríceps de pacientes humanos com DMD (APPLEYARD et al., 1985; BEHRENS et al., 1998; EMSLIE-SMITH et al., 1989; KARPATI et al., 1988; McDOUALL et al., 1989) e para os músculos masseter, parte costal do diafragma, bíceps do braço, cabeça longa do tríceps do braço, semitendinoso, semimembranoso, cabeça superficial do bíceps femoral e sartório cranial de cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses (MIYAZATO, 2010). Os graus de expressão do MHC I foram mais moderados na JMT de distróficos. Sua presença nas células-alvo é indispensável para que ocorra a ação citotóxica de células CD8 (MARTZ et al., 1983; McMICHAEL, 1980). Nestas condições, a menor expressão de MHC I nas miofibras da JMT pode estar relacionada com a menor ativação de CD8 e conseqüentemente menor lesão das miofibras, embora outros fatores como a atuação de citocinas e de moléculas co-estimulatórias possam contribuir para este fato.

A imunoexpressão da vimentina foi intensa na JMT e no MG de distróficos. A presença dessa proteína também foi relatada na musculatura distrófica de humanos com DMD (GALLANTI et al., 1992). A vimentina age no processo regenerativo e é responsável pela migração, fusão e modelagem estrutural de células miogênicas (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; VAITTINEN et al., 2001). A forte intensidade de imunomarcagem observada nesse estudo discorda de outras em cães DMGR com idades entre 10 e 36 meses, onde esta se expressou fracamente em oito músculos avaliados (MIYAZATO, 2010). Esses achados sugerem que o MG e a JMT mantêm sua capacidade regenerativa mesmo nos estágios finais da doença.

No MG e JMT de animais distróficos foram observados focos de células inflamatórias predominantemente mononucleares próximos às fibras necróticas e debrís celulares. Após a lesão muscular os macrófagos são capazes de promover lesão ou reparo, de acordo com o fenótipo. Os macrófagos da linhagem M1, presentes na fase aguda da injúria muscular em camundongos *mdx*, são responsáveis pela lise das miofibras por ação citotóxica do óxido nítrico, obtido da transformação do iNOS, na presença da arginina. Em fases mais tardias, a população de macrófagos observada é a linhagem M2, que promove crescimento e

regeneração muscular através do uso competitivo da arginina com M1 (ST PIERRE; TIDBALL, 2004; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007; VILLALTA et al., 2008). Durante esta fase, os macrófagos M2 são responsáveis pela fagocitose e proteólise do material necrótico, com liberação de fatores de crescimento responsáveis pela migração e ativação de células satélites (VILLALTA et al., 2008). Com a intensa imunomarcagem de fibras em regeneração, observada nesse estudo, acredita-se que a população predominante de macrófagos seja a M2, que pela competição com M1 pelo uso da arginina, reduz a ação citotóxica dos mesmos.

Considerando a preservação morfofuncional da JMT observada nesse estudo acredita-se que uma série de fatores possa agir em conjunto. Um deles seria a maior ancoragem de FTII, gerando lesões menos intensas com menor liberação de proteínas citosólicas, e conseqüentemente menor expressão do complexo MHCI, responsável pela apresentação e ativação de células T citotóxicas, que modulam as lesões das miofibras.

Estudos sobre a conservação morfológica das FTII e o sistema imune na JMT ainda são necessários, mas esses resultados colaboram nas investigações sobre a fisiopatogenia da DMGR.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a preservação morfológica da junção músculo tendínea pode ter relação direta com a melhor estabilização das fibras do tipo II, menor expressão do complexo de histocompatibilidade de classe I e menor ação do sistema imune.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.; VICTOR, M. **Neurologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1996.

APPLEYARD, S.T.; DUNN, J.J.; DUBOWITZ, V.; ROSE, M.L. Increased expression of the HLA abc class I antigens by muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy and other neuromuscular disorders. **The Lancet**, v. 16, p. 361-363, 1985.

ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV. Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 2, p. 168-173, 1988.

BAROHN, R.J. Distrofias musculares. In: BENNETT, J.C.; GOLDMAN, L. **Cecil - tratado de medicina interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. v.2, cap. 506, p. 2458-2462.

BEHRENS, L.; KERSCHENSTEINER, M.; MISGELD, T.; GOEBELS, N.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Human muscle cells express a functional costimulatory molecule distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) *in vitro* and in inflammatory lesions. **The Journal of Immunology**, v. 161, n.11, p. 5943-5951, 1998.

BERGMAN, R.L.; INZANA, K.D.; MONROE, W.E.; SHELL, L.G.; LIU, L.A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G.D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2002.

BERKE, G. The CTL's kiss of death. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 9-12, 1995.

BLAKE, D.J.; WEIR, A.; NEWAY, S.E.; DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiological Review**, v. 82, p. 291-329, 2002.

BORNEMANN, A.; SCHMALBRUCH, H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. **Muscle & Nerve**, v. 15, n. 1, p. 14-20, 1992.

BRAUNT, K.G.; LINCOLN, C.E. Histochemical differentiation of fiber types in neonatal canine skeletal muscle. **The American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 3, p. 407-415, 1981.

BRAUNT, K.G.; HOFF, E.J.; RICHARDSON, K.E.Y. Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. **The American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 4, p. 561-565, 1978.

BRUNELLI, S.; ROVERE-QUERINI, P. The immune system and the repair of skeletal muscle. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 117-121, 2008.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984.

CAI, B.; SPENCER, M.J.; TSENG-ONG, L.; NAKAMURA, G.; TIDBALL, J.G. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cells effectors. **The American Journal of Pathology**, v. 156, p. 1789-1796, 2000.

CHAKKALAKAL, J.V.; HARRISON, M.A.; CARBONETTO, S.; CHIN, E.; MICHEL, R.N.; JASMIN, B.J. Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in *mdx* mice. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 4, p. 379-388, 2004.

CHAKKALAKAL, J.V.; MICHEL, S.A.; CHIN, E.R.; MICHEL, R.N.; JASMIN, B.J. Targeted inhibition of Ca^{2+} /calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in *mdx* mouse muscle. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 9, p. 1423-1435, 2006.

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiological Review**, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.

CLOSE, R.I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 129-127, 1972.

COLLINS, C.A.; MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v.84, n.4, p.165-172, 2003.

COOPER, B.J.; WINAND, N.J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B.A.; HOFFMAN, E.P.; KUNKEL, L.M.; SCOTT, M.O.; FISCHBECK, K.H.; KORNEGAY, J.N.; AVERY, R.J. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, n. 6178, p. 154-156, 1988.

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

CULLEN, M.J.; FULTHORPE, J.J.; HARRIS, J.B. The distribution of desmin and titin in normal and dystrophic muscle. **Acta Neuropathologica**, v. 83, n. 2, p. 158-169, 1992.

CULLEN, M.J.; MASTAGLIA, F.L. Morphological changes in dystrophic muscle. **British Medical Bulletin**, v. 36, n. 2, p. 145-152, 1980.

DUBOWITZ, V. Normal muscle. In: **Muscle biopsy – a practical approach**. 2. ed. Londres: Bailliere Tindall, 1985. cap. 3, p. 41-81.

DUCHENNE, G.B. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclerosique. **Archives Generales de Médecine**, v. 11, p. 421-552, 1868.

EMERY, A.E.H. Duchenne Muscular Dystrophy. Oxford **Monographs on medical genetics**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1987, v. 15, p.392.

EMSLIE-SMITH, A.M.; ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. **Human Pathology**, v. 20, n. 3, p. 224-231, 1989.

ENGEL, A.G.; ARAHATA, K. Mononuclear cells in myopathies: Quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. **Human Pathology**, v. 17, n. 7, p. 704–721, 1986.

ENGEL, W.K.; CUNNINGHAM, G.G. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. **Neurology**, v. 13, p. 919-923, 1963.

EVANS, N.P.; MISYAK, S.A.; ROBERTSON, J.L., BASSAGANYA-RIERA, J.; GRANGE, R.W. Immune mediated mechanisms potentially regulate the disease time course of Duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. **PM & R: The Journal of Injury, Function, and Rehabilitation**, v.1, n.8, p.755-786, 2009.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Different intermediate-size filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 10, p. 5034-5038, 1978.

GALLANTI, A.; PRELLE, A.; MOGGIO, M.; CISCATO, P.; CHECCARELLI, N.; SCIACCO, M.; COMINI, A.; SCARLATO, G. Desmin and Vimentin as markers of regeneration in muscle diseases. **Acta Neuropathologica**, v. 85, n. 1, p. 88–92, 1992.

GASCHEN, F.; BURGUNDER, J.M. Changes of skeletal muscle in Young dystrophin-deficient cats: a morphological and morfometric study. **Acta Neuropathologica**, v. 101, n. 5, p. 591-600, 2001.

GE, Y.; MOLLOY, M.P.; CHAMBERLAIN, J.S.; ANDREWS, P.C. Differential expression of the skeletal muscle proteome in mdx mice at different ages. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2576-2585, 2004.

GONZÁLEZ-QUINTIAL, R.; BACCALÀ, R.; POPE, R.M.; THEOFILOPOULOS, A.N. Identification of clonally expanded T cells in rheumatoid arthritis using a sequence enrichment nuclease assay. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 5, p. 1335–1343, 1996.

GOROSPE, J.R.; THARP, M.D.; HINCKLEY, J.; KORNEGAY, J.N.; HOFFMAN, E.P. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy. Correlations in dystrophin-deficient human, dogs and mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 122, p. 44-56, 1994.

GOWERS, W.R. Clinical lectures on pseudohypertrophic muscular paralysis. **The Lancet**, v. 2, p. 1-2, 1879.

GRANATA, A.; VECCHI, C.; GRACIOTTI, L.; FULGENZI, G.; MAGGI, S.; CORSI, A. Gamma irradiation can reduce muscle damage in mdx dystrophic mice. **Acta Neurophatologica**, v. 96, n. 6, p. 564–568, 1998.

HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENRIED, P. The regulation of expression of major histocompatibility complex products. **Transplantation**, v. 41, n. 4, p. 413-420, 1986.

HARRIS, H.W.; GILL, T.J. Expression of Class I Transplantation Antigens. **Transplantation**, v. 42, n. 2, p. 109-117, 1986.

HAYS, A.R., ARMBRUSTMACHER, V.W. In: RUBIN, E., FARBER, J.L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.27, p.1363-1389.

HIRSCH, E.; LOHIKANGAS, L.; GULLBERG, D.; JOHANSSON, S.; FÄSSLER, D.R. Mouse myoblasts can fuse and form a normal sarcomere in the absence of $\beta 1$ integrin expression. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 2397-2409, 1998.

HOWELL, J.M.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B.A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, n. 5, p. 325–328, 1997.

HSU, S.M.; RAINER, L.; FANGER, H.A. A comparative study of the peroxidaseantiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 75, p. 734-738, 1981.

JÄRVINEN, M.; KANNUS, P.; KVIST, M.; ISOLA, J.; LEHTO, M.; JOZSA, L. Macromolecular composition of the myotendinous junction. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 55, n. 3, p. 230-237, 1991.

JÄRVINEN, T.A.H.; JOZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T.L.N.; KVIST, T.H.M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 857-866, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I,II and III by sirius red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

KAGI, D.; VIGNAUX, F.; LEDERMAN, B.; BURKI, K.; DEPRAETERE, V.; NAGATA, S.; HENGARTNER, H.; GOLSTEIN, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 528–530, 1994a.

KAGI, D.; LEDERMANN, B.; BURKI, K.; SEILER, P.; ODERMATT, B.; OLSEN, K.J.; PODACK, E.R.; ZINKERNAGEL, R.M.; HENGARTNER, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature**, v. 369, n. 6475, p. 31–37, 1994b.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. The effect of immobilization on myotendinous junction: a ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 144, n. 3, p. 387-394, 1992.

KARPATI, G.; POULIOT, Y.; CARPENTER, S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. **Annals of Neurology**, v. 23, p. 64-72, 1988.

KARPATI, G.; CARPENTER, S.; MORRIS, G.E.; DAVIES, K.E.; GUERIN, C.; HOLLAND, P. Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in

normal and pathological human muscle. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 52, n. 2, p. 119–128, 1993.

KENYON, L.C.; CURTES, M.T. Músculo Esquelético. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin – patologia – bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 27, p. 1415-1438.

KORNEGAY, J.N.; TULER, S.M.; MILLER, D.M.; LEVESQUE, D.C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle & Nerve**, v. 11, n. 10, p. 1056-1064, 1988.

KVIST, M.; JOZSA, L.; KANNUS, P.; ISOLA, J.; VIENO, T.; JÄRVINEN, M; LEHTO, M. Morphology and histochemistry of the myotendineal junction of the rat calf muscles. **Acta Anatomica**, v.141, n.3, p.199-205, 1991.

LATIF, N.; BAKER, M.J.; DUNN, M.J.; ROSE, M.L.; BRADY, P.; YACOUB, M.H. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and Western blotting. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 22, n. 5, p. 1378-1384, 1993.

LAW, D.J.; TIDBALL, J.G. Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in pre-necrotic and fully regenerated skeletal muscle. **American Journal of Pathology**, v. 142, n. 5, p. 1513-1523, 1993.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. **Nature**, v. 283, n. 5744, p. 249-256, 1980.

MAISCH, B. Autoreactivity to the cardiac myocyte, connective tissue and the extracellular matrix in heart disease and postcardiac injury. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 11, n. 4, p. 369-395, 1989.

MARTZ, E.; HEAGY, W.; GROMSOWSKI, S.H. The mechanism of CTL mediated killing: monoclonal antibody analysis of the roles of killer and target-cell membrane proteins. **Immunological Reviews**, v. 72, p. 73-96, 1983.

MAYER , U.; SAHER, G.; FÄSSLER, R.; BORNEMANN, A.; ECHTERMEYER, F.; VON DER MARK, H.; MIOSGE, N.; POSCHL, E.; VON DER MARK, K. Absence of integrin $\alpha 7$ causes a novel form of muscular dystrophy. **Nature Genetics**, v.17, p. 318-323, 1997.

McDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Expression of class I and class II MHC antigens in neuromuscular diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 89, p. 213-26, 1989.

McDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 99, p. 199-217, 1990.

McMICHAEL, A.J. HLA restriction of human cytotoxic T-cells. **Springer seminars in Immunopathology**, v. 3, n. 1, p. 3-22, 1980.

MIOSGE, N.C.; KLENCZAR, R.; HERKEN, M.; WILLEM, U.M. Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of $\alpha 7 \beta 1$ integrin. **Laboratory Investigation**, v. 79, p. 1591-1599, 1999.

MIYAZATO, L.G. **Distrofia muscular no Golden Retriever**. 2005. 82f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MIYAZATTO, L.G. **Histopatologia e imunoistoquímica na distrofia muscular no Golden Retriever**. 2010. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

MIYAZATO, L.G. ; MORAES, J.R.E. ; BERETTA, D. C. Muscular dystrophy in dogs: does the crossing of different breeds influence disease phenotype? **Veterinary Pathology**, v. 13, 2011, doi: 10.1177/0300985810387070.

MONTES, G.S. Structural Biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p.15-27, 1996.

MUIR, L.A.; CHAMBERLAIN, J.S. Emerging strategies for cell and gene therapy of the muscular dystrophies. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, n. 25, p. 181-192, 2009.

NEU, N.; PUMMERER, C.; RIEKER, T.; BERGER, P. T cells in cardiac myosin induced myocarditis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 2, p. 107-110, 1993.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscles lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2-3, p. 100-108, 2002.

OLIVEIRA, A.S.B.; GABBAI, A.A.; MOURA, L.S. Miopatias: atualização no diagnóstico e tratamento. **Diagnóstico e Tratamento**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 20-25, 2002.

PAGEL, C.N.; PARTRIDGE, T.A. Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 164, n. 2, p. 103–116, 1999.

PEARCE, M.; BLAKE, D.J.; TINSLEY, J.M.; BYTH, B.C.; CAMPBELL, L.; ANTHONY, P.; MONACO, A.P.; DAVIES, K.E. The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure. **Human Molecular Genetics**, v. 2, n. 11, p. 1765-1772, 1996.

PLOEGH, H.L.; ORR, H.T.; STROMINGER, J.L. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. **Cell**, v. 24, n. 2, p. 287-299, 1981.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and Picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2008.

SARNAT, H.B. Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibers in developmental myopathies. **Pediatrics International**, v. 33, n. 2, p. 238-246, 1991.

SCHWANDER, M.; LEU, M.; STUMM, M.; DORCHIES, O.M.; RUEGG, U.T.; SCHITTNY, J.; MULLER U. β 1 integrins regulate myoblast fusion and sarcômero assembly. **Developmental Cell**, v. 4, p. 673-685, 2003.

SHELTON, G.D.; LIU, L.A.; GUO, L.T.; SMITH, G.K.; CHRISTIANSEN J.S.; THOMAS, W.B.; SMITH, M.O.; KLINE, K.L.; MARCH P.A.; FLEGEL T., ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal Veterinary intern Medicine**, v. 15, n. 3, p. 204-244, 2001.

SHIM, J.Y.; KIM, T.S. Relationship between Utrophin and Regenerating Muscle Fibers in Duchenne Muscular Dystrophy. **Yonsei Medical Journal**, v. 44, n. 1, p. 15-23, 2003.

SILVA, J.D.M.; COSTA, K.S.; CRUZ, C.M. Distrofia muscular de Duchenne: um enfoque cinesioterapêutico. **Lato & Sensu**, v. 4, n. 1, p. 3-5, 2003.

SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 6, p. 556-564, 2001.

SPENCER, M.J.; WALSH, C.M.; DORSHKIND, K.A.; RODRIGUEZ, E.M.; TIDBALL, J. G. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 11, p. 2745–2751, 1997.

SPENCER, M.J.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K.; TIDBALL, J.G. Helper (CD4+) and Cytotoxic (CD8+) T Cells Promote the Pathology of Dystrophin-Deficient Muscle. **Clinical Immunology**, v. 98, n. 2, p. 235–243, 2001.

ST PIERRE, B.A.; TIDBALL, J.G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 1, p. 290–297, 1994.

STEINERT, P.M.; JONES, J.C.R.; GOLDMAN, R.D. Intermediate filaments. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 22s-27s, 1984.

STEVENS, A., LOWE, J. Sistema nervoso e muscular. In: STEVENS, A., LOWE, J. **Patologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 19, p. 398-437.

TIDBALL, J.G.; WELLING-HENRICKS, M. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 17, p. 703-713, 2005.

TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. 1, p. 327–336, 2007.

TIDBALL, J.G.; ALBRECHT, D.E.; LOKENSGARD, B.E.; SPENCER, M.J. Apoptosis precedes necrosis in dystrophin-deficient muscle. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 6, p. 2197–2204, 1995.

TIZARD, I.R. Células T Auxiliares e suas Respostas aos Antígenos. In: TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. 6. ed. São Paulo: Rocca, 2002. cap. 10, p. 108-120.

TRAUB, P. **Intermediate filaments: a review**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 266 p.

UTZ, U.; McFARLAND, H.F. The role of T cells in multiple sclerosis: implications for therapies targeting the T cell receptor. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 53, n. 4, p. 351–358, 1994.

VAITTINEN, S.; LUKKA, R.; SAHLGREN, C.; HURME, T.; RANTANEN, J.; LENDAHL, U.; ERIKSSON, J.E.; KALIMO, H. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 60, n. 6, p. 588-97, 2001.

VALENTINE, B.A.; COOPER, B.J.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 1-23, 1990.

VALENTINE, B.A.; CUMMINGS, J.F.; GALLAGHER, E.A. Development of Duchenne-type cardiomyopathy: Morphologic studies in canine model. **American Journal of Pathology**, v. 135, n. 4, p. 671-678, 1989.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; HARRIS, J.B. The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle *in vivo*. **The Histochemical Journal**, v. 26, n. 12, p. 916-928, 1994.

VILLALTA, S.A.; NGUYEN, H.X.; DENG, B.; GOTOH, T.; TIDBALL, J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 3, 2009.

VOLK, T.; FESSLER, L.I.; FESSLER, J.H. A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. **Cell**, v. 63, p. 525 – 536, 1990.

WALSH, C.M.; MATLOUBIAN, M.; LIU, C.C.; UEDA, R.; KURAHARA, C.G.; CHRISTENSEN, J.L.; HUANG, M.T.; YOUNG, J.D.; AHMED, R.; CLARK, W.R. Immune function in mice lacking the perforin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 23, p. 10854–10858, 1994.

WELSER, J.V.; ROONEY, J.E.; COHEN, N.C.; GURPUR, P.B.; SINGER C.A.; EVANS, R.A.; HAINES, B.A.; BURKIN, D.J. Myotendinous Junction Defects and Reduced Force Transmission in Mice that Lack $\alpha 7$ Integrin and Utrophin. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 4, p. 1545-1554, 2009.

WERNECK, L. Perspectivas em Doenças Neuromusculares: Distrofia Muscular de Duchenne. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.30, n.3, p.33-35, 1994.

WHITEHEAD, N.P.; YEUNG, E.W.; ALLEN, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v.33, n.7, p.657-562, 2006.

ZATZ, M.; VAINZOF, M.; PASSO-BUENO, M.R. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. **Current Opinion in Neurology**, v. 13, n. 5, p. 511-517, 2000.

ZYCHLINSKY, A.; ZHENG, L.M.; LIU, C.C.; YOUNG, J.D. Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 393–400, 1991.