

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2, MHC E DA
UTROFINA NA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA EM CÃES**

**Gabriela Noronha de Toledo
Médica Veterinária**

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2, MHC E DA
UTROFINA NA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA EM CÃES**

Gabriela Noronha de Toledo
Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

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

2012

T649 Toledo. Gabriela Noronha de
pf Participação de macrófagos M1 e M2, MHC e da utrofina na
distrofia muscular progressiva em cães./ Gabriela Noronha de
Toledo. -- Jaboticabal, 2012
x, 57 f. : viii. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
2012

Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Rosemeire de Oliveira
Vasconcelos, Carlos Eduardo Ambrósio
Bibliografia

1. Golden Retriever. 2. imuno-histoquímica. 3.
histopatologia. 4: músculo. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU. 619:616. 74.636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus
de Jaboticabal.
e-mail: bitoledo@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela Noronha de Toledo – Filha de Rommel Ricardo Alves de Toledo e Maria Teresinha de Noronha Toledo nasceu em 16 de dezembro de 1980, em Franca, São Paulo, onde cursou ensino fundamental e médio, concluído em dezembro de 1998. Em 2000, após aprovação no vestibular, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Franca - Unifran, onde se graduou Médica Veterinária em dezembro de 2004. No ano de 2006, após seleção, ingressou no Programa de Residência em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica de Pequenos Animais, da Universidade de Marília – Unimar, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Bonini Abreu dos Santos. Obteve o título de especialista em Clínica Médica de Pequenos Animais em fevereiro de 2008. Em agosto de 2010, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (mestrado), área de concentração Patologia Animal no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes.

DEDICO

À Deus que me guiou, iluminou e deu forças para que continuasse a busca naquilo que almejei.

À minha família, meus queridos pais, Rommel e Teresinha e meu irmão Daniel, pelo amor constante, pela intensa dedicação, pelo apoio e por caminharem ao meu lado, sempre.

À minha avó, Maria Clara, pelo exemplo de vida.

Ao meu amado e estimado cão Pluto (*in memorian*), amigo fiel e companheiro por toda vida.

Aos queridos amigos que fiz em Jaboticabal: as minhas amigas e companheiras da república Casa da Bia: Juliana Kami Mura Maceri, Gabriella Marcondes Dobashi Hirata, Gabriela Cristina Zoccal Volpato, Bruna Piva Maria e aos meninos da república Nazarena: Gustavo Oda, Fabio Nelson Gava, Bruno Watanabe Minto, Thiago Demarchi Munhoz, Marcelo Augusto Koury, Maurício Durante Christofolletti, pessoas com as quais passei alguns dos melhores momentos da minha vida. Obrigada pela amizade, pelos momentos divertidos que estarão para sempre na minha memória.

Aos amigos da pós-graduação: Hurzana de Mello, Ana Carolina da Silva, Marina Tié Shimada, Wilson Gómez Manrique, Márcio de Barros Bandarra, Pamela Rodrigues Reina Moreira, Geórgia Modé Magalhães, pela presença constante, carinho e incentivo na busca de mais uma conquista.

Aos amigos que não foram mencionados, mas que participaram indiretamente na realização deste projeto e tiveram grande importância.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Julieta Rodini Engrácia de Moraes, pela oportunidade ao aceitar esta orientação, pelos ensinamentos e possibilitar a concretização deste trabalho.

Especialmente aos companheiros de pesquisa: Daniel Cortes Beretta e Pamela Rodrigues Reina Moreira, pela cumplicidade, ajuda e dedicação sempre que precisei.

Novamente aos amigos da pós-graduação: Hurzana de Mello, Ana Carolina da Silva, Marina Tié Shimada, Wilson Gómez Manrique, Márcio Bandarra, Geórgia Modé Magalhães, Mayara Caroline Rosolem, Gustavo Claudiano pela participação direta ou indireta na realização deste trabalho, nos diversos momentos em que me ajudaram, aconselharam, esclareceram dúvidas, pelas sugestões ou simplesmente quando conversamos pelo Departamento.

Aos professores doutores Carlos Eduardo Ambrósio e Rosemeire de Oliveira Vasconcelos pelas correções e sugestões feitas que contribuíram muito para este trabalho.

À banca examinadora que esteve presente no Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa e Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, meus sinceros agradecimentos pelas correções feitas.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pela análise estatística.

Ao Prof. Dr. Jair Rodini Engrácia Filho pelas sugestões na redação desta dissertação.

Aos demais professores do Departamento de Patologia Veterinária pela ajuda e aprendizado e momentos agradáveis proporcionados durante a realização do mestrado.

Aos técnicos do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV, Edgar Homem, Francisca de Assis Ardison, Moema Ogassawara, pelo acolhimento e grande auxílio durante o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio pesquisa (Processo Nº 2011/07906-0).

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal) por ter me acolhido.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO-----	iii
ABSTRACT-----	iv
LISTA DE ABREVIATURAS-----	v
LISTAS DE TABELAS-----	vi
LISTA DE FIGURAS-----	vii
1. INTRODUÇÃO-----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA-----	5
2.1 Considerações gerais-----	5
2.2 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)-----	5
2.3 Cães Golden Retriever como modelo para estudo da DMD-----	6
2.4 Lesões na distrofia muscular do Golden Retriever (DMGR)-----	8
2.5 Participação dos macrófagos M1 (CD68) e M2 (CD163) na distrofia muscular-----	10
2.6 Participação do complexo MHC na distrofia muscular-----	14
2.7 Utrofina no músculo distrófico-----	15
3. OBJETIVOS-----	17
4. MATERIAL E MÉTODOS-----	17
4.1 Amostras e grupos-----	17
4.2 Histopatologia-----	18
4.3 Imuno-histoquímica-----	19
4.4 Análises estatísticas-----	22
5. RESULTADOS-----	22
5.1 Avaliações histopatológicas-----	22
5.2 Imuno-histoquímica-----	28
5.2.1 Imunomarcção da utrofina-----	28
5.2.2 Imunomarcção de macrófagos M1 (CD68) e M2 (CD163) -----	30
5.2.3 Imunomarcção do antígeno MHC I-----	33
5.2.4 Imunomarcção do antígeno MHC II-----	34
6. DISCUSSÃO-----	36
7. CONCLUSÕES-----	42
8. REFERÊNCIAS -----	43

PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2, MHC E DA UTROFINA NA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA EM CÃES

RESUMO – O objetivo do trabalho foi caracterizar lesões musculares e estudar marcação de dois subtipos de macrófagos, M1 (CD68) e M2 (CD163) além de MHC I, MHC II e utrofina, nos músculos mais acometidos pela doença (masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral) em cães distróficos de diferentes idades. Foram utilizadas amostras musculares de 17 cães Golden Retriever (GR) machos e três controles não distróficos e livres de anormalidades neuromusculares, distribuídos em dois grupos: GI – animais distróficos até um ano de idade (n=9) e GII – animais distróficos acima de um ano de idade (n=8). Lesões histopatológicas características foram identificadas e classificadas nos quatro músculos distróficos: hialinização, infiltrado inflamatório mononuclear, necrose, regeneração, atrofia e hipertrofia, calcificação distrófica, fibrose e infiltração adiposa. As lesões variaram em extensão e distribuição de acordo com os músculos e o animal. Resultados mostraram que a imunodeteção do CD163 foi maior que a marcação de CD68 nos dois grupos. CD68 não mostrou variação independente da idade dos animais. A imunodeteção de MHC I foi mais evidente no bíceps femoral e tríceps braquial, seguida de marcações moderadas no masseter e diafragma do grupo com idade superior a um ano de idade. MHC II expressou-se de maneira discreta nos quatro músculos distróficos de ambos os grupos. A imunomarcação de utrofina foi maior no grupo afetado com idade superior a um ano de idade. Conclui-se que os macrófagos M2 estão entre as principais células inflamatórias mononucleares presentes nas lesões em cães distróficos e que com a idade ocorre aumento moderado de M2 no músculo de cães Golden Retriever distróficos indicando a associação deste tipo celular com a cronicidade da lesão muscular nestes animais.

Palavras chave: células inflamatórias, Golden Retriever, histopatologia, imuno-histoquímica, músculo.

PARTICIPATION OF M1 AND M2 MACROPHAGES, MHC AND UTROPHIN IN THE PROGRESSIVE MUSCULAR DYSTROPHY IN DOGS.

ABSTRACT – The objective was to characterize the lesions and study the expression of two subtypes of macrophages, M1 (CD68) and M2 (CD163) beyond MHC I, MHC II and utrophin in the most affected muscles by the disease (masseter, diaphragm, triceps braquii and biceps femoris) in dystrophic dogs of different ages. Samples muscle of 17 male Golden Retriever dogs and three controls non dystrophic and free of neuromuscular diseases were classified into two groups: G I - dystrophic animals under one year (n = 9) and G II - dystrophic animals over one year (n = 8). Pathological features were identified and classified in four dystrophic muscles: hyalinization, inflammatory infiltration, necrosis, regeneration, hypertrophy and atrophy, dystrophic calcification, fibrosis and fat infiltration. These lesions varied in extent and distribution according to the muscles and the animal evaluated. The results showed that the CD163 immunostaining detected in GRMD dogs was greater than marking CD68 in both groups. CD68 did not vary regardless of the age of the animals. The immunohistochemical expression of MHC I was most evident in the biceps femoris and triceps braquii, followed by moderate staining in the masseter and diaphragm in the group aged over one year old. MHC II expressed discretely in the four dystrophic muscles of both groups. The immunohistochemical expression of utrophin was higher in the affected group aged less than one year old. We concluded that the macrophage M2 were the main mononuclear inflammatory cells present in the dystrophic lesions in dogs. With the age there is a moderate increase of M2 macrophage in dystrophic muscle Golden Retriever dogs indicating the association of this cell type with the chronicity of muscle damage in these animals.

Key-words: Golden Retriever, histopathology, inflammatory cells, immunohistochemistry, muscle.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARS – Alizarina Red S

bLHL - basic helix-loop-helix

Camundongo *mdx* - distrofia muscular com mutação no cromossomo X

DMB – Distrofia muscular de Becker

CDG - Complexo distrofina glicoproteínas

CK – Creatina quinase

DMD – Distrofia muscular de Duchenne

DMGR – Distrofia muscular do Golden Retriever

FCN – Fibra cálcio negativa

FCP – Fibra cálcio positiva

FTI – Fibras musculares do tipo I

FTII - Fibras musculares do tipo II

GRMD – Golden Retriever muscular dystrophy

HE – Hematoxilina-eosina

IL – Interleucina

JMT – Junção músculo tendínea

JNM – Junção neuromuscular

LDLs - Lipoproteínas de baixa densidade

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MHCI – Complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHCII – Complexo principal de histocompatibilidade classe II

μm - micrômetros

NO - Óxido nítrico

iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida

PBS – Tampão salina fosfato

SRD – Sem raça definida

TGM – Tricômio de Gomori modificado

Th1 – Células T auxiliares 1

Th2 – Células T auxiliares 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

IFN- γ - Interferon- γ

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características histopatológicas de músculos de cães distróficos agrupados em graus de lesões corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Gomori modificado (TGM) segundo a classificação de Nguyen et al. (2002). -----	19
Tabela 2.	Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica para utrofina, CD68, CD163, MHC I e MHC II. Jaboticabal, SP, 2012.-----	20
Tabela 3.	Alterações histopatológicas encontradas e escore predominante observado nos grupos de cães Golden Retriever distróficos com menos de um ano de idade (grupo I) e acima de um ano de idade (grupo II). Jaboticabal, SP, 2012.-----	24
Tabela 4.	Média e desvio padrão da imunomarcção da utrofina nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012. -----	29
Tabela 5.	Média e desvio padrão de macrófagos M1 (CD68) nos músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012.-----	30
Tabela 6.	Média e desvio padrão de macrófagos M2 (CD163) nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012.-----	31
Tabela 7.	Média e desvio padrão da imunomarcção de MHC I e MHC II nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012.-----	33
Tabela 8.	Resumo das reações de imunohistoquímica encontradas nas fibras musculares e escore predominante observado nos grupos de cães Golden Retriever distróficos e controle. Jaboticabal, SP, 2012.-----	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de fibras musculares em cães distróficos. A. Músculo tríceps braquial. Observar hipertrofia e atrofia das fibras musculares (setas), (G II). Barra: 20 μm . B: Músculo masseter. Observar necrose das fibras musculares (detalhe) (G I). Barra 10 μm . Hematoxilina e eosina.----- 25
- Figura 2.** Fotomicrografia de fibras musculares em cães distróficos. A: Músculo diafragma. Observar presença de fibras musculares hialinizadas (setas), (G II) Barra: 20 μm . B: Músculo masseter. Observar fibrose endomisial exuberante das fibras musculares (setas), (G I) Barra: 50 μm . Hematoxilina e eosina.----- 26
- Figura 3.** Fotomicrografia de fibras musculares em cães distróficos. **A:** Músculo bíceps femoral. Observar presença de cálcio intracelular no interior das fibras musculares (setas), (G I). Barra: 100 μm . Alizarina Red S **B:** Músculo masseter. Observar presença de fibrose e infiltrado inflamatório mononuclear nas fibras musculares (setas), (G II). Barra: 100 μm . Hematoxilina e eosina.----- z27
- Figura 4.** Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica para utrofina em cães distróficos Imunomarcção de utrofina no sarcolema no músculo masseter (setas), complexos de polímeros ligados a peroxidase. Barra 10 μm .----- 29
- Figura 5.** Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica macrófagos em cães distróficos. A: Imunomarcção de CD68 no músculo masseter (setas), complexos de polímeros ligados a peroxidase Notar discreta marcação de células. B: Imunomarcção de CD163 no músculo diafragma, complexo estreptoavidina biotina peroxidase. Barra 30 μm . ----- 32

Figura 6. Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica para MHC I e II em cães distróficos. A: Imunomarcção de MHC I no músculo tríceps braquial de cão DMGR (setas), complexos de polímeros ligados a peroxidase. Observar imunomarcção em grupos de células inflamatórias mononucleares em área de degeneração e necrose. Barra: 50 μm . B: imunomarcção de MHC II no músculo tríceps braquial de cão DMGR (setas), notar discreta marcação de células, complexo estreptoavidina biotina peroxidase. Barra: 100 μm 36

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma afecção grave que leva a degeneração e perda progressiva da função da musculatura esquelética e cardíaca

(BUSHBY et al., 2010; KORNEGAY et al., 2012; LEYSER et al., 2012). Existem pelo menos 30 formas diferentes de manifestação clínica em humanos, cuja herança pode ser autossômica dominante, recessiva ou recessiva ligada ao cromossomo X e que acometem frequentemente homens (ZATZ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; ANTHONY et al., 2010). Este tipo de distrofia muscular é causada pela deficiência na síntese de distrofina, proteína que liga o citoesqueleto à matriz extracelular, levando à fraqueza progressiva. Esta proteína é importante na manutenção da integridade estrutural do músculo durante o processo de contração (SHELTON et al., 2001; FAYSSOIL et al., 2010). As fibras musculares deficientes em distrofina não possuem a interação normal entre o sarcolema e a matriz extracelular (STEVENS e LOWE, 1998). Este fato leva ao aumento da fragilidade osmótica, com liberação de enzimas musculares solúveis como a creatina quinase (CK) e o influxo excessivo dos íons de cálcio que ativam as proteases intracelulares e o sistema complemento provocando necrose das fibras musculares (BAROHN, 2001; COZZI et al., 2001; HAYS e ABRUSTMACHER, 2002).

Tanto no homem quanto no cão, a transmissão da distrofia muscular ocorre através de fêmeas portadoras assintomáticas ou pelo aparecimento de casos isolados oriundos de mutações no gene da distrofina (SHELTON et al., 2001).

Mutações espontâneas no gene da distrofina induzindo distrofia muscular ligada ao cromossomo X foram identificadas em muitas raças de cães domésticos como o Golden Retriever (GR) (COOPER et al., 1988), Rottweiler, (PARTRIDGE e BOU-GARCIA, 2007), Beagle (SHIMATSU et al., 2003), Labrador Retriever, Pastor Belga, Terrier Irlandês, Old English Sheepdog, Samoyeda, Schnauzer miniatura, entre outros (BERGMAN et al., 2002; JONES et al., 2004; WIECZOREK, et al., 2006; BALTZER et al., 2007). Dentre estas raças, a distrofia muscular do Golden Retriever (DMGR) é a mais estudada e a melhor caracterizada. O cão afetado apresenta alterações musculares semelhantes às observadas em humanos, caracterizando-o assim como modelo experimental mais adequado para estudo da doença (COOPER et al., 1988).

As principais lesões descritas na doença incluem hipertrofia, atrofia, fibrose no músculo esquelético, miofibras em degeneração, necrose, hialinização, acúmulo de cálcio intracelular e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. Estas lesões variam de acordo com o grupo muscular e o estágio da doença e são

observadas tanto em cães DMGR (MIYAZATO et al., 2011a) quanto em pacientes DMD (STEVENS e LOWE, 1998). Em ambos, o óbito é ocasionado por falha cardio-respiratória e agravamento progressivo dos sintomas (BUSHBY et al., 2010; MIYAZATO et al., 2011b). Além da hipertrofia da musculatura, os sinais clínicos e laboratoriais incluem fraqueza muscular, disfagia, tremores, intolerância ao exercício, deformidade e deslocamento dos membros e atividade sérica de CK elevada (SHELTON et al., 2001; BERGMAN et al., 2002).

A técnica de imuno-histoquímica abriu novas perspectivas na identificação de fenótipos celulares, receptores celulares, citocinas e quimiocinas (HALL e ROJKO, 1996). Esta abordagem é utilizada para investigar e caracterizar lesões espontâneas ou patológicas de diversos órgãos e tecidos (GOLBAR et al., 2012). Nas distrofinopatias, o emprego de vários anticorpos específicos para marcação de proteínas musculares é utilizado como ferramenta essencial para estabelecer o diagnóstico (GOLLA et al., 2010).

Os monócitos que migram para os tecidos durante o processo inflamatório diferenciam-se em macrófagos ativados com base na sua exposição a diferentes mediadores químicos. Estes subconjuntos de macrófagos exibem marcadores moleculares distintos e funções específicas (ARIEL e SERHAM, 2012).

Os macrófagos são classificados principalmente em três tipos celulares: macrófagos exsudativos, residentes (histiócitos, células de Kupffer) e células dendríticas. Estes diferem na sua distribuição pelo tecido, morfologia, ontogenia e imunofenótipos (DAMOISEAUX et al., 1994; TAKAHASHI et al., 1996; VALLEDOR et al., 1998). Os macrófagos possuem funções heterogêneas, tais como: apresentação de antígeno, fagocitose e produção de citocinas, dependendo das condições do microambiente (TAKAHASHI et al., 1996; YAMATE et al., 2000; GOLBAR et al., 2012).

Durante a regeneração do músculo na DMD, há dois tipos de macrófagos envolvidos na miogênese e angiogênese que desempenham papéis diferentes na reparação muscular de acordo com seu estado de ativação (ARNOLD et al., 2007).

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 (NO), obtido da transformação da

enzima óxido nítrico sintetase induzida (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).

A tarefa de exibir antígenos para o reconhecimento é executada por proteínas especializadas que são codificadas por genes em um locus chamado de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (HALLORAN et al., 1986).

Os genes do MHC codificam proteínas importantes na ativação de antígenos específicos na resposta imune (GREGERSEN et al., 2006) e o MHC é expresso na superfície das células nucleadas dos mamíferos (HALLORAN et al., 1986). As interações entre essas moléculas contribuem tanto para a imunidade inata quanto para a adaptativa (PARHAM, 2005).

O MHC é caracterizado por um conjunto de alelos altamente polimórficos apresentando antígenos das classes I e II, incorporados em mais de 230 loci e coletivamente associados a mais de 100 patologias (SHIINA et al., 2006).

A utrofina é uma proteína muscular que interage com as mesmas proteínas citoesqueléticas da 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 saudáveis, a utrofina pode expressar-se na junção neuromuscular (JNM), músculo tendínea, vasos e nervos, além de participar dos processos de formação e regeneração muscular (KARPATI et al., 1993; MARBINI et al., 1996; RADOJEVIC e BURGUNDER, 2000; SHIM e KIM, 2003; BERETTA, 2011).

Em camundongos *mdx* (distrofia muscular com mutação no cromossomo X), a utrofina compensa a falta de distrofina mantendo a interação entre o citoesqueleto de actina e o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) no sarcolema (BANKS e CHAMBERLAIN, 2008). A imunomarcagem de anticorpos anti-utrofina é positiva e com intensidade variável na musculatura esquelética distrófica (MARBINI et al., 1996; BERETTA, 2011).

Na literatura consultada, dados sobre alterações musculares relacionadas à distrofia muscular no modelo canino são escassos. Não há relatos de estudos que caracterizem a participação de células inflamatórias mononucleares nos processos de degeneração e/ou regeneração de músculos afetados por esta enfermidade e nem comparação das lesões musculares relacionadas à evolução do processo inflamatório. Com isso o presente trabalho, utilizando cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular, realizou um estudo morfológico e imunohistoquímico sistemático que caracterizou e estabeleceu comparação entre essas lesões e as alterações das células inflamatórias mononucleares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

2.2 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

Dentre as doenças neuromusculares incluem-se as distrofias que são miopatias hereditárias caracterizadas por fraqueza e degeneração muscular progressiva com consequente substituição deste por tecido conectivo de características fibroadiposas (BAROHN, 2001).

As primeiras descrições da DMD em humanos referiam a hipertrofia dos músculos da panturrilha como uma das características mais marcantes. Similarmente cães DMGR adultos apresentam hipertrofia dos músculos dos membros torácicos, língua, diafragma, sartório, do esôfago e atrofia dos demais músculos esqueléticos (MIYAZATO et al., 2011b).

As distrofias musculares mais comuns envolvem mutações do CDG (complexo distrofina glicoproteínas), constituído pelas proteínas intracelulares distrofina e sintrofina e pelas proteínas sarcolemas distroglicanas (subunidades α e β) e sarcoglinas (subunidades α , β , γ e δ) (SPENCE et al., 2002).

A distrofina é uma proteína citoesquelética de grande importância na manutenção da integridade estrutural do músculo durante o processo de contração (SHELTON et al., 2001). Esta proteína está presente na musculatura lisa, cardíaca e esquelética e age como uma âncora entre o citoesqueleto intracelular de actina e o CDG (HOFFMAN et al.;1987).

Os efeitos da deficiência de distrofina variam entre espécies e dentro da mesma espécie, entretanto, as variações fenotípicas entre os músculos com ausência de distrofina ainda são pouco compreendidas (HOFFMAN e GOROSPE, 1991).

2.3 Cães Golden Retriever como modelo para estudo da DMD

Miopatias ligadas ao cromossomo X foram descritas em animais de laboratório como camundongos (WHITEHEAD et al., 2006) e de companhia como cães e gatos (GASCHEN e BURGUNDER, 2001; BERGMAN et al., 2002). Entretanto, modelos experimentais como os camundongos *mdx* e gatos, possuem características clínicas e morfofuncionais diferentes da DMD em humanos (COLLINS e MORGAN, 2003).

Camundongos e cães com distrofia muscular, ambos apresentando defeito na síntese de distrofina dos tecidos musculares, são modelos experimentais para o estudo da DMD em humanos (COZZI et al., 2001; NGUYEN et al., 2002). Porém, os cães constituem-se nas melhores fenocópias da doença no homem, quando comparados com outros modelos animais (BOGDANOVICH et al., 2003; COLLINS e MORGAN, 2003; PELLEGRINO et al., 2007).

Colônias de cães com distrofia muscular foram estabelecidas e estudos sobre genética, clínica, patogenia, biologia molecular e imunocitoquímica realizados no modelo canino são úteis para avaliar a DMD em humanos (PELLEGRINO et al., 2007).

A distrofia muscular canina ligada ao cromossomo X é reconhecida e mais bem caracterizada em cães GR, nos quais a doença ocorre de forma espontânea (SHIMATSO et al., 2003). O cão GR é utilizado como modelo experimental ideal no estudo da DMD pela similaridade das manifestações fenotípicas e genotípicas (COOPER et al., 1988; HOWELL et al., 1997; NGUYEN et al., 2002; COLLINS e MORGAN, 2003; MIYAZATO et al., 2011c). Além disso, os cães desta raça possuem massa corpórea e alterações musculares comparáveis aos pacientes DMD (NGUYEN et al., 2002; COLLINS e MORGAN, 2003, MIYAZATO et al., 2011c).

A DMD possui uma variante mais branda conhecida como distrofia muscular de Becker (DMB). DMB é menos grave, mas apresenta fenótipos, e possui características mais leves quando comparados a DMD. No entanto, um recente livro de casos clínicos relatou um menino sem quaisquer sinais de DMD (DUBOWITZ, 2006), mas com a confirmação dos achados moleculares. Ambas as formas de distrofia muscular são encontradas em pacientes portadores de mutações similares, o que indica que o

fenótipo não pode ser determinado apenas pela mutação no locus genômico; outros fatores podem desempenhar papel significativo (AMBRÓSIO et al., 2009).

Situação semelhante é observada em cães DMGR. A hipótese é de que o fenótipo mais leve é devido a um gene modificador provavelmente herdado através da transmissão macho a macho. É importante notar que, este canil possui um número de cadelas afetadas que transmitem a mesma mutação em ambos os cromossomos X, no entanto, não há variação observada no fenótipo feminino destas cadelas afetadas. Portanto, parece que a variação foi observada entre estes cães afetados e está de algum modo limitado aos machos. Entender o mecanismo e bases genéticas subjacentes a estas variações é de grande interesse (AMBRÓSIO et al., 2007; AMBRÓSIO et al., 2009).

Os sintomas na DMD podem variar entre os pacientes humanos, assim como na DMGR, pois o fenótipo nos cães exibe variação notável. Quando modificados por condições ambientais e de desenvolvimento, os cães DMGR possuem um fenótipo mais grave quando comparados com pacientes DMD, sendo considerado então o melhor modelo animal para estudo da patogênese da doença e também prever a eficácia do tratamento (AMBRÓSIO et al., 2009; KORNEGAY et al., 2012).

A identificação e classificação em fenótipos pode refletir a variabilidade clínica inter e intra-familiar que é observada em pacientes de DMD e que não pode ser atribuído aos fatores genéticos (VAINZOF e ZATZ, 2003), mas a correlação entre a quantidade de distrofina e da gravidade do fenótipo foi sugerido pelo aumento em algumas proteínas, como a caseína-quinase I, dinactina de cadeia leve e o fator beta de núcleo de ligação, os quais estão envolvidos na regulação do ciclo celular e podem estar relacionados com um fenótipo mais leve (SIFRINGER et al., 2004).

Foram identificados três fenótipos principais denominados leve (grau I): cães que exibiram pouca modificação na simetria muscular, alterações mínimas nos membros posteriores em comparação com outros cães, alterações gastrintestinais leves, tais como, dilatação discreta do esôfago e não foram observados problemas cardíacos e desidratação. Os animais deste fenótipo possuem tolerância ao exercício melhor do que outros.

O fenótipo moderado, denominado grau II incluiu cães que mostraram sinais clínicos mais graves do que aqueles de grau I. Animais desse fenótipo mostraram todos os sinais descritos anteriormente para o grupo de grau I, mas com alterações nos membros posteriores. Neste grupo, a regurgitação foi freqüente o que contribuiu para a desidratação.

O fenótipo severo (grau III) mostrou alterações nos membros posteriores com hiperflexão do carpo e joelho, além de mobilidade reduzida associada com atrofia e outras alterações músculo-esqueléticas. O sistema gastrointestinal mostrou hipertrofia da língua, megaesôfago e hérnia hiatal.

Estudos futuros devem ser realizados para determinar se a diferença dos níveis de distrofina também pode ser observada nestes cães e se estes níveis podem explicar os fenótipos diferentes que foram descritas neste estudo (AMBRÓSIO et al., 2009).

2.4 Lesões na distrofia muscular do Golden Retriever (DMGR)

Nas distrofinopatias, as miofibras tornam-se frágeis, de modo que os movimentos de contração e tensão induzem estresse muscular com consequente ruptura da membrana plasmática (sarcoplasma), liberação de enzimas musculares, influxo de fluido para o meio extracelular e aumento da concentração do cálcio intracelular. Estas alterações hidrodinâmicas quebram a homeostasia celular e ativam proteases endógenas, iniciando o processo de degeneração da miofibrila. Simultaneamente, o cálcio se acumula no interior das mitocôndrias ocasionando déficit energético dentro da miofibrila e morte celular na maioria dos casos (HAYS e ARMBRUSTMCAHER, 2002).

No estágio inicial da doença, fibras necróticas e em regeneração tendem a ocorrer em grupos pequenos, junto a fibras escuras hialinizadas, grandes e dispersas que se encontram contraídas e, acredita-se, precedem à necrose da fibra. Esse estado de marcada hipercontração é causado pela elevada concentração de cálcio, e a coloração de alizarina red S (ARS) indica a presença do mesmo dentro do citoplasma (MIYAZATO et al., 2011a). Por fim, os macrófagos invadem as fibras necróticas com

função de eliminar os resíduos (VILLALTA et al., 2011). Esta sequência de eventos é responsável pelo desenvolvimento de atrofia, hipertrofia muscular e fibrose que são lesões típicas das distrofias musculares. Por serem oriundas de processo de degeneração contínuo e progressivo, algumas delas são mais frequentes em determinados estágios da doença (COZZI et al., 2001). O aumento de diâmetro observado nos músculos é resultado da pseudo-hipertrofia ocasionada pela deposição de tecido conectivo fibroadiposo (EMERY, 1993). A regeneração das miofibras ocorre após sua necrose (NGUYEN et al., 2002; KENYON e CURTES; 2006). A extensão e distribuição das diferentes lesões dependem do músculo e do animal. Em geral, nos neonatos identificam-se um ou dois tipos e em cães acima de dois meses de idade são múltiplas e associadas (NGUYEN et al., 2002; MIYAZATO et al., 2011c).

Na forma mais típica da doença os sinais clínicos em cães foram atraso no desenvolvimento, fraqueza muscular e ganho de peso. Essas anormalidades presentes em animais jovens foram progressivas, levando a acentuada atrofia muscular, fibrose e contraturas aos seis meses de idade. A mortalidade foi alta nestes animais, ocorrendo entre os sete e nove meses de idade (VALENTINE et al., 1989). Com relação à *causa mortis*, aproximadamente 72,7% dos cães apresentaram falência cardio-respiratória (MIYAZATO et al., 2011b). As taxas de mortalidade foram mais elevadas nas duas primeiras semanas de vida e entre sete e nove meses de idade (VALENTINE e COOPER, 1991; HOWELL et al., 1997; MIYAZATO et al., 2011b).

Estes sinais podem ser observados em cães GR, a partir do nascimento e as alterações evoluem rapidamente entre os três e seis meses de idade. Observam-se com maior frequência a disfagia, o enrijecimento dos membros pélvicos com atrofia e hipertrofia muscular seletiva, desvio do eixo de membros, hipertrofia da língua, fraqueza muscular e contraturas (MIYAZATO et al., 2011 b).

Em neonatos os músculos mais severamente afetados são o diafragma, a musculatura da língua e os músculos flexores dos membros (OLIVEIRA et al., 2002; MIYAZATO et al., 2011 c). Estes músculos apresentam-se mais acometidos em decorrência da sua grande utilização durante esta fase da vida (MIYAZATO et al., 2011 a).

As lesões degenerativas da miofibrila 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 (WERNECK, 1994). O estado terminal caracteriza-se pela perda quase completa das fibras musculares esqueléticas, com substituição fibroadiposa (HAYS e ARMBRUSTMACHER, 2002).

Em cães distróficos de diferentes idades foram caracterizados seis tipos de lesões nos músculos esqueléticos, quais sejam, alterações de diâmetro, necrose, hialinização, calcificação, fibrose e infiltração de tecido adiposo (NGUYEN, 2002; MIYAZATO, 2010). A regeneração de miofibrilas foi mais intensa nos animais jovens, enquanto que o grau da necrose foi variável nos cães distróficos de diferentes idades (VALENTINE et al., 1990; NGUYEN et al., 2002; MIYAZATO, 2010). Estes fatos sugerem que fatores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e os mediadores químicos sejam liberados em resposta à necrose das miofibrilas nos diferentes estágios da doença, induzindo a regeneração muscular (ANTHONY et al., 2010).

2.5 Participação dos macrófagos M1 (CD68), M2 (CD163) e MHC na distrofia muscular

Estudos da função de células imunes nos músculos lesionados e em regeneração foram baseados em modelos no qual o músculo está sujeito a danos agudos, produzindo resposta inflamatória inata em com a infiltração de neutrófilos seguida por macrófagos. No entanto, a inflamação muscular, que pode ser dominada por infiltrado de células mielóides (macrófagos, mastócitos e eosinófilos), é também característica proeminente de diversas doenças musculares progressivas, incluindo a DMD (TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2004).

A caracterização dos receptores de membrana plasmática de anticorpos para algumas moléculas de sinalização, que atuam como mediadores da resposta dos

macrófagos em diversas doenças, foram investigados por alguns autores (MOSSER, 2003, LIU e YANG, 2012).

Embora macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T citotóxicos (LTC) contribuam para a patogênese destas miopatias crônicas, os macrófagos e os eosinófilos são conhecidos por contribuírem com a regeneração muscular (TIDBALL e VILLALTA, 2010).

Na DMD e na distrofia muscular do camundongo *mdx*, o início das alterações histopatológicas musculares coincide com a inflamação, sugerindo que as células inflamatórias desempenham papel regulador (WEHLING-HENRICKS e TIDBALL, 2011). Essa possibilidade foi apoiada por dados que mostram que a depleção de macrófagos em camundongos *mdx* ocorreu antes do início das lesões histopatológicas (WEHLING-HENRICKS e TIDBALL, 2011), mostrando que os macrófagos estão presentes durante a fase aguda e degenerativa da distrofia do camundongo *mdx* possuem propriedades citolíticas e participam da patogênese na distrofia muscular (VILLALTA et al., 2011 a).

O curso da inflamação nas fases iniciais da distrofia muscular possui algumas semelhanças com a resposta do sistema imune inato que ocorre quando há lesão muscular aguda (TIDBALL e VILLALTA, 2010).

O macrófago é o tipo celular primário envolvido nas distrofinopatias e sua depleção no camundongo *mdx* reduz a necrose muscular em 80% nos estágios iniciais da doença (WEHLING-HENRICKS et al., 2010). Adicionalmente, sabe-se que os monócitos e os macrófagos desempenham um papel importante na regulação da resposta inflamatória (GEISSMANN et al., 2010; KOWAL et al., 2011).

A ativação e polarização dos macrófagos mudam o estado funcional e os efeitos da resposta imune. Estas células são ativadas de forma diferente e programadas em diversos subtipos funcionais em resposta a vários tipos de antígenos, estímulos ou citocinas presentes no microambiente e poderia influenciar profundamente a resposta imunológica (GORDON e TAYLOR, 2005; LIU e YANG, 2012).

Com base nas suas propriedades funcionais, pelo menos duas subpopulações de fagócitos mononucleares (M1 e M2) foram descritas e estas diferem em seu potencial pró e anti-inflamatório (YONA e YUNG, 2010; GEISSMANN et al., 2010).

Macrófagos do tipo M1 são tidos como macrófagos ativados que participam da resposta imune Th1 induzindo danos ao tecido hospedeiro. Os macrófagos do tipo M2, mais diversos, participam da resposta imune Th2 e podem promover o reparo tecidual (ST PIERRE e TIDBALL, 1994; NGUYEN e TIDBALL, 2003 a/b; DESGUERRE et al., 2009).

O músculo esquelético, assim como outros tecidos, inicialmente responde à injúria por meio da resposta imune dirigida por citocinas. IFN- γ e TNF- α são as principais citocinas expressas durante a resposta inflamatória (LUNDBERG et al., 1995; LAGROTA-CANDIDO, 2002). Estas conduzem à ativação clássica de macrófagos para o fenótipo M1, uma população pró-inflamatória, capaz de perpetuar a resposta inflamatória (DESGUERRE et al., 2009; YONA e YUNG, 2010; KOWAL et al., 2011).

Macrófagos M1 podem também promover lesão muscular *in vitro* e *in vivo* por produção de níveis citotóxicos de óxido nítrico (NO) gerado pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (ST PIERRE e TIDBALL, 1994; NGUYEN e TIDBALL, 2003 a/b; TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2005; VILLALTA et al., 2009). Desta forma, os macrófagos M1 expressam CD68, também chamado de ED1, que é receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) oxidadas. A ligação de CD68 com LDLs oxidadas ativa a fagocitose nos macrófagos M1 e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, o CD68 é um valioso marcador específico de macrófagos deste fenótipo (TIDBALL e VILLALTA, 2010). A população inicial de células mielóides (macrófagos, mastócitos e eosinófilos) que invadem o músculo distrófico é rica em neutrófilos, iNOS (óxido nítrico sintetase induzida) e macrófagos M1 que refletem a sua capacidade de remover debris celulares produzidos por danos oxidativos e também por produzirem citocinas Th1 capazes de promover a fase proliferativa da miogênese, especialmente TNF- α e IL-6, que possuem forte influência sobre a progressão da fase proliferativa e é aparentemente necessária para a transição de fenótipos de macrófagos (VILLALTA et al., 2009).

Quando os macrófagos M1 atingem seu pico de concentração no músculo lesionado e em regeneração são substituídos por outra população de macrófagos, o M2, que pode atenuar o processo inflamatório e promover a reparação tecidual. Macrófagos M2 são ativados por citocinas Th2, principalmente IL-4, IL-10, e IL-13 que

desempenham papéis bem caracterizados na sua ativação (TIDBALL e VILLALTA, 2010).

O macrófago M2 é subdividido em três categorias que refletem sua função (VILLALTA et al., 2009; KOWAL et al., 2011). Macrófagos M2A são ativados por IL-4 e IL-13 e promovem a cicatrização de feridas e reparação. Macrófagos M2B são ativados por complexos imunes e citocinas anti-inflamatórias. Macrófagos M2C são ativados por IL-10 e TGF- β e liberam citocinas que podem desativar o fenótipo M1, o que poderia reduzir danos ao músculo distrófico e ainda promover proliferação de células não mielóides (VILLALTA et al., 2009; KOWAL et al., 2011). Alguns pesquisadores também consideraram a M2A e M2C como macrófagos reguladores (MARTINEZ et al., 2009).

Para este fenótipo, o anticorpo CD163 é considerado marcador específico de macrófagos M2C e contribui na regulação do mesmo, por meio do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias, especialmente IL-10 (PHILIPPIDIS et al., 2004; VILLALTA et al., 2009; KOWAL et al., 2011).

A interleucina-10 (IL-10) regula a função de células linfóides e mielóides através da capacidade de modular a imunidade celular na distrofia muscular. Embora sua função primária seja de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e desativar os macrófagos M1, também ativa os macrófagos para o fenótipo M2C (VILLALTA et al., 2011a). Este subtipo expressa os marcadores usuais de M2 (IL-4Ra, arginase-1 e CD206), mas também expressa o CD163, que não é expresso por outras subpopulações de macrófagos M2 (SCHAER et al., 2001). Macrófagos M2C CD163+ são uma população de macrófagos predominante durante a fase de regeneração na distrofia muscular do camundongo mdx, o que sugere que estes possam influenciar a regulação deste processo (VILLALTA et al., 2011a).

A mudança do fenótipo de macrófagos durante o curso da distrofia muscular pode desempenhar papel significativo na regulação da regeneração do músculo pelos efeitos diretos nas células musculares, bem como influenciando a morte do músculo com a desativação de macrófagos M1 (citolíticos) (VILLALTA et al., 2011a).

A alteração no fenótipo das populações de macrófagos M1 para M2 é importante na regeneração muscular, pois ocorre durante a mudança da fase proliferativa para a de diferenciação precoce na miogênese. Devido a esta alteração no fenótipo coincidir

com a mudança na fase regenerativa e também porque os macrófagos M2 estão na proximidade de fibras musculares em regeneração, a regulação deste processo é atribuída aos macrófagos M2 (ST PIERRE e TIDBALL, 1994).

Vários modelos fundamentam o papel dos macrófagos M2 em promover a regeneração muscular (TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2007).

Durante o período de 2 a 4 dias após a recuperação muscular, os macrófagos M2 estão em maior número que os M1 que entram em declínio (TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2007; WEHLING et al., 2010). A depleção de macrófagos durante este período desencadeia o aumento de diâmetro da fibra muscular que normalmente ocorre, impedindo o reparo do sarcolema (WEHLING; SPENCER; TIDBALL, 2001; TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2007).

Embora os macrófagos M2 estejam tipicamente associados à reparação tecidual, eles desempenham papel diferente no músculo distrófico. Assim, os macrófagos M2 podem exercer função central na regulação da regeneração na distrofia muscular pela atenuação do fenótipo potencialmente citolítico de macrófagos M1 e também atuar diretamente nas células satélites para conduzir sua função na regeneração muscular (KOWAL et al., 2011; TIDBALL e VILLALTA, 2010).

Todavia, na ausência de transição de fenótipos e a partir da resposta Th1 (dominada por neutrófilos e macrófagos M1) para a resposta tipo Th2 (dominado pelos macrófagos M2), o processo regenerativo é dependente da ativação das células satélites para desencadear a proliferação e expressão genética dos primeiros fatores de transcrição da família bLHL (MyoD) que age como intensificador de proteínas permitindo a ligação aos genes específicos do músculo para ativar o processo de transcrição (TIDBALL e VILLALTA, 2010).

2.6 Participação do complexo MCH na distrofia muscular

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) compreende mais de 160 proteínas codificadoras de genes (TRAHERNE, 2008). Possui influência em várias

doenças crônicas inflamatórias e auto-imunes e contribui para as diferenças individuais na resposta imune (TRAHERNE, 2008).

A atuação do sistema imune é realizada pelo MHC que se expressa na superfície das células nucleadas dos mamíferos (HALLORAN et al., 1986; HARRIS; GILL, 1986).

Os produtos do gene do MHC subdivididos em classes I (MHC I) e II (MHC II) podem ser identificados com o uso de anticorpos monoclonais específicos em culturas e suspensões celulares, cortes de tecidos e “imunoblots” teciduais homogeneizados (PONDER et al., 1983). No tecido muscular sua expressão normalmente se dá na superfície de vasos sanguíneos e capilares (EMSLIE-SMITH et al., 1989; McDOUALL et al., 1989).

Para que o complexo MHC seja ativado, é necessária a presença de citocinas produzidas durante o processo inflamatório (HALLORAN et al., 1986; HARRIS e GILL, 1986).

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 miofibra em uma célula apresentadora de antígeno (KARPATI, POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL et al., 1989).

Os complexos MHCI e MHCII não são expressos em fibras musculares saudáveis ao contrário do observado no músculo distrófico (SPENCER; TIDBALL, 2001). Entretanto, alguns autores relataram ausência de MHCII em fibras musculares distróficas (KARPATI et al., 1988; McDOUALL et al., 1989) e concluíram que a expressão de MHCII limita-se aos vasos sanguíneos endomisiais e células mononucleares em áreas de necrose, e não em fibras musculares distróficas (KARPATI et al., 1988; McDOUALL et al., 1989; MIYAZATO, 2010; BERETTA, 2011).

2.6 Utrofina no músculo distrófico

A utrofina é definida como proteína homóloga a distrofina (WINDER et al., 1995), a qual é expressa na superfície do músculo afetado pela distrofia muscular e

possivelmente está relacionada a algum mecanismo compensatório (WINDER et al., 1995). Sua abundância está geralmente relacionada à vascularização do órgão. No entanto, é predominante não só nos vasos sanguíneos (BERETTA, 2011), mas também em fibras cardíacas de Purkinje e discos intercalares de miofibras normais e na DMD (RADOJEVIC e BURGUNDER, 2000).

Embora a sequência de ambas seja muito semelhante e possuam muitas propriedades de proteína de ligação, as duas são expressas de forma aparentemente recíproca e podem ser coordenadamente reguladas. Estes dados sugerem que a utrofina consegue dar suporte ao complexo CDG, o que é importante quando as estratégias de substituição pela mesma são investigadas para o tratamento de distrofinopatias (RADOJEVIC e BURGUNDER, 2000).

A ausência de distrofina induz uma sequência de eventos incluindo a redução ou o desaparecimento de vários componentes do CDG e necrose das fibras. Embora esta necrose afete o músculo esquelético de forma mais sistemática do que o músculo cardíaco, pode variar de espécie para espécie (PONS et al., 1994).

No músculo distrófico observou-se que a ausência da distrofina ocasiona aumento compensatório da utrofina (KARPATI et al., 1993; BLAKE et al., 2002). Apesar de suas características homólogas, a substituição de utrofina em áreas onde a distrofina está ausente não mantém a integridade da fibra muscular em pacientes DMD (VOIT et al., 1991; PONS et al., 1994).

A expressão dessas proteínas durante o desenvolvimento muscular foi extensivamente estudada e podem ser utilizados como marcadores para o desenvolvimento de fibras musculares. Estes resultados podem fornecer informações sobre a relação entre a estrutura da distrofina e sua função celular mecânica (RADOJEVIC e BURGUNDER, 2000).

Em algumas pesquisas segure-se que há relação entre a expressão da utrofina e a regeneração das fibras musculares, amenizando a instabilidade do sarcolema na ausência de distrofina (SHIM e KIM et al., 2003). Portanto, tem-se argumentado que utrofina é expressa em fibras em regeneração (BERETTA, 2011), independentemente da deficiência de distrofina (SHIM e KIM et al., 2003).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar lesões musculares e estudar a imunodeteção de subtipos de macrófagos, através dos anticorpos CD68, CD163, MHC I e II e da utrofina e por meio da técnica de imuno-histoquímica em cães da raça Golden Retriever de diferentes idades afetados pela distrofia muscular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras e grupos

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

Os cães machos utilizados neste estudo pertenciam à colônia situada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo e na Associação dos Amigos da Distrofia Muscular – Ribeirão Preto – São Paulo.

Foram utilizados fragmentos musculares de 17 cães machos afetados pela DMGR, provenientes do banco de músculos do laboratório de Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp. Estes foram classificados em grupo I – animais distróficos com até um ano de idade (n=9); grupo II – animais distróficos acima de um ano de idade (n=8). Amostras musculares de três cães não distróficos, SRD e livre de anormalidades neuromusculares foram utilizadas como controles.

Foram analisados quatro grupos musculares mais frequentemente afetados pela doença que foram escolhidos por meio de pesquisas anteriores realizadas neste Departamento. Os músculos utilizados foram divididos em três grupos: mastigatório (masseter), respiratório (diafragma) e locomotório torácico (tríceps braquial) e pélvico (bíceps femoral).

Para as colorações histológicas e reações de imuno-histoquímica em material parafinado foram realizados cortes transversais seriados de 5 µm nos fragmentos musculares, em seguida, fixados em solução de formalina tamponada com fosfatos a 10% por 24 horas e mantidos em álcool 70% até o processamento de acordo com a técnica de inclusão em parafina do laboratório de histopatologia da FCAV – Unesp/Jaboticabal.

Fragmentos correspondentes para reações de imuno-histoquímica e coloração Alizarina red S (ARS) em material congelado foram coletados e armazenados em botijão de nitrogênio líquido e mantidos na temperatura de 120°C negativos. Posteriormente, foram cortados com 5 µm no criostato à 20°C negativos, em secções seriadas transversais e fixadas em lâminas silanizadas eletricamente carregadas (Easy Pat).

4.2 Histopatologia

Após processamento histológico usual para histologia, os fragmentos musculares foram fixados em lâminas de vidro, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e tricômio de Gomori modificado (TGM) para visualização de tecido conjuntivo e determinação da fibrose. Os cortes histológicos foram analisados e todas as alterações histopatológicas foram descritas.

Para caracterizar as lesões foi utilizado o método de análise quantitativa levando em consideração a porcentagem de miofibras alteradas em relação ao corte muscular (NGUYEN et al., 2002). Quatro graus de lesões foram identificados segundo a extensão

do dano na miofibra nos cortes corados com HE e TGM (tabela 1). Nesta avaliação, os achados histopatológicos encontrados foram analisados nos diferentes grupos.

Tabela 1: Características histopatológicas de músculos de cães distróficos agrupados em graus de lesões segundo a classificação de Nguyen et al. (2002).

Grau	Lesão	Características histológicas
0	Ausente	Músculo apresentando as mesmas características histológicas vistas em músculos normais.
1	Discreta	Fibras musculares danificadas isoladas e aleatoriamente distribuídas.
2	Moderada	Fibras musculares danificadas em grupo apresentado distribuição multifocal e afetando 10- 50% das miofibras em cada corte muscular.
3	Severa	Fibras musculares danificadas coalescentes ou difusas afetando mais de 50% das miofibras em cada corte muscular.

As lâminas com os cortes congelados foram coradas pela técnica ARS, pH 4,3 específica para avaliação de cálcio intracelular. Na avaliação histopatológica duzentas fibras musculares dos músculos colhidos foram analisadas aleatoriamente aferindo-se a porcentagem de fibras cálcio-positivas (FCP) e negativas (FCN).

4.3 Imuno-histoquímica

O método imuno-histoquímico empregado foi o complexo estreptoavidina-biotina peroxidase desenvolvido por Hsu et al. (1981). Cinco anticorpos primários foram utilizados para avaliar a imunomarcação de macrófagos M1 (CD68) e M2 (CD163), MHC I e MHC II e utrofina, conforme protocolo descrito (tabela 2).

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica para utrofina, CD68, CD163, MHC I e MHC II. Jaboticabal, SP, 2012.

Anticorpo primário	Marca	Diluição	Código	Controle Positivo	Anticorpo Secundário	Recuperação**	Amostra	Tempo de incubação
Anti-utrofina	Novo Castra	1:80	NCLDRP2	JNM*	Kit Advance	-----	Congelada	18 horas
Anti-CD68	Dako	1:50	Nr. M 0876	Baço	Kit Advance	-----	Congelada	18 horas
Anti-CD163	Spring	1:200	E18684	Pulmão	Kit LSAB	Steamer, citrato, pH 6,0	Parafinada	18 horas
MHC I	VRMD	1: 240	H 58	Cólon	Kit Envision	-----	Congelada	18 horas
MHC II	Dako	1: 400	M0746	Linfonodo	Kit Envision	Steamer, citrato, pH 6,0	Parafinada	18 horas

*JNM: junção neuro muscular

Kits da Dako Citomation

**Recuperação: panela elétrica a vapor a temperatura de 97°C (Steamer Cuis, T-Fal. Arno®) com solução pré-aquecida de citrato de sódio 10 µM (pH 6,0).

As lâminas foram inicialmente mantidas por uma hora em estufa a 60°C seguindo-se a desparafinização em xilol e hidratação em álcool etílico em concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%, respectivamente. Todos os passos a seguir foram precedidos por lavagem com solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,4).

Nas reações com anticorpo anti-CD163 e MHC II foi realizada a recuperação antigênica. No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se peróxido de oxigênio 30 volumes (Synth), adicionado ao álcool metílico (Synth) com concentração final de 15%. Para bloqueio dos antígenos não específicos utilizou-se solução de bloqueio Protein Block (Dako®).

Os anticorpos primários foram diluídos em solução de diluente para anticorpo (Dako®) e incubados em câmara úmida por 18 horas a 4 °C. No controle negativo da reação optou-se em excluir o anticorpo primário incubando-se somente com a solução de diluente para anticorpo.

As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Liquid DAB, Dako®, k334468-1) e contracoradas com hematoxilina de Harris.

A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de álcool etílico seguida de diafanização em xilol. Para a montagem de lamínulas utilizou-se Entellan (Merck®).

Nos cortes congelados, para o anticorpo anti-utrofina, CD68 e MHC I, as lâminas foram fixadas em acetona gelada e em seguida lavadas com solução tampão de PBS (pH 7,4). A partir desta etapa, os demais procedimentos seguiram o protocolo realizado para cortes parafinados iniciando-se pelo bloqueio da atividade endógena da peroxidase.

Para caracterizar a imunomarcção dos anticorpos anti-utrofina, anti-CD68, anti-CD163, MHC I e MHC II observou-se o padrão de distribuição da reação observada nos cortes musculares em escores.

Foram estabelecidos três escores de imunomarcção para avaliar a intensidade e distribuição de células imunomarcadas nos fragmentos musculares, de acordo com os critérios descritos por MYIAZATO et al. (2011):

Escore (0), ausência de marcação;

Escore (1), escassas – imunomarcações isoladas e aleatoriamente distribuídas;

Escore (2), moderadas – imunomarcção em grupos com distribuição multifocal;
Escore (3), acentuadas – imunomarcção difusas por todo o corte muscular.

Em seguida, foram contadas todas as células imunomarcadas em cinco campos microscópicos aleatórios, dos quatro músculos avaliados e de todos os cães distróficos, com auxílio de um graticulo micrométrico (Nikon®, Inc., Japan), no aumento de 400x.

4.4 Análises estatísticas

Para as lesões histopatológicas foi realizada análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância.

Os resultados referentes às células imunomarcadas foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram comparadas as médias de imunomarcção entre os grupos (GI, GII e controle) para cada um dos músculos avaliados. Do mesmo modo, foi realizada análise de variância entre os quatro músculos avaliados nas diferentes idades (GI e GII). Para a comparação de médias pelo teste de Tukey foi utilizado o nível de 5% de probabilidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1974). As análises estatísticas foram processadas utilizando o pacote estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliações histopatológicas

Os fragmentos de músculos dos cães controle apresentaram características histológicas normais, com a presença de fibras musculares uniformemente distribuídas com diâmetro regular, formato poliédrico entremeado por tecido conectivo e mionúcleos periféricos, ocupando posição subsarcolemal. As fibras musculares apoiaram-se umas às outras formando contorno poligonal com ângulos arredondados.

Em todas as amostras de músculos avaliados nos animais afetados nas diferentes idades foram constatadas alterações no diâmetro das miofibras (tanto hipertrofia quanto atrofia) com intensidade variada (figura 1A). Estas fibras se mostravam entremeadas com abundante tecido conectivo caracterizando fibrose, notada mais intensamente no tríceps braquial (tabela 3, figura 2B).

Observaram-se também focos de células inflamatórias (figura 3A), principalmente com células mononucleares (linfócitos e macrófagos) adjacentes às fibras necróticas além de debris celulares, aumento do espaço endomisial e perimisial com substituição fibrosa exuberante. O músculo tríceps braquial e o diafragma apresentaram maior intensidade para resposta inflamatória, enquanto que no masseter e no bíceps femoral foi moderada. Além disso, a intensidade do processo inflamatório foi proporcional a presença de fibrose encontrada.

As fibras necróticas encontravam-se agrupadas e com imperfeições no citoplasma e próximo a elas foram observadas presença de fagossomos. O sarcoplasma destas miofibras apresentou-se pálido, homogêneo e com núcleo picnótico (figura 1B). Nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial a necrose foi moderada.

As fibras em regeneração mostraram-se individualizadas ou agrupadas. O citoplasma destas células era basófilo e o núcleo volumoso. Estas alterações foram mais evidentes nas amostras dos músculos masseter e diafragma que mostrou discreta capacidade regenerativa e em menor intensidade no tríceps braquial e bíceps femoral.

As fibras musculares hialinizadas apresentaram-se com o citoplasma hiperacidófilo, hipertrofiadas e claramente bem definidas (figura 2A) e foram discretas nos diferentes fragmentos avaliados.

A substituição fibroadiposa foi escassa em todos os músculos, exceto no masseter onde esta lesão não foi observada. A presença de células gigantes estava ausente nos locais de inflamação na maioria dos músculos analisados, exceto no músculo diafragma onde estavam presentes em menor número

Todos os músculos avaliados exibiram calcificação distrófica. A maior intensidade foi notada no músculo tríceps braquial enquanto que o músculo masseter apresentou quantidades reduzidas.

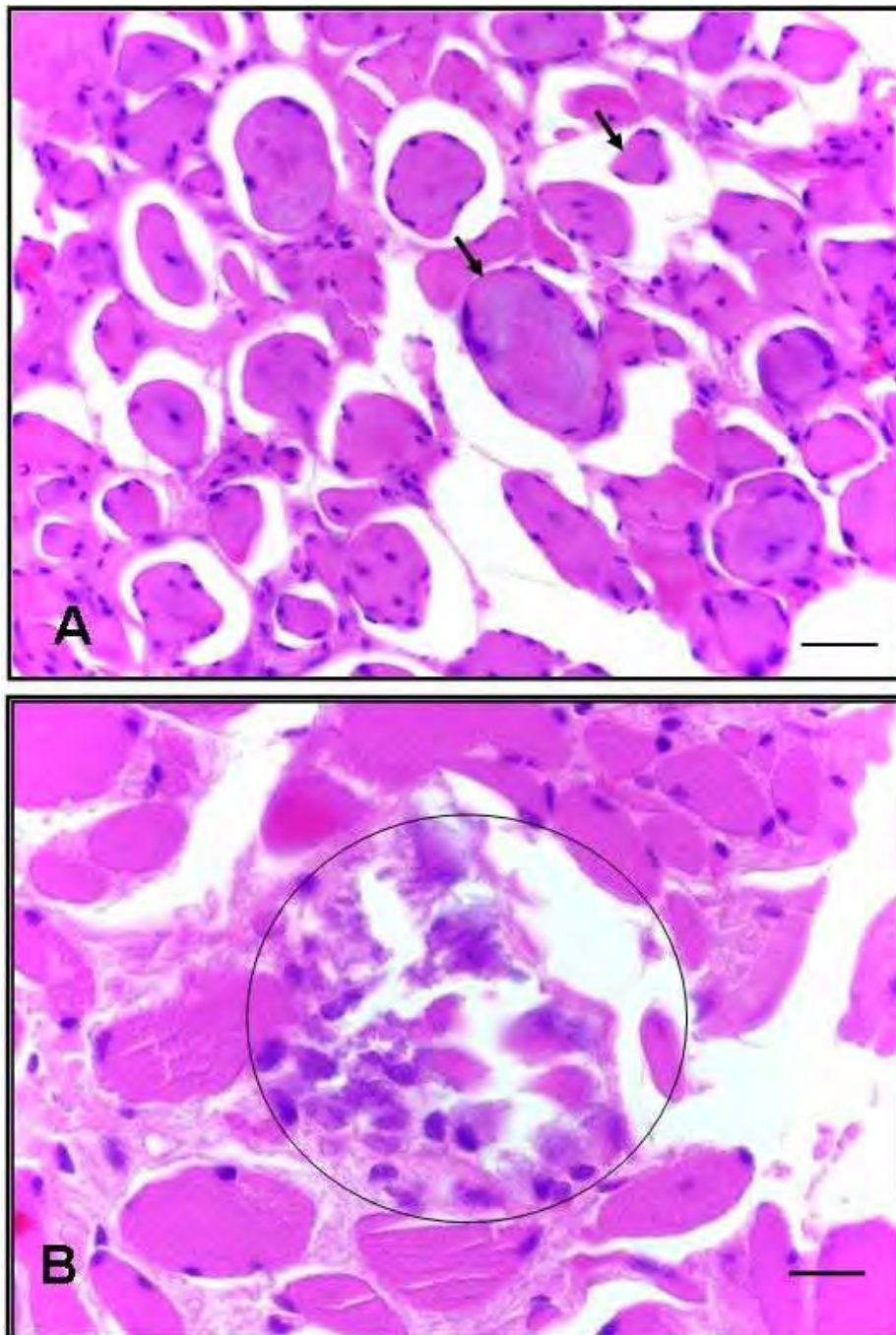


Figura 1: Fotomicrografia de fibras musculares em cães distróficos. **A.** Músculo tríceps braquial. Observar hipertrofia e atrofia das fibras musculares (setas), (GII). Barra: 20 μ m. **B:** Músculo masseter. Observar necrose das fibras musculares (detalhe) (GI). Barra 10 μ m. Hematoxilina e eosina.

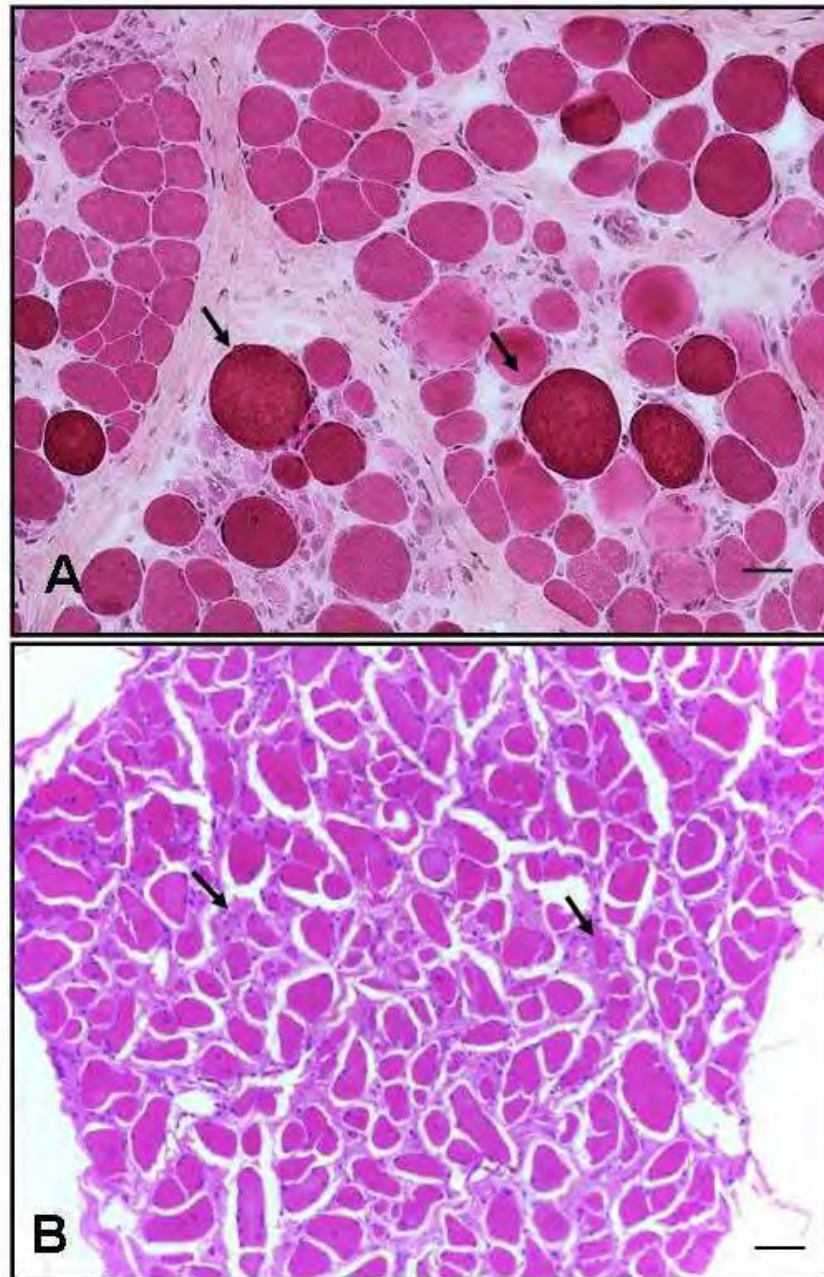


Figura 2: Fotomicrografia de fibras musculares em cães distróficos. A: Músculo diafragma. Observar presença de fibras musculares hialinizadas (setas), (GII) Barra: 20 μ m. B: Músculo masseter. Observar ibrose endomysial exuberante das fibras musculares (setas), (GI) Barra: 20 μ m. Hematoxilina e eosina.

O cálcio presente na miofibras distróficas foi identificado através da coloração ARS e distribuiu-se difusamente pelo sarcoplasma (figura 3B). Foram visibilizadas fibras isoladas e/ou áreas de concentração cálcio-positivas nos músculos de cães afetados pela distrofia muscular. O músculo mais afetado foi o tríceps braquial e o masseter exibiu o menor número de fibras cálcio positivas (FCP).

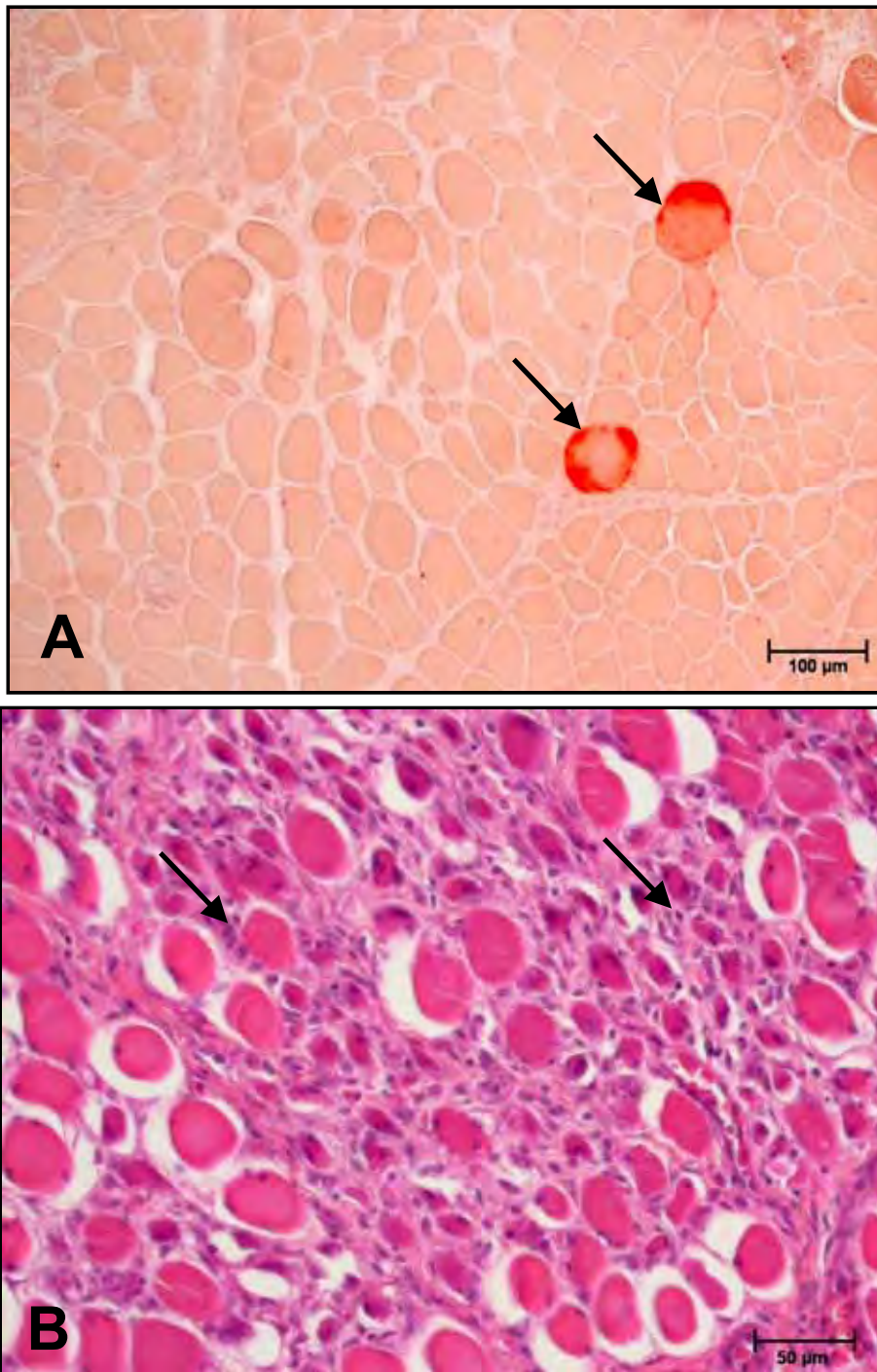


Figura 3: Fotomicrografia de fibras musculares em cães distróficos. **A:** Músculo bíceps femoral. Observar presença de cálcio intracelular no interior das fibras musculares (setas), (G I). Barra: 100 μm. Alizarina Red S. **B:** Músculo masseter. Observar presença de fibrose e infiltrado inflamatório mononuclear nas fibras musculares (setas), (G II). Barra: 50 μm. Hematoxilina e eosina.

O tecido conectivo presente no perimísio e endomísio foram exuberantes pela coloração de TGM. As fibras mostraram-se de coloração azulada ou azul-avermelhada dependendo da intensidade e do grau de lesão.

Tabela 3: Relação das alterações histopatológicas encontradas e escore predominante observado em ambos os grupos de cães Golden Retriever distróficos. Jaboticabal, SP, 2012.

Lesões musculares	Grupo I	Grupo II
Inflamação crônica	++	+++
Atrofia	+	+++
Hipertrofia	+	++
Calcificação	+	+
Fibrose	++	+++
Regeneração	+	+
Hialinização	+	+
Necrose	+	++
Adipócitos	+	+

Os resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância das lesões histopatológicas nos músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães afetados por distrofia muscular, não mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$) indicando que o fator idade não interferiu no grau das lesões histopatológicas encontradas nos animais utilizados neste estudo.

Após análise todos os parâmetros morfológicos conjuntamente, quais sejam, atrofia, hipertrofia, grau de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, fibrose, hialinização, calcificação distrófica, presença de cálcio intracelular e presença de adipócitos temos que o músculo tríceps braquial e o diafragma que estão inseridos no grupo locomotor torácico e no respiratório foram os mais acometidos, independentemente da idade, nos cães DMGR utilizados neste estudo.

5.2 Imuno-histoquímica

5.2.1. Imunomarcção de utrofina

Nos animais controle, a imunomarcção da utrofina foi intensa nos vasos sanguíneos dos músculos analisados nesse estudo e de fraca intensidade na superfície das células musculares. Nos animais afetados, o grau de marcação foi intenso (escore 3) na superfície das miofibras, vasos sanguíneos e no sarcoplasma de algumas fibras em regeneração.

As imunomarcções de utrofina nos animais distróficos do grupo I foram moderadas (escore 2) nos quatro músculos avaliados e no grupo II (escore 3), foram mais evidentes no masseter seguidas de marcações moderadas (escore 2) no bíceps femoral, tríceps braquial e diafragma (figura 2).

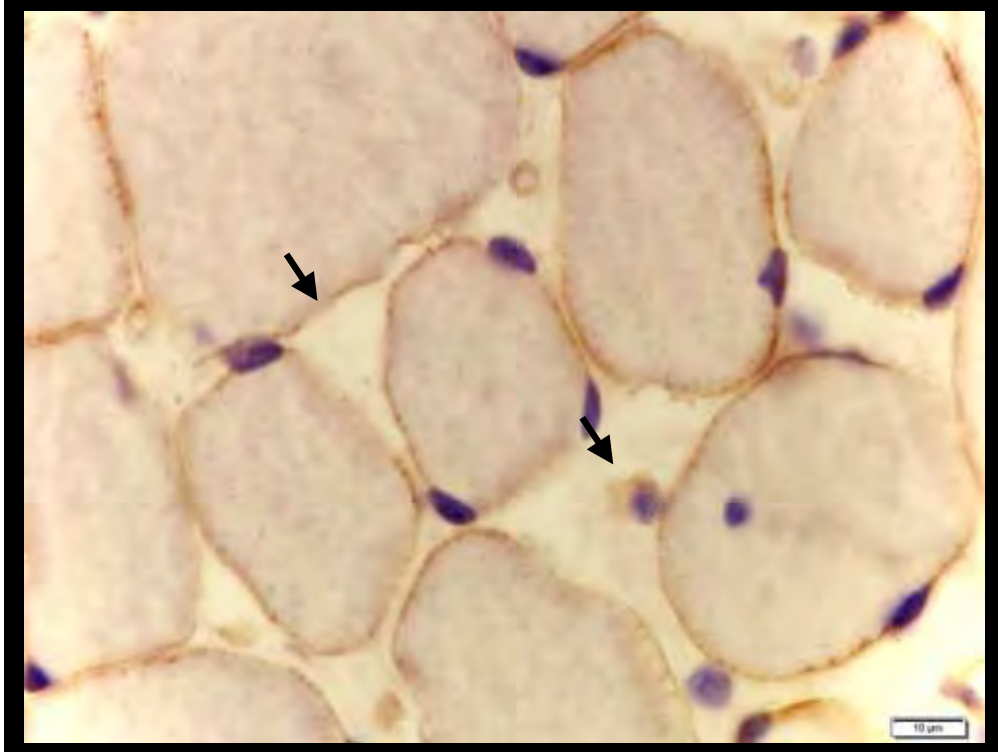


Figura 4: Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica para utrofina em cães distróficos. Imunomarcção de utrofina no sarcolema no músculo masseter (setas), complexos de polímeros ligados a peroxidase. Barra 10 μm .

A expressão de utrofina foi maior no masseter e no diafragma nos animais do grupo II (acima de um ano de idade) e não houve diferença significativa para os músculos bíceps femoral e tríceps braquial (tabela 3).

Tabela 4: Média e desvio padrão da imunomarcção da utrofina, nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012.

	Masseter	Diafragma	Bíceps femoral	Tríceps braquial
Grupo I	13,42 ± 6,09 ^A	12,864 ± 4,958 ^A	23,955 ± 9,114 ^A	14,530 ± 10,754 ^A
Grupo II	33,86 ± 20,38 ^B	24,822 ± 8,863 ^B	20,211 ± 6,319 ^A	19,689 ± 8,85 ^A

* Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente por Tuckey (P<0,05).

GI: cães distróficos com até um ano de idade. GII: cães distróficos com mais de um ano de idade.

5.2.2. Imunomarcção de macrófagos M1 (CD68) e de macrófagos M2 (CD163)

A análise da distribuição dos macrófagos M1 (CD68) e M2 (CD163) nos músculos controles evidenciaram células isoladas e aleatoriamente distribuídas pelo endomísio, perimísio e ao redor de vasos. Entretanto, estas células foram observadas em pequenos grupos nas áreas de degeneração e necrose dos músculos distróficos nos quatro músculos avaliados (figuras 5 A e B).

Nos músculos distróficos de ambos os grupos avaliados (I e II) a média de imunomarcção de macrófagos M1 foi discreta (escore 1) e a de M2 (CD163) variou de moderada a intensa (escore 2 e 3).

Os resultados da análise da expressão do macrófago M1 (CD68) para os quatro músculos avaliados, não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos de animais distróficos, indicando que o fator idade não interferiu no número de macrófagos M1.

Tabela 5. Média e desvio padrão de macrófagos M1 (CD68) nos músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012.

	Masseter	Diafragma	Bíceps femoral	Tríceps braquial
Grupo I	0,5182 ± 0,376 ^A	0,5273 ± 0,2412 ^A	0,5091 ± 0,1375 ^A	0,5282 ± 0,396 ^A
Grupo II	0,311 ± 0,2261 ^A	0,5778 ± 0,338 ^A	0,4667 ± 0,200 ^A	0,411 ± 0,2281 ^A

* Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste de Tuckey (P<0,05).

GI: cães distróficos com até um ano de idade. GII: cães distróficos com mais de um ano de idade.

A expressão de macrófagos M2 nos dois grupos de animais distróficos variou de moderada a intensa em todos os músculos avaliados. Adicionalmente, verificou-se que o músculo diafragma dos animais do grupo I mostrou maior escore de imunoexpressão do CD163 (escore 3), seguidas de marcações discretas e moderadas (escore 1 e 2) no masseter, bíceps femoral e tríceps braquial.

A imunomarcção de CD163 diferiu significativamente no músculo diafragma entre os grupos I e II, embora as médias de marcação no grupo II em número absolutos tenham sido maiores em todos os quatro músculos avaliados (tabela 5).

Tabela 6: Média e desvio padrão da imunoexpressão de CD163, nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (GI e GII). Jaboticabal, SP, 2012.

	Masseter	Diafragma	Bíceps femoral	Tríceps braquial
Grupo I	0.57 ± 0.33 ^A	2.55±0.82 ^A	0.46 ± 0.17 ^A	0.67 ± 0.43 ^A
Grupo II	0,63 ± 0,62 ^A	2,22 ±1,18 ^B	0,55 ± 0,14 ^A	0,43 ± 0,28 ^A

* Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente por Tuckey (P<0,05).

GI: cães distróficos com até um ano de idade. GII: cães distróficos com mais de um ano de idade.

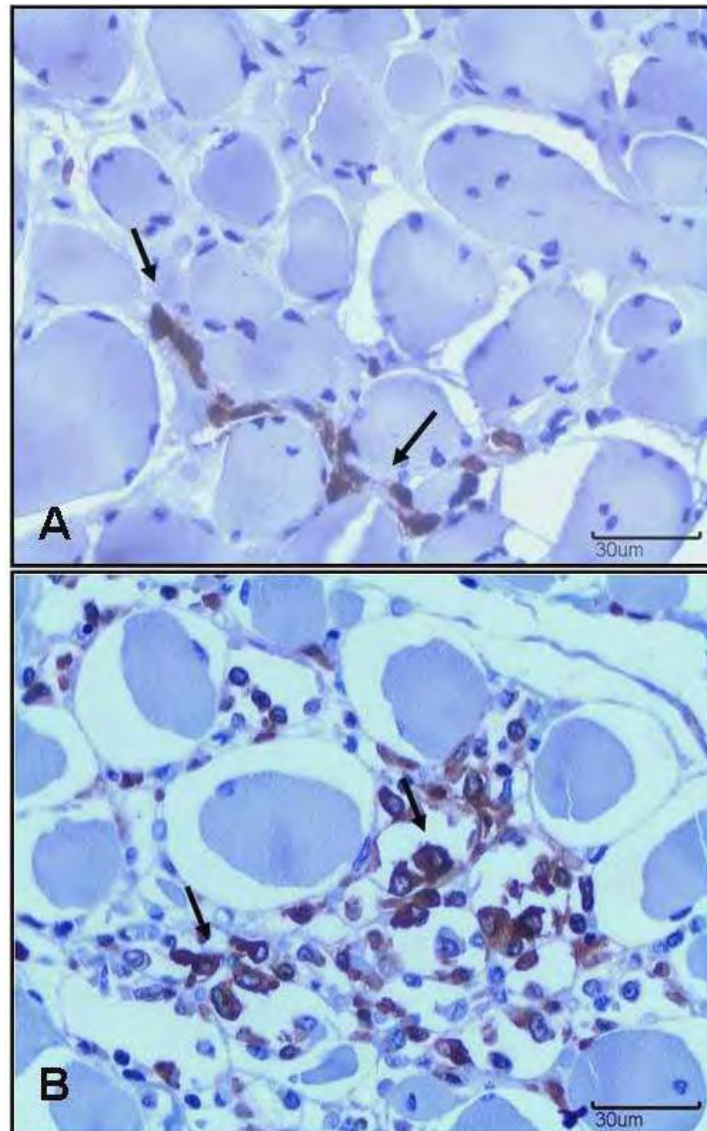


Figura 5: Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica para macrófagos em cães com distrofia muscular. **A:** Imunomarcção de macrófagos CD68 (M1) no músculo masseter em cães Golden Retriever distróficos. Complexos de polímeros ligados a peroxidase. Notar discreta marcação de células. **B:** Imunomarcção de macrófagos CD163 (M2) no músculo diafragma de cães distróficos. Complexo estreptoavidina Biotina Peroxidase. Barra 30µm.

5.2.3 Imunomarcção do antígeno MHC I

A análise da imunomarcção do antígeno MHC I ocorreu em capilares e vasos sanguíneos do endomísio e perimísio nos músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral dos animais controle.

Nos músculos distróficos, a imunomarcção foi observada em áreas de inflamação, necrose, regeneração e na superfície das miofibras, principalmente em macrófagos (figura 6A).

As imunomarcções do MHC I nos animais distróficos do grupo I foram intensas em dois dos músculos avaliados neste estudo (bíceps femoral e tríceps braquial), seguidas de marcações moderadas no masseter e diafragma. No grupo II as imunomarcções foram intensas nos quatro músculos avaliados.

A imunomarcção de MHC I diferiu significativamente nos quatro músculos quando comparados entre si, embora as médias de marcação no grupo II em número absolutos tenham sido maiores em todos os músculos avaliados (tabela 5).

Tabela 7: Média e desvio padrão da imunomarcção de MHC I e MHC II nos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e tríceps braquial de cães Golden Retriever distróficos em diferentes idades (G I e G II). Jaboticabal, SP, 2012.

MHC I	Masseter	Diafragma	Bíceps femoral	Tríceps braquial
Grupo I	2.01± 0.14 ^{Aa}	2.07±0.19 ^{Aa}	2.27± 0.19 ^{Aa}	2.28± 0.17 ^{Aa}
Grupo II	3.12± 0.16 ^{Ba}	3.06±0.16 ^{Ba}	3.11± 0.22 ^{Ba}	3.12 ± 0.18 ^{Ba}

MHC II	Masseter	Diafragma	Bíceps femoral	Tríceps braquial
Grupo I	1.07± 0.27 ^{Ca}	0.95± 0.16 ^{Ca}	0.98±0.19 ^{Ca}	1.06±0.14 ^{Ca}
Grupo II	0.97±0.21 ^{Ca}	0.90± 0.25 ^{Ca}	1.10± 0.24 ^{Ca}	1.20± 0.25 ^{Ca}

^{A, B, C} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente por Tuckey (P<0,05).

^a Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente por Tuckey (P<0,05).

GI: cães distróficos com até um ano de idade. GII: cães distróficos com mais de um ano de idade.

Verificou-se relação direta entre a intensidade da marcação de MHC I e a idade, indicando ação promotora do antígeno MHC I para atuação dos macrófagos.

5.2.4 Imunomarcção do antígeno MHC II

Nos músculos controle o MHC II foi observado na superfície de células inflamatórias mononucleares distribuídas aleatoriamente no endomísio, ao redor e na parede dos vasos sanguíneos.

Nos músculos distróficos a imunoexpressão do MHC II ocorreu nas células inflamatórias mononucleares, especialmente macrófagos, concentradas em áreas de degeneração e necrose das miofibras (figura 6B). A média de imunomarcção foi discreta (escore 1) nos quatro músculos distróficos de ambos os grupos avaliados (I e II).

Os resultados da expressão de MCH II mostraram que para os quatro músculos avaliados, não houve diferença significativa entre os dois grupos de animais distróficos, demonstrando que a expressão do MHC II não variou com a idade dos animais distróficos (tabela 5).

Tabela 8: Resumo das reações de imuno-histoquímica encontradas nas fibras musculares e escore predominante observado nos grupos de cães Golden Retriever distróficos e controle. Jaboticabal, SP, 2012.

Escore	Anticorpos				
	Utrofina	CD68	CD163	MHC I	MHC II
Grupo I	++	+	+	+++	+
Grupo II	+++	+	+++	++	++
Controle	Ausente na miofibra	+	+	+	+

GI: cães distróficos com até um ano de idade. GII: cães distróficos com mais de um ano de idade.

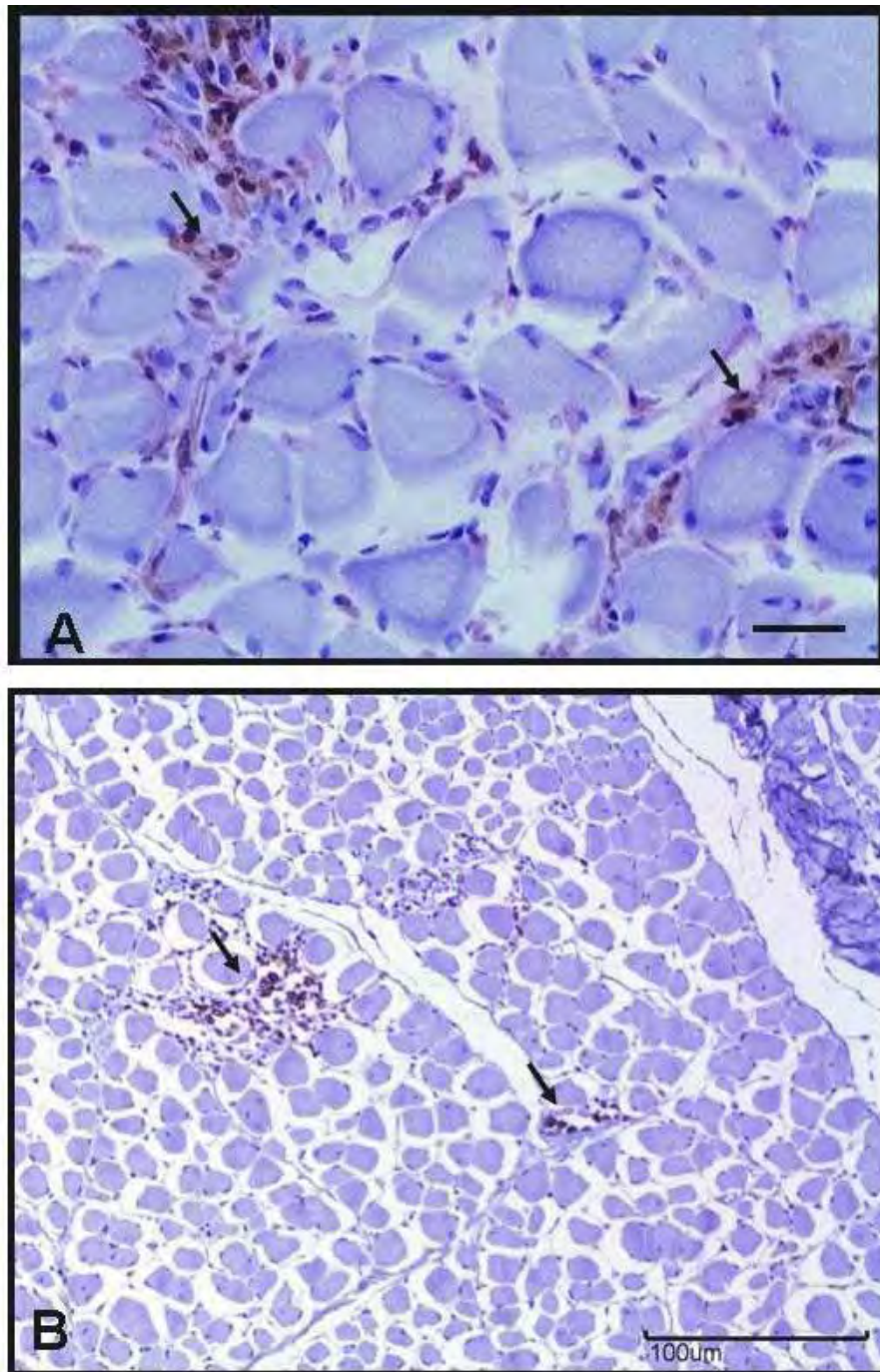


Figura 6: Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica para MCH I e MHC II em cães com distrofia muscular. **A:** Imunomarcação de MHC I no músculo tríceps braquial de cão DMGR (setas), observar imunomarcação em grupos de células inflamatórias mononucleares em área de degeneração e necrose. Barra: 50 μm . **B:** imunoexpressão de MHC II no músculo tríceps braquial de cão DMGR (setas), notar discreta marcação de células. Barra: 100 μm .

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificadas e classificadas, por critérios morfológicos, todas as lesões degenerativas características da distrofia muscular em todos músculos distróficos escolhidos. Estas lesões variaram em extensão e distribuição nos quatro músculos avaliados. Após análise das lesões em conjunto, verifica-se que o músculo tríceps braquial e o diafragma foram mais acometidos em comparação aos outros músculos estudados (masseter e bíceps femoral), independentemente da idade. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura por outros autores (SHELTON, 2001; BERGMAM et al., 2002; NGUYEN et al., 2002; MIYAZATO et al., 2011c).

Da análise dos resultados constata-se que o músculo masseter foi o único que mostrou capacidade regenerativa, ainda que pequena, dentre todos os quatro músculos avaliados. A regeneração de miofibras, nos outros músculos foi fraca enquanto que a intensidade de necrose foi variável entre eles indicando que esta lesão é uma característica permanente nos músculos de cães DMGR. Estes resultados concordam com os descritos por Miyazato (2010) para cães de mesma idade e discordam dos descritos por Valentine et al. (1990) que afirmaram que ambas foram marcantes em animais jovens.

Isto pode ser explicado pelo fato que, após a degeneração, a regeneração do músculo masseter adquire características inteiramente diferentes de outros músculos. No camundongo *mdx*, o masseter sofre degeneração mínima e as alterações nas suas fibras ocorrem por possuírem menor diâmetro e também pela exposição a uma carga mecânica mais leve do que os músculos localizados nas extremidades (LEE et al., 2006).

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 II A (FTIIA) e tipo II C (FTIIC); sendo FTI e FTII A histoquímicamente semelhantes às encontradas no homem (DUBOWITZ, 1985)

No músculo esquelético, o número de fibras musculares do tipo I e II (FTI e FTII) são proporcionalmente iguais, independente do peso do animal. Observou-se também que após os seis meses de idade a porcentagem do tipo de fibras nos diferentes músculos se estabilizou, não havendo mudanças com o envelhecimento dos cães (BRAUNT; LINCOLN, 1981, MIYAZATO et al., 2010).

A formação de agrupamentos de FTI e FTII, observada na musculatura esquelética foi também descrita em cães DMGR por outros autores (KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1990; MIYAZATO, 2005; BERETTA, 2011), sendo este um tipo de lesão relatada apenas nesta espécie (VALENTINE et al., 1990).

Nos músculos distróficos, as FTII foram prevalentes apresentando inversão no tipo de fibra quando comparado ao controle, a 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).

A fraca capacidade de regeneração do tecido muscular relaciona-se com a redução progressiva das células satélites e diminuição da proliferação. Por outro lado, a função fagocítica de células inflamatórias na remoção de debris celulares também reduz com a idade. Assim, fibrose e atrofia são resultados da falha da resposta regenerativa para tentar equilibrar a necrose persistente (PASTORET e SEBILLE, 1995).

No presente estudo, a utrofina expressou-se no sarcolema e nos vasos sanguíneos das miofibras distróficas e foi significativamente maior nos animais do grupo II (acima de um ano de idade) corroborando com as descrições feitas por Beretta (2011) que estudou o músculo gastrocnêmio e a junção músculo tendínea. Por outro lado, discordam dos descritos por Blake et al. (2006) que relataram que a expressão de utrofina no músculo deficiente em distrofina é característica de miofibras que não estão em processo de regeneração. Há relatos de que a imunomarcagem da utrofina para pacientes DMD foi fraca nas miofibras maduras dos músculos vasto lateral, gastrocnêmio, bíceps, quadríceps, reto lateral e deltóide (SHIM e KIM, 2003). Devido à intensa imunomarcagem para utrofina observada na periferia das miofibras distróficas, presumimos que foi incorporada ao sarcolema. Este fato sugere

que a diferença na regulação da utrofina entre diferentes músculos distróficos estudados foi pequena para que houvesse diferença entre os grupos avaliados.

A distribuição dos macrófagos M1 e M2 mostrados através da imunomarcacão de CD68 e CD163 foram distintas nos quatro músculos avaliados, mostrando relação direta entre o número de macrófagos e o grau de inflamação. A diferenciação destes tipos celulares ocorreu no músculo quadríceps de pacientes afetados pela DMD (DESGUERRE et al., 2009) e no soléo de camundongos *mdx* (VILLALTA et al., 2011).

O subtipo M1, expresso pelo CD68, característico de lesões imaturas foi observado em número reduzido nas zonas necróticas e nas áreas com acentuada fibrose. Estes dados são semelhantes com os descritos na literatura por outros autores que observaram fraca imunexpressão de macrófagos M1 em relação ao subtipo M2 no músculo quadríceps de pacientes afetados pela DMD (DESGUERRE et al., 2009). Assim, tal fato pode revelar a existência de associação destas células com a cronicidade do processo inflamatório das fibras musculares em cães distróficos.

Algumas hipóteses referentes à fraca expressão do CD68 podem ser discutidas. A primeira seria que o anticorpo utilizado para a marcação do antígeno anti-CD68 não seja específico para a espécie canina. A segunda seria que, a semelhança do que ocorre em tecidos normais, o CD68 se expressa em níveis elevados especialmente no sangue periférico e no fígado, não sendo seletivo para o músculo esquelético (FALINI et al., 1993). E a terceira, seria a possibilidade deste antígeno expressar-se abaixo do limite de sensibilidade do procedimento imuno-histoquímico utilizado.

A imunomarcacão do subtipo M2, expresso pelo CD163, na musculatura esquelética de cães deste estudo foi observada nas regiões onde havia fibrose endomisial, principalmente nos músculos diafragma e tríceps braquial. Nestes músculos, a contagem em números absolutos de M2 foi duas vezes maior que a de macrófagos M1. Há relatos de que em músculos quadríceps de pacientes DMD, a mesma expressão de M1 e M2 foi equivalente (DESGUERRE et al., 2009). A intensa estimulação de citocinas Th2 foi observada em macrófagos isolados em camundongos *mdx* com 12 meses de idade, indicando que os macrófagos M2 expressaram receptores para IL-4, IL-10 e IL-13 (mais prevalentes nesta fase da doença) e coincidiram temporalmente com o desenvolvimento de fibrose patológica na

musculatura esquelética, confirmando os dados relatados na literatura (WEHLING-HENRICKS et al., 2010). No entanto, a expressão de macrófagos residentes ocorre em números muito baixos nos músculos saudáveis refletindo o papel dos macrófagos M2C no processo fisiológico normal no músculo. Embora o número de macrófagos M2C possa aumentar consideravelmente no músculo *mdx*, eles continuam a ser uma pequena fração do total de células inflamatórias que se infiltram nas lesões (VILLALTA et al., 2010). À semelhança do que já foi descrito para o M2C (VILLALTA et al., 2010), neste estudo, a imunomarcagem de CD163, apesar de maior que a do CD68, esteve aquém do esperado para o grupo II, onde as lesões inflamatórias foram intensas. Assim, conclui-se que as células imunomarcadas podem não refletir o total de células presente na lesão. Entretanto, com a intensa imunomarcagem de fibras em regeneração, acredita-se que a população predominante de macrófagos na lesão seja a M2, que pela competição com M1 pelo uso da arginina, reduz a ação citotóxica dos mesmos (BERETTA, 2011), fato observado em menor intensidade neste estudo.

A localização dos macrófagos M2 nas áreas de fibrose sugere que eles desempenham outra função no músculo esquelético além da fagocitose. É conhecido o fato que os macrófagos M2 inicialmente acumulados no epimísio e no perimísio somente penetraram na área lesionada mais tardiamente após a fagocitose do tecido necrótico (ST. PIERRE e TIDBALL, 1994; MCLENNAN, 1996).

Especula-se que a função dos macrófagos M2 pode ser a de ativar células satélites durante a adaptação da miofibrila e secretar fatores de crescimento, como o derivado de plaquetas e o fator de crescimento de fibroblasto (PARTRIDGE e BOU GARCIA, 2007). Em outros modelos de lesão de células musculares, a ativação inicial das células satélites pode ocorrer concomitantemente com a infiltração de macrófagos no músculo lesionado (SIFRINGER et al., 2006).

O fato de ter observado menor número de macrófagos M1 (que possuem ação inflamatória e são inicialmente recrutados nos locais de lesão muscular aguda), em áreas de necrose nos músculos afetados pela DMGR, confirma a mudança de seu fenótipo após fagocitose para macrófagos M2, que exibem perfil anti-inflamatório, confirmando com os dados encontrados na literatura (TIDBALL, 2004).

A imunomarcção do macrófago M2 sugere que, com a evolução da idade, há aumento moderado deste subtipo de macrófagos no músculo de cães DMGR indicando a associação deste tipo celular com a cronicidade da lesão muscular em cães distróficos.

O número de macrófagos M2 (CD163) nos animais afetados foi significativamente maior em relação ao controle, demonstrando a participação destas células na DMGR bem como a intensificação das marcações do antígeno MHC I com a idade. Este fato demonstra aumento da expressão das proteínas de superfície nas miofibras lesionadas para que possa ocorrer a ação complementar dos macrófagos M2.

A intensa imunodeteção de MHC I no músculo esquelético conduz a danos nas fibras musculares com características clínicas, bioquímicas, histológicas e imunológicas de miosite (NAGARAJU, 2005). Estas observações em pacientes humanos e no modelo camundongo sugerem que moléculas MHC I potencialmente podem mediar os danos da fibra muscular e causar disfunção na ausência de linfócitos (NAGARAJU, 2005).

A expressão do antígeno MHC I foi evidenciada na superfície de miofibras distróficas e em áreas de necrose, regeneração e inflamação. Estes dados corroboram com achados anteriores que descreveram a expressão deste antígeno na DMD em humanos (McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989; BEHRENS et al., 1998) e nos músculos masseter, diafragma, bíceps braquial, tríceps braquial, semimembranoso bíceps femoral, sartório cranial (MYIAZATO, 2010), gastrocnêmio e junção músculo-tendínea de cães DMGR; (BERETTA, 2011). Estas características sugerem a participação dos macrófagos na patogenia da DMD e sua ativação em resposta a um antígeno específico. Embora a fonte de ativação do antígeno seja ainda desconhecida, é possível que ela decorra de danos oriundos do processo de contração no músculo distrófico (SPENCER; TIDBALL, 2001).

A imunomarcção do antígeno MHC II ocorreu em grupos de células inflamatórias mononucleares, especialmente macrófagos, concentrados em áreas de degeneração e necrose confirmando sua participação na DMGR. Estes achados confirmam descrições anteriores de outros autores (KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989; NAGARAJU, 2005). Segundo Wehling, Spencer e Tidball (2001) os macrófagos seriam o tipo celular primário envolvido na distrofinopatia e sua depleção no camundongo mdx seria responsável pela redução em 80% da necrose muscular nos estágios

iniciais da doença. Apesar destes relatos, alguns autores confirmam também a expressão do antígeno MHC II na superfície de miofibras distróficas (SPENCER; TIDBALL, 2001) fato este não encontrado nesse estudo. A imunomarcção do antígeno MHC II não variou com a idade, ao contrário do que outros autores afirmam para a DMD em humanos (McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990). Entretanto não podemos excluir a possibilidade deste antígeno estar se expressando abaixo do limite de sensibilidade do procedimento imuno-histoquímico utilizado.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que a imunomarcção de utrofina nos músculos DMGR foi mais evidente nos animais com idade igual ou superior a um ano de idade.

A expressão de macrófagos M1 (CD68) e M2 (CD163) nos músculos de cães DMGR foi mais expressiva nas áreas de degeneração e necrose.

O numero de macrófagos M1 não apresentou variação e sua expressão foi discreta nos dois grupos avaliados. Por outro lado, o numero de M2 detectados na musculatura de cães DMGR foi duas vezes o número de M.

Os macrófagos M2 estão entre as principais células inflamatórias mononucleares presentes nas lesões em cães DMGR

A imunomarcção do macrófago M2, sugere que, com a evolução da idade, há aumento moderado deste subtipo de macrófagos no músculo de cães DMGR indicando a associação deste tipo celular com a cronicidade da lesão muscular em cães distróficos.

A imunomarcção do antígeno MHC I foi intensa nos dois grupos avaliados e aumentou com a idade.

A expressão do antígeno MHC II não se alterou independente da idade dos animais.

8. REFERÊNCIAS

AMBROSIO, C. E.; ZUCCONI, E.; MARTINS, D.; VANUCCHI, C.; PEREZ, M.; VIEIRA, N.; VALADARES, M.; JAZEDJE, T.; MIGLINO, M.; ZATZ, M. Extreme clinical variability in GRMD: from neonatal death to asymptomatic carriers. **Neuromuscular Disorders**, London, v. 17, n. 9, p. 776, 2007.

AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAÚJO, K. P. C.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L. T.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.

ANTHONY, D. C.; FROSCHE, M. P.; GIROLAMI, U. nervo periférico e músculo esquelético. In: COTRAN, R.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2010. p. 1257-1279.

ARIEL, A.; SERHAN, C. N. New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 4, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00004>>.

ARNOLD, L.; HENRY, A.; PORON, F.; BABA-AMER, Y.; ROOIJEN, N. van; PLONQUET, A.; GHERARDI, R. K.; CHAUZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 5, p. 1057-1069, 2007.

BALTZER, W. I.; CALISE, D. V.; LEVINE, J. M.; SHELTON, G. D.; EDWARDS, J. F.; STEINER, J. M. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Weimaraner. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 43, n. 3, p. 227-232, 2007.

BANKS, G. B.; CHAMBERLAIN, J. S. The value of mammalian models for Duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. In: KRAUSS, R. (Ed.). **Mouse models of developmental genetic disease**. S. l.: Hardcover, 2008. p. 431-453. (Current Topics in Developmental Biology, 84). Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00609-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00609-1)>.

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, p. 2458-2462.

BERETTA, D. C. **Lesões do músculo gastrocnêmio e da junção músculo tendínea em cães afetados pela distrofia muscular progressiva**. 2011. 51 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

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**, Lakewood, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2002.

BLAKE, D. J.; WEIR, A.; NEWAY, S. E.; DAVIES, K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin related proteins in muscle. **Physiological Review**, Bethesda, v. 82, n. 2, p. 291-329, 2002.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and futures directions. **Journal of Molecular Medicine**, Swannon, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2003.

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

BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D. J.; BIRNKRANT, D. J.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; CRIPE, L. KAUL, A.; KINNETT, K.; McDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, London, v. 9, n. 1, p. 77-93, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6)>.

CLOSE, R. I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, Bethesda, 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**, Chichester, 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.; WILLIAMS, J. R.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, London, 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**, Heidelberg, v. 101, n. 5, p. 469-478, 2001.

DAMOISEAUX, J. G.; DOPP, E. A.; CALAME, W.; CHAO, D.; MACPHERSON, G. G.; DIJKSTRA, C. D. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. **Immunology**, Chichester, v. 83, n. 1, p. 140-147, 1994.

DESGUERRE, I.; MAYER, M.; LETURCQ, F.; PATRICK BARBET, J.; GHERARDI, R. K.; CHRISTOV, C. Endomysial fibrosis in duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. **Journal of Neuropathology e Experimental Neurology**, v. 68, n. 7, p. 762-763, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181aa31c2>>.

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

DUBOWITZ, V. Enigmatic conflict of clinical and molecular diagnosis in Duchenne/Becker muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders, London**, v.16, n. 12, p. 865-866, 2006.

EMERY, A. E. H. Duchenne muscular dystrophy – Meryon's disease. **Neuromuscular Disorders**, London, v. 3, n. 4, p.263-266, 1993.

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.

FALINI, B.; FLENGHI, L.; PILERI, S.; GAMBACORTA, M.; BIGERNA, B.; DURKOP, H.; EITELBACH, F.; THIELE, J.; PACINI, R.; CAVALIERE, A.; MARTELLI, M.; CARDARELI, N.; SABATINI, E.; POGGI, S.; STEIN, H. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 142, p. 1359-1372, 1993.

FAYSSOIL, A.; NARDI, O.; ORLIKOWSKI, D.; ANNANE, D. Cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy: pathogenesis and therapeutics. **Heart Failure Reviews**, New York, v. 15, n. 1, p. 103-107, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10741-009-9156-8>>.

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

GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M, LEY K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656–661, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1178331>>.

GOLBAR, H. M.; IZAWA; T.; MURAI, F.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J. Immunohistochemical analyses of the kinetics and distribution of macrophages, hepatic satellites cells and bile duct epithelia in the developing rat liver. **Experimental and Toxicology Pathology**, Jena, v. 64 p 1-8, 2012.

GOLLA, S.; AGADI, S.; BURNS, D. K.; MARKS, W.; DEV, B. S.; DEL GAUDIO, D.; IANNACCONE, S. T. Dystrophinopathy in girls with limb girdle muscular dystrophy phenotype. **Journal of Clinical Neuromuscular Disease**, Philadelphia, v. 11, n. 4, p. 203-208, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/CND.0b013e3181c7f18f>>.

GORDON, S., TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GREGERSEN, J. W.; KRANC, K. R.; KE, X.; SVENDSEN, P.; MADSEN, L. S.; THOMSEN, A. R.; CARDON, L. R.; BELL, J. I.; FUGGER, L. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. **Nature**, Washington, v. 443, n. 111, p. 574-576, 2006.

HALL, W. C.; ROJKO, J. L. The use of immunohistochemistry for evaluating the liver. **Toxicology Pathology**, Thousand Oaks, v. 24, p. 4–12, 1996.

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

HARRIS, H. W.; GILL, T. J. Expression of class I transplantation antigens. **Transplantation**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 109-117, 1986.

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

HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. **Current Topics in Membranes**, Maryland Heights, v. 38, p. 113-154, 1991. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60785-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60785-6)>.

HOFFMAN, E. P.; BROWN JR., R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, Cambridge, v. 51, n. 6, p. 919–928, 1987.

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**, London, v. 7, n. 5, p. 325–328, 1997.

HSU, S. M.; RAINER, L.; FANGER, H. A. A comparative study of the peroxidase antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, Birmingham, v. 75, n. 5, p. 734-738, 1981.

JONES, B. R.; BRENNAN, S.; MOONEY, C. T.; CALLANAN, J. J.; MCALLISTER, H.; GUO, L. T.; MARTIN, P. T.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese spitz dogs. **Journal of Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 217, n. 2, p. 143-149, 2004.

KARPATI, G.; POULIOT, Y.; CARPENTER, S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. **Annals of Neurology**, Hoboken, v. 23, n. 1, 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 and Experimental Neurology**, Philadelphia, 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.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHILDERS, M. K.; LI, J.; NGHIEM, P.; DETWILER, D. A.; LARSEN, C. A.; GRANGE, R. W.; BHAVARAJU-SANKA, R. K.; TOU, S.; KEENE, B. P.; HOWARD JR, J. F.; WANG, J.; FAN, Z.; SCHATZBERG, S. J.; STYNER, M. A.; FLANIGAN, K. M.; XIAO, X.; HOFFMAN E. P. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. **Mammalian Genome**, Secaucus, v. 23, n. 1-2, p. 85–10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00335-011-9382-y>>.

KOWAL, K.; SILVER, R.; SŁAWIŃSKA, E.; BIELECKI, M.; CHYCZEWSKI, L.; KOWAL-BIELECKA, O. CD163 and its role in inflammation. **Folia Histochemical e Cytobiologica**, Krakow, v. 49, n. 3, p. 365–374, 2011.

LAGROTA-CANDIDO, J.; VASCONCELLOS, R.; CAVALCANTI, M.; BOZZA, M.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. **International Journal of Experimental Pathology**, Chichester, v. 83, n. 3, p. 121–132, 2002.

LEE, W-H.; ABE, S.; KIM, H-J.; USAMI, A.; HONDA, A.; SAKIYAMA, K.; IDE, Y. Characteristics of muscle fibers reconstituted in the regeneration process of masseter muscle in an mdx mouse model of muscular dystrophy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Dordrecht, v. 27, p. 235–240, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10974-006-9066-5>>.

LEYSER, M.; MARQUES, F. J. P.; ELIAS, M. A. C.; GONSALVES, M. C. D.; SILVA JR., O. S. da; CARVALHO, R. S.; SILVA, C. C.; VACONCELOS, M. M. de; NASCIMENTO, O. J. M. Classic manifestations of Duchenne dystrophy in a young female patient: A case report. **European Journal of Paediatric Neurology**, London, v. 17, n. 2, p. 212-218, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.08.002>>.

LIU, G.; YANG, H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 228, n. 2, p. 502-512, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24157>>.

LUNDGBERG, I.; BRENGMAN, J. M.; ENGEL, A.G. Analyze of cytokine expression in muscle in inflammatory miopathies, Duchenne's dystrophy and non-weak controls. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 9-16, 1995.

MARBINI A.; GEMIGNANI, F.; BELLANOVA, M. F.; GUIDETTI, D.; FERRARI, A. Immunohistochemical localization of utrophin and other cytoskeletal proteins in skin smooth muscle in neuromuscular diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 143, n. 2-3, p.156- 216, 1996.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Reviews of Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

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**, Amsterdam, v. 89, n. 1-2, p. 213-226, 1989.

MCLENNAN, I. S. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. **Journal of Anatomy**, Chichester, v. 188, pt. 1, p. 17-28, 1996.

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

MIYAZATO, L. G.; BERETTA, D. C.; ENGRACIA FILHO, J.R.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Evaluation of intracellular calcium in canine muscular dystrophy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 95-102, 2011a.

MIYAZATO, L. G.; BERETTA, D. C.; ENGRACIA FILHO, J. R.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Involvement of Organic Systems in Golden Retriever X-linked Muscular Dystrophy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 87-94, 2011b.

MIYAZATO, L. G.; MORAES, J. R. E.; BERETTA, D. C.; KORNEGAY, J. N. Muscular dystrophy in dogs: does the crossing of breeds influence disease phenotype? **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 48, n. 655, 2011c. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985810387070>>.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.

NAGARAJU, K. Role of major histocompatibility complex class I molecules in autoimmune myositis. **Current Opinion Rheumatology**, New York, v. 17, n. 6, p. 725-730, 2005.

NGUYEN, H. X.; TIDBALL, J. G. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use. **The Journal of Physiology**, Chichester, v. 550, n. 2, p. 347-356, 2003a.

NGUYEN, H. X.; TIDBALL, J. G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells *in vitro*. **The Journal of Physiology**, Chichester, v. 547, n. 1, p. 125-132, 2003b.

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**, London, 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.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 5, n. 3, p. 201-214, 2005.

PARTRIDGE, A. C. T.; BOU-GARCIA, G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, Bethesda, v. 293, n. 2, p. 661-669, 2007.

PASTORET, C. I.; SEBILLE, A. Mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 97-105, 1995.

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**, Oxford, v. 2, n. 11, p. 1765-1772, 1996.

PELLEGRINO, A.; PETRUS, L. C.; PEREIRA, G. G.; SOARES, E. C.; YAMATO, R.; J.; FERNANDEZ, E. L.; LARSSON, A. H. M.; A. Padronização de parâmetros ecocardiográficos de cães da raça Golden Retriever clinicamente sadios. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1039-1044, 2007.

PHILIPPIDIS, P.; MASON, J. C.; EVANS, B. J.; NADRA, I.; TAYLOR, K. M.; HASKARD, D. O.; LANDIS, R. C. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. **Circulation Research**, Baltimore, v. 94, n. 1, p. 119-126, 2004.

PONDER B. A.; WILKINSON, M. M.; WOOD, M.; WESTWOOD, J. H. Immunohistochemical demonstration of H2 antigens in mouse tissue sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 31, n. 7, p. 911-919, 1983.

PONS, F.; ROBERT, A.; FABBRIZIO, E.; HUGON, G.; CALIFANO, J. C.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; MORNET, D. Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. **Circulation**, Des Plaines, v. 90, n. 1, p. 369-374, 1994.

RADOJEVIC, V.; LIN, S.; BURGUNDER, J. M. Differential expression of dystrophin, utrophin, and dystrophin-associated proteins in human muscle culture. **Cell Tissue Research**, Secaucus, v. 300, n. 3, p. 447-457, 2000.

SCHAER, D. J.; BORETTI, F. S.; HONGEGGER, A.; POEHLER, D.; LINNSCHIED, P.; STAEGE, H.; MULLER, C.; SCHOEDON, G.; SCHAFFNER, A. Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. **Immunogenetics**, Heidelberg, v. 53, n. 2, p. 170–177, 2001.

SIFRINGER, M.; UHLENBERG, B.; LAMMEL, S. Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. **Human Genetics**, Heidelberg, v. 114, n. 2, p. 149-156, 2004.

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 Internal Medicine**, Lakewood, 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**, Seoul, v. 44, n. 1, p. 15-23, 2003.

SHIMATSU, Y.; KATAGIRI, K.; FURUTA, T.; NAKURA, M.; TANIOKA, Y.; YUASA, K.; TOMOHIRO, M.; KORNEGAY, J. N.; NONAKA, I.; TAKEDA, S. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). **Experimental Animal**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 93–97, 2003.

SHIINA, T., OTA, M., SHIMIZU, S., KATSUYAMA, Y.; HASHIMOTO, N.; TAKASU, M.; TATSUYA, A.; KULSKI, J. K.; KIKKAWA, E.; NARUSE, T.; KIMURA, N.; YANAGIYA, K.; WATANABE, A.; HOSOMICHI, K.; KOHARA, S.; IWAMOTO, C.; UMEHARA, Y.; MEYER, A.; WANNER, V.; SANO, K.; MACQUIN, C.; IKEO, K.; TOKUNAGA, K.; GOJOBORI, T.; INOKO, H.; BAHRAM, S. Rapid evolution of major histocompatibility complex class I genes in primates generates new disease alleles in humans via hitchhiking diversity. **Genetics**, Heidelberg, v. 173, n. 3, p. 1555-1570, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.057034>>.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University Press, 1974. p. 507.

SPENCE, H. J.; CHEN, Y. J.; WINDER, S. J. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. **BioEssays**, Chichester, v. 24, n. 6, p. 542–552, 2002.

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

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

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.

TAKAHASHI, K.; NAITO, M.; TAKEYA, M. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. **Pathology International, Richmond**, v. 46, n. 7, p. 473–485, 1996.

TRAHERNE, J. A. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. **International Journal of Immunogenetics**, Chichester, v. 35, n. 3, p.179–192, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2008.00765.x>>.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 2, p. R345-R353, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00454>>.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Evolving therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. **Pediatric Research**, New York, v. 56, n. 6, p. 831–841, 2004.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. **Current Opinion in Rheumatology**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 703-713, 2005.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fiber growth and regeneration during modified muscle loading in mice *in vivo*. **Journal of Physiology**, Chichester, v. 578, p. 327–336, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118265>>.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 298, n. 5, p. 1173-1187, 2010.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 5, p. 543-555, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003000500001>>.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscles in neonatal dogs. **Neuromuscular Disorders**, Ankara, v. 1, n. 1, p. 31-38, 1991.

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

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

VALLEDOR, A. F.; BORRAS, F. E.; CULLELL-YOUNG, M.; CELADA, A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 63, n. 4, p. 405-417, 1998.

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**, Oxford, v. 18, p. 482-496, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn376>>.

VILLALTA, S. A.; DENG, B.; RINALDI, C.; WEHLING-HENRICKS, M.; TIDBALL, J. G. IFN-g promotes muscle damage in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy by suppressing m2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 187, n. 10, p. 5419-5428. 2011a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101267>>.

VILLALTA, S. A.; RINALDI, C.; DENG, B.; LIU, G.; FEDOR, B.; TIDBALL, J. G. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 20, n. 4, 2011b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq523>>.

VOIT, T.; HAAS, K.; LEGER, J.; PONS, F.; LEGER, J. J. Xp21 dystrophin and 6q24 dystrophin related protein: comparative immunolocalization using multiple antibodies. **American Journal of Pathology**, New York, v. 139, p. 969- 976, 1991.

WEHLING-HENRICKS, M.; TIDBALL, J. G. Neuronal nitric oxide synthase-rescue of dystrophin/utrophin double knockout mice does not require nnos localization to the cell membrane. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371.2011>>.

WEHLING-HENRICKS, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 155, n. 1, p. 123–131, 2001.

WEHLING-HENRICKS, M., JORDAN, M. C.; GOTOH, T.; GRODY, W. W.; ROOS, K. P.; TIDBALL, J. G. Arginine metabolism by macrophages promotes cardiac and muscle fibrosis in mdx muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 21, n. 5, p. 107-63, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010763>>.

WEHLING-HENRICKS, M.; TIDBALL, J. G. Neuronal nitric oxide synthase-rescue of dystrophin/utrophin double knockout mice does not require nnos localization to the cell membrane. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371.2011>>.

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 α_7 integrin and utrophin. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 175, n. 4, p. 1545-1554, 2009.

WERNECK, L. Perspectivas em doenças neuromusculares: distrofia muscular de Duchenne. **Revista Brasileira de Neurologia**, Rio de Janeiro, 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**, Richmond, v. 33, n. 7, p. 657-562, 2006.

WIECZOREK, L. A., GAROSI, L. S., SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in an old english sheepdog. **The Veterinary Record**, London, v.158, n. 8, p. 270-273, 2006.

WINDER, S. J.; HEMMINGS, L.; MACIVER, S. K.; BOLTON, S. J.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E.; CRITCHLEY, D. R.; KENDRICK-JONES, J. Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, pt. 1, p. 63-71, 1995.

YAMATE, J.; YOSHIDA, H.; TSUKAMOTO, Y.; IDE, M.; KUWAMURA, M.; OHASHI, F. Distribution of cells immunopositive for AM-3K, a novel monoclonal antibody recognizing human macrophages, in normal and diseased tissues of dogs, cats, horses, cattle, pigs, and rabbits. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 37, p. 837-847, 2000.

YONA, S., YUNG, S. Monocytes: subsets, origin, fate and function. **Current Opinion Hematology**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 53-55, 2010.

YUSUF, F.; BRAN-SABERI, B. Myogenesis and muscle regeneration. **Histochemistry Cellular Biology**, Heidelberg, v.138, p. 187-199. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00418-012-0972-x>>.

]

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**, Philadelphia, v. 13, n. 5, p. 511-517, 2000.