



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde
Mestrado e Doutorado - UNISUL

ARYADNNE LUYSE SCHACTAE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E A
ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM
CAMUNDONGOS COM Distrofia Muscular Congênita 1D**

PALHOÇA

2015

ARYADNNE LUYSE SCHACTAE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E A
ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM
CAMUNDONGOS COM DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA 1D**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora Profa. Dra. Clarissa Martinelli Comim

PALHOÇA

2015

ARYADNNE LUYSE SCHACTAE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E A
ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM
CAMUNDONGOS COM Distrofia Muscular Congênita 1D**

Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Palhoça, 28 de setembro de 2015

Orientador: Prof.Dra. Clarissa Martinelli Comim
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins
Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Dra. Leidiane Mazzardo Martins
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me amparar em todos os momentos, por me dar forças para superar todas as dificuldades e mostrar o caminho certo a seguir.

A minha orientadora, Professora Doutora Clarissa M. Comim que considero não somente a melhor professora, mas sim uma pessoa excepcional com um coração enorme, que sempre esteve ao meu lado me auxiliando e me incentivando a ser cada vez melhor.

A minha família, em especial minha mãe, irmã e avó e minhas lindas sobrinhas, que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes e me deram o maior amor do mundo.

Agradeço aos meus amigos, com ênfase a minha amiga Andreza Hoepers, por todo a incentivo, confiança, estadias free, tapiocas, risadas, puxões de orelha que me ajudam a crescer e acreditar que existem pessoas especiais em nossa vida que jamais esqueceremos.

RESUMO

Distrofia Muscular Congênita do tipo 1D é uma doença neuromuscular, caracterizada pela glicosilação anormal da proteína alfa-distroglicana, e isto pode estar fortemente implicada no desenvolvimento anormal do sistema nervoso central, levando ao comprometimento cognitivo observado em pacientes e em modelo animal. A fisiopatologia do envolvimento do cérebro ainda não está clara, entretanto, pesquisas recentes indicam uma possível ligação entre alterações do sistema nervoso central com quebra da integridade da barreira hematoencefálica. A barreira é uma estrutura presente entre o tecido encefálico e circulatório, constituído por metaloproteinases de matriz, que possuem a função de controlar e regular a homeostase do sistema nervoso central. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a integridade da barreira hematoencefálica e a atividade das metaloproteinases de matriz 2 e 9 em tecido encefálico no animal Large. Para o estudo, usaram-se camundongos machos adultos (60 dias de vida), homozigotos (animais Large), heterozigotos e selvagens (C57BL/6) para a avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e a atividade das metaloproteinases 2 e 9 em hipocampo, estriado e córtex cerebral, a escolha das estruturas avaliadas foi devido a estas apresentarem barreira hematoencefálica segundo estudos prévios. Verificou-se um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica significativo nas estruturas de hipocampo e estriado em camundongos Large homozigotos em comparação com o grupo selvagem. Em relação as metaloproteinases, houve um aumento da atividade da metaloproteinase 2 nas estruturas de córtex e estriado, quanto a metaloproteinase 9 houve um aumento na sua atividade na estrutura hipocampo quando comparados ao grupo selvagem. Este estudo mostrou a evidência de que uma glicosilação anormal da proteína alfa-distroglicana pode estar afetando a permeabilidade da barreira hematoencefálica e da atividade das metaloproteinases 2 e 9 no tecido encefálico, contribuindo para o envolvimento do sistema nervoso central na distrofia muscular congênita do tipo 1D.

Descritores: camundongo LARGE; barreira hematoencefálica; metaloproteinases de matriz; Sistema Nervoso Central.

ABSTRACT

Congenital muscular dystrophy type 1D is a neuromuscular disease characterized by abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan protein, and that may be closely involved in the abnormal development of the central nervous system, leading to cognitive impairment observed in patients and in animal model. The pathophysiology of brain involvement is still unclear, however, recent research indicates a possible link between changes in the central nervous system with breaking the integrity of the blood brain barrier. The barrier structure is present between the circulatory and brain tissue, consisting of matrix metalloproteinases, which have the function of controlling and regulating the homeostasis of the central nervous system. In this context, the aim of this study was to evaluate the integrity of the blood brain barrier and the activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in brain tissue in Large animal. For the study, it was used adult male mice (60 days old), homozygous (Large animals), heterozygous and wild (C57BL / 6) for evaluating the integrity of the blood brain barrier and the activity of metalloproteinases 2 and 9 in the hippocampus, striatum and cortex. There was a significant increase in permeability of the blood brain barrier in hippocampal structures in Large homozygous mice compared with wild group. Regarding the metalloproteinases, there was an increase in metalloproteinase 2 activity in cortex structures and striatum, as the metalloproteinase 9 there was an increase in activity in the hippocampus structure when compared to the wild group. This study showed evidence that an abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan protein may be affecting the permeability of the blood-brain barrier and the activity of metalloproteinases 2 and 9 in brain tissue, thus contributing to the involvement of the central nervous system in congenital muscular dystrophy type 1D .

Keywords: mouse LARGE; blood-brain barrier; matrix metalloproteinases; Central nervous system.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

BHE – Barreira hematoencefálica

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CK – Creatina quinase (do inglês creatina kinase)

DMC – Distrofia muscular congênita

DMC1D – Distrofia muscular congênita do tipo 1 D

DMP's – Distrofias musculares progressivas

FKRP - Fukutina relacionada (do inglês fukutin related protein)

HT – Camundongos Heterozigotos

KO – nocaute (do inglês knockout)

MMP – Metaloproteinases

PGFA – Proteína acida fibrilar glial

SMN - Sobrevivência neuromotora

SNC – Sistema nervoso central

TRIM32 - Proteína tripartite 32

WT – Selvagens (do inglês wild type)

α -DG – α -Distroglicana

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Desenho experimental | 22 |
| Figura 2 - Integridade da BHE. Dados são apresentados com média \pm S.E.M, n=8 animais por grupo. *p<0,05 versus WT. | 24 |
| Figura 3 - Atividade das MMP 2 e 9 em hipocampo (2A e 2B), córtex cerebral (2C e 2D) e em estriado (2E e 2F). Os dados são apresentados com média \pm S.E.M, n=8 animais por grupo. *p<0,05 versus WT. | 25 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 11 |
| 1.1.1 DISTROFIAS MUSCULARES PROGRESSIVAS | 11 |
| 1.1.2 DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA 1D..... | 11 |
| 1.1.3 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA 1D | 13 |
| 1.1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE) | 14 |
| 1.1.5 METALOPROTEINASES 2 E 9 | 16 |
| 1.1.6 MODELO ANIMAL DE DMC1D | 18 |
| 2 OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 20 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 3 METODOLOGIA | 21 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDO | 21 |
| 3.2 ASPECTOS ÉTICOS..... | 21 |
| 3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... | 21 |
| 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL | 21 |
| 3.4.1 Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica por azul de Evans | 22 |
| 3.4.2 Isolamento de tecido cerebral para dosagem de Metaloproteinasas | 23 |
| 3.4.2.1 ZIMOGRAFIA PARA MEDIÇÃO DA MMP-2 E MMP- 9 | 23 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 23 |
| 4 RESULTADOS | 24 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA..... | 24 |
| 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADES DA METALOPREOTEINASES 2 E 9 | 24 |
| 5 DISCUSSÃO | 26 |
| 6 CONCLUSÃO | 30 |
| REFERÊNCIAS | 31 |
| ANEXO | 40 |

1 INTRODUÇÃO

As Distrofias Musculares Progressivas (DMPs) estão entre as doenças neuromusculares incapacitantes mais graves¹, sendo consideradas doenças causada por alterações genéticas que tem como características a fraqueza muscular generalizada, progressiva e irreversível. As distrofinopatias diferem entre si pela idade de início dos sintomas e pela gravidade se sua evolução clínica².

As Distrofias Musculares Congênitas (DMC) se referem a um grupo hereditário heterogêneo de doenças nas quais os sintomas se manifestam ao nascimento ou ainda na primeira infância³. A Distrofia Muscular Congênita do tipo 1D (DMC1D), é a doença genética que ocorre pela mutação no gene LARGE que possui como característica o comprometimento do sistema muscular esquelético, músculo cardíaco e sistema nervoso central (SNC)⁴. Sua origem genética é associada a uma hipoglicosilação da proteína α -dystroglicana (α -DG), componente essencial na gênese e desempenho do complexo de glicoproteínas que mantêm a estabilidade da membrana plasmática⁵.

Estudos demonstram que as alterações no SNC podem estar ligadas a alterações na Barreira Hematoencefálica (BHE) em modelos animais de doenças neuromusculares como a Distrofia Muscular de Duchenne⁶. A BHE é uma estrutura encontrada entre o tecido encefálico e a corrente sanguínea⁷, que tem o papel de controlar e regular a homeostase do SNC⁸, através das metaloproteinases de matriz (MMP), constituintes da barreira, que quando deficitárias, contribuem para o aumento da permeabilidade⁹.

Outra característica importante e associada a DMC1D é o grave comprometimento cognitivo presente tanto em pacientes¹⁰ como em modelos animais^{11,12}.

Em um estudo que avaliou a fisiopatologia das alterações no SNC em um modelo animal de DMC1D, observou-se que ocorre disfunção da memória de habituação e aversiva, dano oxidativo, disfunção mitocondrial e a diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), sendo o último responsável pela existência neuronal, sinapses e pela plasticidade sináptica^{11,12}.

Entretanto, os processos fisiopatológicos envolvidos no comprometimento cognitivo ainda não estão esclarecidos na literatura. Neste contexto, esta pesquisa busca compreender os mecanismos envolvidos na relação das alterações do SNC e

a DMC1D, através da avaliação da integridade da BHE e as atividades das metaloproteinases de matriz 2 e 9, que são possíveis vias comprometidas na doença. Com o aprofundamento do conhecimento sobre as vias participantes do processo fisiopatológico é possível compreender melhor a DMC1D e desenvolver novas possibilidades terapêuticas com o intuito de prevenir e tratar o comprometimento do SNC.

1.1 Fundamentação teórica

1.1.1 Distrofias Musculares Progressivas

As DMPs compõem uma procedência de patologias desiguais, porém todas relacionadas à distúrbios genéticos, caracterizadas pela degeneração progressiva e irreversível do sistema muscular¹³. As DMP se diferem pela herança genética alterada podendo ser recessivas ligadas ao cromossomo X, autossômicas recessivas ou autossômicas dominantes, assim como pelo comprometimento de musculaturas específicas, início dos sintomas e o quadro de evolução da doença¹⁴.

Estudos mostram que as mutações genéticas ocorridas nas DMPs, causam deficiência ou ausência funcional de várias proteínas constituintes do sistema de glicoproteínas associadas a membrana celular¹⁴. Como constituinte dos compartimentos das fibras encontramos as proteínas determinantes, associada à membrana sarcolemal, encontram-se a distrofina, as 4 sarcoglicanas (α -, β -, γ - e δ -SG), disferlina e caveolina 3: na matriz extracelular, a $\alpha 2$ -laminina e o colágeno VI: nos sarcômeros, a teletonina, miotilina, titina, actina e tropomiosina; no citosol, a calpaína 3, fukutina (FKRP), proteína tripartite 32 (TRIM32), miotubularina; e nos núcleos, a emerina, laminina A e C e proteína de sobrevivência neuromotora (SMN)¹⁵. A alteração associada a cada uma dessas proteínas e seus complexos são responsáveis pelo desenvolvimento dos tipos de DMP's¹⁵.

1.1.2 Distrofia Muscular Congênita 1D

As Distrofias Musculares Congênitas (DMC) são patologias predominantemente de herança autossômica recessiva, com suas manifestações

clínicas advindas na infância e se apresenta como a distrofia mais prevalente, acometendo 1 a cada 3.500 nascidos vivos no mundo¹⁶.

A classificação das DMC se apresenta da seguinte forma: DMC com deficiência de merosina; DMC com anormalidades na glicosilação da α -dístroglicana e DMC associada a deficiência à integrina¹⁷. Em pesquisas referentes à DMC, os achados facilitam determinar as múltiplas formas da doença que são ligadas a mutações de codificação das glicosiltransferases, enzima contribuinte na glicosilação da proteína α -DG¹⁸ e atuante na comunicação entre as células e a matriz extracelular assim como no recrutamento de neurônios ao SNC¹⁹.

A partir disto, para o grupo que apresenta essas características morfológicas, podem ocorrer mutações no gene LAMA 2, sendo o mais comum e responsável por 40% dos casos de DMC²⁰, e de forma mais rara nos genes FKRP, POMT1, POMGnT1, FKTN e LARGE, denominados coletivamente como distroglicanopatias¹⁹.

Alterações no gene LARGE são classificados como DMC1D. A mutação do gene LARGE é do tipo autossômica recessiva e ocorre no cromossomo 22 no locus q12, responsável por alterações cardíacas, musculares e esqueléticas⁴. Este gene está altamente envolvido na glicosilação da proteína α -DG, necessária no desenvolvimento e funcionamento do complexo distrofina-glicoproteínas⁵.

A proteína alfa distroglicana é uma proteína altamente glicosilada sendo importante para as interações célula e matriz extracelular e na migração de células neuronais¹⁹.

A alteração da glicosilação da proteína α -DG é associada a um influxo excessivo de cálcio para o citoplasma celular o que causa uma contração excessiva e dano da fibra muscular e da membrana celular, como resposta ocorre um processo inflamatório crônico, o aumento do estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético com diminuição na produção de ATP (trifosfato de adenosina), levando a a morte da célula²¹.

O quadro clínico de pacientes envolve fraqueza muscular, hipotonia, atraso no desenvolvimento motor e deformidade músculo esquelética^{22,23}. Ao exame de biopsia muscular é observada a presença de miopatia distrófica, com alteração das fibras musculares, desenvolvimento anormal do tecido conjuntivo e a substituição do tecido muscular por tecido adiposo²⁴. Os déficits podem se restringir a musculatura esquelética ou ainda afetar o SNC²⁵.

Para o preciso diagnóstico é necessário além da biópsia, exames complementares de ressonância magnética e níveis de creatina quinase (que se apresentam elevadas nesses indivíduos) assim como a avaliação de especialistas nas áreas da genética, morfologia e neuroradiologia²⁶.

Até 2010 foram descritos na literatura somente 11 casos onde foram comprovadas alterações na glicosilação da proteína α -DG onde apresentavam características clínicas músculo esqueléticas e cerebrais²⁷.

Em pesquisa recente com pacientes de mutações no gene LARGE, foi descrito características da DMC1D, onde todos os pacientes apresentaram atraso cognitivo, aumento nos níveis de creatina quinase e alterações encefálicas. Em relação as alterações musculares foi observado atraso nos marcos motores, hipotonia e disartria²⁸.

Em seu estudo Mendell e colaboradores³ verificaram como características clínicas em paciente com DMC1D, um atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, fraqueza muscular facial, hipertrofia muscular, alteração de marcha e deficiência cognitiva.

1.1.3 Envolvimento do Sistema Nervoso Central na Distrofia Muscular Congênita 1D

Na DMC distúrbios que afetam o SNC podem ocasionar um acometimento da substância branca do encéfalo associado a alterações estruturais, atraso cognitivo, anormalidade oculares²⁵, e diminuição da massa cerebral com associação de deficiência intelectual em 70% dos casos¹⁶.

A anormalidade no processo de glicosilação de α -DG, ocorre com maior intensidade na DMC do tipo 1D. Este procedimento é fundamental na integridade de formação do SNC⁴. Sabe-se que o comprometimento do SNC é descrito pelo evento de desorganização da disposição da laminação cortical e falhas na transferência e formação de neurônios, essenciais ao desenvolvimento do encéfalo²⁹. Satz e colaboradores³⁰, afirmam que essas alterações advêm do desencontro entre a glicosilação da proteína α -DG e o seu ligante, o que causa a ruptura da lâmina basal e assim a origem do acometimento do SNC na DMC1D.

Além disso, o complexo de proteínas α -DG, desempenha um papel importante na função sináptica, portanto indicam funções deficitárias em hipocampo,

gerando alterações de aprendizagem e memória em portadores de distrofinopatias, sendo assim, uma possível ocorrência é a alteração na função encefálica desses indivíduos³¹.

Pela diferenciação no processo de desenvolvimento cerebral ocasionado na DMC1D, ao observar o quadro clínico desses indivíduos, estudos evidenciaram: (1) alterações no desempenho cognitivo, associado a uma dificuldade na realização de atividades fundamentais de sobrevivência; (2) dano significativo das funções linguísticas³²; (3) epilepsia e (4) dificuldade de aprendizagem³⁰.

Neste contexto, indivíduos com DMC1D podem apresentar deficiência intelectual grave e alteração na migração neuronal^{10,33}. Tem-se visto que a migração neuronal atua na formação do encéfalo em mamíferos, por isso defeitos nessa migração e na desorganização da laminação cortical e da sua estrutura podem estar envolvidos em algumas das alterações descritas em DMC1D³⁴. As estruturais encefálicas que apresentam agravo são frequentemente o cerebelo, o córtex cerebral³⁰, a substância branca encefálica³⁵ e o hipocampo, onde verifica-se emaranhados de neurofibrilas atípicos podendo levar à dano cognitivo³⁶.

Meilleur e colaboradores²⁸, descreveram em seu estudo achados através da ressonância magnética de pacientes de DMC1D, onde foram encontrados resultados como hipoplasia cerebelar, dilatação dos ventrículos cerebrais, lisencefalia, má formações encefálicas e feixes de fibras mielínicas deslocados no cérebro o que pode sugerir uma distúrbio na integridade axonal destes pacientes.

Em outras distrofias musculares como a DMD, são observadas deficiência cognitiva em pacientes e em modelos animais³⁷. Estudos demonstram que nestes animais com deficiência cognitiva há relação entre a disfunção da BHE e a atividade das MMP⁶, contudo o conhecimento das modificações em DMC1D e a deficiência cognitiva ainda encontram-se em processo de evolução.

1.1.4 Barreira Hematoencefálica (BHE)

A BHE (Figura 02) é uma estrutura especializada do SNC, localizada entre o tecido encefálico e a corrente sanguínea⁷, responsável por controlar e regular a homeostase⁷ e por ser fundamental para proteção do encéfalo³⁸. É uma passagem permeável, mas possui uma função seletiva. Algumas substâncias como oxigênio, água, dióxido de carbono e certos fármacos podem ultrapassar com

facilidade pela barreira. Porém a glicose, algumas vitaminas, aminoácidos entre outros, só tem acesso por meio de transportes ativos de receptores ou pela difusão facilitada³⁹. Morfologicamente, a BHE apresenta diversas estruturas responsáveis por sua manutenção e funcionamento como as células endoteliais, as junções apertadas e as junções aderentes, reguladoras da permeabilidade celular⁴⁰. As junções apertadas, são formadas pelas proteínas claudinas, ocludinas e moléculas de adesão, que auxiliam na integridade da estrutura e função do endotélio^{41,42}. Os astrócitos são células da glia, que possuem um desempenho ativo na manutenção e sinalização das células endoteliais e vasculares⁴³ e no processamento de informações e modulação da atividade neuronal, envolvidos na permeabilidade da BHE⁴⁴.

O espaço situado entre os vasos sanguíneos e as células da glia é chamado de matriz extracelular. Esta matriz realiza a comunicação de suas proteínas com os receptores localizados no endotélio⁴⁰ que, por sua vez, atuam na sinalização celular, na migração e constituição capilar durante a formação de novos vasos sanguíneos dentro da BHE⁴⁵. Por fim, os pericitos realizam a auto-regulação e a homeostase do encéfalo, logo, são essenciais na manutenção da BHE, pois são células contráteis que regulam o fluxo sanguíneo capilar⁹. Os pericitos propagam moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular e as MMP, reguladoras da barreira hematoencefálica⁴⁶. Todas as células constituintes desta barreira são consideradas unidades neurovasculares, uma disfunção na unidade neurovascular pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade celular causando distúrbios em SNC^{47,48}.

Figura 1 - Barreira Hematoencefálica, adaptado de Kim, 2008.

Quando falamos em disfunções da BHE e doenças podemos observar que estudos comprovam o envolvimento da unidade neurovascular no edema cerebral⁴⁹ durante episódios isquêmicos que levam a doenças neurodegenerativas irreversíveis⁵⁰, disfunções da barreira também são observadas em doenças como acidente vascular encefálico, traumatismo crânio encefálico, lesão cerebral traumática, esclerose múltipla, neoplasias, epilepsias, Alzheimer e deficiência cognitiva^{51,52}.

Quanto as distrofias, sabe-se que as proteínas da família da distrofina foram observada em micro vasos do cérebro e em astrócitos e estes resultados sugerem que a proteína distrofina desempenham um papel nas funções de BHE⁵³. Nico e colaboradores⁶, demonstraram em seu estudo com modelo animal de distrofia muscular de Duchenne uma alteração estrutural na parede dos vasos cerebrais, assim como modificações em células endoteliais da BHE como as junções apertadas, zonas ocludens, claudinas, astrócitos e pericitos, descrevendo que estas alterações endoteliais e moleculares levam a um aumento da permeabilidade da BHE.

Apesar dos estudos que descrevem o envolvimento da disfunção da BHE em varias doenças, ainda não existem estudos que mostram alterações na permeabilidade da BHE na DMC1D.

1.1.5 Metaloproteinases 2 e 9

Mediadoras nas doenças do SNC⁵⁴, as MMP são enzimas responsáveis pela degradação ou modificação dos componentes da matriz extracelular⁵⁵ da membrana basal perivascular, assim como, do colágeno, laminina e proteoglicanos^{56,57}. Geralmente encontradas inativas, as MMP pertencem a uma família multigênica de proteases neutras zinco-dependentes, codificada em 23 genes distintos em humanos⁵⁸. As enzimas MMP são sintetizadas quando necessário e transcritas por sinais relacionados as citocinas, estresse mecânico ou fator de crescimento. Já sua ativação pode ocorrer pelo trabalho das proteases plasmina e funina, ou ainda pela ação de outras MMP^{59,60}.

Suas classificações são determinadas de acordo com os nomes específicos, numerações e estruturas⁶¹: a) collagenases verdadeiras, que comandam a tripla hélice do colágeno (MMP: 1, 8, 13); b) gelatinases, que atingem o colágeno e a gelatina desnaturada (MMP: 2, 9); c) estromelinas que degradam os proteoglicanos (MMP: 3, 10, 11); d) matrilisinas que degradam a fibronectina e laminina (MMP: 7, 26); e) metaloproteinase ligada à membrana que degradam gelatina, fibronectina, agrecan e outros componentes da membrana extracelular (MMP: 14, 15, 16, 17, 23, 24, 25); f) outras MMP (MMP: 12, 19, 20, 21, 27 e 28)^{62,63}, que degradam proteínas do tecido conjuntivo e todos os substratos da matriz⁶⁴.

As MMP 2 e 9 são enzimas da classe das gelatinases que são os principais elementos da BHE, tem a função de decompor componentes como colágeno tipos I, II, III e IV, elastina e proteoglicanos⁶⁵. A MMP-2 de 72kDa, tem habilidade de degradar colágenos V, VII, XI e a fibronectina inativa, já a MMP-9 é uma enzima de 92 kDa, armazenada na forma ativa ou latente no citosol, sendo que seu desenvolvimento pode ser influenciado por citocinas, espécies reativas de oxigênio e fatores de crescimento⁶⁶. Para que ocorra um controle adequado dos efeitos das MMP, três mecanismos são necessários: regulação da transcrição de genes; regulação da ativação de pró-enzimas; e existência de inibidores específicos. Estes mecanismos proporcionam um equilíbrio entre produção, ativação e inibição dos componentes com direta relação na degradação da matriz extracelular⁶².

A complexidade na regulação e a ativação das MMP faz com que ocorra um controle de suas expressões no SNC, quando ocorre a perda deste controle isso se torna uma relação com a alteração da BHE, a quebra da barreira permite o influxo de substâncias, como por exemplo leucócitos e ativação da micróglia, o que leva a uma resposta inflamatória encontrada em diversas doenças com alterações da BHE⁸.

O papel na participação do desenvolvimento neuronal, em respostas a lesões e doenças neurológicas das MMPs vem sendo discutidos em vários estudos⁶⁷⁻⁶⁹. A hipótese de participação na memória e aprendizagem⁷⁰⁻⁷², e em prováveis modificações estruturais de axônios e dendritos⁷¹. A ênfase maior está associada as MMP 2 e 9, que são formas básicas encontradas em estruturas encefálicas como córtex, cerebelo e hipocampo⁶⁹.

O envolvimento das MMPs já foi evidenciado em várias doenças, como na doença de Parkinson onde as MMPs contribuem para a fisiopatologia da doença por suas alterações na substância negra causando distúrbios por ativação microglial, processo inflamatório, apoptose dopaminérgica e alteração da BHE⁷³⁻⁷⁷, tendo em vista que o bloqueio das MMPs pode diminuir a inflamação em SNC, morte das células e incapacidade funcional em alguns modelos animais da doença de Parkinson⁷⁸.

Na doença de Alzheimer a ativação anormal das MMPs podem contribuir para sua fisiopatologia, pois estas são primordiais na regulação de formação e eliminação de peptídeos beta-amilóide, o que tem um duplo papel na patogênese, podendo diminuir os depósitos de beta-amilóides, auxiliando na melhora ou estabilização da doença, ou contribuir para a destruição encefálica⁷⁹⁻⁸².

Foi observado um envolvimento das MMPs de matriz, principais constituintes da BHE, na distrofia muscular através de estudos em modelos animais, onde os resultados comprovaram um aumento da atividade das MMP 2 e 9, o que pode levar a uma degradação de outras células constituintes da BHE como as junções apertadas⁶. Com recente pesquisa também observou-se que modelos animais de distrofia, como o Large apresentam dano oxidativo¹² sendo que esta alteração pode estar envolvida na ativação das MMP de matriz.

1.1.6 Modelo animal de DMC1D

Dentro das DMP, os modelos animais utilizados apresentam alterações observadas em humanos portadores da doença neuromuscular, os fenótipos analisados nos animais são advindos de uma forma hereditária ou ainda são geneticamente modificados em laboratório, assim sendo, os modelos animais são recursos de estudos histopatológicos, genéticos, clínicos e terapêuticos que fornecem conhecimento para a compreensão das doenças manifestadas em humanos⁸³.

O camundongo denominado Large^{myd}, é um modelo murino que possui características semelhantes à de humanos afetados pela distrofia muscular congênita do tipo 1D. Identificado nos Estados Unidos em 1963, surgiu de uma

mutação no gene da LARGE, localizado no cromossomo 22q12 nos camundongos assim como nos humanos^{4,84}. Mutações no gene desta proteína geram deficiência na glicosilação de α -distroglicana que passa a ser incapaz de realizar uma correta ligação com os componentes da matriz extracelular e as proteínas internas da fibra muscular, em consequência ocorre a característica distrófica⁸⁴.

Alguns aspectos fenotípicos são vistos em animais Large, como diminuição da aptidão reprodutiva, altos níveis de creatina quiase e depósito de cálcio no diafragma. Em relação a parte histológica muscular, apresentam uma miopatia focal, com áreas de necrose aguda, calibres diferenciados de fibras sendo que estas se apresentam em regeneração ou degeneração, diminuição das estrias e núcleos centralizados⁸⁵, como sintomas apresentam fraqueza muscular progressiva com comprometimento esquelético e cardíaco⁸³.

Os animais Large podem ser reconhecidos com 12-15 dias pela restrição de tamanho e peso corporal, estrutura óssea anormal, alterações de marcha, deficiência cardíaca e celular, do mesmo modo, eles se deparam com alterações no SNC como defeitos na migração neuronal em cerebelo e córtex,^{5,84} degeneração celular que leva a uma falha na comunicação distroglicana-laminina danificando a glicosilação⁸⁶, diferenciação da morfologia na região de hipocampo⁸⁷, assim como enfraquecimento e defeitos na potencialização de longo prazo em neurônios do hipocampo, que é uma função desenvolvida pelas distroglicanas^{30, 88}.

Para que ocorra o avanço do conhecimento sobre DMP atualmente, faz se necessários mecanismos para o desenvolvimento de pesquisas sobre patologias neuromusculares ainda desconhecidas e a descoberta de novos elementos das já então citadas na literatura, portanto as análises de modelos animais tem sido uma alternativa altamente utilizada para a investigação das questões distróficas e genéticas patológicas⁸⁴.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a integridade da Barreira Hematoencefálica em camundongos com Distrofia Muscular Congênita 1D.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a permeabilidade da Barreira Hematoencefálica em camundongos com Distrofia Muscular Congênita 1D

Verificar a atividade das Metaloproteinases 2 e 9 em camundongos com Distrofia Muscular Congênita 1D

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de Estudo

Este estudo é do tipo experimental com uso de um modelo animal.

3.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos⁸⁹. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da UNISUL sob número 14.018.4.08.IV.

3.3 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos adultos machos wild-type (WT - selvagens), heterozigotos (HT - possuem somente 50% do dano em LARGE) e Nocautes (KO – Possuem total dano no gene LARGE – camundongos com DMC1D), pesando entre 20-30g, procedentes da USP – São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério da UNISUL e acondicionados em 5 animais por caixa, ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}$ C.

3.4 Desenho experimental

O estudo foi dividido em duas partes: experimento 1 e experimento 2. No experimento 1 os animais foram divididos em 3 grupos contendo oito animais cada: (1) WT; (2) HT e (3) KO. Ao completarem 60 dias foram submetidos a avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica pelo corante azul de Evans. No experimento 2, os animais foram divididos em 3 grupos contendo oito animais cada: (4) WT; (5) HT e (6) KO. Ao completarem 60 dias foram submetidos a avaliação da atividade das metaloproteinases 2 e 9 a partir da zimografia. A figura 1 demonstra o desenho do estudo com a separação dos grupos experimentais.



Figura 1 - Desenho Experimental

3.4.1 Permeabilidade da barreira hematoencefálica por Azul de Evans

A integridade da BHE foi investigada através de extravasamento do corante azul de Evans⁹⁰. Foi injetado 1ml via i.p de azul de Evans (1%) 1h antes dos animais serem submetidos a eutanásia⁹¹. Os animais foram anestesiados, consistindo de uma administração intraperitoneal de cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg) e acepromazina (0,16 mg/kg)^{92,93}, e em seguida, o tórax foi aberto para realização de perfusão cardíaca com aplicação de 200ml de solução salina através do ventrículo esquerdo na pressão de 100mmHg até que o fluido de perfusão incolor for obtido a partir do átrio direito. As estruturas hipocampo e córtex cerebral e estriado foram retiradas para avaliação da BHE. As amostras foram pesadas e colocadas em 50% de solução tricloroacético. Após homogeneização e centrifugação, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3), e determinada a sua fluorescência (excitação em 620nm e emissão a 680nm) com um espectrofotômetro de luminescência (Hitachi 650-40, Tóquio, Japão). Os cálculos foram baseados no padrão externo (62,5-500ng/ml) no mesmo solvente. O teor de azul de Evans no tecido foi quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa por grama de tecido⁸⁹.

3.4.2 Isolamento de tecido cerebral para dosagem de metaloproteinases

Depois da decapitação o animal foi submetido ao isolamento das estruturas hipocampo, estriado e córtex cerebral. Após, as amostras foram homogenizadas em 4ml de PBS por três vezes e centrifugados a 4000rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. As amostras foram colocadas em 15% dextrano T-500 e, em seguida, adicionadas em 20% dextrano T-500, onde os pellets foram centrifugados a 25.000 rpm por 10 min. a 4°C⁹⁴.

3.4.2.1 Zimografia para medição da MMP-2 e MMP- 9

A zimografia é uma técnica de eletroforese que permite observar e identificar a atividade proteolítica. Para isso há a utilização da poliacrilamida que ao contrário da eletroforese de proteínas simples, a polimerização da poliacrilamida ocorre na presença de gelatina solúvel. Assim, o gel resultante da polimerização possui gelatina (colágeno desnaturado)⁹⁵. Após a corrida eletroforética, as amostras foram lavadas em uma solução contendo Triton X100 e incubadas em um tampão apropriado que favorece a atividade de proteases. Posteriormente o gel foi corado e a atividade enzimática foi demonstrada pela ausência de coloração (faixas brancas) nas áreas onde o substrato (gelatina) foi degradado.

3.5 Análise Estatística

Após a coleta dos dados, um teste de normalidade foi aplicado para caracterização dos dados. Os dados foram expressos por média e erro padrão da média. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando o valor de F foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Integridade da Barreira Hematoencefálica

Neste estudo foi avaliada a integridade da BHE através da análise do azul de Evans. Na **Figura 1** pode-se observar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na permeabilidade da BHE em hipocampo e estriado nos animais KO quando comparado aos animais WT. Em córtex cerebral, não houve diferença significativa quanto a permeabilidade da BHE ($p > 0,05$) no grupo de animais KO quando comparado ao grupo de animais WT.

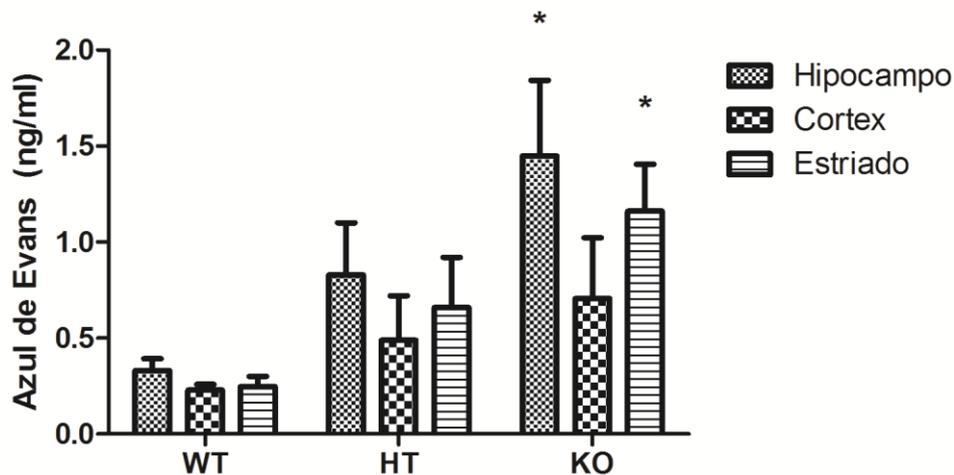


Figura 2 - Integridade da BHE. Dados são apresentados com média \pm S.E.M, n=8 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus WT.

4.2 Avaliação da atividades da Metaloproteínases 2 e 9

A **Figura 2** apresenta os dados da avaliação da atividade das MMP 2 e 9 em hipocampo, córtex e estriado. A **Figura 2A** e **2B** mostram os dados das avaliações da atividade da MMP 2 e 9 em hipocampo. Pode-se observar que houve um aumento da atividade da MMP 9 no grupo de animais KO quando comparado ao grupo de animais WT ($p < 0,05$). Não houve alteração da MMP 2 em nenhum dos grupos experimentais analisados. Os dados da avaliação da atividade das MMP 2 e 9 em córtex cerebral foram demonstradas pela **Figura 2C** e **2D**. Pode-se observar

que houve um aumento da atividade da MMP 2 no grupo de animais KO em relação ao grupo de animais WT. Não houve alteração na atividade da MMP 9 nos grupos experimentais avaliados. A atividade das MMP 2 e 9 no estriado são mostradas na **Figura 2E e 2F**. Houve um aumento da atividade da MMP 2 no grupo de animais HT e KO em relação ao grupo WT. Não houve alteração na atividade da MMP 9 nos grupos experimentais analisados.

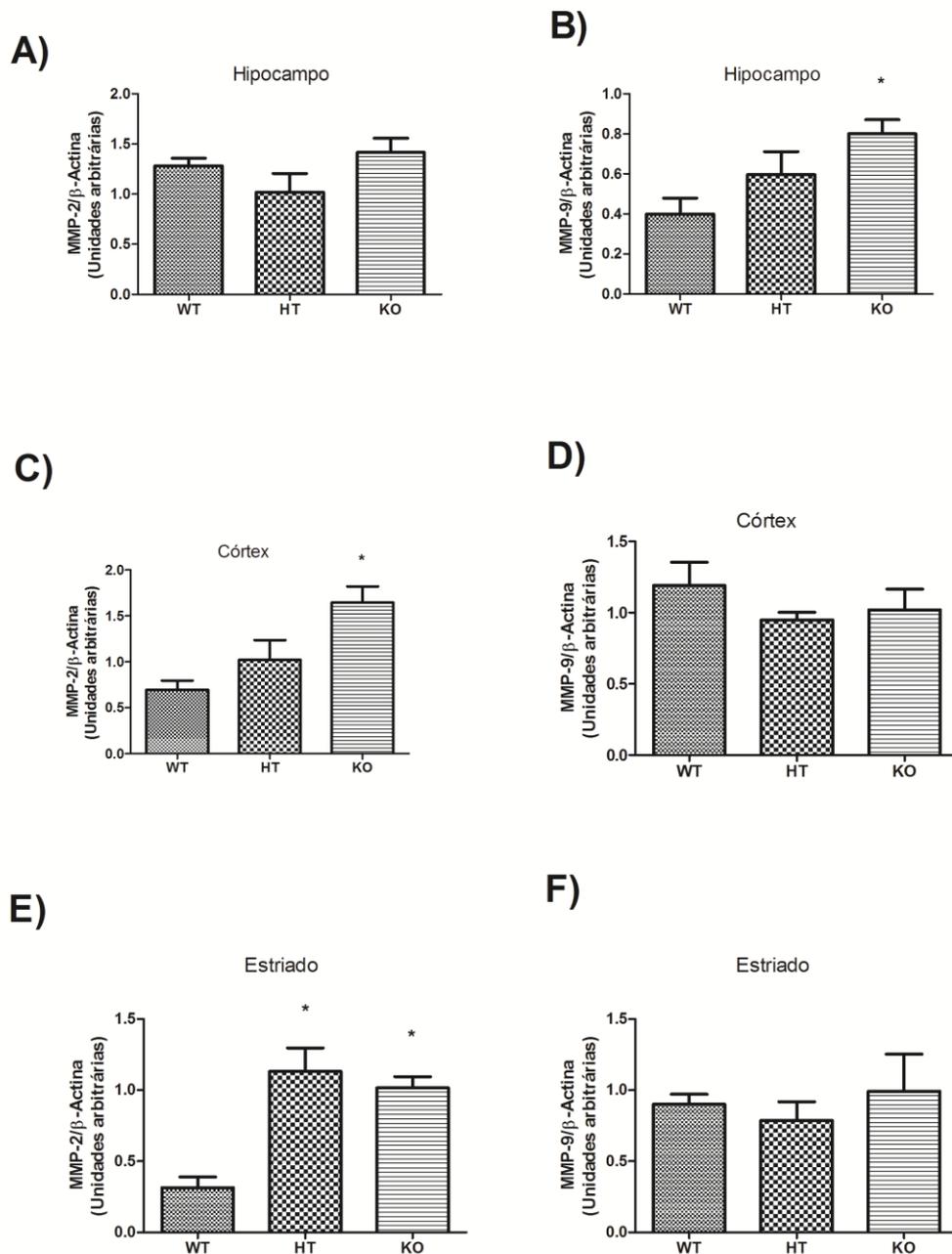


Figura 3 - Atividade das MMP 2 e 9 em hipocampo (2A e 2B), córtex cerebral (2C e 2D) e em estriado (2E e 2F). Os dados são apresentados com média ± S.E.M, n=8 animais por grupo. *p<0,05 versus WT.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a integridade da BHE e a atividade das MMP 2 e 9 em camundongos com DMC1D. Neste contexto observou-se que houve um aumento da permeabilidade da BHE em hipocampo e estriado, um aumento da atividade da MMP 2 em córtex cerebral e estriado e um aumento da atividade da MMP 9 no hipocampo. As estruturas avaliadas no estudo foram hipocampo, córtex e estriado por serem estruturas que tem a presença da barreira hematoencefálica evidenciadas segundo estudos prévios em modelos animais de distrofia⁶.

A BHE é uma estrutura associada a membrana com a finalidade de regular o influxo de substâncias do sangue para o SNC^{7,8}.

Alterações na permeabilidade da BHE podem ser explicados pela disfunção de seus componentes como as células endoteliais cerebrais que se encontram apoiadas a lamina basal contendo moléculas da matriz extracelular, o rompimento da matriz leva a alterações no citoesqueleto afetando as proteínas constituintes das junções apertadas que por sua vez afeta a integridade da BHE⁸. Por exemplo as células chamadas de astrócitos que tem a função de manutenção e sinalização das células endoteliais cerebrais, portanto estão diretamente relacionada a integridade da BHE⁴⁴. Já os pericitos são fundamentais na interação entre células endoteliais sendo que o rompimento dessa comunicação pode levar a alterações da barreira e neuroinflamação⁹⁶.

Uma série de doenças neurológicas estão associadas à neurodegeneração e morte neuronal associada ao comprometimento cognitivo⁹⁷, o que pode ser derivado do aumento da permeabilidade da BHE, sendo assim esse processo é associado ao surgimento de doenças degenerativas, isquêmicas ou inflamatórias, levando a um influxo de agentes tóxicos que podem estar envolvidos no comprometimento das funções neurológicas⁵¹. Segundo Nico e colaboradores⁹⁸, os déficits anatômicos e moleculares na integridade da BHE são indícios de várias condições patológicas do SNC. Em estudos recentes, alterações da BHE foram associados a déficits cognitivos evidenciados em patologias como Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla e outras doenças degenerativas⁹⁸.

Na DMC1D sabe-se que ocorre alterações na glicosilação da α -DG, causando o fenótipo distrófico da doença. Essas alterações causam desestabilidade no complexo de glicoproteínas, induzindo a disfunção da membrana celular¹⁰⁰.

Em modelo animal, foi visto que a hipoglicosilação da α -DG é associada a alterações no SNC como déficit cognitivo, alterações no metabolismo energético, dano oxidativo e comprometimento da memória de habituação e aversiva, assim como diminuição nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)^{11,12} que atuam em diversas funções cerebrais como o processo de aprendizagem e formação da memória¹⁰¹. As alterações citadas acima foram evidenciadas em tecido cerebral como hipocampo, estriado e córtex cerebral. Estruturas que foram utilizadas para avaliação da permeabilidade da BHE e da atividade da MMP e e 9. Em um modelo animal de distrofia muscular miotônica, pesquisa demonstra déficits de memória espacial e prejuízos na plasticidade sináptica em hipocampo¹⁰².

O complexo distroglicano está situado em diversas regiões encefálicas, incluindo hipocampo e córtex cerebral, onde são essenciais para a realização de determinadas sinapses. A estrutura localizada no telencéfalo, chamada de hipocampo é responsável pela memória de curta duração e formação da memória a longo prazo, tanto em animais como em humanos¹⁰³.

Nesta pesquisa, observou-se que os camundongos *Largemyd* apresentaram um aumento na permeabilidade da BHE em hipocampo e corpo estriado, estruturas responsáveis por memória e cognição, portanto isso pode ser uma possível fisiopatologia do comprometimento observado em estudos prévios deste modelo. Em outros modelos animais de DMP, como os animais *mdx*, modelo animal para a DMD, estudos comprovam que alterações nas junções apertadas, astrócitos, claudinas e zonas ocludens, que são constituintes da BHE, podem causar um aumento no influxo de água e conseqüentemente contribuir para o surgimento de um edema encefálico, o que por sua vez pode estar associado a déficits neurológicos¹⁰³. Em outro estudo também houve a demonstração de uma relação entre o aumento da permeabilidade da BHE e alterações cognitivas em camundongos *mdx*⁶. Nico e colaboradores⁹⁸ evidenciaram que em camundongos *mdx*, ocorrem alteração nas proteínas da membrana o que pode ser a causa do aumento da permeabilidade da BHE, levando a distúrbios cognitivos⁹⁸.

A disfunção da BHE pode estar relacionada com a diminuição de sua função de homeostase pela abertura das junções apertadas, o que leva a exposição do

ambiente cerebral a substâncias nocivas, comprometendo a sinalização neuronal e pode causar a morte dos neurônios, isto pode se apresentar como uma das causas de progressão das doenças do SNC⁷.

As MMP, enzimas que realizam a degradação ou modificação dos componentes da matriz⁵⁵, são os principais constituintes da BHE, que modificam substâncias da matriz extracelular que, por conseguinte, podem causar reações secundárias à BHE com impacto em sua funcionalidade¹⁰⁴. As deficiências em proteínas do complexo de glicoproteínas da membrana podem acarretar em alterações no citoesqueleto, o que aumenta a secreção das MMP por células gliais, aumentando os espaços entre as junções apertadas e conseqüentemente o aumento da permeabilidade da BHE¹⁰³. A primeira evidência de alterações das MMP em modelos animais de DMP, foi através da pesquisa de Nico e colaboradores¹⁰⁵, onde na avaliação de estruturas encefálicas em camundongos mdx, encontraram um aumento na atividade das MMP 2 e 9 no encéfalo¹⁰⁵.

Neste estudo observou-se um aumento da atividade da MMP 2 em córtex cerebral e estriado e um aumento da atividade da MMP 9 no hipocampo nos animais Large. A MMP 2 pertence ao grupo das gelatinases, que podem hidrolisar várias moléculas da matriz extracelular participando da integridade da barreira¹⁰⁶. A degradação dos componentes das junções apertadas, realizada pelas MMP 9, pode ser a causa do aumento da permeabilidade da BHE¹⁰⁷. O aumento da expressão desta enzima foi visto no córtex e no hipocampo após despolarização da membrana, o que mostra uma associação da MMP 9 com a fisiologia neuronal¹⁰⁸. Na pesquisa de Tsuge e colaboradores¹⁰⁹ o aumento da atividade da MMP 9 foram achados em regiões encefálicas como córtex cerebral e hipocampo.

Em outro modelo animal de acidente vascular encefálico foi observado uma ativação da MMPs o que causava uma ruptura da lâmina basal, do complexo de glicoproteínas e o aumento da permeabilidade na BHE. Onde a MMP-2 foi evidenciada pela degradação de parte estrutural das junções apertadas e conseqüentemente alteração da barreira, e a MMP-9 por causar a entrada de neutrófilos em SNC aumentando a morte neuronal^{111,112}.

Uma associação entre os níveis de MMP-9 no sangue e o aumento da permeabilidade da BHE pós acidente vascular encefálico em humanos, foram descritos ainda na década de 90 por Anthony e colaboradores¹¹³.

Há diversos estudos que relatam alterações de funcionamento na expressão e ativação das MMPs em pacientes com distrofias. Nico e colaboradores¹⁰⁵ comprovaram por estudo histoquímico, que em modelos animais de distrofia muscular de Duchenne, ocorre um aumento da expressão das MMP 2 e 9 no cérebro desses camundongos, e confirmam que esses resultados evidenciam a ação patogênica das MMP nas desordens de SNC associadas a Duchenne¹⁰⁶. As células chamadas de astrócitos tem sido relacionadas com a produção das MMP 2¹¹⁴, para tanto um mau funcionamento das células constituintes da BHE causa um déficit na produção de MMPs que também fazem parte do processo de proteção da barreira.

A disfunção da proteína distrofina, aquela com comprometimento na distrofia muscular de Duchenne, apresenta-se de uma forma deficiente associada a outras proteínas ligadas ao complexo e as células da glia em região encefálica¹¹⁴ esse acontecimento conseqüentemente induz a alterações no citoesqueleto glial, alterando as MMPs e as células que constituem a BHE, como as junções apertadas, aumentando a permeabilidade da barreira^{103,114}, sendo assim como a α -DG é uma proteína constituinte do complexo uma deficiência nesta acaba alterando MMPs e conseqüentemente a BHE, sendo uma possível via patológica que leva a alterações neurológicas na DMC1D.

6 CONCLUSÃO

Através dos dados encontrados nesta pesquisa e as informações coletadas da literatura, pode-se constatar que o aumento da permeabilidade da BHE e a alteração da atividade da MMP 2 em hipocampo e córtex cerebral e MMP 9 em hipocampo, estruturas que são responsáveis pelo aprendizado, memória e cognição podem estar associados a um distúrbio de funcionalidade a aos déficits cognitivos encontrados nos animais Large. Em conclusão, estes dados apontam para um papel patogênico específico para a MMP-2 e MMP-9 em disfunções neurológicas associadas com DMC1D e sugerem que a anormalidade na glicosilação da α -DG pode induzir a um aumento da atividade dessas metaloproteinases e que esse fenômeno pode estar associado a um aumento da permeabilidade da BHE em animais Large, causando uma alteração da homeostase.

Futuros experimentos deverão ser feitos no intuito de avaliar a relação entre alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica e da atividades da metaloproteinases, utilizando inibidores específicos das metaloproteinases 2 e 9.

REFERÊNCIAS

- 1- Connors BW, Bear MF, Paradiso MA. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 2 ed. Porto Alegre. Artmed; 2002.
- 2- Adams R, Victor M, Neurologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1996.
- 3- Mendell JR, Boué DR, Martin PT. The Congenital Muscular Dystrophies: Recent Advances and Molecular Insights. *Pediatr Dev Pathol.* 2006; 9(6): 427–443.
- 4- Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(21):2853-61.
- 5- Barresi R, Michele D, Kanagawa M, Harper HA, Dovico AS, Sata JS, Moore, et al. LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defect in distinct congenital muscular dystrophy. *Nat. Med.* 2004; 10: 696-703.
- 6- Nico B, Roncali L, Mangieri D, Ribatti D. Blood-Brain Barrier Alterations in MDX Mouse, An Animal Model of the Duchenne Muscular Dystrophy. *Current Neurovascular Research.* 2005; 2:47-54.
- 7- Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788: 842-857.
- 8- Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev.* 2010; 64: 328-363.
- 9- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Małcki A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep.* 2008; 60:600-22.
- 10-Lane PW, Beamer TC, Myers DD. Myodystrophy, a new myopathy on chromosome 8 of the mouse. *J Hered.* 1976; 67(1):135–38.
- 11-Comim CM, Mendonça BP, Domingui D, Cipriano AL, Steckert AV, Scaini G, et al. Central nervous system involvement in the animal model of myodystrophy. *Mol Neurobiol.* 2013; 48 (1):71-7.

- 12-Comim, c. M. ; Schactae, a.l. ; Soares, j. A. ; Ventura, l. ; Freiburger, v. ; Mina, f. ; Dominguni, d. ; Vainzof, m. ; Quevedo, j. . Behavioral responses in animal model of Congenital Muscular Dystrophy 1D. *Molecular Neurobiology*, 2014.
- 13-Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet* 381. 2013; (12):61897-2.
- 14-Otsuka MA, Boffa CFB, Vieira AAM. *Distrofias Musculares. Fisioterapia Aplicada. Editora Revinter. 2005.*
- 15-Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazi J Med Biol Reseach*. 2003; 36(2):543-55.
- 16-Romeo V. Myotonic dystrophy type 1 or steinert's disease. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 724(3):239-57.
- 17-Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part 1: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 2009; 67(1):144-168.
- 18-Muntoni F, Brockington M, Godfrey C, et al. Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. *Acta Myol*. 2007; 26:129-135.
- 19-Clarke NF, Maugendre S, Vandebrouck A, Urtizberea JA, Willer T, Peat RA, et al. Congenital muscular dystrophy type 1D (MDC1D) due to a large intragenic insertion/deletion, involving intron 10 of the LARGE gene *European Journal of Human Genetics*. 2011; 19:452–457.
- 20-Reed UC, Marie SK, Carvalho MS, Ferreira LG ,Resende MBD, Liu EC, et al. Dystrophin-glycoproteins associated in congenital muscular dystrophy. Immunohistochemical analysis of 59 Brazilian cases. *Arq Neuropsiquiatr*; 2005; 63(3-B):791-800.
- 21-Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM, Banks GB, Gardner MK, Lowe DA, Ervasti JM. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 15;111(15):5723-8. doi: 10.1073/pnas.1323842111.
- 22-Fonseca IF, Pianete G, Xavier CC. *Compêndio de neurologia infantil. São Paulo-SP: MEDII Editora Médica e Científica Ltda, 2002.*
- 23-Emery, AEH. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; 359:687–95.
- 24-Leite CC, Lucato LT, Martin MG, Ferreira MB, Carvalho MS, Marie SK, et al. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (CMD): a study of 25 Brazilian patients using MRI. *Pediatr Radiol*. 2005; 35:572-9.
- 25-Muntoni F, Voit T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14:635-649.

- 26-Bertini E, D'amico A, Gualandi F, Petrini S. Congenital Muscular Dystrophies: A Brief Review. *Semin Pediatr Neurol*. 2011; 18(4):277–288.
- 27-Brockington M, Torelli S, Sharp PS, et al. Transgenic overexpression of LARGE induces α -dystroglycan hyperglycosylation in skeletal and cardiac muscle. *PLoS One* 2010;5:14434.
- 28-Meilleur KG, Zukosky K, Medne L, Fequiére P, Powell-Hamilton N, Winder TL, Alsaman A, El-Hattab AW, Dastgir J, Hu Y, Donkervoort S, Golden JA, Eagle R, Finkel R, Scavina M, Hood IC, Rorke-Adams LB, Bönnemann CG. Clinical, pathologic, and mutational spectrum of dystroglycanopathy caused by LARGE mutations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014 May; 73(5):425-41
- 29-Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordquist AC, et al. The human LARGE gene from 22q12.3- q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:598–603.
- 30-Satz JS, Ostendorf AP, Hou S, Turner A, Kusano H, Lee JC, et al. Distinct Functions of Glial and Neuronal Dystroglycan in the Developing and Adult Mouse Brain *J Neurosci*. 2010; 30(43):14560-72.
- 31-Muntoni F, Torelli S, Brockington M. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics Muscular Dystrophies Due to Glycosylation Defects*. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics Inc. 2008; 5:627–632.
- 32-Modoni A, Silvestri G, Pomponi MG, Mangiola F, Tonali PA, Marra C. Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch of Neurol*. 2004; 61(56):1943-7.
- 33-Rayburn HB, Peterson AC. Naked axons in myodystrophic mice. *Brain Res* . 1978; 146(1):380–84.
- 34-Baudry M, Bi X. Learning and memory: An emergent property of cell motility. *Neurobiol Learn Mem*. 2013;104 (1):64-72.
- 35-Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, et al. Muscular and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase POMGnT1. *Dev Cell*. 2001; 1(1):717–24.
- 36-Vermersch P, Sergeant N, Ruchoux MM. Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurol*. 1996; 47(3):711-17.

- 37-Zaccaria ML, Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neurosc.* 2001; 104(1):311–24.
- 38-De Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007; 47:323-55.
- 39-Gartner PL, Hiatt LJ. *Atlas Colorido de Histologia*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2010; 144.
- 40-Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):869-901.
- 41-Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004; 16:1-13.
- 42-Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:402593.
- 43-Pereira A. Jr, Furlan F.A. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Prog Neurobiol.* 2010. 92(3):405-20.
- 44-Willis CL, Nolan CC, Reith SN, Lister T, Prior MJ, Guerin CJ, et al. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*, 2004; 45(4):325-37.
- 45-Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008; 57(2):178-201.
- 46-Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases. mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res.* 2010; 1347:1-10.
- 47-Arai K, Jin G, Navaratna D, Lo EH. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J.* 2009; 276:4644–52.
- 48-Lee HS, Han J, Bai HJ, Kim KW. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *FEBS J.* 2009; 276:4622–35.

- 49-Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* 1987; 72:236–9.
- 50-Ujiie M, Dickstein DL, Carlow DA, Jefferies WA. Blood–Brain Barrier Permeability Precedes Senile Plaque Formation in an Alzheimer Disease Model. *Microcirculation.* 2003; 10(6):463–470.
- 51-Abbot, N.J.; Rönnebeck, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006; 7: 41-53.
- 52-Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2010; 6:393–403.
- 53-Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Fuji Y, Takayama I, Mei X, Ohno S. Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat. *Neurosci Lett.* 2000; 283: 121-124.
- 54-Agrawal SM, Lau L, Yong VW. MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19:42-51.
- 55-Clark IM; et al. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1362-78.
- 56-Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-4.
- 57-Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14:2123-33.
- 58-Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist.* 2010; 16:156-70.
- 59-Rundhaug, JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer. *Clinical Cancer Res.* 2003; 9:551-4.
- 60-Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases in oral diseases. *Oral Diseases.* 2004; 10:311-8.
- 61-Nabeshima, K. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathology International.* 2002; 52:255-64.
- 62-Wright JW, Harding JW. Contributions of matrix metalloproteinases to neural plasticity, habituation, associative learning and drug addiction. *Neural Plast.* 2009; 1-12.

- 63-Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int.* 2010. 60:477-496.
- 64-Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods. Rev Bras Ter Intensiva.* 2011; 23(2):222-227.
- 65-Glader P, Eldh B, Bozinovski S, Andelid K, Sjöstrand M, Malmhäll C, et al. Impact of acute exposure to tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space. *Eur Respir J.* 2008; 32:644-50.
- 66-Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol.* 2002; 22:51-86.
- 67-Ulrich R, Gerhauser I, Seeliger F, Baumgartner W, Alldinger S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study. *Dev. Neurosci.* 2005; 27, 408–418.
- 68-Yong, VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6, 931–944.
- 69-Fujioka H, Dairyo Y, Yasunaga K. Emoto K. Neural functions of matrix metalloproteinases: plasticity, neurogenesis, and disease. *Biochem. Res. Int.* 2012:789083.
- 70-Van Den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2002; 37, 375–536.
- 71-Ethell IM, Ethell DW. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J. Neurosci. Res.* 2007; 85, 2813–2823.
- 72-Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.* 2006; 38, 333–347.
- 73-Hu J, Van Den Steen, PE, Sang QX, and Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6:480–498.

- 74-Choi DH, Kim EM, Son HJ, Joh TH, Kim YS, Kim D, et al. A novel intracellular role of matrix metalloproteinase-3 during apoptosis of dopaminergic cells. *J. Neurochem.* 2008; 106: 405–415.
- 75-Joo, SH, Kwon KJ, Kim JW, Hasan MR, Lee HJ, Han SH, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by alpha-synuclein in rat primary glial cells. *Neurosci. Lett.* 2010; 469, 352–356.
- 76-Kim, EM, Hwang O. Role of matrix metalloproteinase- 3 in neurodegeneration. *J. Neurochem.* 2011; 116: 22–32.
- 77-Lorenzl S, Albers DS, Narr S, Chirichigno J, Beal, MF. Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2002; 178, 13–20.
- 78-Kim YS, Choi DH, Block ML, et al. A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J.* 2007; 21:179–87.
- 79-Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, et al. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 24566–24574.
- 80-Yin KJ, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, Pan X, et al. Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *J. Neurosci.* 2006; 26, 10939–10948.
- 81-Walsh DM, Minogue AM, Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Wasco W, Selkoe DJ. The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35, 416–420.
- 82-Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008; 18, 240–252.
- 83-Vainzof M, Ayub-guerrieri D, Onofr, PC, Martins PC, Lopes VF, Zilberztajn D, et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J. Mol. Neurosci.* 2008; 34:241-248.
- 84-Browning CA, Grewal PK, Moore CJ, Hewitt JE. A rapid PCR method for genotyping the Large(myd) mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 2005; 15:331-335.

- 85-Grewal PK, Hewitt JE. Mutation of Large, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1573 (3):216-224.
- 86-Kanagawa M, Saito F, Kunz S, Yoshida-moriguchi T, Barresi R, Kobayashi YM, et al. Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell.* 2004; 117(1):953–64.
- 87-Holzfeind PJ, Grewal PK., Reitsamer HA, Kechvar J, Lassmann H, Hoeger, H. et al. Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large(myd) mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(1):2673–87.
- 88-Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, et al.. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nat.* 2012; 418(1):417–21.
- 89-Concea, Ministério da ciência, tecnologia e inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretrizes Brasileira de Prática para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos. 2013. Disponível em: <http://www.cesupa.br/saibamais/CEUA/docs/Diretrizes%20CONCEA%202013.pdf>.
- 90-Smith S, L Hall. Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma.* 1996; 13(1):1-9.
- 91-Coimbra, RS, Loquet G, Leib SL. Limited efficacy of adjuvant therapy with dexamethasone in preventing hearing loss due to experimental pneumococcal meningitis in the infant rat. *Pediatr Res.* 2007; 62(3):291-294.
- 92-Hoogman, M, Van De Beek D, Weisfelt M, Gans J, Schmand B. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry.* 2007; 78:1092-1096.
- 93-Grandgirard D, et al. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathologica.* 2007; 114(6):609–617.
- 94-Kogo J, Takeba Y, Kumai T. Involvement of TNF in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res.* 2006; 1122:201.
- 95-Planas AM. Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278:803–7

- 96-Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010;468(7323):562-6
- 97-Tuon L, Comim CM, Fraga DB, Scaini G, Rezin GT, Baptista BR, Streck EL, Vainzof M, Quevedo J. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in mdx mouse brain. *Muscle Nerve*. 2010; 41(2):257-60.
- 98-Nico B, Ribatti D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. *D Curr Drug Metab*. 2012; 13(1):50-60.
- 99-Reeuwijk JV, Grewal PK, Salih MAM, Bernabé DBV, Laughlan JM, Michelse CB, Herrmann R, Hewitt JE, Steinbrecher A, Seidahmed MZ, Shaheed MM, Abomelha A, Brunner HG, Bokhoven HV, Voit T. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet*. 2007; 121(6): 685–90.
- 100- Francia N, Cirulli F, Chiarotti F, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins. *Eur J NeuroSci*. 2006; 23(1):711 – 28.
- 101- Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Clark HB, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Foster TC, Ares M Jr, Darnell RB, Swanson MS. *Neuron*. 2012; 75(3):437-50.
- 102- Izquierdo I, Barros DM, Mello E Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 1998; 393(1):635-6.
- 103- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*. 2003 May;42(3):235-51.
- 104- Woo MS, Park JS, Choi IY, Kim WK, Kim HS. Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *J Neurochem*; 2008. 106: 770-80.
- 105- Nico B, Corsi P, Ria C, Crivellato E, Vacca A, Roccaro AM, Mangieri D, Ribatti D, Roncali L. Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse. *Neuroscience*. 2006; (140) 3.

- 106- Glader P, Eldh B, Bozinovski S, Andelid K, Sjöstrand M, Malmhäll C, et al. Impact of acute exposure to tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space. *Eur Respir J*; 2008. 32:644-50.
- 107- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*; 2001. 21:7724-7732.
- 108- Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett*; 2004. 567:129-35.
- 109- Tsuge M, Yasui K, Ichiyawa T, Saito Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Yamashita N, Morishima T. Increase of tumor necrosis factor-alpha in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. *Microbiol Immunol*. 2010; 54: 417-24.
- 110- Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol*. 2010; 92(4):463-77.;
- 111- Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009; 158(3):983-94.
- 112- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997; 23(5):406-15
- 113- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with bloodbrain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998; 29(10):2189-95.
- 114- Nico B, Paola NG, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*. 2004; 125(4):921-35.