

## IMPORTÂNCIA DO CAMUNDONGO mdx NA FISIOPATOLOGIA DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

SANDRA LOPES SEIXAS\*, JUSSARA LAGROTA-CÂNDIDO\*\*,  
WILSON SAVINO\*\*\*, THEREZA QUIRICO-SANTOS\*\*\*\*

---

**RESUMO** - O camundongo mdx desenvolve distrofia muscular recessiva ligada ao cromossoma X (locus Xp21.1) e não expressa distrofina. Embora não apresente intensa fibrose do tecido muscular e acúmulo de tecido adiposo, é considerado o modelo animal mais adequado da distrofia muscular de Duchenne. As alterações estruturais no tecido muscular associadas à mionecrose e presença do infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e monócitos/macrófagos sugerem uma participação do sistema imunológico nesta miopatia. Além disso a modulação na expressão dos componentes da matriz extracelular no microambiente muscular nas várias fases da doença (início, mionecrose, regeneração) indicam um papel importante do conjuntivo no direcionamento das células inflamatórias para o foco da lesão muscular. O camundongo mdx coloca-se como um excelente modelo para o estudo dos mecanismos patogênicos da mionecrose e regeneração na distrofia muscular de Duchenne, possibilitando inclusive o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais adequadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** distrofia muscular, distrofina, mdx, modelo animal.

### **The importance of mdx mouse in the pathophysiology of Duchenne's muscular dystrophy**

**ABSTRACT** - The mdx mouse develop an X-linked recessive muscular dystrophy (locus Xp21.1) and lack dystrophin expression. Despite showing less intense myofibrosis and scarce deposition of fatty tissue, mdx mice are considered an adequate animal model for studies on the pathogenesis of Duchenne-type muscular dystrophy. Marked histological alterations in the muscular tissues associated to myonecrosis and inflammatory mononuclear cell infiltrate (lymphocytes, monocytes/macrophages) suggest a participation of the immune system in this myopathy. Modulation of the extracellular matrix (ECM) components in the muscular tissue during all phases (onset, myonecrosis and regeneration) of disease, indicate an important role for the ECM driving inflammatory cells to the foci of lesion. Therefore mdx mice should be regarded as an important tool for studies on pathogenetic mechanisms of Duchenne-type muscular dystrophy. Such experimental model would allow development of new therapeutic approaches for increasing survival and clinical amelioration.

**KEY WORDS:** Duchenne muscular dystrophy, dystrophin, mdx, animal model.

---

Distrofia muscular compreende um grupo heterogêneo de doenças hereditárias, cuja principal manifestação é fraqueza muscular progressiva devido a defeitos intrínsecos do tecido muscular. Distrofia muscular de Duchenne (DMD), a mais comum e devastadora das distrofias musculares humanas e sua variante mais branda, distrofia muscular de Becker (BMD), são doenças progressivas que evoluem com perda severa da musculatura, aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial e tecido adiposo. Outras alterações histopatológicas importantes são múltiplos focos de necrose ativa associados a intenso infiltrado inflamatório, fagocitose e regeneração parcial das fibras musculares.

---

Laboratório de Patologia Celular & Molecular, Departamento de Biologia Celular & Molecular, Universidade Federal Fluminense (UFF): \*M.Sc., Professora Assistente do Departamento de Morfologia; \*\* M.Sc., Professora Assistente do Departamento de Imunobiologia da UFF; \*\*\* Ph.D., Pesquisador Titular do Departamento de Imunologia da FIOCRUZ/RJ; \*\*\*\*Ph.D., Professora Titular do Departamento de Biologia Celular & Molecular da UFF e Pesquisadora do Departamento de Imunologia da FIOCRUZ/RJ. Aceite: 25-abril-1997.

Dra. Thereza Quirico-Santos - Laboratório de Patologia Celular & Molecular, Departamento de Biologia Celular & Molecular, Instituto de Biologia, UFF - 24030-120 Niterói RJ - Brasil. Fax 021 719 5934.

A anormalidade genética na DMD está presente no braço curto do cromossoma X (locus Xp21.1) cujo produto normal é uma proteína denominada distrofina<sup>3,10</sup>. Devido ao tamanho (~ 400 kDa) e complexidade do gene, é bastante elevada a taxa de mutação, deleções ou duplicações<sup>10</sup>, resultando na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, geralmente instável e facilmente degradada por proteases endógenas.

Existem várias isoformas da distrofina oriundas da ativação de diferentes promotores ou por quebras (splicings) diferenciais no gene. Contudo, as distrofinas presentes nos músculos esquelético, cardíaco e liso, bem como a encontrada no tecido cerebral são bastante semelhantes, explicando as alterações cognitivas observadas em pacientes com DMD<sup>22</sup>. Nas células não musculares (fibroblastos, neurônios, células da glia e linfoblastos)<sup>13,23</sup> observam-se alterações citomorfológicas, redução no conteúdo de triglicérides, fosforilação e permeabilidade celular aumentadas e migração inadequada (capping) dos receptores celulares. Distrofina, exibe semelhança estrutural com outras proteínas associadas ao citoesqueleto como: espectrina,  $\alpha$  actinina, talina, vinculina e paxilina.

Distrofina está localizada na superfície interna do sarcolema formando grande complexo (DGC) oligomérico de glicoproteínas (Fig 1) associado em trama com a matriz extracelular (ECM). Esta interação é essencial para a manutenção da integridade da função muscular<sup>14,17</sup>, pois miotubos e fibras musculares deficientes em distrofina tornam-se muito sensíveis ao estresse mecânico da contração muscular ficando susceptíveis à lise osmótica<sup>5,16</sup>. Deficiência de proteínas presentes neste complexo ou na matriz extracelular estão implicadas<sup>3</sup> em vários tipos de distrofias musculares (Tabela 1).

A caracterização do gene defeituoso da DMD permitiu a identificação desta alteração em várias espécies animais: cão, gato, camundongo<sup>8,14,29</sup>. Nos cães, a doença parece ser mais severa,

com início e evolução mais rápida que em humanos<sup>17</sup>. Em camundongos e gatos a fibrose do tecido muscular é mais moderada e o processo de regeneração maior. Contudo, o gato apesar de apresentar um processo de fibrose mais branda, desenvolve hipertrofia muscular exagerada com evolução geralmente fatal<sup>8</sup>. Em certas aves (galinha, pato, peru), na marta, hamster e carneiro, a distrofia muscular tem característica autossômica recessiva, não estando relacionada à deficiência de distrofina.

Em murinos, a distrofia muscular foi inicialmente identificada numa colônia de camundongos Bar Harbor 129/ReJ-dy/dy<sup>15</sup> como mutação autossômica recessiva no cromossoma 10. O camundongo dy foi bastante utilizado como modelo experimental para distrofia muscular humana, principalmente antes da descoberta do defeito molecular das distrofias de Duchenne e Becker. Um segundo alelo dy<sup>21</sup> surgido na colônia WK/ReJ, foi transferido para a linhagem de camundongo C57BL6J originando a linhagem com genótipo C57BL6J dy<sup>21</sup>/dy<sup>21</sup>. As características gerais da distrofia nesses animais são semelhantes, diferindo porém, na fisiopatologia da lesão, no quadro clínico, início do processo e capaci-

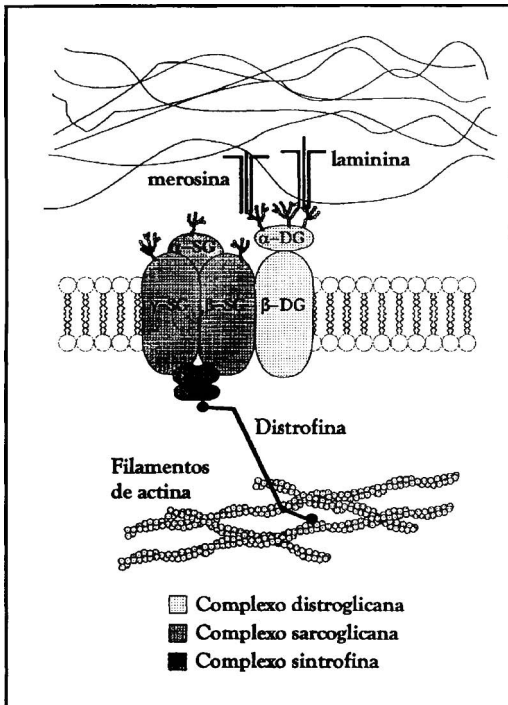


Fig 1. Organização da distrofina e complexo DGC associado ao sarcolema. Relação hipotética da molécula de distrofina com componentes do citoesqueleto e membrana basal. DGC complexo distrofina-glicoproteína.

Tabela 1. Proteínas associadas à miopatia nas diferentes espécies animais.

Espécie		Proteína	Referência
hamster	BIO	sarcoglicana (50 kDa)	30
camundongo	dy	M-laminina	30
	mdx	distrofina	26
cão	xmd	distrofina	29
gato		distrofina	8
homem	FCMD	distroglicana (43 kDa)	14
	CMD	M-laminina	28
	SCARMD	sarcoglicana (50 kDa)	14
	LGMD	sarcoglicanas (35,45, 50 kDa)	3
	Duchenne	distrofina	26

FCMD, distrofia muscular congênita de Fukuyama; CMD, distrofia muscular congênita; SCARMD, distrofia muscular recessiva autossômica severa da infância; LGMD, distrofia muscular da cintura e membros.

dade de regeneração muscular. Os camundongos dy/dy apresentam doença com evolução progressiva de curso rápido e fatal. Recentemente<sup>30</sup> foi mostrado que camundongos dy possuem deficiência de M-laminina, a isoforma de laminina (LN) mais abundante no tecido muscular normal, dificultando a sustentação da miofibrila.

O mutante mdx foi inicialmente identificado na colônia de camundongos C57BL10/ScSn devido aos níveis elevados das enzimas musculares pirovatoquinase e creatinoquinase<sup>12</sup>. Estudos genéticos adicionais mostraram que o mdx possui mutação pontual no gene da distrofina, o que causa terminação prematura da proteína<sup>26</sup>. As principais alterações histológicas evidentes no tecido muscular a partir do 18º dia pós-natal são necrose e intenso infiltrado inflamatório<sup>19,25</sup>. Em torno da terceira semana observa-se necrose abrupta do tecido muscular, seguida de rápida regeneração após a quinta semana pós-natal.

Embora o camundongo mdx apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo<sup>17</sup> na maioria dos tecidos musculares esqueléticos. No entanto, o diafragma do camundongo mdx apresenta degeneração e fibrose semelhante aos músculos extensores de pacientes com DMD<sup>2</sup>. Além disso, camundongos mdx idosos (65-104 semanas) também apresentam deposição de tecido adiposo e diminuição da sobrevida<sup>12,18</sup>.

Nos camundongos distróficos há acentuada deposição de matriz extracelular no músculo esquelético durante todas as fases da doença. Nas miofibras necróticas e com intensa reação inflamatória encontra-se grande deposição de fibronectina (FN), laminina (LN) e colágeno tipo IV, enquanto nas fibras regeneradas e com poucas células inflamatórias ocorre deposição de fibras reticulares e colágeno tipo I e III<sup>25</sup>.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar as alterações no microambiente do músculo esquelético gastrocnêmio do mutante mdx durante os vários estágios da distrofia muscular.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos mdx distróficos (Biotério de Camundongos Isogênicos da USP, São Paulo) e controles não distróficos Balb/cAn e C57BL/10J (Biotério Central, FIOCRUZ/RJ). Os animais foram mantidos em ambiente aclimatado (20°C) com ciclo de iluminação 12:12 horas e receberam água filtrada

em bebedores de canudo longo, ração Purina *ad libitum* com suplementação alimentar (farelo de trigo e semente de girassol) e vitamínica (Vitagold) semanal. Os animais foram sacrificados por ruptura da coluna cervical em diversas idades pós-natal (PN), sendo utilizados de 5 a 8 animais por grupo. Os animais foram sacrificados antes do desmame e surgimento das alterações histopatológicas (7° e 14° dia PN), no pico da mionecrose (21° e 35° dia PN), durante o processo de regeneração muscular (63° e 84° dia PN) e após a regeneração (140° dia PN).

#### *Processamento histológico*

Fragments de músculo gastrocnêmio foram fixados com formol a 10% tamponado (Millonig pH 7,2) e processados até 7 dias após. Os tecidos foram desidratados por período de 60 minutos, em soluções com concentrações crescentes (70%, 80%, 90%) de álcool etílico, passados 3 vezes em álcool absoluto e posteriormente no xilol. A impregnação e inclusão com parafina prosseguiu em duas incubações de 1 hora a 60°C. Cortes semi-seriados de 6 µm de espessura foram colocados em lâminas filmadas com solução de glicerol-albumina e submetidos às seguintes técnicas histológicas: hematoxilina-eosina, reticulina de Gomori, picrofucsina de van Gieson, hematoxilina ácida-fosfotúngstica, tricrômico de Masson e picrossírius.

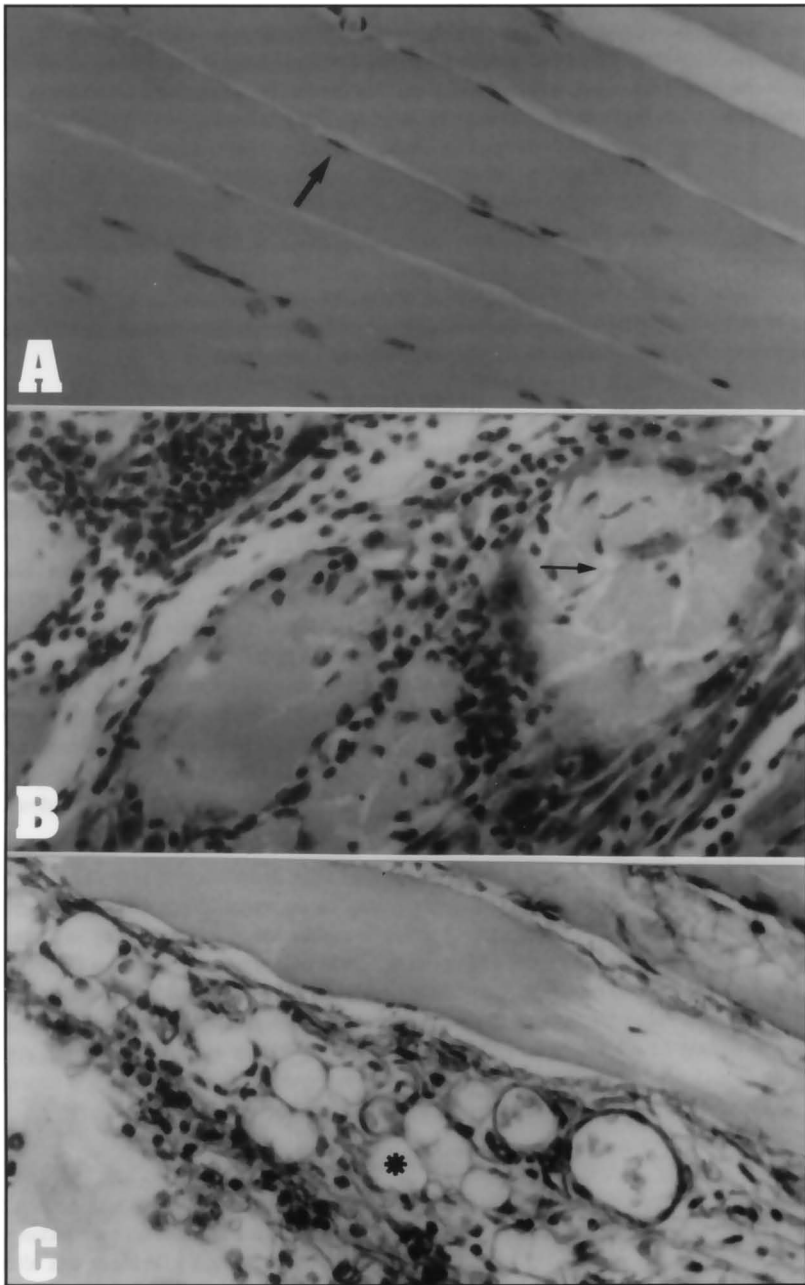
## RESULTADOS

O músculo estriado esquelético (gastrocnêmio) de camundongos BALB/cAn apresentou em todas as idades estudadas característica histológica normal (Fig 2a), com miofibras homogêneas, arredondadas e nucleação periférica. Em contraste, o músculo gastrocnêmio do mutante *mdx* distrófico mostrou desde 7 dias PN, alterações acentuadas no padrão da estriação transversal. Além disso, as miofibras eram heterogêneas (Fig 2b) geralmente com nucleação central, hipertróficas, hialinas e apresentando fragmentação (*split*). Nas idades compreendidas entre os dias 21° e 35° PN quando ocorre extensa mionecrose, o infiltrado inflamatório (Fig 2b), constituído de células mononucleares e polimorfonucleares, localizava-se principalmente nas áreas próximas à lesão. Pequenos focos de inflamação eram evidentes nas fibras musculares a partir da primeira semana pós-natal (7° dia PN). Entretanto a partir da oitava semana (63° e 84° dia PN) coincidindo com o processo de regeneração da fibra muscular podem-se observar áreas com miofibras alteradas inclusive com acúmulo de tecido adiposo (Fig 2c). O infiltrado inflamatório era menos acentuado porém pela coloração do picrossírius podia-se evidenciar as células mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos associados à trama densa da matriz extracelular.

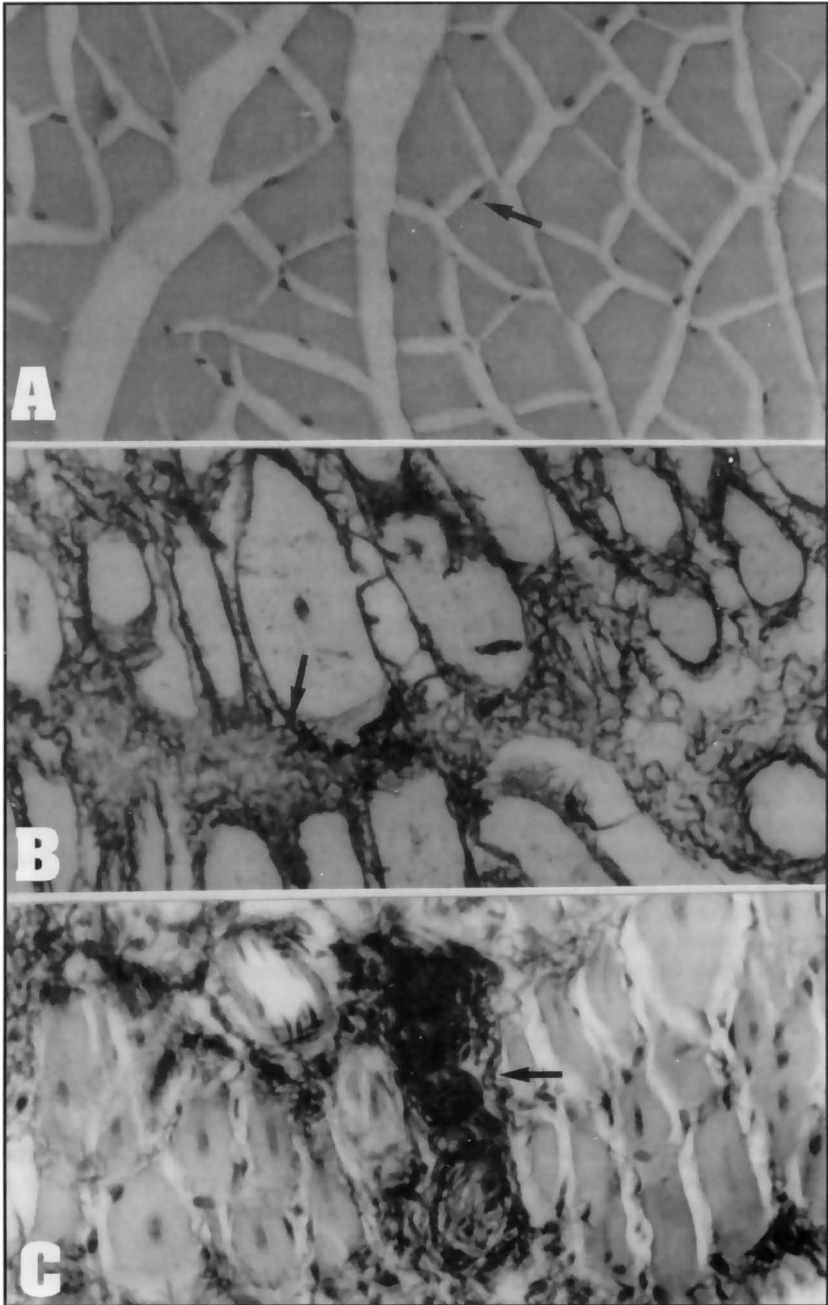
Independente da idade estudada, os camundongos *mdx* distróficos apresentaram deposição acentuada de tecido conjuntivo evidenciado nas colorações de reticulina de Gomori e picrossírius. Na coloração pelo picrossírius o músculo gastrocnêmio de camundongos normais (Fig 3a) apresentava distribuição uniforme de uma fina e delicada rede de fibras colágenas dos tipos I e III. Entretanto, camundongos *mdx* apresentaram nos focos de mionecrose (Fig 3b) grande deposição de fibras reticulares (coloração pela reticulina de Gomori) e de fibras colágenas (Fig 3c) densas e grosseiras nas regiões próximas às miofibras tumefeitas, degeneradas e com nucleação central. As fibras colágenas do tipo I predominavam nas áreas de mionecrose, enquanto durante o processo de regeneração muscular pode-se observar predomínio de fibras colágenas do tipo III.

## DISCUSSÃO

O camundongo *mdx* é considerado o modelo experimental mais adequado ao estudo das alterações decorrentes da deficiência de distrofina. No entanto, a miopatia no camundongo *mdx* contrasta com a doença humana (distrofia do tipo Duchenne) quanto à gravidade das alterações histopatológicas e evolução clínica. Este estudo mostra que, apesar da natureza benigna da miopatia, os camundongos *mdx* apresentam desde antes do desmame (7 dias PN) até a senescência (140 dias PN) intensas alterações histopatológicas no microambiente do tecido muscular. A deposição acentuada de tecido conjuntivo e inclusive de tecido adiposo foi observada no músculo esquelético gastrocnêmio dos camundongos *mdx* já recuperados (140° PN). As alterações eram acompanhadas por evidente modulação na expressão dos componentes da matriz extracelular dependendo da idade do animal e grau de distrofia.



**Fig 2.** Corte longitudinal (a) do músculo gastrocnêmio de camundongo controle Balb/cAn com 21 dias PN corado pela picrofucsina de van Gieson mostra o alinhamento miofibras, estriação transversal característica de sarcômeros íntegros e nucleação periférica (seta). Na mesma coloração, o músculo gastrocnêmio do mdx 21 dias PN apresenta (b) intenso infiltrado inflamatório, miofibras tumefeitas com fragmentação do sarcolema (seta menor). Na coloração pelo picrosúrius (c) o músculo do mdx com 63 dias PN apresenta acúmulo de tecido adiposo (\*) e infiltrado inflamatório. Aumento 160 x (a) e 400 x (b,c).



**Fig 3.** Músculo gastrocnêmio de camundongo Balb/cAn (a) com 21 dias PN corado pelo picrosírius mostrando fibras íntegras com nucleação periférica (seta) e delicada trama de tecido conjuntivo no endomísio. Nos camundongos mdx (21 PN) o músculo esquelético apresenta na coloração da reticulina de Gomori, intensa deposição (seta) de fibras reticulares (b) e na coloração do picrosírius (c) densa trama de fibras colágenas (seta) envolvendo o endomísio das miofibras tumefeitas e degeneradas. Aumento 160 x (a) e 400 x (b, c).

A descoberta da anormalidade bioquímica presente nos pacientes com DMD e no camundongo mdx ainda não elucidou a fisiopatologia da doença. A relação direta entre a deficiência de distrofina e morte da miofibrila é controversa, pois estas nem sempre estão associadas diferindo inclusive o grau de distrofia nos vários tecidos musculares<sup>2</sup>. Além disso, não se sabe o que causa o início tardio da doença, em torno de 3 anos de idade na DMD em humanos e 3-4 semanas no camundongo mdx. Questiona-se a necessidade de maior esforço físico a partir dessas idades. Contudo, não existe uma relação clara entre a sobrecarga mecânica e a mionecrose, com alguns estudos<sup>7,24</sup> sugerindo que o exercício físico pode ser benéfico. Recentemente, Tidball et al.<sup>27</sup> mostraram que o início da morte da fibra muscular é um processo apoptótico e que em estágios mais tardios da doença ocorre tanto apoptose como necrose. Contudo, ainda não é conhecido como ocorre a sinalização para indução de apoptose pela miofibrila.

Alteração na membrana sarcoplasmática do músculo estriado é considerada como a lesão primária responsável pela patogênese da distrofia muscular<sup>11</sup>. Pouca ênfase é dada ao possível papel da membrana basal, havendo dados bastante contraditórios<sup>6,21</sup> nos estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a participação do conjuntivo na mionecrose da distrofia muscular. O tecido conjuntivo desempenha funções de sustentação, preenchimento, defesa e nutrição, caracterizando-se por apresentar diversos tipos celulares e material intercelular constituído principalmente de proteínas fibrosas, colágenas, reticulares e elásticas.

O camundongo mdx apresenta alterações acentuadas na organização do conjuntivo no músculo estriado esquelético<sup>19,25</sup> e dependendo do grau de distrofia ocorre aumento na deposição de FN, LN e colágenos dos tipos I, III e IV. Assim, no início da doença (7º PN) e pico da mionecrose (21 a 35º PN) as células do infiltrado inflamatório ficam aderidas à densa e grosseira trama de ECM que se acumula entre as miofibrilas lesadas devido ao espessamento da membrana basal. Este fenômeno pode influenciar o processo de migração das células inflamatórias nos tecidos. A interação e adesão de leucócitos, via receptores (integrinas) para ECM com macromoléculas presentes no estroma, induz a produção e secreção local de citocinas (IL-1 e TNF  $\alpha$ )<sup>1,9</sup> pelas células mononucleares nas áreas de mionecrose. A ausência ou disfunção da distrofina<sup>10</sup> promove o rompimento da ligação entre o complexo subsarcolema/citoesqueleto e a ECM, iniciando ativação sequencial de eventos que culminam com a degeneração da miofibrila no músculo estriado esquelético. Recentemente demonstramos<sup>19,25</sup> que a doença no camundongo mdx não é restrita ao tecido muscular esquelético. Estes animais possuem alterações marcantes na citoarquitetura e microambiente do timo e órgãos linfóides periféricos que são mais acentuadas dependendo do grau da distrofia e idade do animal. É importante determinar se as alterações nos órgãos linfóides decorrem de fatores solúveis produzidos durante a fase aguda da miopatia ou de alterações intrínsecas destes animais devido a ausência de distrofina<sup>20</sup>.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Falhas genéticas em animais de laboratório constituem fonte valiosa de informação científica. A utilização de modelos animais associados à análise *in vitro*, permite a realização de estudos minuciosos levando a maior compreensão das influências genéticas na fisiopatologia da doença. Além disso possibilitam a utilização de agentes farmacológicos com potencial modulador, capazes de influenciar o curso da doença. Vale ressaltar que o maior conhecimento da biologia do processo patológico poderá ainda permitir o delineamento de novas estratégias terapêuticas de base biotecnológica a serem testadas experimentalmente.

O conhecimento de quatro espécies animais, incluindo o homem, com falta de distrofina, permite analisar as consequências patológicas diretas do defeito bioquímico primário. É também importante compreender porque a falta de distrofina leva a uma doença devastadora no homem e no cachorro, porém a uma doença relativamente suave no camundongo e no gato. As diferenças seriam inerentes do próprio músculo, ou haveria produção de um perfil diferente de citocinas que poderiam estimular a miogênese ou fibrinogênese nas diferentes espécies? As células inflamatórias presentes

nas lesões, também estariam influenciando o processo patológico? Esses animais produzem uma ECM alterada a fim de compensar a falta de distrofina, ou este aumento é uma consequência do processo inflamatório presente na fibra muscular? Existem ainda várias questões a serem respondidas sobre a distrofia muscular. Estamos certos que apenas um estudo detalhado desse modelo animal elucidará questões tão cruciais, indicando um possível controle efetivo da miopatia.

## REFERÊNCIAS

1. Beezhold DH, Personius C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by monocytes. *J Leuk Biol*, 1992; 51:59-64.
2. Boland B, Himpens B, Deneff JF, Gillis JM. Site-dependent pathological differences in smooth muscles and skeletal muscles of the adult mdx mouse. *Muscle & Nerve*, 1995;18:649-657.
3. Brown RH. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies: a glossary. *Brain Pathol*, 1996;6:19-24.
4. Bullfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1189-1192.
5. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of the cytoskeleton extracellular matrix linkage. *Cell*, 1995, 80: 675-679
6. De Jong, L, Walterman S, Hillarius S, Bolhuis PA. Collagen synthesis in cultured myoblasts and myotubes from patient with DMD. *J Neurol Sci* 1987;82:271-279.
7. Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ, Katz MS. Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice *J Appl Physiol* 1994;77:1736-1741.
8. Gasphen ER, Hoffman EP, Gorospe JR, Uhl EW, Senior DF, Cardinet GH, Pearse LK. Dystrophy deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 1992;110:149-153.
9. Hershkovitz R, Cahalon L, Gilatt D, Mirin S, Miller A, Lider D. Physically damaged extracellular matrix induces TNF alpha secretion by interaction resting CD4+ T cells and macrophages. *Scand J Immunol* 1993;37:111-118.
10. Hoffman EP. Clinical and histopathological features of abnormalities of dystrophin-based membrane cytoskeleton. *Brain Pathol* 1996;6:49-61.
11. Jones GE, Witkowski JA. Membrane abnormalities in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1983;58:159-163.
12. Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec* 1995;242:70-76.
13. Lidov HG. Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol* 1996;6:63-77.
14. Matsumura K, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve* 1994;17:2-15.
15. Michelson AM, Russel ES, Harman PJ. Dystrophia muscularis: a hereditary primary myopathy in the house mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*;1995,41:1079.
16. Partridge T. Pathophysiology of muscular dystrophy. *Br J Hosp Med* 1993;49:26-34.
17. Pasternack C, Woung S, Wilson EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 1995;128:355-361.
18. Pastoret C, Sebille A. Age related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle & Nerve* 1995;18:1147-1154.
19. Quirico-Santos TJ, Ribeiro MM, Savino W. Increased deposition of extracellular matrix components in the thymus gland of MDX mouse: correlation with muscular lesion. *J Neuroimmunol* 1995,59:9-18.
20. Roberds SL, Ervasti JM, Anderson RD, Ohlendieck K, Kahl SD, Zoloto D, Campbell KD. Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J Biol Chem* 1993;268:11496-11499.
21. Rodemann HP, Bayreuther K. Abnormal collagen metabolism in cultured skin fibroblasts from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1984;81:5130-5133.
22. Saudolet-Puccio HM, Kunkel LM. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol* 1996;6:25-35.
23. Schloesser M, Slomski R, Wagner M, Reiss J, Berg LP, Kakkar VV, Cooper DN. Characterization of pathological dystrophin transcripts from the lymphocytes of a muscular dystrophy carrier. *Mol Biol Med* 1990;79:519-523.
24. Scott OM, Hyde SA, Goddard C, Jones R., Dubowitz V. Effect of exercise in Duchenne muscular dystrophy: a controlled six-month feasibility study of the effects of two different regimes of exercises in children with Duchenne muscular dystrophy. *Physiotherapy* 1981;67:174-176.
25. Seixas SIL, Wajsenzon LJ, Savino W, Quirico-Santos T. Altered deposition of extracellular matrix components in the skeletal muscle and lymph node of the mdx dystrophic mouse. *Braz J Med Biol* 1994;27:2229-2240.
26. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlington MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989;244:1578-1580.
27. Tidball JG, Albrecht DE, Lokensgard BE, Spencer MJ. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J Cell Sci* 1995;108:2197-2204.
28. Tomé FMS, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci Paris* 1994;317:351-357.
29. Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, De Lahynta A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscopic and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986;71:301-305.
30. Xu H, Christmas P, Wu XR, Wewer U, Engvall E. Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5572-5576.