

DISCUSSIÓ

1 - Cronopatologia del ratolí mdx

L'existència de grups de fibres en els que, simultàniament, es poden observar fibres en fase de necrosi i d'altres en fase de regeneració, tal com es veuen en els pacients afectes de distròfia muscular de Duchenne (DMD), han estat observats en el ratolí mdx des de la seva descripció inicial (Bulfield G 1984, Bridges LR 1986, Karpati G 1988, Gorospe JRM 1997). Aquests grups de fibres d'acord amb la proposta de A.Engel han estat anomenats grups degeneratius-regeneratius (GDRs) (Engel AG 1986). Carnwath i cols. van descriure al 1987 diferents estadis histopatològics en el ratolí mdx. Aquests autors van suggerir que l'existència d'aquests estadis histopatològics estava relacionada amb l'edat del ratolí i que corresponien a diferents fases del procés de degeneració i subseqüent regeneració. És a dir, en els ratolins joves predominaven lesions de tipus degeneratiu en tan que en els adults predominaven els fenòmens regeneratius (Carnwath JW 1987). Aquests autors, probablement van interpretar que GDRs en diferents fases corresponien a diferents estadis de la malaltia. Les nostres observacions, al llarg de la vida del ratolí mdx, ens han permès de comprovar que GDRs en diferents fases coexisteixen en un mateix múscul (Fig. 15). Cap dels estudis que hem pogut recollir fins a l'actualitat ha utilitzat el nombre, grandària i distribució dels GDRs per intentar quantificar la intensitat de necrosi que es produeix al llarg de la vida d'aquest animal. La presència de múltiples GDRs de diferents grandàries i estadis en la mateixa secció del grup muscular del gastrocnemi (GMG) i la seva evolució durant tota la vida del ratolí mdx (Fig. 14), juntament amb l'evolució del percentatge de fibres amb nucli no perifèric (NNP) que evoluciona en paral·lel amb el nombre de GDRs mitjans i grans (Fig. 16) són les troballes més remarcables de l'estudi de la cronopatologia del ratolí mdx que hem portat a terme. L'anàlisi de l'evolució del nombre de GDRs petits, mitjans i grans ens mostra com la malaltia del ratolí mdx no es manifesta abans de les dues setmanes de vida i que un cop iniciada, aquesta no presenta una intensitat constant. Concretament, veiem una fase aguda que va des dels quinze

dies de vida fins els dos o tres mesos on hi ha una gran intensitat de necrosi. La fase posterior es caracteritza per una gradual disminució del nombre de GDRs de mitjà i gran tamany, i per tant, una disminució considerable de la magnitud de la necrosi. A partir dels 6 mesos, la necrosi persisteix en forma de GDRs petits (afectant a menys de 5 fibres) o de fibres aïllades (Fig. 16). Els nostres resultats de l'estudi de l'evolució del percentatge de fibres amb NNP són pràcticament superposables als obtinguts per McGeachie i cols. Aquests autors en el seu treball utilitzant timidina tritiada per mesurar proliferació de les cèl.lules precursors del múscul en el ratolí mdx, van observar un increment notable del nombre de nuclis que incorporaven el radioisòtop entre els 15 dies i els dos mesos d'edat. A partir dels dos mesos fins el sisè més de vida es produïa un descens progressiu de la replicació cel.lular que a partir del sisè mes es mantenia estable fins el final del període observacional (McGeachie JK 1993). Ja que la replicació cel.lular és una resposta a la necrosi, podem concloure que tan els resultats de McGeachie i cols. com els nostres, donen suport a la teoria de que el ratolí mdx experimenta un clar descens en la intensitat de la seva necrosi muscular a partir de cert moment de la seva vida.

Tot i que la variació de la grandària de les fibres és un fenomen que ha estat àmpliament descrit en el ratolí mdx (Bridges LR 1986, Torres LFB 1987), es va decidir repetir un estudi morfomètric exhaustiu. Esperàvem demostrar que a partir del moment que començava a reduir-se la intensitat de la necrosi, l'histograma de les fibres es tornaria bimodal. D'un histograma on predominarien les fibres de petit tamany com a conseqüència d'una necrosi intensa, passaríem a veure un histograma en el que predominarien dos tipus de grandària de fibres, les de petit i les de gran tamany. L'augment de les fibres grans es produiria a expenses de la hipertròfia de fibres sanes, en un intent per compensar els efectes de la malaltia. Aquest canvi en la distribució de grandàries de les fibres ha estat observat en

humans amb dèficit de distrofina. En fenotips distròfics severes (DMD) es detecta un predomini de fibres petites, mentre que en les més suaus (BMD) s'hi troba un histograma bimodal (Roig M 1998). El ratolí mdx però, per sorpresa nostre, malgrat presentar moltes fibres de petit tamany, no presenta un nombre gaire elevat de fibres hipertròfiques (Fig. 21). Tal i com es discutirà més endavant, la possible explicació d'aquesta escassa presència de fibres hipertròfiques en el ratolí, seria deguda a fenòmens de partició de les fibres (*splitting*), molt més actius en el ratolí mdx que en l'humà amb DMD.

McGeachie i cols. van suggerir que el descens del percentatge de fibres amb NNP que s'observa a partir de 6 mesos en el ratolí mdx podia ser deguda a un lent retorn dels nuclis cap a la perifèria de les fibres regenerades (McGeachie JK 1993). Els nombrosos fenòmens de partició de fibres (*splitting*) observats en el present treball, especialment en fibres de gran tamany, fenomen que ja havia estat descrit abastament en estudis previs (Bridges LR 1986, Schmalbruch H 1976, Pastoret C 1995b, Tamaki T 1994), creiem que poden ser una explicació alternativa que permet conciliar el retorn dels nuclis a la posició perifèrica i el fet de que no es detecti un nombre elevat fibres de gran tamany. La partició de les fibres o *splitting*, per altre banda, també pot ser un mecanisme que contribuiria a protegir les mateixes fibres de posteriors episodis de necrosi ja que, en el ratolí mdx, les fibres de menor grandària semblen ser més resistents a la necrosi (Weller B 1990, Karpati G 1988).

En el ratolí mdx s'han portat a terme diversos estudis sobre el dipòsit de components fibril·lars de la matriu extracel·lular (de la Porte S 1999). El fet de que els col·làgens de tipus III i VI participin tan en la regeneració muscular com en la fibrosi muscular és important, ja que és un fet que pot interferir en la correcta valoració de la fibrosi endomisial (Roig M 1998). La presència dels col·làgens tipus III i VI és bastant abundant dins els GDRs, però desapareix ràpidament un cop la regeneració es completa. L'acumulació d'aquests col·làgens

en els espais endomisials de fibres normals o regenerades és identificada inequívocament a partir del sisè mes de vida del ratolí mdx, i a partir dels divuit mesos és freqüent veure espais entre la fibrosi on la fibra ha estat substituïda per teixit adipós (Fig. 19).

La densitat de mastòcits augmenta progressivament fins assolir un pic als 6 mesos d'edat, moment a partir del qual es manté gairebé estable fins els 12 mesos, i després experimenta un lleu descens. En contra de la hipòtesi que postulava que l'activitat mastocítica podia ser la desencadenant dels fenòmens de necrosi en grup (Gorospe JRM 1994, Granchelli JA 1995), les nostres observacions conclouen que no es pot establir una correlació entre els GDR i la presència de mastòcits en la regió concreta on es dona aquest fenomen. La distribució dels mastòcits sembla ser a l'atzar en tota la secció muscular, excepte en les zones amb grans vasos sanguinis on si que es troba una localització preferent, però mai correlacionable amb la presència de fenòmens necròtics. A més, les edats de màxima intensitat necròtica del ratolí mdx (2-3 mesos) no coincideixen amb el moment de major densitat mastocítica en el teixit muscular d'aquests ratolins (Fig. 24). El fet de que les nostres dades mostrin com la densitat de mastòcits en el teixit muscular distròfic del ratolí mdx va augmentant gradualment fins els 12 mesos i que es manté elevada fins el final de la vida dels ratolins suggereix que els mastòcits puguin estar jugant un paper important en fenòmens relacionats amb la cronificació de la malaltia, especialment amb la fibrosi.

A nivell molecular, el grau de necrosi-regeneració en el ratolí mdx és un paràmetre difícil de quantificar. En estudis previs, s'ha utilitzat l'expressió del mRNA d'algunes proteïnes com la miogenina, MyoD i metaloproteïna-9 (MMP-9) per quantificar-lo (Grounds MD 1992, Lluís F 2001). La MMP-9 és una proteasa de la matriu extracel·lular l'expressió de la qual es veu transitòriament induïda després d'una lesió muscular (Kherif S. 1999). En el nostre estudi, hem utilitzat el nivell d'expressió d'aquesta proteïna, com a

marcador de regeneració en el múscul del ratolí mdx (Fig. 25). En algunes mostres control hem detectat petits nivells d'aquesta proteasa que hem atribuït a nivells basals. Aquests nivells però, en cap cas es poden confondre amb els nivells tan alts com els que s'han detectat en el múscul dels ratolins mdx. Els nostres resultats demostren com l'evolució dels nivells d'aquesta proteasa en el ratolí mdx encaixa bé amb el model evolutiu obtingut mitjançant els nostres estudis cronopatològics, corroborant la teoria de que després del pic inicial de necrosi, al voltant dels dos mesos, té lloc una reducció de la necrosi més que una potenciació de la regeneració.

Tot i que la presència de miosina del desenvolupament (MHCd) en el ratolí mdx es pot demostrar inequívocament i en tot moment per immunohistoquímica (Fargas A 2002 i 2003, Pons F 1994), només la vàrem poder detectar en Western blot durant els 5 primers dies de vida (Fig. 25). En aquest període la MHCd és la miosina majoritària de totes les fibres del múscul esquelètic (Allen DL 2001). És probable que la detecció de la MHCd per Western blot requereixi quantitats més altes de la proteïna que les que s'obtenen de mostres on un nombre molt reduït de fibres es troba en l'estadi concret de regeneració en que s'expressa MHCd.

Per finalitzar aquest primer apartat de la discussió, voldríem fer notar l'existència de certes evidències que indiquen que certs músculs o grups de músculs poden reaccionar de forma diferent enfront del mateix defecte genètic (Porter JD 1998, Andrade FH 2000). També cal afegir que diferents estudis sobre diferents músculs del ratolí mdx arriben a diferents resultats i diferents conclusions degut a la diferent localització anatòmica i/o funció dels músculs observats. Músculs com el diafragma presenten una afectació molt important (Stedman HH 1991), en tan que músculs més distals o els extraoculars que pràcticament es mantenen sense afectació (Andrade FH 2000, Dowling P 2002). Per aquest motiu, la generalització dels resultats obtinguts en un sol múscul, com és el nostre cas, s'ha de fer amb

molta cautela i amb certes reserves. Malgrat això, l'estudi que presentem indica que el ratolí mdx, contràriament a l'humà amb DMD, presenta un canvi de comportament de la malaltia que la fa molt més lleu. Aquest canvi de comportament de la malaltia comporta un grau de necrosi molt menor i una fibrosi menys important i més tardana, i probablement és la causa de que el ratolí mdx mai arribi a desenvolupar unes característiques distròfiques tan severes com la DMD humana.

2 - Paper de la utrofina i del β -dístroglicà

Estudis previs en ratolins mdx i controls destinats a analitzar els nivells d'expressió de la utrofina durant els 15 dies posteriors al naixement han donat lloc a informació fragmentada i contradictòria (de la Porte S 1999). En ratolins control, Koga i cols. han publicat un decrement dels nivells de utrofina en fetus a partir dels 13.5 dies de gestació per arribar gairebé a desaparèixer coincidint amb el moment del naixement (Koga R 1993). Per altre banda, Pons i cols. utilitzant immunohistoquímica havien trobat que la utrofina desapareixia en ratolins mdx entre la segona i la quarta setmana. Aquests autors, malauradament, no van poder visualitzar la utrofina en ratolins normals per que l'anticòs de que disposaven reconeixia també la distrofina i emmascarava la presència o l'absència d'utrofina (Pons F 1994). La informació d'aquests dos treballs, el primer amb ratolins normals i el segon amb mdx, semblava indicar que la utrofina desapareixia abans en els ratolins normals que en els distròfics. Els nostres resultats ens permeten descartar aquesta possibilitat, ja que el comportament de la utrofina en els primers quinze dies de vida és idèntic entre els ratolins mdx i els controls (Fig. 27). De fet, l'expressió fisiològica post-natal de utrofina pot ser una de les raons que permeten explicar perquè el ratolí mdx no necrosa mai abans del dia 14 després del naixement, doncs l'inici de la necrosi coincideix exactament amb la desaparició de la utrofina. No podem descartar, però, que l'inici de l'activitat física dels ratolins o algun altre

factor desconegut pugui jugar també un paper important en el començament de la necrosi muscular.

Els resultats del nostre estudi evolutiu (Fig. 27), per altra banda, ens han permès demostrar com la utrofina reapareix poc després de l'inici de la necrosi en els mdx arribant a un pic d'expressió al voltant dels dos mesos, coincidint amb el moment en que la necrosi comença a disminuir. Law i cols. no van trobar diferències en la quantitat d'utrofina present en ratolins mdx i en controls de 2 setmanes, però van trobar nivells 1,5 vegades més grans en ratolins mdx de 11 mesos d'edat (Law DJ 1994). El fet de que en el present treball s'hagin estudiat un nombre molt més elevat de ratolins i d'un espectre molt més ampli d'edats ens ha permès de tenir una visió més completa de l'evolució dels nivells d'utrofina al llarg de tota la vida del ratolí mdx i dels seus controls, permetent-nos correlacionar la seva presència amb els fenòmens cronopatològics, millorant així la nostra interpretació del paper de la utrofina en el curs natural de la malaltia del ratolí mdx.

Diverses investigacions sobre el paper de la utrofina en el múscul carent de distrofina utilitzant ratolins transgènics ja havien postulat que la utrofina podia ser capaç d'unir les proteïnes del complex de la distrofina, compensant així la seva absència en el sarcolema (Deconinck N 1997, Deconinck AE 1997, Grady RM 1997, Rafael JA 1998, Porter JD 1998). L'evolució paral·lela dels nivells de utrofina i β -dístroglicà que es mostra en el nostre estudi ens permet donar suport a aquesta hipòtesi en el ratolí mdx espontani. Sembla molt clar, doncs, que al voltant dels 15 dies, la desaparició de la utrofina post-natal va acompanyada d'una desaparició del β -dístroglicà en el ratolí mdx però no en els controls (Fig.27). Probablement, aquesta desaparició del β -dístroglicà en els mdx és deguda a que en aquest moment no es troba ni distrofina ni utrofina en el seu sarcolema. A més, la posterior recuperació dels nivells d'utrofina en els ratolins distròfics va també acompanyada d'una

recuperació paral·lela dels nivells de β -dístroglicà sense arribar mai als nivells dels ratolins normals. Aquesta correlació que s'intueix a l'analitzar les dades visualment, ha estat objectivada matemàticament i ens mostra com els nivells de β -dístroglicà i utrofina estan clarament i linealment correlacionats (Fig. 29) mentre que no ho estan en els controls, una prova més de que la utrofina pot actuar com a lligand del β -dístroglicà en absència de dístrofina.

Un altre aspecte destacable és el fet de que en el múscul del ratolí mdx, detectem una segona banda de pes molecular lleugerament inferior a la utrofina quan incubem amb l'anticòs contra aquesta proteïna (Fig. 30). De les dades presentades es desprèn que és possible que existeixi una isoforma d'utrofina amb un pes molecular lleugerament menor, encara que no hem pogut trobar cap processament alternatiu del seu mRNA entre els nucleòtids 41 i 10958 del seu cDNA (Fig. 31). No podem descartar, tal i com s'ha descrit, que l'ús d'un promotor alternatiu pugui donar lloc a isoformes diferents en aquests animals (Burton EA 1999, Galvagni F 2002). S'han descrit dues isoformes de utrofina, anomenades utrofines A i B. La isoforma A començaria amb l'exó 1A, empalmaria amb 2A (on hi hauria l'ATG d'inici de traducció), després amb l'exó 3 i seguiria fins el final. La forma B començaria entre els exons 2A i 3, en l'exó alternatiu 1B (que contindria el seu propi ATG) i empalmaria directament amb l'exó 3. La resta de la proteïna seria idèntica (veure figura 59), doncs l'única diferència seria l'extrem N-terminal on es substituirien els 26 aminoàcids codificats per l'exó 2A per els 31 codificats per l'exó 1B. Apart de la diferència qualitativa que suposa aquest canvi d'aminoàcids, la diferència en nombre total d'aminoàcids seria de només 5 aminoàcids, la qual cosa fa pensar de que difícilment es pugui discriminar aquestes dues isoformes en un Western blot (caldrà distingir una isoforma de 3429 aminoàcids d'una de 3424). Això fa que la identitat de la banda inferior que detectem en el nostre Western blot no pugui ser atribuïda a una isoforma produïda per l'ús d'aquest promotor alternatiu, excepte si l'ús d'aquest promotor

anés associat a altres processaments alternatius. Tots aquests fets ens han portat a hipotetitzar que per tal de poder assumir que la banda inferior és una isoforma de la utrofina hauria d'existir algun altre mecanisme que pogués donar lloc a una isoforma de pes molecular menor al de les utrofines A i B.

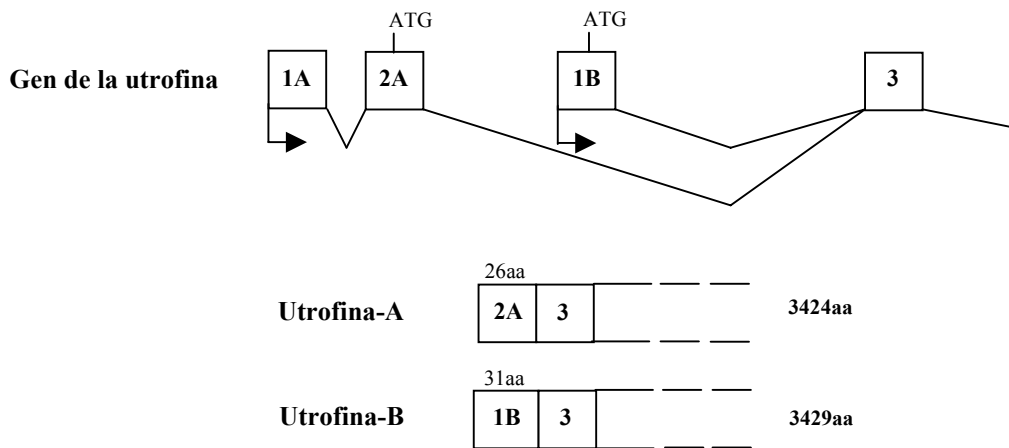


Figura 59 - Processament alternatiu del mRNA de la utrofina per donar lloc a les seves isoformes A i B. La part superior mostra el mRNA i els dos processaments alternatius i la part inferior mostra les isoformes A i B a nivell de proteïna. S'indiquen els dos ATG d'inici de la transcripció. També s'indica el nombre d'aminoàcids pels que codifiquen els exons 2A i 1B respectivament i el nombre d'aminoàcids totals d'ambdues isoformes (Galvagni F 2002).

Tot i el clar increment que experimenta la utrofina a nivell de proteïna en el múscul esquelètic del ratolí mdx, els nivells del seu RNA missatger no mostren increments paral·lels, sinó que es mantenen pràcticament constants entre 1 i 9 mesos tan en ratolins mdx com en controls (Fig. 33), edats entre les qual es dona l'increment màxim de la utrofina a nivell de proteïna en el mdx. Aquest fet ens indica que la pujada dels nivells de utrofina no són deguts a increments en el seu transcrit. Alguns autors ja havien apuntat discrepàncies entre els seus nivells de mRNA i proteïna en altres models (Gramolini AO 1999, Vater R 1988). Ens sembla

particularment interessant el treball de Gramolini i cols. on demostren que l'increment en els nivells de utrofina en el múscul regenerant de ratolí després d'una lesió induïda per cardiotoxina no es veu acompanyat per canvis paral·lels en el seu transcrit, i que humans amb DMD tampoc presenten una quantitat més gran del seu mRNA respecte els controls tot i presentar també més proteïna (Gramolini AO 1999). Per altra banda, recentment s'ha descrit l'existència d'una forma d'utrofina transcrita des de un promotor alternatiu, que s'ha anomenat utrofina-A, el transcrit de la qual sí que es veu transitòriament regulat a l'alça en cèl·lules satèl·lit en proliferació (Galvagni F 2002). En qualsevol cas, el fet de que la utrofina-A només vegi induïda la seva transcripció durant l'activació de les cèl·lules satèl·lit i que desaparegui del tot abans de la fusió de les cèl·lules satèl·lit per formar miotubs, ens fa pensar que aquesta no sigui la forma de utrofina que sigui capaç de suplir la funció de la distrofina en les fibres regenerades madures. Els nostres resultats suggereixen la hipòtesi de que, a més de la regulació transcripcional (Galvagni F 2002) i post-transcripcional (Gramolini AO 2001) que han estat descrites en certes condicions, existeix també una modulació a nivell post-traduccionals dels nivells d'utrofina que podria explicar els nivells tan alts que detectem en el ratolí mdx. La nostra hipòtesi per explicar el mecanisme d'aquesta regulació post-traduccionals és que la proteïna podria veure's estabilitzada gràcies a la possibilitat d'unir-se als llocs d'unió de la distrofina.

Valorats en conjunt, els resultats presentats en aquesta part del treball ens han permès d'aportar dades a favor de que l'explicació de les diferències clíniques entre el ratolí mdx i els pacients amb DMD poden ser atribuïdes principalment a un decrement de la intensitat de la necrosi en el ratolí més que no pas a una capacitat regenerativa més gran del ratolí respecte l'humà. En segon lloc, els canvis en la intensitat de la necrosi poden ser explicats gràcies a que la utrofina és capaç de suplir el dèficit de distrofina. Finalment, malgrat l'increment d'utrofina

a nivell de proteïna, el seu transcrit no presenta una regulació positiva, subratllant la importància d'una regulació post-traduccional per l'utrofina en el múscul del ratolí mdx. En la nostra opinió però, un dels principals reptes pel futur és l'explicació del perquè la utrofina pot reduir significativament el fenotip distròfic en ratolins, però en canvi no pot fer-ho en humans amb DMD.

3 - Paper de la proteasa uPA en la regeneració muscular:

En aquesta part de l'estudi, discutim les conseqüències durant la regeneració muscular del dèficit de la proteasa uPA que porta a una inactivació del sistema del plasminògen. El ratolí carent de uPA mostra un retard en la regeneració molt important després d'una lesió muscular experimental (Fig. 37). El ratolí mdx-uPA^{-/-}, per la seva banda, presenta un increment en la severitat de la malaltia derivat del defecte regeneratiu que presenta. Ambdós models suggereixen un paper crucial de uPA en la regeneració muscular. Aquesta reducció de la capacitat regenerativa del ratolí carent de uPA es reproduïx també en els ratolins carents de plasminògen (Lluís i cols. 2001). Això ens permet concloure que de les dues vies conegudes d'activació del plasminògen (mediades per uPA i tPA), la mediada per uPA és la predominant en el procés de regeneració muscular. A més, està ben descrit que en la línia mioblàstica murina C2C12, l'activitat uPA també és la predominant (Muñoz-Canoves P 1997).

L'acumulació de fibrina extravascular és una característica de patologies caracteritzades per inflamació i reparació de teixit en pell i glomèrul (Romer J 1996, Kitching AR 1997). En aquestes dues situacions, l'acúmulo excessiu de fibrina va ser atribuït a una reducció patològica de l'eliminació de fibrina deguda a una reducció de fibrinolisi mediada per uPA i tPA respectivament. En el nostre model de regeneració muscular induïda per lesió experimental, també hem trobat que la carència de uPA dóna lloc a un acúmulo de fibrina

muscular, indicant la importància de uPA en la neteja de la fibrina extravascular en aquest teixit (Fig. 40). L'acumulació de fibrina en els espais endomisials pot tenir uns efectes negatius pel que fa a l'accessibilitat dels macròfags i altres tipus cel.lulars a la zona necrosada i permetre la correcta neteja de les restes de fibres. Els lligams entre l'alt grau de fibrina present en el teixit i l'allargament del període de regeneració va ser explorat desfibrinogenant amb Ancrod els ratolins carents de uPA. L'administració d'Ancrod redueix els nivells plasmàtics de fibrinogen en els ratolins uPA^{-/-} i dóna lloc a una substancial millora en la seva regeneració muscular (Fig. 41).

La troballa de que la pèrdua d'activació del plasminògen impedeix la regeneració ens va portar a preguntar-nos sobre com està involucrat el sistema uPA-plasminògen en la regeneració muscular. La inflamació es un procés associat a la reparació tisular. El fet de que el nombre de cèl.lules Mac-1 positives 48 hores després de la lesió es vegi reduïda a aproximadament la meitat suggereix que l'activitat uPA és requerida pel correcte funcionament del mecanismes inflamatoris (Fig. 39). Aquesta hipòtesi es veu reforçada per resultats obtinguts amb el ratolí deficient en uPA (Gyetko MR 1996) on es demostra que la falta de uPA comporta un inadequat reclutament dels macròfags, un descontrol de la infecció pulmonar i la mort quan aquesta soca de ratolí és infectada per *Cryptococcus neoformans*. A més, se sap que la producció endògena de uPA pot amplificar la neosíntesi del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) per part dels fagocits mononuclears, representant un nou mecanisme mitjançant el qual una proteasa derivada dels fagocits contribueix a generar senyals promotores de la inflamació (Sitrin RG 1996).

La reducció de l'infiltrat de macròfags en el teixit muscular associat a la carència de uPA pot ser degut a una menor quimioatracció de macròfags i/o a la dificultat dels macròfags

per travessar matrius extracel·lulars riques en fibrina. A més, estudis *in vitro* ens mostren que alguns factors produïts després de la necrosi (com el factor de creixement fibroblàstic [FGF] i el factor de creixement derivat de plaquetes [PDGF]) tenen un alt poder quimioatracent per neutròfils i macròfags (Robertson TA 1993) i que la seva activitat comença a ser aparent a partir de les 6 hores post-lesió i esdevé màxim a les 24-48 hores. L'alliberament d'aquests factors es correlacionaria amb l'entrada de macròfags *in vivo* que s'ha mostrat en aquest estudi. S'ha demostrat també que els macròfags activats, però no els neutròfils, produeixen factors solubles (FGF i PDGF) que actuen com a forts quimioatracents i mitogènics per les cèl·lules precursors del múscul (Robertson TA 1993). Així, els macròfags activats que s'acumulen en el teixit en resposta a una lesió muscular, no només poden fagocitar restes cel·lulars, sinó que també poden atreure i fer entrar en mitosi les cel·lules satèl·lit per poder formar de nou miofibrils i fibres musculars. Tots aquests processos podrien estar alterats tan en el ratolí carent de uPA com en el doble mutant mdx-uPA-/-.

La hipòtesi de que el sistema del plasminògen faria les matrius extracel·lulars més permeables a l'infiltrat inflamatori encaixaria amb la hipòtesi de que la conversió de plasminògen a plasmina via uPA és necessària per donar lloc a una eliminació de la fibrina tisular. Probablement, la plasmina és un membre més del curoament regulat equip d'enzims capaços de degradar la matriu extracel·lular, incloent serin-, metalo-, i altres tipus de proteases, les quals són claus en el remodelatge tisular després d'una lesió. Els nostres resultats suggereixen que la plasmina desenvolupa un paper importantíssim en la solubilització de la fibrina i que sense ella la reorganització de teixit muscular després d'una lesió es veu severament compromesa. En qualsevol cas, basant-nos en dades prèvies, no podem descartar que la deficiència en uPA i per tant del sistema del plasminògen pugui impedir també la migració cel·lular impedit secundàriament la degradació d'altres components de la matriu extracel·lular. Tampoc podem excloure la possibilitat de que, a part

dels efectes de la carència de uPA sobre els components de la matriu extracel.lular, el tàndem uPA/plasmina pugui estar alterant l'activació d'altres factors latents com TGF- β i HGF/SF (Naldini L 1992) i que per tan aquests tampoc puguin desenvolupar correctament algunes de les seves funcions. Aquests dos factors, per exemple, són expressats en el múscul lesionat i es creu que juguen un important paper promovent l'activació de les cel.lules satèl.lit quiescents després d'una lesió *in vivo* (Tatsumi R 1998).

En el ratolí doble mutant mdx-uPA hem pogut portar a terme un contactge de les fibres que han passat per almenys un cicle de necrosi-regeneració a 1 mes d'edat dels ratolins. Això suposa que aquests ratolins porten uns 15 dies de necrosi ja que la necrosi dels ratolins mdx i del doble mutant mdx-uPA^{-/-} comença a les dues setmanes. En aquest contactge, s'aprecia clarament com els dobles mutants (respecte els mdx) presenten un clar retard en la regeneració ja que a aquesta edat molt poques fibres han pogut completar un cicle sencer de necrosi-regeneració (Fig. 46). Una característica anatòmica molt visible tan en els músculs dels ratolins uPA^{-/-} després d'una lesió com dels mdx-uPA^{-/-} és la permanència en el teixit de fibres necròtiques no fagocitades (Fig. 44). El fet de que aquestes fibres es mantinguin en el teixit durant un temps molt més llarg del normal, pot ser un efecte directe del descens del nombre de macròfags i de l'anormal acúmulo de fibrina. Ha estat àmpliament descrit que les fibres necròtiques pateixen una entrada massiva de calci (Franco A 1990, Menke A 1991, Mariol MC 2001), però en el ratolí mdx la fagocitosis d'aquestes fibres és molt ràpida i per aquest motiu només veiem algunes fibres amb calci intracel.lular en el seu múscul. No tenim clar però, si l'acúmulo intracel.lular de calci que veiem en aquestes fibres no fagocitades del doble mutant seria una causa del retard de la fagocitosis o simplement en seria un efecte.

El fet de que el ratolí doble mutant mdx-uPA presenti una elevada mortalitat (de l'ordre del 80%) i que aquesta no es presenti repartida al llarg de tota la vida del ratolí doble mutant ens dóna peu a introduir un concepte que ens permet correlacionar el nombre de grups necròtics presents en cada moment de la vida del ratolí mdx amb aquesta mortalitat tan elevada (Fig. 42). En el model del doble mutant carent de distrofina i utrofina (Grady RM 1997, Deconinck AE 1997) els ratolins moren tots abans dels sis mesos, i encara que aquests treballs no detallen exactament quan es produeixen les morts, del seu treball es desprèn que les morts es produeixen de forma esglaonada i no pas concentrades en un període concret com és el cas del nostre doble mutant mdx-uPA^{-/-}. El doble mutant distrofina-utrofina, a diferència del doble mutant mdx-uPA^{-/-}, no presenta cap mena d'impediment en la regeneració. La diferència fenotípica més important d'aquest doble mutant distrofina-utrofina respecte als mdx és la intensitat de la necrosi que es mantindria elevada més enllà dels 3 mesos, moment que en els mdx comença a decaure significativament, probablement degut a mecanismes compensatoris mediat per la utrofina. En aquesta tesi hem descrit com evoluciona el nombre de grups necròtics en el ratolí mdx (Fig. 16) així com en el doble mutant mdx-uPA^{-/-} (Fig. 45) i queda clar com la malaltia pateix una fase crítica entre 1 i 3 mesos, moment que coincideix amb el període en que moren aproximadament el 80% dels ratolins dobles mutants. Ens sorprèn, però, que les morts dels ratolins s'aturin a partir de la novena setmana i no continuïn morint ratolins fins la dotzena setmana, moment en el qual remet més clarament la malaltia (Fig. 42). Malgrat aquesta consideració, el fet de que les morts dels ratolins es concentrin dins la fase de màxima necrosi dóna suport indirecte a la teoria de que el ratolí carent de distrofina suporta millor la malaltia que l'humà amb el mateix defecte genètic, degut a que decreix el seu ritme de necrosi i no degut a que gaudixi d'una capacitat regenerativa més potent. Si la segona teoria fos la correcte, trobaríem les morts dels ratolins repartides al llarg de tota la seva vida. Si aquestes diferències de fenotip entre el model murí i l'humà fossin degudes a una millor regeneració del ratolí, al disminuir-li la seva capacitat

regenerativa esperàriem veure un empitjorament del seu fenotip que el faria molt similar a l'humà. L'únic moment en que la disminució de la seva capacitat regenerativa sembla jugar un paper fonamental és la fase de màxima necrosi, a la que els ratolins carents de distrofina es veuen sotmesos. Un cop passada la fase crítica de necrosi elevada, els ratolins dobles mutants, tot i tenir àmpliament mermada la seva capacitat regenerativa sobreviuen sense dificultats aparents.

4 - Identificació de noves proteïnes implicades en la regeneració muscular:

En aquesta part de la tesi es discuteix la identificació de nous gens/factors implicats en la regeneració muscular del ratolí mdx. Gràcies a l'anàlisi de l'expressió gènica diferencial es van poder identificar un total de 9 gens que es trobaven sobreexpressats en el ratolí mdx respecte els seus controls. El sol fet de que estiguin sobreexpressats en el ratolí mdx ens fa pensar que tots ells seran gens implicats en els fenòmens de necrosi-regeneració ja que a diferència dels controls, el ratolí mdx està contínuament necrosant i regenerant intensament degut a la seva deficiència de distrofina. Aquestes troballes obren nous camins per continuar caracteritzant un fenomen molt estudiat però encara molt desconegut com és la regeneració muscular. Alguns dels mRNA's que hem tractat en aquest apartat, fins el moment només han pogut ser identificats com a diferencials. Malgrat això, i donada la seva potencial importància, esperem en un futur immediat poder-los caracteritzar amb la profunditat que probablement mereixen. Només amb dues de les bandes trobades com a diferencials hem portat a terme experiments de caracterització. Gràcies a aquests experiments inicials hem pogut comprovar com per la banda 2 existeix una clara expressió diferencial en els ratolins mdx un cop ha començat la malaltia i que aquesta es manté al llarg de tota la vida dels ratolins (Fig. 56). A

més, aquest mRNA s'expressa en mioblastes C2C12 en diferenciació durant un període de temps molt concret, indicant-nos que és possible que intervingui en una fase molt concreta de la diferenciació o fusió dels mioblastes (Fig. 57). Malauradament, encara no podem donar més respostes a les preguntes que ens suscita l'expressió d'aquest mRNA i la seva proteïna, però estem molt interessats en aprofundir en el seu coneixement. La recent publicació del genoma complet de ratolí (Mouse Genome Sequence Consortium, 2002) ens ha aportat noves dades sobre la seva localització cromosòmica i ens permetrà de conèixer la seva seqüència completa.

Pel que fa a la banda 3, sabem que correspon a CD63, proteïna de la família de les tetraspanines (superfamília de proteïnes amb quatre dominis transmembrana, TM4SF). Ha estat descrit que CD63 intervé en la diferenciació de cèl.lules epitelials en cultiu interaccionant amb la integrina $\beta 1$ (Halldén G 1999) i és clau pel reconeixement de la matriu extracel.lular. També ha estat descrit que CD63 juga un paper crucial en la motilitat de cèl.lules estel.lades hepàtiques *in vitro* les quals són claus en la regeneració i fibrogènesi hepàtiques (Mazzocca A 2002). Malgrat que la seva expressió no és molt diferencial al comparar ratolins mdx i controls, sí que existeix una discreta diferència (Fig. 58). A més, la seva expressió es manté constant durant la diferenciació dels mioblastes de la línia C2C12 (Fig. 59). Probablement, el fet d'haver portat a terme els nostres estudis amb teixit muscular *ad integrum*, potser hagi emmascarat parcialment la seva diferencialitat. Si haguéssim pogut separar diferents tipus cel.lulars o diferents estadis de diferenciació en fibres regenerants, potser la diferencialitat hauria estat més clara. Per portar a terme aquesta separació de parts del teixit, ens hauria estat de gran ajuda la tecnologia del microdissector làser, de la qual actualment ja disposem en la nostra institució. Probablement aquesta tecnologia ens ajudi a resoldre, en un futur pròxim, si CD63 pot tenir alguna funció important en la regeneració

muscular, tal i com la bibliografia sembla indicar per altres teixits com l'hepàtic o l'epitelial intestinal (Halldén G 1999, Mazzocca A 2002). També ha estat descrita la seva expressió en macròfags activats (Miyamoto H 1994), la qual cosa és molt rellevant en el nostre model, doncs el ratolí mdx presenta sovint focus necròtics amb multitud de macròfags. Aquests podrien ser els productors de CD63 i els causants de la diferencialitat d'expressió, encara que discreta, observada entre ratolins mdx i controls. Aquesta part de l'estudi no la donem per acabada, ja que tenim previst de realitzar múltiples experiments per tal d'avançar en la caracterització de tots aquests possibles factors implicats en la regeneració muscular, ja siguin proteïnes de membrana, citoquines inflamatòries o altres tipus de factors.

CONCLUSIONS

1 - El ratolí mdx presenta una disminució important de la necrosi muscular a partir dels 2 mesos d'edat. Aquesta disminució de la necrosi, més que no pas una millor regeneració, pot explicar per que el ratolí mdx mai arriba a presentar unes característiques distròfiques tan accentuades com les observades en la DMD humana.

2 - La desaparició de la utrofina als catorze dies de vida del ratolí mdx, coincideix amb el moment d'inici de la necrosi muscular. A més, la posterior reaparició de la utrofina coincideix amb un descens en la intensitat de la necrosi. Aquests resultats suggereixen un paper protector de la utrofina enfront de la necrosi en el ratolí mdx.

3 - L'augment de la utrofina observat en els ratolins mdx no es correlaciona amb variacions en el seu mRNA. Aquest fet indica que l'increment de la utrofina en el múscul del ratolí mdx adult, es produeix principalment per mecanismes de regulació post-transcripcional.

4 - La proteasa uPA juga un paper clau en les reaccions de degradació de la matriu de fibrina durant la regeneració muscular, i és per això, que en el seu defecte la regeneració muscular es veu severament afectada.

5 - La obtenció del doble mutant mdx-uPA^{-/-} ens ha permès demostrar que aquest presenta un nombre més elevat de grups necròtics que el ratolí mdx, degut a la disminució de la seva capacitat regenerativa provocada per la carència de uPA, confirmant la importància d'aquesta proteasa per la regeneració muscular.

6 - La mortalitat de la soca de ratolí doble mutant mdx-uPA^{-/-} es troba concentrada exclusivament en el període de màxima necrosi. Aquest fet, aporta una nova dada en favor de la hipòtesi de que les diferències de fenotip observades entre el model murí distròfic i la DMD humana no són degudes a una major capacitat regenerativa del ratolí, sinó a un descens del seu ritme de necrosi.

7 - L'estudi d'expressió diferencial de gens en el període de màxima necrosi del ratolí mdx ha permès identificar un total de 9 gens diferencials. D'aquests, 2 codifiquen per enzims, 1 correspon a una interleuquina, 2 a proteïnes transmembrana i 4 són seqüències sense proteïna caracteritzada.

8 - Experiments preliminars amb dos dels gens diferencials obtinguts (B2 i CD63) han permès la detecció de la seva expressió durant la diferenciació de mioblastes in vitro. Aquests resultats indiquen que aquestes proteïnes poden tenir un paper rellevant en el procés de regeneració muscular.

REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, Froehner SC (1993) Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* 11:531-540.

Adams ME, Dwyer TM, Dowler LL, White RA, Froehner SC (1995) Mouse 1- and 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J Biol Chem* 270:25859-25865.

Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM (1996) The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 271:2724-2730.

Ahn AH, Kunkel LM (1995) Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 128:363-371.

Ahn AH, Yoshida M, Anderson MS, Feener CA, Selig S, Hagiwara Y, Ozawa E, Kunkel LM. Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4446-50.

Allbrook D. Skeletal muscle regeneration. *Muscle & Nerve* 1981; 4: 234-245

Allen DL, Leinwand LA. Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IIB or IID myosin heavy chains. *Dev Biol*. 2001 Jan 15;229(2):383-95.

Ambrose HJ, Blake DJ, Nawrotzki RA, Davies KE. Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics*. 1997 Feb 1;39(3):359-69.

Anderson JE, Kao L, Bressler BH, Gruenstein E. (1990). Analysis of dystrophin in slow and fast-twitch skeletal muscle of mdx and DY2J mice at different ages. *Muscle Nerve* 13, 6-11

Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. *Anat Rec*. 1987 Nov;219(3):243-57.

Andrade FH, Porter JD, Kaminski HJ. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? *Microsc Res Tech*. 2000 Feb 1-15;48(3-4):192-203. Review.

André B, Springael JY. WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1201-1205.

Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet*. 1999 Sep;8(9):1589-98.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000 Dec 11;151(6):1221-34

Bergman RL, Inzana KD, Monroe WE, Shell LG, Liu LA, Engvall E, Shelton GD. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2002 May-Jun;38(3):255-61.

Bewick GS, Nicholson LV, Young C, O'Donnell E, Slater CR. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport*. 1992 Oct;3(10):857-60.

Bieber FR, Hoffman EP. Duchenne and Becker muscular dystrophies: genetics, prenatal diagnosis, and future prospects. *Clin Perinatol*. 1990 Dec;17(4):845-65. Review.

Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acid Research* 1992; 20: 1725-31

Bischoff R. Proliferation of muscle satellite cells in intact myofibers in culture. *Dev Biol* 1986; 115:129-139

Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1994, p.97-118.

Bischoff R. Tissue culture studies on the origin of myogenic cells during muscle regeneration in the rat. In Mauro A. (Ed.) *Muscle Regeneration*, Raven Press. New York, NY, 1979, pp13-29.

Blake DJ, Nawrotzki R, Peters MF, Froehner SC, Davies KE. Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29;271(13):7802-10.

Blake DJ, Schofield JN, Zuellig RA, Gorecki DC, Phelps SR, Barnard EA, Edwards YH, Davies KE. Utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 25;92(9):3697-701.

Bodine-Fowler S. Skeletal muscle regeneration after injury: an overview. *J Voice* 1994 Mar; 8(1):53-62.

Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet*. 1995 Nov;11(3):266-73.

Bork P, Sudol M. The WW domain: A signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 531-533.

Bridges LR. The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of mdx mice. *J Neurol Sci* 1986; 72: 147-157.

Bulfield 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.

Burton EA, Tinsley JM, Holzfeind PJ, Rodrigues NR, Davies KE. A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):14025-30.

Burton HW, Carlson BM, Faulkner JA. Microcirculatory adaptation to skeletal muscle transplantation. *Annu Rev Physiol* 1987;49:439-51.

Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet*. 1991 Apr 27;337(8748):1022-4.

Butler MH, Douville K, Murnane AA, Kramarcy NR, Cohen JB, Sealock R, Froehner SC. Association of the Mr 58,000 postsynaptic protein of electric tissue with Torpedo dystrophin and the Mr 87,000 postsynaptic protein. *J Biol Chem*. 1992 Mar 25;267(9):6213-8.

C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K, Chamberlain JS. Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci*. 1999 Jul;2(7):611-7.

Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80: 675-679.

Campion DR. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 1984; 87: 225-51.

Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994 Mar 31;368(6470):419-24.

Carnwath JW, Shotton DM. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* 1987; 80: 39-54.

Carpenter JL, Hoffman EP, Romanul FC, Kunkel LM, Rosales RK, Ma NS, Dasbach JJ, Rae JF, Moore FM, McAfee MB, et al. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol.* 1989 Nov;135(5):909-19.

Carpenter S, Karpati G. Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989; 48: 154-70.

Chan YM, Bonnemann CG, Lidov HGW, Kunkel LM Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture - *J Cell Biol* 1998 Dec 28;143(7):2033-44.

Chevallier A, Pautou MP, Harris AJ, Kieny M. On the non-equivalence of skeletal muscle satellite cells and embryonic myoblasts. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.*1986. 87;75(3):161-6.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-9

Coffey AJ, Roberts RG, Green DE, Cole CG, Butler R, Anand R, Gianelli F, Bentley DR. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* 1992 ;12:474-484.

Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature.* 1988 Jul 14;334(6178):154-6.

Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell.* 1999 Aug 20;98(4):465-74.

Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 1997 Nov 15; 191(2): 270-83.

Couch CB, Strittmatter WJ: Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. *Cell* 32:257-265, 1983

Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JD. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I, a histological morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1988; 14: 53-70.

Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31221-4.

Crosbie RH, Lebakken CS, Holt KH, Venzke DP, Straub V, Lee JC, Grady RM, Chamberlain JS, Sanes JR, Campbell KP. Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol.* 1999 Apr 5;145(1):153-65.

Cullen MJ, Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1988; 77: 69-81.

Cullen MJ. Muscle regeneration. In: Brown SC, Lucy JA, editors. *Dystrophin*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997, p. 233-264.

D'Souza VN, Nguyen TN, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN A novel dystrophin isoform is required for normal retina electrophysiology. *Hum Mol genet* 1995; 4: 837-842.

Dangain J, Vrbova G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle & nerve* 1984; 7: 700-704

De la Porte S, Morin S, Koenig J. Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol.* 1999;191:99-148. Review.

Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):717-27.

Deconinck N, Tinsley J, De Backer F, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Davies K, Gillis JM. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1216-21.

DiMario JX, Uzman A, Strohmman RC. (1991). Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle. *Dev. Biol.* 148, 314-321.

Dixon AK, Tait TM, Campbell EA, Bobrow M, Roberts RG, Freeman TC. Expression of the dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J Mol Biol* 1997; 270(4): 551-558.

Dowling P, Culligan K, Ohlendieck K. Distal mdx muscle groups exhibiting up-regulation of utrophin and rescue of dystrophin-associated glycoproteins exemplify a protected phenotype in muscular dystrophy. *Naturwissenschaften.* 2002 Feb;89(2):75-8.

Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol.* 1998 Sep 21;142(6):1461-71.

Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle & nerve* 1992; 15:1105-1110.

Durbeej M, Campbell KP Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. *J Biol Chem* 1999 Sep 10;274(37):26609-16.

Durbeej M, Henry MD, Campbell K *Curr Opin Cell Biol* 1998 Oct;10(5):594-601 Dystroglycan in development and disease.

Dwyer TM, Froehner SC. Direct binding of Torpedo syntrophin to dystrophin and the 87 kDa dystrophin homologue. *FEBS Lett.* 1995 Nov 13;375(1-2):91-4.

Ebashi S, Ebashi F, Kodama A. Troponin as the Ca⁺⁺-receptive protein in the contractile system. *J Biochem (Tokyo).* 1967 Jul;62(1):137-8.

Ebashi S, Endo M. Calcium ion and muscle contraction. *Prog Biophys Mol Biol.* 1968;18:123-83. Review.

Emery AE Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. *Neuromuscul Disord* 1993 Jul; 3(4):263-6.

Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology.* 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1994.

Engel AG. Duchenne Dystrophy. In: Engel AG and Banker BQ (Eds.) *Myology.* McGraw Hill Book Co. 1986; pp: 1185-1240

Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993 Aug;122(4):809-23.

Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991; 66: 1121-1131.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP *Nature* 1990. May 24;345(6273):315-9
Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle.

Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. Published erratum appears in *J Biol Chem* 1998 Jul 31;273(31):19922. Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 1997 Dec 19;272(51):32534-8.

Fargas A, Gratacós M, Roma J, Roig M. Effects of single intramuscular injection of indian ink. *Acta Anatomica* 2003. En premsa.

Fargas A, Roma J, Roig M. Muscle regeneration: the effect of the basal lamina, size of the lesion and inflammatory response in C57BL10/ScSn mice. *Rev Neurol*. 2002 16; 34 : 328-38.

Faulkner JA, Weiss SW, McGeachie JK. Revascularization of skeletal muscle transplanted into the hamster cheek pouch: intravital and light microscopy. *Microvasc Res* 1983 Jul;26(1):49-64

Feener CA, Koenig M, Kunkel LM Alternative splicing of human dystrophin mRNA generate isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 1989; 338: 509-11.

Fletcher S, Ly T, Duff RM, McC Howell J, Wilton SD. Cryptic splicing involving the splice site mutation in the canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2001 Apr;11(3):239-43.

Fors J, Enciclopèdia de medicina i salut, Enc. Catalana.

Franco A Jr, Lansman JB. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 1990 Apr 12;344(6267):670-3

Franzini-Armstrong C, Fischman DA .Morphogenesis of skeletal muscle fibers. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1994, p.74-96

Froehner SC, Adams ME, Peters MF. Syntrophins: modular adapter proteins at the neuromuscular junction and the sarcolemma. *Gee SH Soc Gen Physiol Ser* 1997;52:197-207.

Galvagni F, Cantini M, Oliviero S. The utrophin gene is transcriptionally up-regulated in regenerating muscle. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):19106-13.

Garry DJ, Meeson A, Elterman J, Zhao Y, Yang P, Bassel-Duby R, Williams RS. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5416-21

Garry DJ, Yang Q, Bassel-Duby R, Williams RS. Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. *Dev Biol* 1997; 188 (2): 280-94.

Gaschen F, Burgunder JM. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study *Acta Neuropathol (Berl)*. 2001 Jun;101(6):591-600.

Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JR, Uhl EW, Senior DF, Cardinet GH 3rd, Pearce LK. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci*. 1992 Jul;110(1-2):149-59.

Gee SH, Blacher RW, Douville PJ, Provost PR, Yurchenco PD, Carbonetto S. Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14972-80.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC *J Neurosci* 1998 Jan 1;18(1):128-37 Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins.

Gesemann M, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA. Agrin is a high-affinity binding protein of dystroglycan in non-muscle tissue. *J Biol Chem*. 1998 Jan 2;273(1):600-5.

Gibson MC, Schultz E. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fibre types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec* 1982; 202: 329-37.

Gogos JA, Thompson R, Lowry W, Sloane BF, Weintraub H, Horwitz M: Gene trapping in differentiating cells lines: Regulation of the lysosomal protease cathepsin B in skeletal myoblast growth and fusion. *Journal of Cell Biology* 134:837-847, 1996.

Gorospe JRM, Nishikawa BK, Hoffman EP. Pathophysiology of dystrophin deficiency: a clinical and biological enigma. In: Brown SC, Lucy JA, editors. *Dystrophin*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997, p. 201-232.

Gorospe JRM, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci* 1996; 135:10-17.

Gorospe JRM, Tharp MD, Hinckley J et al. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. *J Neurol Sci*. 1994 Mar;122(1):44-56.

Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):729-38.

Gramolini AO, Belanger G, Thompson JM, Chakkalakal JV, Jasmin BJ. Increased expression of utrophin in a slow vs. a fast muscle involves posttranscriptional events. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Oct;281(4):C1300-9.

Gramolini AO, Karpati G, Jasmin BJ. Discordant expression of utrophin and its transcript in human and mouse skeletal muscles. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Mar;58(3):235-44.

Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS. Duchenne-like myopathy in double-mutant mdx mice expressing exaggerated mast cell activity. *J Neurol Sci* 1995 Jul;131(1):1-7

Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res*. 1992 Jan;267(1):99-104.

Grounds MD, McGeachie JK. A comparison of muscle precursor replication in crush-injured skeletal muscle of Swiss and BALBc mice. *Cell Tissue Res* 1989 Feb;255(2):385-91.

Grounds MD, McGeachie JK. A model of myogenesis in vivo, derived from detailed autoradiographic studies of regenerating skeletal muscle, challenges the concept of quantal mitosis. *Cell Tiss Res* 1987; 250: 563-9.

Grounds MD, McGeachie JK. Myogenic cell replication in minced skeletal muscle isografts of Swiss and BALBc mice. *Muscle Nerve* 1990 Apr;13(4):305-13.

Grounds MD, Partridge TA, Sloper JC. The contribution of exogenous cells to regeneration of skeletal muscle: an isoenzyme study of muscle allografts in mice. *J Pathol* 1980, 132: 325-41.

Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res Pract* 1991; 187: 1-22.

Guerin CW, Holland PC: Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics* 202:91-99, 1995.

Gyetko MR, Chen GH, McDonald RA, Goodman R, Huffnagle GB, Wilkinson CC, Fuller JA, Toews GB. Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1818-26.

Hack AA, Cordier L, Shoturma DI, Lam MY, Sweeney HL, McNally EM. Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Sep 14;96(19):10723-8.

Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol.* 1998 Sep 7;142(5):1279-87.

Hallden G, Hadi M, Hong HT, Aponte GW. Y receptor-mediated induction of CD63 transcripts, a tetraspanin determined to be necessary for differentiation of the intestinal epithelial cell line, hBRIE 380i cells. : *J Biol Chem* 1999 Sep 24;274(39):27914-24

Hanson J, Huxley HE. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature*, 1953, 172, 530.

Hanson J, Lowry J. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Molec. Biol.*,6, 46. 1963.

Hasselbach W. Elektromikroskopische untersuchungen an muskelfibrillen bei totaler und partieller extraktion des L-myosins. *Ztschr.Naturforsch.* 1953, 86, 449.

Hoffman EP, Brown Jr RH, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987 51:919-928

Howell JM, Fletcher S, Kakulas BA, O'Hara M, Lochmuller H, Karpati G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord.* 1997 Jul;7(5):325-8.

Howell JM, Fletcher S, O'Hara A, Johnsen RD, Lloyd F, Kakulas BA. Direct dystrophin and reporter gene transfer into dog muscle in vivo. *Muscle Nerve.* 1998a Feb;21(2):159-65.

Howell JM, Lochmuller H, O'Hara A, Fletcher S, Kakulas BA, Massie B, Nalbantoglu J, Karpati G. High-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscle of dystrophic dogs: prolongation of expression with immunosuppression. *Hum Gene Ther.* 1998b Mar 20;9(5):629-34.

Hughes SM, Blau HM Migration of myoblasts across the basal lamina during skeletal muscle development. *Nature* 1990; 345: 350-3.

Huxley HE. Electron microscope studies of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J Molec. Biol.* 1963,7, 281.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* 1992 Feb 20;355(6362):696-702.

Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999 Oct 1;56(1-2):104-32

Irigoyen JP, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y: The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell.Mol.Life Sci.* 56:104-132, 1999. *J Cell Biol.* 1998 Sep 21;142(6):1461-71.

Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):27305-10.

Karinch AM, Zimmer WE, Goodman SR. The identification and sequence of the actin-binding domain of human red blood cell beta-spectrin. *J Biol Chem.* 1990 Jul 15;265(20):11833-40.

Karpati G, Carpenter S, Melmed C, Eisen AA. Experimental Ischemic Myopathy. *J Neurol Science* 1974; 23:129-161.

Karpati G, Carpenter S, Morris GE, Davies KE, Guerin C, Holland P. Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993 Mar;52(2):119-28.

Karpati G, Carpenter S, Prescott S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy 1988; 11: 795-803.

Kawai H, Nishino H, Kusaka K, Naruo T, Tamaki Y, Iwasa M. Experimental glycerol myopathy: a histological study. *Acta neuropathol* 1990; 80: 192-197

Kelly AM. Perisynaptic satellite cells in the developing and mature rat soleus muscle. *Anat Rec* 1978; 190: 891-903.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier J-G, Verdiere-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS: Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev.Biol.* 205:158-170, 1999

Khurana TS, Hoffman EP, Kunkel LM. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 16717-20.

Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tome FM, Fardeau M, Kaplan JC, Kunkel LM. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle *Neuromuscul Disord.* 1991;1(3):185-94.

Khurana TS, Watkins SC, Kunkel LM. The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J Cell Biol.* 1992 Oct;119(2):357-66.

Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, Plow EF, Collen D, Carmeliet P, Tipping PG. Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 1997 Mar 3;185(5):963-8

Koenig M, Kunkel, LM. detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility *J. Biol. Chem* 1990; 265, 4560-4566.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53 : 219-226.

Koga R, Ishiura S, Takemitsu M, Kamakura K, Matsuzaki T, Arahata K, Nonaka I, Sugita H. Immunoblot analysis of dystrophin-related protein (DRP). *Biochim Biophys Acta.* 1993 Jan 22;1180(3):257-61.

Koishi K, Zhang M, McLennan IS, Harris AJ. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev Dyn* 1995;202 (3): 244-54.

Kornegay JN, Tuler SM, Miller DM, Levesque DC. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve.* 1988 Oct;11(10):1056-64.

Kramarcy NR, Vidal A, Froehner SC, Sealock R (1994) Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem* 269:2870-2876.

Law DJ, Allen DL, Tidball JG. Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at the myotendinous junctions following onset of necrosis. *J Cell Sci* 1994 107, 1477-1483.

Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. Experimental skeletal muscle grafts as a model of regeneration. *Aust N Z J Surg* 1997 Jan;67(1):35-9

Lebakken CS, Venzke DP, Hrstka RF, Consolino CM, Faulkner JA, Williamson RA, Campbell KP. Sarcospan-deficient mice maintain normal muscle function. *Mol Cell Biol* 2000 Mar;20(5):1669-77.

Lederfein D, Yaffe D, Nudel U. A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1883-8.

Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, Gates C, Robbins P, Wernig A, Huard J. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 2000 Sep 4;150(5):1085-100.

Lefaucheur JP, Gjata B, Sebille A. Factors inducing mast cell accumulation in skeletal muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996 Jun;22(3):248-55

Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *The anatomical record* 1995; 242: 70-76.

Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D. Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Jul;18(7):1035-45.

Lim LE, Campbell KP *Curr Opin Neurol* 1998 Oct;11(5):443-52. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy.

Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, et al Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12 *Nat Genet* 1995 Nov;11(3):257-65.

Lin S, Gaschen F, Burgunder JM. Utrophin is a regeneration-associated protein transiently present at the sarcolemma of regenerating skeletal muscle fibers in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Aug;57(8):780-90.

Liu LA, Engvall E. Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1999 Dec 31;274(53):38171-6.

Lluis F, Roma J, Suelves M, Parra M, Anierte G, Gallardo E, Illa I, Rodriguez L, Hughes SM, Carmeliet P, Roig M, Munoz-Canoves P. Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood*. 2001 Mar 15;97(6):1703-11.

Loh NY, Ambrose HJ, Guay-Woodford LM, DasGupta S, Nawrotzki RA, Blake DJ, Davies KE. Genomic organization and refined mapping of the mouse beta-dystrobrevin gene. *Mamm Genome*. 1998 Nov;9(11):857-62.

Love D.R., Morris G.E., Ellis J.M., Fairbrother U., Marsden R.F., Bloomfield J.F., Edwards Y.H., Slater C.P., Parry D.J., and Davies K.E. (1991). Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *Proc. natl. Acad. Lumeng Sci. USA* 88:3243-324.

Love, D.R., Hill, D.F., Dickson, G., Spurr, N.K., Byth, B.C., Marsden, R.F., Walsh, F.S., Edwards, Y.H., and Davies, K.E. (1989). An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339:55-58.

Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol*. 1969 May 28;42(1):1-29

Lumeng C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K, Chamberlain JS. Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci*. 1999 Jul;2(7):611-7.

Maecker HT. *FASEB J* 1997 May;11(6):428-42 The tetraspanin superfamily: molecular facilitators.

Maillet M. *Histologia e histofisiologia humanas*. In: Vigot Frères, editor. *Tejido muscular*. 1st ed. Madrid: editorial AC, 1980, Vol. 4, p. 71.

Mariol MC, Segalat L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol* 2001 Oct 30;11(21):1691-4

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibres. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 493-98.

Mayne R, Sanderson R. The extracellular matrix of skeletal muscle. *Collagen Rel Res* 1985; 5: 449-468.

Mazzocca A, Carloni V, Sciammetta S, Cordella C, Pantaleo P, Caldini A, Gentilini P, Pinzani M. Expression of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and their role in hepatic stellate cell motility and wound healing migration. *J Hepatol.* 2002 Sep;37(3):322.

McGeachie JK, Grounds MD, Partridge T, Morgan JE. Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci* 1993; 119: 169-179

McGeachie JK, Grounds MD. Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice: an autoradiographic study. *Cell Tiss Res* 1987; 248: 125-30.

McGeachie JK, Grounds MD. Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice. An autoradiographic study. *Cell Tissue Res.* 1987 Apr;248(1):125-30.

McGeachie JK, Grounds MD. The timing between skeletal muscle myoblast replication and fusion into myotubes, and the stability of regenerated dystrophic myofibres: an autoradiographic study in mdx mice. *J Anat* 1999 Feb;194 (Pt 2):287-95.

McNally EM, Ly CT, Kunkel LM Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhelin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett* 1998 Jan 23;422(1):27-32.

Menke A, H jockusch: Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature* 1991; 349: 69-71

Miyamoto H, Homma M, Hotta H. Molecular cloning of the murine homologue of CD63/ME491 and detection of its strong expression in the kidney and activated macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Apr 6;1217(3):312-6.

Muntoni F, Mateddu A, Marchei F, Clerk A, Serra G. Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci.* 1993 Dec 1;120(1):71-7.

Muñoz-Cánoves P, Miralles F, Baiget M, Félez J: Inhibition of urokinase-type plasminogen activator (uPA) abrogates myogenesis in vitro. *Thrombosis and Haemostasis* 77:526-534, 1997.

Nahirney PC, Dow PR, Ovalle WK. Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice. *Anat Rec* 1997 Mar;247(3):341-9

Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992 Dec;11(13):4825-33

Nguyen TM, Ellis JM, Love DR, Davies KE, Gatter KC, Dickson G, Morris GE. Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol.* 1991 Dec;115(6):1695-700.

Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet.* 1996 Oct;14(2):195-8.

Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, Nigro G, Ventura C, Abbondanza C, Molinari AM, Acampora D, Nishimura M, Hayashizaki Y, Puca GA. Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):601-7.

Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, et al. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*. 1995 Nov 3;270(5237):819-22.

O'Brien KF, Engle EC, Kunkel LM. Analysis of human sarcospan as a candidate gene for CFEOM1. *BMC Genet*. 2001;2(1):3.

Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SD, Leveille CJ, Campbell KP. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*. 1991 Sep;7(3):499-508.

Ono K, Abe J, Kagawa N, Ii K, Hizawa K. Immunohistochemical analysis of myoblast proliferation and differentiation in experimental skeletal muscle regeneration. *Zentralbl Pathol* 1993 Aug;139(3):231-7.

Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle & Nerve* 1991; 14: 515-20.

Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 1998 Apr;21(4):421-38. Review.

Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y, Noguchi S. Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 1995;4 Spec No:1711-6. Review.

Papadimitriou JM, Robertson TA, Mitchell CA, Grounds MD. The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers. *J of Structural Biology* 1990, 103: 124-34

Partridge TA. Models of dystrophinopathy, pathological mechanisms and assessment of therapies. In: Brown SC, Lucy JA, editors. *Dystrophin*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997, p.310-331.

Pastoret C, Sebille A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle & nerve* 1995b; 18: 1147-1154

Pastoret C, Sebille A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 1995a Apr;129(2):97-105.

Peng HB, Ali AA, Daggett DF, Rauvala H, Hassell JR, Smalheiser NR. The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun*. 1998 Sep;5(6):475-89.

Peters MF, Adams ME, Froehner SC (1997) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 138:81-93

Peters MF, Kramarcy NR, Sealock R, Froehner SC (1994) 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *NeuroReport* 5:1577-1580.

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3710-3714.

Pimorady-Esfahani A, Grounds M, McMenamin PG: Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle and Nerve* 20:158-166, 1997

Pons F, Augier N, Leger JO, Robert A, Tome FM, Fardeau M, Voit T, Nicholson LV, Mornet D, Leger JJ. A homologue of dystrophin is expressed at the neuromuscular junctions of normal individuals and DMD patients, and of normal and mdx mice. Immunological evidence. *FEBS Lett*. 1991 Apr 22;282(1):161-5.

Pons F, Robert A, Marini JF, Leger JJ. Does utrophin expression in muscles of mdx mice during postnatal development functionally compensate for dystrophin deficiency? *J Neurol Sci*. 1994 Apr;122(2):162-70.

Porter JD, Rafael JA, Ragusa RJ, Brueckner JK, Trickett JI, Davies KE. The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J Cell Sci.* 1998 Jul;111 (Pt 13):1801-11.

Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 1990 Dec;110(4):1001-20. Review.

Quinlan JG, Cambier D, Lyden S, Dalvi A, Upputuri RK, Gartside P, Michaels SE, Denman D. Regeneration-blocked mdx muscle: in vivo model for testing treatments. *Muscle Nerve.* 1997 Aug;20(8):1016-23.

Quinlan JG, Lyden SP, Cambier DM, Johnson SR, Michaels SE, Denman DL. Radiation inhibition of mdx mouse muscle regeneration: dose and age factors. *Muscle Nerve.* 1995 Feb;18(2):201-6.

Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet.* 1998 May;19(1):79-82.

Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 1995 Mar;72(3):341-7

Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnya O, Campbell KP *J Biol Chem* 1993 Nov 15;268(32):23739-42 Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin).

Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB, et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell.* 1994 Aug 26;78(4):625-33.

Roberts P, McGeachie JK, Grounds MD, Smith ER. Initiation and duration of myogenic precursor cell replication in transplants of intact skeletal muscles: an autoradiographic study in mice. *Anat Rec* 1989; 224:1-6.

Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Determination of the exon structure of the distal portion of the dystrophin gene by vectorette PCR. *Genomics.* 1992 Aug;13(4):942-50.

Roberts RG, Freeman TC, Kendall E, Vetrie DL, Dixon AK, Shaw-Smith C, Bone Q, Bobrow M. Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet* 1996 Jun;13(2):223-6.

Robertson TA, Grounds MD, Mitchell CA, Papadimitriou JM Fusion between myogenic cells in vivo: an ultrastructural study in regenerating murine skeletal muscle. *J Struct Biol* 1990 Oct-Dec;105(1-3):170-82.

Robertson TA, Maley MA, Grounds MD, Papadimitriou JM. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res.* 1993 Aug;207(2):321-31.

Roig M, Gratacos M, Fargas A, Roma J. Role of the extracellular matrix in X-chromosome-linked muscular dystrophy: immunohistochemical study. *Rev Neurol.* 1998 Jun; 26(154): 895-904.

Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med.* 1996 Mar;2(3):287-92.

Ruegg MA, Bixby JL. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci.* 1998 Jan;21(1):22-7. Review.

Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathology* 1996; 6: 25-35.

Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K *J Biol Chem* 1999 Mar 19;274(12):8240-6 Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann cells.

Sanes JR. The extracellular matrix. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1994, p.242-60.

Schatzberg SJ, Olby NJ, Breen M, Anderson LV, Langford CF, Dickens HF, Wilton SD, Zeiss CJ, Binns MM, Kornegay JN, Morris GE, Sharp NJ. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. *Neuromuscul Disord*. 1999 Jul;9(5):289-95.

Schmalbruch H, Hellhammer U. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec* 1977; 189: 169-75.

Schmalbruch H. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue cell* 1976; 8, (4): 673-692.

Schultz E, Jaryszack DL, Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle and Nerve* 1985; 8: 217- 22.

Schultz E, McCormick K. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994;123:213-57.

Schultz E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 1996 Apr 10;175(1):84-94.

Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, et al. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*. 1992 May;13(1):115-21.

Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*. 2001 Jun;30(3):677-87.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; 244: 1578-1580.

Sitrin RG, Shollenberger SB, Strieter RM, Gyetko MR. Endogenously produced urokinase amplifies tumor necrosis factor-alpha secretion by THP-1 mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 1996 Feb;59(2):302-11

Snow MH. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tiss Res* 1978; 186 (3): 535-540.

Stauber WT, Knack KK, Miller GR, Grimmet JG. Fibrosis and intercellular collagen connections from four weeks on muscle strains. *Muscle & nerve* 1996; 19: 423-30.

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich J, Sladky JT, Kelly AM. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1991; 352: 536-8.

Stoward PJ, Christie KN, Thomson C. Dipeptidyl peptidases in the soleus muscle of the rat before and after treatment with 5-Hydroxytryptamina. *Histochemistry* 1988; 89: 11-24.

Straub V, Campbell KP. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*. 1997 Apr;10(2):168-75. Review.

Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP. *J Biol Chem* 1999 Sep 24;274(39):27989-96. Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex.

Sunada Y, Bernier SM, Kozac CA, Yamada Y, Campbell KP *J Biol Chem* 1994 May 13;269(19):13729-32 Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus.

Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol*. 1995 Feb;128(3):373-81.

Szent-Gyorgyi A. Chemical physiology of contraction in body and heart muscle. Academic Press NY. 1953.

Talts JF, Andac Z, Gohring W, Brancaccio A, Timpl R. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J*. 1999 Feb 15;18(4):863-70.

Tamaki T, Akatsuka A. Appearance of complex branched fibers following repetitive muscle trauma in normal rat skeletal muscle. *Anat Rec* 1994; 240: 217-224.

Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1986;69(1-2):91-5.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 1998 Feb 1;194(1):114-28

Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1995 Jul;27(7):1022-32

Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, Edwards YH, Davies KE. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*. 1992; 360: 591-593.

Tonomura Y, Watanabe S, Morales M. Conformational changes in the molecular control of muscle contraction. *Biochemistry*. 1969 May;8(5):2171-6.

Torrente Y, Tremblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Sironi M, Fortunato F, El Fahime M, D'Angelo MG, Caron NJ, Constantin G, Paulin D, Scarlato G, Bresolin N. Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* 2001 Jan 22;152(2):335-48

Torres LFB, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. *Brain* 1987; 110: 269-299.

Turner RP, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 1988; 335: 735-738.

Uchino M, Teramoto H, Naoe H, Miike T, Yoshioka K, Ando M. Dystrophin and dystrophin-related protein in the central nervous system of normal controls and Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1994;87(2):129-34.

Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 1991 Oct;88(4):1067-72

Vater R, Young C, Anderson LVB, Lindsay S, Blake DJ, Davies KE, Zuellig R, Slater CR. Utrophin mRNA Expression in Muscle Is Not Restricted to the Neuromuscular Junction. *Mol Cell Neurosci* 1998 Apr;10(5/6):229-42

Wagner KR, Cohen JB, Haganir RL. The 87 KDa postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. *Neuron* 1993; 10: 511-522.

Wakeford S, Watt DJ, Partridge TA. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofibre loss in DMD. *Muscle & nerve* 1991; 14: 42-50

Waldeyer W. Ueber die Veranderungen der quergestreiften Muskeln bei der Entzundung und dem Typhusprozess, sowie uber die Regeneration derselben nach Substanzdefecten. *Archiv fur Pathologische Anatomie* 1865; 34: 473-98

Weiss SW, Faulkner JA. Revascularization of skeletal muscle transplanted into the hamster cheek pouch: electron microscopy. *Microvasc Res* 1983 Jul;26(1):65-73

Weller B, Karpati G, Carpenter S. Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions. *J Neurol Sci* 1990; 100: 9-13.

- Wilkinson JM, Perry SV, Cole HA, Trayer IP. The regulatory proteins of the myofibril. Separation and biological activity of the components of inhibitory-factor preparations. *Biochem J.* 1972 Mar;127(1):215-28.
- Wilson LA, Cooper BJ, Dux L, Dubowitz V, Sewry CA. Expression of utrophin (dystrophin-related protein) during regeneration and maturation of skeletal muscle in canine X-linked muscular dystrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994 Aug;20(4):359-67.
- Winand NJ, Edwards M, Pradhan D, Berian CA, Cooper BJ. Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1994 Sep-Nov;4(5-6):433-45.
- Winder SJ, Gibson TJ, Kendrick-Jones J. Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett.* 1995 Aug 1;369(1):27-33. Review.
- Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994 Dec;15(12):588-94.
- Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, Kamijo K, Nabeshima Y-I, Fujisawa-Sehara A: A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature (London)* 377:652-656, 1995.
- Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP (1995) Identification of syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* 270:4975-4978.
- Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo).* 1990 Nov;108(5):748-52.
- Yoshida M, Suzuki A, Yamamoto H, Noguchi S, Mizuno Y, Ozawa E. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem.* 1994 Jun 15;222(3):1055-61.
- Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Beauchamp JR, Partridge TA. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 2002 Nov 15;281(1):39-49.