



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALEX DIAS ASSIS

EFEITOS PROTETORES DA PREGABALINA NO SISTEMA  
NERVOSO PERIFÉRICO E SISTEMA MUSCULAR ESQUELÉTICO DE  
CAMUNDONGOS MDX

PROTECTIVE EFFECTS OF PREGABALIN ON THE PERIPHERAL NERVOUS  
SYSTEM AND SKELETAL MUSCLE OF MDX MICE

**CAMPINAS**

**2021**

**ALEX DIAS ASSIS**  
**EFEITOS PROTETORES DA PREGABALINA NO SISTEMA**  
**NERVOSO PERIFÉRICO E SISTEMA MUSCULAR ESQUELÉTICO DE**  
**CAMUNDONGOS MDX**

PROTECTIVE EFFECTS OF PREGABALIN ON THE PERIPHERAL NERVOUS  
SYSTEM AND SKELETAL MUSCLE OF MDX MICE

*Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,  
área de concentração de Anatomia.*

*Thesis presented to the Institute of  
Biology of the State University of  
Campinas as part of the requirements  
for obtaining the title of Doctor in  
Cellular and Structural Biology, with  
focus on Anatomy.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO ALEX DIAS ASSIS E ORIENTADO PELO  
PROF. DR. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES  
OLIVEIRA.

*Orientador: PROF. DR. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES OLIVEIRA*

**CAMPINAS**  
**2021**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

As76e Assis, Alex Dias, 1981-  
Efeitos protetores da pregabalina no sistema nervoso periférico e sistema muscular esquelético de camundongos mdx / Alex Dias Assis. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Pregabalina. 2. Neuroproteção. 3. Nervos periféricos. 4. Sistema musculoesquelético. 5. Camundongos endogâmicos mdx. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Protective effects of pregabalin on the peripheral nervous system and skeletal muscle of mdx mice

**Palavras-chave em inglês:**

Pregabalin

Neuroprotection

Nerves, Peripheral

Musculoskeletal system

Mice, Inbred mdx

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Valéria Paula Sassoli Fazan

Rogério Martins Amorim

Thiago Luiz de Russo

Roger Frigério Castilho

**Data de defesa:** 31-08-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5200-6920>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2896374107708248>

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. *Alexandre Leite Rodrigues Oliveira*

Prof. Dra. *Valéria Paula Sassoli Fazan*

Prof. Dr. *Rogério Martins Amorim*

Prof. Dr. *Thiago Luiz de Russo*

Prof. Dr. *Roger Frigério Castilho*

*A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade;*

## DEDICATÓRIA

Zambi – Umbanda.

Filha Emanuelle.

A mim, Alex.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Renata G. Zanon, pela indicação ao meu orientador. Ao Prof. Dr. Alexandre L.R. Oliveira, agradeço pelo suporte, ensinamentos teóricos/práticos, amizade e cuidado todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Gustavo F. Simões, por confiar em minha dedicação ao projeto de pesquisa e pelas orientações e auxílios práticos.

A todos os camundongos das linhagens C57BL/10 e MDX, meu respeito. Sem vocês, não seria possível a realização da presente tese.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Regeneração Nervosa - LRN, os que já passaram, Pedro e Júlio e ao Guilherme que ainda está aqui. Obrigado, Luciana pela paciência e dedicação nos ensinamentos teóricos/práticos, Raffaella e Gabriela pelo apoio profissional.

Obrigado especial ao meu amigo, irmão mais novo, Bruno Henrique. Companheiro profissional e pessoal, por confiar em meu caráter e ter me mostrado que a vida é bem maior que a bolha que vivemos e almejamos. Tmj.

À Tanacy – Tay para os amigos ilumina a todos com sua energia. Aos técnicos, Walter, Roberto e Paulo e toda equipe de manutenção interna e externa do IB. Obrigado pelo apoio. Aos professores da Biologia Estrutural e Funcional.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Especialmente à coordenadora Profa. Dra. Elaine.

Ao restaurante universitário (Bandejão), parabéns! Já estou com saudades. E ao transporte gratuito de qualidade que tanto me ajudou, obrigado.

À minha progenitora Francisca (Bibi para os filhos e netos), mamãe solo, guerreira que cuidou de 4 trabalhos praticamente sozinha. Não só te amo como tenho orgulho de ser seu filho, por você ser um exemplo. Obrigado por estar sempre comigo, mesmo longe fisicamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da bolsa de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX I – números do processo 88882.329644). Obrigado, Brasil! Por me ajudar a realizar esse sonho.

“Felicidade é quando o que você pensa, o que você diz e o que você faz estão em harmonia”

Gandhi

## Resumo

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética ligada ao cromossomo X induzida por mutações no gene da distrofina. A distrofina anormal leva à degeneração das fibras musculares, resultando em alterações retrógradas que afetam o sistema nervoso. Assim, drogas neuroprotetoras, como a pregabalina (PGB), podem melhorar a função motora por meio da modulação das sinapses excitatórias, juntamente com efeitos antiapoptóticos e antiinflamatórios. O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da PGB na preservação axonal e sua capacidade de sincronização da regeneração axônio/fibra muscular, após lesão de nervos periféricos distróficos e não distróficos, permitindo melhorias nas respostas motoras em camundongos MDX. Para isso, camundongos MDX, modelo para DMD e C57BL/10 (linhagem controle), divididos em três experimentos, na parte I sem lesão nervosa periférica e partes II e III com lesão unilateral de nervos isquiáticos por esmagamento na sexta semana, foram tratados assim que completaram cinco semanas de vida, com PGB (30 mg/kg/dia, i.p.) ou veículo, durante 28 dias consecutivos. Período de pico da degeneração muscular com aumento da mionecrose, regeneração de miofibrilas e fraqueza muscular. Os camundongos foram sacrificados, na nona semana, devido ao período crítico de mionecrose, inflamação crônica, regeneração de fibras e déficit funcional. Os nervos isquiáticos ipsi e contralaterais à lesão foram processados para imunohistoquímica e qRT-PCR, avaliando a expressão de proteínas e transcritos gênicos relacionados à atividade neuronal e das células de Schwann. A intumescência lombar de animais sem lesão, também foram processadas para qRT-PCR, servindo de referencial para o estudo da expressão de fatores neurotróficos e citocinas pró e anti-inflamatórias. Músculos tibiais craniais foram dissecados para avaliação das junções neuromusculares pelo uso de  $\alpha$ -bungarotoxina. Na morfometria, nervos isquiáticos foram analisados em seções transversais semifinas. A recuperação da função motora foi monitorada durante todo o tratamento, por meio do teste de marcha espontânea (sistema Catwalk) e do teste de locomoção forçada (Rotarod). Os resultados mostram que o tratamento com PGB, reduziu, da quinta à nona semana, na linhagem MDX, os efeitos retrógrados da degeneração/regeneração muscular sobre o sistema nervoso. Tal fato foi confirmado após lesão nervosa periférica, mostrando melhor adaptação e resposta dos neurônios e glia para regeneração axonal rápida, com direcionamento eficiente do sítio alvo em fibras musculares normais e/ou regeneradas. Não observamos efeitos negativos do tratamento, que modulou positivamente a expressão de proteínas pró-regenerativas nos neurônios e células de Schwann. A avaliação morfométrica se mostrou alinhada com a melhor morfologia axonal e preservação de placas motoras, resultando na otimização da função e coordenação motora de animais distróficos. Acreditamos que o tratamento com PGB melhorou o equilíbrio entre as entradas excitatórias e inibitórias para os motoneurônios espinais, aumentando o controle motor. Além disso, aumentou a homeostase do nervo periférico, preservando as células de Schwann. De maneira geral, os presentes resultados indicam que a pregabalina é eficaz na proteção do SNP durante o desenvolvimento da DMD, melhorando a coordenação motora, o que pode, por sua vez, ser traduzido para a clínica.

## Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked genetic disorder induced by mutations in the dystrophin gene. Abnormal dystrophin leads to degeneration of muscle fibers, resulting in retrograde changes that affect the nervous system. Thus, neuroprotective drugs such as pregabalin (PGB) can improve motor function by modulating excitatory synapses, together with anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. The present work aimed to study the effects of PGB on axonal preservation and its capacity to synchronize axon/muscle fiber regeneration after damage to dystrophic and non-dystrophic peripheral nerves, allowing improvements in motor responses in MDX mice. For this purpose, MDX mice, model for DMD and C57BL/10 (control strain), divided into three experiments, in part I without peripheral nerve damage and parts II and III with unilateral crush injury in the sciatic nerves in the sixth week, were treated like this who completed five weeks of life, with PGB (30 mg/kg/day, ip) or vehicle, for 28 consecutive days. Peak period of muscle degeneration with increased myonecrosis, myofibril regeneration and muscle weakness. The mice were sacrificed, in the ninth week, due to the critical period of myonecrosis, chronic inflammation, fiber regeneration and functional deficit. The sciatic nerves ipsi and contralateral to the lesion were processed for immunohistochemistry and qRT-PCR, evaluating the expression of proteins and gene transcripts related to neuronal and Schwann cell activity. Lumbar tumescence of uninjured animals was also processed for qRT-PCR, serving as a reference for studying the expression of neurotrophic factors and pro and anti-inflammatory cytokines. The anterior tibialis muscles were dissected out for evaluation of neuromuscular junctions using  $\alpha$ -bungarotoxin. For the morphometry, sciatic nerves were analyzed in semi-thin cross sections. The recovery of motor function was monitored throughout the treatment, through the spontaneous gait test (Catwalk system) and the forced locomotion test (Rotarod). The results show that treatment with PGB reduced, from the fifth to the ninth week, in the MDX strain, the retrograde effects of muscle degeneration/regeneration on the nervous system. This fact was confirmed after peripheral nerve injury, showing better adaptation and response of neurons and glia for axonal regeneration, with efficient reinnervation of muscle fibers. We did not observe negative effects of PGB treatment, which positively modulated the expression of pro-regenerative proteins in neurons and Schwann cells. The morphometric evaluation is in line with the best axonal morphology and preservation of motor endplates, resulting in the optimization of motor function in dystrophic animals. We believe that treatment with PGB improved the balance between excitatory and inhibitory inputs to spinal motoneurons, increasing motor control. In addition, PGB increased peripheral nerve homeostasis, preserving Schwann cells. Overall, the present results indicate that pregabalin is effective in protecting the SNP during the development of DMD, improving motor coordination, which can, in turn, be translated to the clinic.

## Lista de abreviaturas

**ANVISA** - agência nacional de vigilância sanitária  
**AchRs** - receptores de acetilcolina  
**AT** - azul de toluidina  
**BSA** - albumina de soro bovino  
**BDNF** - fator neurotrófico derivado do cérebro  
**CEMIB** - centro multidisciplinar para investigação biológica  
**CEUA** - comissão de ética no uso de animais  
**COL** - colágeno  
**CS** - células de *Schwann*  
**CSNM** - células de Schwann não mielinizantes  
**CSM** - células de Schwann mielinizantes  
**DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenilindol  
**DMD** - distrofia muscular de duchenne  
**DW** - degeneração walleriana  
**EAE** - encefalomielite autoimune experimental  
**EPL** - comprimento da impressão experimental  
**ETS** - propagação experimental do dedo do pé  
**EGF** - fator de crescimento epidermal  
**EM** - espessura da mielina  
**FN** - fibronectina  
**GAM** - glicoproteína associada à mielina  
**GABA** - ácido gama-aminobutírico  
**Gapdh** - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
**Gap43** - proteína 43 associada ao crescimento  
**GFAP** - proteína fibrilar ácida glial  
**Hprt1** - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase  
**IB** - Instituto de Biologia  
**SFI** - índice funcional do nervo isquiático  
**IFN- $\gamma$**  - interferon gama  
**JNM** - junção neuromuscular  
**LM** - laminina

**M** - terminais pré-sinápticos do tipo M

**MBP** - proteína básica de mielina

**MDX** - distrofia muscular ligada ao cromossomo X

**MET** - microscopia eletrônica de transmissão

**MN** - motoneurônio

**MPL** - músculo plantar longo

**MS** - músculo sóleo

**MTC** - músculo tibial cranial

**NGF** - fator neurotrófico de crescimento do nervo

**NPL** - comprimento normal de impressão

**NTS** - propagação normal do dedo do pé

**p75NGFR** - receptor de baixa afinidade para fator de crescimento do nervo

**PB** - tampão fosfato

**PBS** - salina tamponada em tampão fosfato

**PGB** - pregabalina

**PMP** - proteína mielina periférica

**PMP22** - proteína mielínica periférica 22

**PNS** - sistema nervoso periférico

**qRT-PCR** - reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa

**RPM** - rotações por minuto

**RNA<sub>m</sub>** - ácido ribonucléico mensageiro

**S** - terminais pré-sinápticos do tipo S

**SFI** - índice de função ciática

**S100 $\beta$**  - proteína B de ligação ao cálcio

**SN** - sistema nervoso

**SNC** - sistema nervoso central

**SNP** - sistema nervoso periférico

**TBS-T** - solução salina tamponada de tris com tween

**Tgf $\beta$ 1** - fator transformador de crescimento beta 1

**Tnfa** - fator de necrose tumoral alfa

**UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas

## Lista de figuras

- Figura 1** - Imunoistoquímica anti-neurofilamento de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando a regulação positiva da marcação após a administração de PGB. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . .....37
- Figura 2** - Imunoistoquímica anti-laminina de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando a regulação positiva da marcação após a administração de PGB em camundongos MDX. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . ...39
- Figura 3** - Imunoistoquímica anti-S100 de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando a regulação negativa da expressão, após a administração de PGB. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . .....41
- Figura 4** - Imunoistoquímica de p75NTR (receptor de baixa afinidade pan-neurotrofina) de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando regulação negativa de marcação após administração de PGB em camundongos MDX. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*\*  $p < 0,001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . .....43
- Figura 5** - Receptores pós-sinápticos de acetilcolina (coloração com  $\alpha$ -bungarotoxina) nas placas terminais motoras dos músculos tibiais craniais de camundongos C57BL/10 e MDX. A-D - Fotos representativas de C57BL/10 e MDX tratadas com veículo e PGB. E – Número reduzido de junções neuromusculares na linhagem MDX. A PGB aumentou o número de placas terminais encontradas em camundongos C57BL/10 e melhorou a morfologia das placas terminais motoras em camundongos MDX. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 25 $\mu\text{m}$ . .....45
- Figura 6** - Quantificação relativa da expressão de transcritos dos genes de TNF $\alpha$  (A); IFN $\gamma$  (B); TGF $\beta$ 1 (C); BDNF (D) e GAP43 (D) da medula espinhal lombar dos

camundongos sem lesão nervosa periférica, após 28 dias de tratamento com PGB. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. Média ± SEM.....	46
<b>Figura 7</b> - Quantificação relativa da expressão de transcritos gênicos da proteína básica da mielina MBP (A), S100 (B) e p75NTR (C) no nervo isquiático íntegro, após 28 dias de tratamento com PGB. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. Média ± SEM. 47	
<b>Figura 8</b> - Locomoção forçada demonstrando o déficit motor na linhagem distrófica MDX. Observe a adaptação funcional em ratos MDX a partir do 21º dia de teste. C57BL/10 - n = 5 por grupo, MDX - n = 9 por grupo. */# p <0,05; ****/##### p <0,0001. Média ± SEM.....	49
<b>Figura 9</b> - Índice funcional isquiático (SFI) em camundongos C57BL/10 e MDX. Observe a melhoria geral dos camundongos MDX tratados com PGB em comparação com o veículo. N = 5 por grupo. * p <0,05; ** p <0,01. Média ± SEM. ..	50
<b>Figura 10</b> - Imunoistoquímica anti-neurofilamento de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando a regulação positiva da marcação após a administração de PGB. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. I - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. * p <0,05; ** p <0,01; **** p <0,0001. Média ± SEM. Barra de escala: 50 µm. ....	52
<b>Figura 11</b> - Imunoistoquímica anti-laminina de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando a regulação positiva da marcação após administração de PGB em camundongos MDX, B e F - MDX, contralateral. D e H - MDX, Ipsilateral. I - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. ** p <0,01; **** p <0,0001. Média ± SEM. Barra de escala: 50 µm.....	54
<b>Figura 12</b> - Imunoistoquímica anti-S100 de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando a regulação negativa da expressão, após administração de PGB. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. I - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. ** p <0,01; **** p <0,0001. Média ± SEM. Barra de escala: 50 µm.....	56
<b>Figura 13</b> - Imunoistoquímica de p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas) de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando regulação negativa de marcação após administração de	

PGB em camundongos C57BL/10 e MDX. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*p <0,05; \*\*\*\* p <0,0001. Média ± SEM. Barra de escala: 50 µm. ....58

**Figura 14** - Receptores pós-sinápticos de acetilcolina (coloração com  $\alpha$ -bungarotoxina) nas placas terminais motoras dos músculos tibiais craniais de camundongos C57BL/10 e MDX, três semanas após o esmagamento. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. I - Número reduzido de junções neuromusculares na linhagem MDX tratada veículo. Porém a PGB aumentou o número de placas terminais encontradas em camundongos C57BL/10 e MDX melhorando a morfologia das placas terminais motoras destes camundongos distróficos. \* p <0,05; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001. Média ± SEM. Barra de escala: 25µm.....60

**Figura 15** - Quantificação relativa da expressão de transcritos gênicos da proteína básica da mielina Mbp (A), S100 (B) e P75<sup>NTR</sup> (C) no nervo isquiático, três semanas após o esmagamento e tratamento com PGB, iniciando uma semana antes da lesão. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001. Média ± SEM. ....61

**Figura 16** - Locomoção forçada demonstrando o déficit motor na linhagem distrófica MDX, aumentada após esmagamento do nervo isquiático. Observe a melhora funcional com tratamento PGB, no 17º dia de teste e subsequente adaptação dos camundongos MDX. C57BL/10 - n = 5 por grupo, MDX - n = 9 por grupo. \*/# p <0,05; \*\*/## p <0,01; \*\*\*p <0,001; \*\*\*\*/#### p <0,0001. Média ± SEM.....63

**Figura 17** - Índice funcional isquiático (SFI) em camundongos C57BL/10 e MDX. Observe a melhora geral dos camundongos MDX tratados com PGB após lesão nervosa periférica, na sexta semana de vida. Principalmente na 7ª semana de vida em comparação com o veículo (\*Veículo e # PGB). N = 5 por grupo. # p <0,05; ## p <0,01; \*\*\*p <0,001. Média ± SEM.....65

**Figura 18** – Vistas ampliadas e panorâmicas de secções transversais dos nervos de camundongos C57BL/10 e MDX, contralaterais (A e B, veículos); (E e F, PGB) e regenerados, ipsilaterais (C e D, veículos) e (G e H, PGB). Barra de escala: 100µm e 25µm. Gráficos representando em contralaterais (I) e ipsilaterais (J) a área total dos nervos em µm<sup>2</sup>. E gráficos contralaterais (K) e ipsilaterais (L), apresentando estimativa do número de fibras mielínicas em 100.000 µm<sup>2</sup>. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\*\* p <0,0001. Média ± SEM.....67

**Figura 19** - Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina de fibras nervosas dos nervos contralateral (A,C,E,G) e ipsilateral (B,D,F,H) em diferentes grupos experimentais. Média  $\pm$  SEM.....69

**Figura 20** - Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios e razão "g" (razão do diâmetro axonal pelo diâmetro da fibra) de cortes transversais dos nervos contralateral (A,C,E,G) e ipsilateral (B,D,F,H) em diferentes grupos experimentais. Observamos em (F e H), entre 0,2 - 0,6 de razão g, MDX tratado com PGB, demonstrando ausência da proeminência neste intervalo. ....71

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> Grupos experimentais da pesquisa, <b>parte I</b> (sem lesão) e <b>partes II e III</b> (com lesão), dose de 30mg/Kg/dia de PGB e tempos de sobrevivência durante o tratamento. ....	28
<b>Tabela 2</b> Anticorpos primários usados ao longo do estudo, partes I e II.....	31
<b>Tabela 3</b> Ensaios TaqMan usados na técnica RT-qPCR.....	32
<b>Tabela 4</b> Expressão relativa de transcritos gênicos na medula espinhal e nervo isquiático após o tratamento com PGB e lesão nervosa periférica. ....	48
<b>Tabela 5</b> Dados do teste em Rotarod após 28 dias de tratamento com PGB.....	49
<b>Tabela 6</b> Índice funcional do isquiático - SFI durante os 28 dias de tratamento com PGB.....	51
<b>Tabela 7</b> Expressão relativa de transcritos gênicos no nervo isquiático após o tratamento com PGB e lesão nervosa periférica. ....	62
<b>Tabela 8</b> - Dados do teste do Rotarod, 21 dias após lesão e 28 dias de tratamento com PGB em camundongos controles e distróficos. ....	63
<b>Tabela 9</b> - Índice funcional do isquiático - SFI após 21 dias de lesão e durante os 28 dias de tratamento com PGB. ....	65

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS .....	vi
Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Lista de figuras .....	xii
Lista de tabelas.....	xvi
<b>1. Introdução .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Distrofia muscular de Duchenne.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Sistema nervoso periférico de camundongos MDX.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Lesão mecânica no Sistema Nervoso Periférico de camundongos MDX .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4. Reparação do nervo periférico e matriz extracelular .....</b>	<b>21</b>
<b>1.5. Funções das Células de Schwann no processo regenerativo .....</b>	<b>22</b>
<b>1.6. Pregabalina (PGB).....</b>	<b>24</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Animais .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Tratamento medicamentoso, partes I, II e III.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Lesão do nervo isquiático, partes II e III. ....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Coleta e preparação de tecidos, partes I, II e III. ....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Imunoistoquímica, partes I e II. ....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 PCR em tempo real (RT-qPCR) partes I e II .....</b>	<b>31</b>
3.6.1 Medula Espinhal parte I .....	31
3.6.2 Nervo Isquiático partes I e II .....	32
<b>3.7 Morfometria, parte III.....</b>	<b>32</b>
3.7.1 Análise das secções semifinas .....	33
<b>3.8 Testes da função motora, partes I e II.....</b>	<b>34</b>
<b>3.9 Testes de equilíbrio e coordenação motora, partes I e II.....</b>	<b>34</b>
<b>3.10 Análises estatísticas, partes I, II e III.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>36</b>
<b>Parte I - Pregabalina protege axônios e placas motoras do músculo tibial cranial de camundongos MDX.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Pregabalina influencia a reestruturação do nervo periférico de camundongos distróficos.....</b>	<b>36</b>

4.2	Imunomodulação da medula espinhal retrógrada de citocinas por tratamento com PGB.....	46
4.3	PGB modifica os níveis basais dos transcritos gênicos em células de Schwanns no nervo isquiático .....	47
4.4	PGB melhora locomoção forçada em camundongos MDX .....	48
4.5	O tratamento com PGB melhora o desempenho da marcha espontânea em camundongos MDX.....	50
5.	Resultados .....	51
	Parte II - Pregabalina sincroniza a regeneração axonal após lesão do nervo isquiático do músculo tibial cranial de camundongos MDX.....	51
5.1	Pregabalina influência e padroniza a regeneração axonal do nervo periférico de camundongos MDX.....	51
5.2	PGB modificam níveis basais dos transcritos gênicos de células de Schwann no nervo isquiático em regeneração após lesão periférica.....	61
5.3	Tratamentos com PGB pode ser associado ao crescimento axonal após lesão e melhora o desempenho da marcha em camundongos MDX.....	62
5.4	Tratamentos com PGB pode ser associado a fatores neurais pró-regenerativos e induzem melhora no desempenho da marcha espontânea em camundongos MDX.	64
6.	Resultados .....	66
	Parte III - Pregabalina melhora a mielinização, otimizando a regeneração axonal após lesão do nervo isquiático, influenciando positivamente o músculo tibial cranial em camundongos MDX.....	66
6.1	Pregabalina influencia mielinização axonal no nervo periférico de camundongos MDX e controle.....	66
6.2	Análises morfométricas da espessura da bainha de mielina dos axônios .....	68
6.3	Análises morfométricas da frequência geral da espessura da mielina.....	70
7.	Discussão.....	72
8.	Conclusão .....	83
9.	Referências .....	84
10.	Apêndice - Publicação do artigo na revista Molecular and Cellular Neuroscience .....	101
11.	Anexo.....	114
11.1.	Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais - Instituto de Biologia - CEUA / IB / UNICAMP .....	114
12.	Declaração de direitos autorais .....	116

## **1. Introdução**

### **1.1. Distrofia muscular de Duchenne**

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética de caráter recessivo, em que o cromossomo X sofre mutações espontâneas gerando um defeito na codificação do gene responsável pela produção da distrofina (1-4). Essa proteína tem papel fundamental durante as contrações musculares, o que mantém a integridade das fibras. Sua ausência é caracterizada por degeneração e fraqueza muscular progressiva, causada pela mionecrose, que também ocorre nas fibras musculares de camundongos MDX (um modelo animal para a distrofia muscular de Duchenne) utilizado em nosso laboratório. A degeneração das fibras é frequentemente precedida por um colapso e descolamento da lâmina basal do sarcolema, associado a um extenso processo inflamatório (5, 6). Portanto, a maioria dos estudos sobre DMD é direcionada exclusivamente ao sistema muscular.

Ray e colaboradores (4), investigaram os ciclos de degeneração / regeneração muscular, de 2 a 10 semanas de vida, em camundongos MDX. Seus resultados mostraram que, já com 2 semanas de vida, as alterações eram em pequenos focos dispersos de miofibrilas em degeneração, circundados por infiltrados celulares, fibras musculares “pálidas” e pequenos grupos de fibras musculares regeneradas com núcleo celular central. Esses achados foram considerados evidências de que, entre 2 e 5 semanas de vida, ocorrem degeneração e subsequente regeneração muscular em camundongos MDX, havendo aumento da necrose, regeneração miofibrilar e fraqueza muscular acentuada, tornando a fibra suscetível a lesões induzidas por contração (7-10). Nesse contexto, os períodos críticos ocorrem de 6 a 8 semanas de vida, nos membros pélvicos de camundongos MDX. Assim, ocorrem alterações musculares, com presença de núcleos centrais, incluindo mionúcleos apoptóticos, mobilizando células satélites com maturação incompleta. Durante esse período há prevalência de déficit funcional atribuído à redução da taxa metabólica (11-14).

### **1.2. Sistema nervoso periférico de camundongos MDX**

Os processos de degeneração / regeneração muscular que ocorrem em camundongos MDX, promovem alterações retrógradas nas junções

neuromusculares e sistema nervoso periférico, como aumento das proteínas S100 $\beta$  aos 8 e 13 meses de idade, induzindo alterações neurodegenerativas (15, 16). Estas afetam especificamente os motoneurônios alfa do sistema nervoso central, levando ao aumento da astrogliose, redução significativa da expressão de sinaptofisina e retrações parciais e/ou totais dos terminais pré-sinápticos, principalmente do tipo S (excitatório / glutamatérgico), indicando uma redução na atividade sináptica em animais distróficos com nove meses de idade (17).

Todos os eventos mencionados acima, representam que os déficits motores e comportamentais em pacientes com DMD e camundongos MDX, provavelmente não se limitam às fibras musculares. Assim, sugerimos que tais desfechos patológicos, ocorram de forma comutativa com o sistema nervoso central e periférico, pois os músculos são dependentes da inervação para manter-se funcionalmente ativos. E fibras musculares em degeneração, resultam em fragmentação da placa neuromuscular, induzindo desnervação e, por consequência, falhas de neurotransmissão (5, 18-20). Tal perda de inervação provoca alterações no corpo celular dos neurônios, denominada cromatólise, que incluem edema do corpo celular, retração de terminações sinápticas, deslocamento do núcleo para a periferia da célula e a dissolução da substância de Nissl, ocorrendo assim, remodelamento da glia adjacente no microambiente periférico(21-23).

Todas essas alterações são interpretadas como remodelamento do estado funcional dos neurônios lesados, passando de um modo de transmissão sináptica para um modo de reinervação (brotamento), sugerindo que também possa ocorrer em camundongos MDX, devido as alterações nas JNMs, em que os neurônios direcionam seu metabolismo para a recuperação da lesão retrógrada (24-26).

### **1.3. Lesão mecânica no Sistema Nervoso Periférico de camundongos MDX**

A fim de melhor compreendermos os mecanismos e limitações da regeneração do SNP de camundongos MDX, estudamos modelos de lesão nervosa periférica, que foram propostos e pesquisados por diversos autores e que possam ser aplicados em nosso projeto. Seddon & Sunderland,

descreveram tipos de lesão nervosa. Neuropraxia ou lesão de grau I a mais leve que bloqueia a condução dos impulsos nervosos, mas sem lesionar o perineuro e axônio, recuperando em horas, dias ou meses. Axonotmese que subdividem nos graus II, III e IV. Grau II, que lesiona o axônio, com preservação da lâmina basal e endoneuro. Grau III, lesão da fibra nervosa (axônio e endoneuro) com prevalência de déficits funcionais. E grau IV, referindo-se a perda de continuidade axonal, do endoneuro e perineuro, visto em lesão por esmagamento e aplicada em nosso projeto. Tornando-se uma técnica bastante utilizada, em razão da redução de danos, devido ao incentivo da regeneração axonal espontânea e direcionada, através, da manutenção da integridade do tecido conjuntivo do nervo (epineuro). Diferentemente, da neurotmese ou lesões de grau V, que relata o tipo de lesão mais grave, com ruptura de todo o nervo e tecido conjuntivo com comprometimento sensorial e funcional (27-30).

Nas lesões em que há perda da continuidade axonal, diversas modificações celulares e moleculares se desenvolvem imediatamente após a lesão com a finalidade de remover o segmento danificado e promover a regeneração axonal e assim, a recuperação do nervo lesionado (31). No segmento distal à lesão, os axônios desconectados dos seus respectivos corpos celulares, juntamente com a bainha de mielina, iniciam um processo inflamatório denominada degeneração Walleriana (DW), que atua sob dois mecanismos distintos. Primeiro, axônios desconectados do soma, executam desmontagem por dissolução do seu próprio citoesqueleto, devido à cascata de sinalização e fragmentação da bainha de mielina. Segundo células de Schwann (CS) destacadas do axônio e macrófagos no microambiente lesado, fagocitam os detritos resultantes (32-35).

#### **1.4. Reparação do nervo periférico e matriz extracelular**

Eventos como reorganização do espaço endoneural, mudanças nos componentes da matriz extracelular e elevação da produção de neurotrofinas e citocinas na DW (36, 37), atuam para criar um microambiente pró-regenerativo no coto distal ao local da lesão, necessários para estimular a regeneração axonal nos cotos proximais. Por meio de brotos axonais, que terminalmente, formam cones de crescimento, para exploração do microambiente através de

movimentos constantes a fim de promover o direcionamento preciso da regeneração axonal em direção ao órgão-alvo (34, 38, 39). Cones de crescimento, estruturados por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (neurofilamentos), mantêm o calibre axonal, regulando o transporte vesicular e condução nervosa (40-43).

Além disso, componentes da matriz extracelular como a laminina, sustentam o crescimento e mielinização axonal periférica, bem como as JNM (44). No entanto, estudos demonstram, que camundongos mutantes e indivíduos com distrofias musculares congênitas, apresentam ausência de isoformas da laminina, alterando assim as atividades homeostáticas das CS, exibindo descontinuidade da lâmina basal, conseqüente hipomielização e desmielinização axonal com redução da propagação dos estímulos elétricos (44-51).

### **1.5. Funções das Células de Schwann no processo regenerativo**

No sistema nervoso, existem quatro diferentes classes de células de Schwann maduras. São elas: CS satélites, localizadas nos gânglios periféricos, CS perissimpáticas conhecidas como (CS terminais), CS mielinizantes (CSM) e CS não mielinizantes (CSNM), localizadas no nervo periférico. Respalçadas em sua morfologia e composição bioquímica, por exemplo, da proteína básica de mielina (Mbp), que participa do diâmetro das fibras nervosas e compactação das camadas de mielina (52, 53), atuando efetivamente durante os eventos de transmissão e plasticidade sináptica (54-56). No entanto, a perda do contato axonal faz com que as CS se diferenciem e assumam características fenotípicas de CSNM, indispensáveis para a regeneração do nervo. As CSNM, atuam neste processo através da síntese de moléculas de adesão celular e fatores neurotróficos, responsáveis pela elaboração de uma membrana basal, que contém várias proteínas da matriz extracelular, denominada banda de Büngner (57-59). A banda de Büngner, atua como um canal dentro do qual o crescimento axonal é guiado, alojando as moléculas de adesão celular, juntamente com os fatores neurotróficos que são essenciais para o crescimento axonal no interior deste canal.

As moléculas de adesão celular promovem orientação e adesividade dos axônios e CS, enquanto os fatores neurotróficos correspondem a agentes

tróficos específicos que aumentam a regeneração no coto proximal da lesão (60-62). Por sua vez, cada axônio envia um grande número de brotos que atravessam o local da lesão e continuam seu crescimento no interior das bandas de *Büngner*, cuja ausência na sua formação pelas CSNM, no coto distal, dificulta fortemente a regeneração axonal, que normalmente resulta no aparecimento de neuromas (63).

Bandas que também atuam na mielinização dos axônios, após brotamento, promovendo substrato rico para o crescimento axonal, através da síntese de vários fatores de crescimento. Como o fator neurotrófico de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), entre outros, garante-se o desenvolvimento, manutenção e regeneração axonal (64-69). Todos esses processos dependem da interação, inicialmente, com o receptor de baixa afinidade para neurotrofinas (p75<sup>NTR</sup>). Possui efeitos pleiotrópicos, quando ativados promove sobrevivência e/ou morte neuronal (70-72). É intensamente expresso em células de Schwann, seu aumento indica redução nos mecanismos de reparo (73, 74) e sua expressão reduzida na imunohistoquímica, após lesão nervosa periférica em camundongos MDX, indica diminuição na capacidade regenerativa (39, 75, 76).

Lesões nervosas periféricas, induzem aumento do influxo de cálcio no axoplasma de axônios dos neurônios lesados, em associação com abertura de canais de cálcio voltagem dependentes (77-79) e conseguinte aumento das subunidades estruturais  $\alpha 2\delta$  (tipo 1), nas membranas pré-sinápticas em neurônios localizados nos gânglios espinhais e na coluna dorsal da medula espinhal. Desta forma, a sensibilização central fundamenta o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (80, 81). Excesso de cálcio, por sua vez, leva ao desequilíbrio nas vias glutamatérgicas excitatórias e inibitórias, resultando em atividades anormais dos potenciais de ação, induzindo distúrbios neurológicos e anormalidades comportamentais, juntamente com os agravos de mionecrose em camundongos MDX, à semelhança dos indivíduos DMD (82-84).

Em conjunto, a saturação de cálcio no sistema nervoso de animais MDX distróficos, induzidos por alta concentração intracelular, que altera a saída da comunicação celular, responsável pelas funções motoras e não motoras (85-

87). Tal fato se soma ao aumento de cálcio já existente, nas fibras musculares de camundongos MDX (88) e pacientes DMD (89). Assim, o uso de fármacos capazes de reduzir a concentração de cálcio intracelular pode aliviar o quadro clínico da distrofia, melhorando o prognóstico do paciente DMD, principalmente no início dos sintomas, resultando em qualidade de vida.

### **1.6. Pregabalina (PGB)**

A PGB é uma droga análoga ao GABA, com extensas indicações terapêuticas (90), atuando como um anticonvulsivante, através da subunidade  $\alpha_2\delta$  (tipo 1) dos canais de cálcio dependentes de voltagem (91). Assim, atenua o influxo exacerbado de cálcio em células neuronais (92, 93). Reduzindo a liberação de neurotransmissores, como noradrenalina (94, 95) e glutamato dos terminais pré-sinápticos (96, 97). Que por sua vez, possui manuseio defeituoso, por astrócitos de culturas de pacientes DMD, devido a perda de distrofina, resultando em hiperexcitabilidade neuronal e astrogliose reativa (98), igualmente relatado em camundongos MDX (17).

A partir do tratamento com PGB é possível reduzir ativação astrocitária, como demonstrado em estudos anteriores (93, 99, 100), tendo potencial para modular as atividades neurais, em lesões nervosas periféricas intrínsecas e após lesão condicional em camundongos MDX, apresentando efeitos sobre o controle da reatividade glial (101). Como visto, após injeção local de lisolecitina (LPC) no quiasma óptico para indução de desmielinização (102) a PGB, além de proteger o quiasma, melhorou sua remielinização após lesão (99). Uma vez que, remielinização no SNC, durante e após insultos é um evento complexo e de difícil ocorrência (103, 104).

Pesquisa realizada em nosso laboratório revelou efeitos protetores da PGB, por meio da preservação da rede sináptica, no microambiente dos motoneurônios espinais alfa. Durante o curso da encefalomielite autoimune experimental (EAE), mostrando redução na reatividade glial no grupo tratado com PGB (100). Em conjunto, tais descobertas, demonstrando que o tratamento com 30mg/kg/dia de PGB, ip, atua principalmente no tráfego de canais de cálcio neuronais, reduzindo a citotoxicidade, obtendo efeitos neuroprotetores, aumentando a regeneração axonal e recuperação funcional, após lesão medular (92, 93, 105-109).

Nossa hipótese é que tal redução do influxo de cálcio, possa melhorar a proteção, regeneração e mielinização axonal. Refletindo na melhora da função motora de camundongos MDX, por meio da modulação das sinapses excitatórias, juntamente com efeitos antiapoptóticos e antiinflamatórios da PGB (110, 111).

## 2. Objetivos

O presente trabalho teve, como objetivo principal, compreender respostas moleculares, morfológicas e funcionais do sistema nervoso periférico com tratamento PGB, na dose baseada na literatura para ratos e camundongos de 30mg/kg/dia, ip, durante 28 dias consecutivos. Buscou-se otimizar, assim, a comunicação bidirecional do sistema nervoso com o sistema muscular em resposta à degeneração muscular constante que ocorre em camundongos MDX. Além disso, avaliamos os efeitos da PGB, após lesão nervosa periférica, atuando como sincronizador da regeneração axonal e de fibras musculares. Esses objetivos podem ser detalhados no sentido de:

- a) Analisar a modulação da expressão de neurofilamento, laminina, S-100 e p75NGFR por imunistoquímica (densidade integrada de pixels), em cortes longitudinais de nervos íntegros e lesionados das linhagens MDX e controle C57BL/10.
- b) Evidenciar e avaliar a morfologia das junções neuromusculares, com  $\alpha$ -bungarotoxina, no músculo tibial cranial de camundongos das linhagens MDX e controle C57BL/10, com nervos íntegros e após lesão.
- c) Análisar, por RT-qPCR, a expressão dos transcritos para os fatores neurotróficos (Bdnf e Gap43), citocinas pró-inflamatórias (Tnf $\alpha$  e Ifn $\gamma$ ) e citocina anti-inflamatória (Tgf $\beta$ 1) na medula lombar dos animais com nervos íntegros das linhagens MDX e controle C57BL/10.
- d) Avaliar, por RT-qPCR, a expressão dos transcritos de genes das células de Schwann (Mbp, S100 e p75<sup>NTR</sup>), em nervos íntegros e lesionados das linhagens MDX e controle C57BL/10.
- e) Avaliar a função neuromotora, utilizando o sistema de locomoção forçada (Rota Rod) em camundongos MDX e C57BL/10, com nervos íntegros e lesionados, tratados com PGB e veículo.
- f) Analisar funcionalmente o nervo isquiático íntegro e a recuperação após lesão, utilizando locomoção espontânea dos camundongos MDX e C57BL/10, no sistema CatWalk, tratados com PGB e veículo.
- g) Avaliar o número e parâmetros morfométricos, referentes às fibras nervosas de camundongos MDX e C57BL/10, de nervos íntegros e regenerados após lesão nervosa periférica, tratados com PGB e veículo.

### 3. Materiais e métodos

Esta tese de doutorado está dividida em três experimentos:

Na **parte I** investigamos a possibilidade da PGB proporcionar neuroproteção em nervos periféricos de camundongos MDX, resultando na melhora da marcha. Para tal, experimentos de imunistoquímica dos nervos isquiáticos,  $\alpha$ -bungarotoxina para receptores de acetilcolina (AChRs), RT-qPCR da intumescência lombar e nervo isquiático, teste de equilíbrio e coordenação motora (Rota rod) e teste da função motora (Cat Walk System) foram realizados, resultando em artigo publicado na revista *Molecular and Cellular Neuroscience* (112).

A **parte II** aborda as atribuições da PGB, em atuar na sincronização da regeneração das fibras nervosas, após lesão axonal, com a reestruturação das fibras musculares, em camundongos MDX, melhorando assim, a marcha dos animais distróficos. Para alcançar tais objetivos, realizou-se lesão do nervo isquiático e experimentos de imunistoquímica, marcação com  $\alpha$ -bungarotoxina, RT-qPCR do nervo isquiático, teste de equilíbrio e coordenação motora (Rota rod) e teste da função motora (Cat Walk System).

Na **parte III**, avaliamos os efeitos da PGB no metabolismo das células de Schwann de camundongos MDX e mielinização de axônios após lesão. Por intermédio da morfometria, os seguintes parâmetros foram estudados: área total dos nervos, estimativa do número de fibras mielínicas em  $100.000 \mu\text{m}^2$ , espessura da bainha de mielina, diâmetro axonal e razão “g” (razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra) dos nervos contralaterais e ipsilaterais.

#### 3.1 Animais

Utilizamos camundongos das linhagens C57BL/10 e MDX (machos, 5 semanas de idade, 15-20g), obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica de Universidade Estadual de Campinas (CEMIB / UNICAMP) e alojados nas instalações do Laboratório de Regeneração Nervosa, Instituto de Biologia, UNICAMP. Os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro (12h / 12 h) com temperatura e umidade controladas e com água e alimento peletizado ad libitum. Os experimentos foram aprovados pelo Instituto Comitê de Ética no Uso de Animais (Instituto de Biologia - CEUA / IB / UNICAMP,

protocolo n°. 3769-1(A) 2017), foi realizado de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). No total, 148 camundongos foram usados, sendo os grupos experimentais detalhados na **tabela 1**.

**Tabela 1** Grupos experimentais da pesquisa, **parte I** (sem lesão) e **partes II e III** (com lesão), dose de 30mg/Kg/dia de PGB e tempos de sobrevivência durante o tratamento.

Técnicas utilizadas e animais por grupo também são descritas.

<b>Parte I</b>	28 dias Imunoistoquímica nervo isquiático e toxina em AchRs	28 dias (RT-qPCR) intumescência lombar e nervo isquiático	28 dias 24 testes Catwalk	28 dias 7 testes Rotarod
C57BL/10 - Veículo	5*	5	5*	5
C57BL/10 - PGB	5*	5	5*	5
MDX - Veículo	5*	5	5*	9
MDX PGB	5*	5	5*	9

<b>Partes II e III</b>	28 dias Imunoistoquímica nervo isquiático e toxina em AchRs	28 dias (RT-qPCR) nervo isquiático	28 dias 24 testes Catwalk	28 dias 7 testes Rotarod	28 dias Morfometria
C57BL/10 - Veículo	5*	5	5*	5	5
C57BL/10 - PGB	5*	5	5*	5	5
MDX - Veículo	5*	5	5*	5	5
MDX PGB	5*	5	5*	5	5

\* Os mesmos camundongos foram usados para ambas as técnicas.

### 3.2 Tratamento medicamentoso, partes I, II e III.

Nos camundongos tratados com (Pregabalina 75mg, Lyrica, Pfizer) foram administrados 30mg/kg/dia, diluídos diariamente em 200µl de solução tampão fosfato-salina 0,9% NaCl, formando solução homogênea com auxílio do Vortex mixer. Nos camundongos tratados com veículo foram administrados 200 µl de solução tampão fosfato-salina 0,9% NaCl (veículo). Ambos os tratamentos foram iniciados no primeiro dia da 5ª semana e finalizados no

último dia da 8ª semana de vida, tanto a pregabalina como solução veículo, foram administrados intraperitonealmente, sempre no mesmo horário do dia. Todos os camundongos foram eutanasiados no primeiro dia da nona semana de vida.

### **3.3 Lesão do nervo isquiático, partes II e III.**

Camundongos com 6 semanas de idade, uma semana após o início do tratamento com PGB, foram anestesiados com isoflurano, usando o sistema de anestesia por inalação, de pequenos roedores (BRASMED - Código 170130). Após a tricotomia da face posterior da coxa esquerda, a pele foi incisada com bisturi (aproximadamente 1,5 cm de comprimento) no meio da coxa. A pele e os músculos da coxa foram separados cuidadosamente, expondo o nervo isquiático para a realização da lesão na altura do forame obturado. O esmagamento do nervo esquerdo foi realizado sempre pela mesma pessoa, com auxílio de pinça nº 4, pressão constante foi mantida por 10 segundos o procedimento foi repetido pelo mesmo período, verificando sempre a integridade do epineuro (113, 114). Após a cirurgia, os camundongos foram mantidos no biotério do laboratório de Regeneração Nervosa, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Unicamp, até o momento da eutanásia.

### **3.4 Coleta e preparação de tecidos, partes I, II e III.**

Os camundongos foram anestesiados com uma overdose de xilazina e cetamina e submetidos a toracotomia seguida de perfusão transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato de sódio 0,1 M (PBS, com NaCl a 0,9%; pH 7,38), para análise de (RT-qPCR). Em outros camundongos, designados para análise de imuno-histoquímica além da solução salina, segue a perfusão transcardíaca agora com solução fixadora (4% paraformaldeído em 0,1 M PBS) ou fixadas com *Karnovsky* (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 10% em PBS 0,1M) para morfometria. Após a fixação, os nervos isquiáticos foram dissecados e imersos na mesma solução fixadora durante a noite a 4°C. Em sequência, os espécimes foram lavados três vezes com PBS 0,1 M, em seguida, imersos em séries de soluções sacarose (10%, 20% e 30%, 24 h cada). As amostras foram então embebidas em Tissue-Tek, congelado em n-

hexano a uma temperatura controlada (-25°C a -30°C) e armazenados a -20°C.

### **3.5 Imunoistoquímica, partes I e II.**

Secções longitudinais de nervos isquiáticos e músculos tibiais craniais com 12 µm de espessura foram obtidas usando um criostato (Microm, HM525). Elas foram transferidas para lâminas microscópicas gelatinizadas e armazenadas a -20°C até o uso. Para imunoistoquímica, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente, e as seções foram delineadas com uma caneta hidrofóbica (caneta PAP, Sigma Z377821). As lâminas foram transferidas para câmara de imunoistoquímica, uma cuba úmida que protege da luz. As seções foram imersas em PBS 0,01 M (3 x 5 min cada), levemente secas na periferia da lâmina e incubadas com 150 µl de solução de bloqueio (3% albumina bovina sérica em PBS 0,1 M) durante 45 min. Posteriormente, os anticorpos primários, tabela 2, foram diluídos em solução de incubação (1,5% albumina bovina sérica e Tween 0,2% em PBS 0,1 M), e as seções foram incubadas por 4 h em temperatura ambiente. Após a incubação dos anticorpos primários, as seções foram lavadas com 0,01 M de PBS e incubadas com o anticorpo secundário apropriado (exceto músculos, sendo as lâminas já montadas em glicerol/PBS 0,01M 3:1 com lamínula), (Cy2 anti-coelho ou Cy3 anti-camundongo; Jackson Immunoresearch, 1: 500) por 45 min. As seções foram novamente lavadas com PBS 0,01 M e cobertas com uma lamela com glicerina / PBS (3: 1). As lâminas foram observadas com um microscópio de epifluorescência (Leica DMB5500) e documentado com uma câmera digital (Leica DFC 345 FX), utilizando filtros específicos de acordo com a anticorpos secundários. Para quantificação, três imagens representativas de cada espécime de cada grupo experimental foram selecionadas. A densidade integrada de pixels, que representa a intensidade de anticorpo ligado a proteína de interesse, foi medida de cortes longitudinais do nervo isquiático. E as placas motoras de músculos tibiais craniais, com  $\alpha$ -bungarotoxina ligada a AchRs, foram quantificadas. Nos dois experimentos, utilizamos o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). Para cada nervo isquiático e músculo tibial cranial, e então a média  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo experimental foi calculada e, através desses valores, foram realizadas as

comparações entre os grupos.

**Tabela 2** Anticorpos primários usados ao longo do estudo, partes I e II.

Anticorpo/	Fabricante	Hospedeiro	Códigos	Concentração
Neurotoxina				
Neurofilamento	milipore	rabbit	ab1989	1:2000
Laminina 6	abcam	rabbit	ab11575	1:1500
S100	abcam	rabbit	ab868	1:1500
p75 <sup>NGFR</sup>	Santa Cruz	rabbit	SC271708	1:1500
$\alpha$ -bungarotoxina	Thermofisher	Bungarus	B35451	1:500

### 3.6 PCR em tempo real (RT-qPCR) partes I e II

#### 3.6.1 Medula Espinhal parte I

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen, catálogo número 15596026), seguindo-se as instruções do fabricante. Para isso, 1mL de TRIzol foi adicionado as amostras, seguido de homogeneização com Politron®. A concentração de RNA e qualidade das amostras foram mensuradas em nanofotômetro considerando-se as razões A260/280 e A260/230. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 $\mu$ g de RNA total com o kit High Capacity (Thermo Fisher Scientific, código 4368814) de acordo com as instruções, do fabricante. Para as reações de PCR, o cDNA foi utilizado como amostra em uma reação de 10 $\mu$ l contendo água nuclease free, ensaios TaqMan (Tabela 3) e TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied biosystems, código 4369016), sempre em triplicatas. Todo o procedimento de RT-qPCR foi realizado na plataforma de instrumentação Stratagene Mx3005P (Agilent). As condições de termociclagem utilizadas foram de 95 C por 10 minutos seguida de 45 ciclos de 95 C de 15 segundos e 60 C de 1 minuto. O gene de referência Hprt1 foi testado e validado pelo software Best-Keeper e empregado como normalizador. Os resultados foram calculados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 3.6.2 Nervo Isquiático partes I e II

O RNA total foi extraído utilizando-se o RNeasy Micro kit (Quiagem, 74004) seguindo-se as instruções do fabricante. A concentração de RNA e qualidade das amostras foram mensuradas em nanofotômetro considerando-se as razões A260/280 e A260/230. O cDNA foi sintetizado a partir de 170ng de RNA total com o kit High Capacity (Thermo Fisher Scientific, código 4368814) de acordo com as instruções, do fabricante. Para as reações de PCR, o cDNA foi utilizado como amostra em uma reação de 10µl contendo água nuclease free, ensaios TaqMan (Tabela 3) e TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied biosystems, código 4369016). Todo o procedimento de RT-qPCR foi realizado na plataforma de instrumentação Stratagene Mx3005P (Agilent). As condições de termociclagem utilizadas foram de 95 C por 10 minutos seguida de 45 ciclos de 95 C de 15 segundos e 60 C de 1 minuto. O gene de referência Gapdh foi testado e validado pelo software Best-Keeper e empregado como normalizador. Os resultados foram calculados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Tabela 3** Ensaios TaqMan usados na técnica RT-qPCR

Tecidos	Genes	Códigos
	Tnfa	Mm00443258_m1
Intumescência	IFN $\gamma$	Mm01168134_m1
lombar	Tgf $\beta$ 1	Mm01178820_m1
<b>parte I</b>	BDNF	Mm04230607_s1
	Gap43	Mm00500404_m1
Nervos isquiáticos	S100	Mm01149792_m1
<b>partes I e II</b>	P75	Mm00446296_m1
	Mpb	Mm01266402_m1

### 3.7 Morfometria, parte III.

Os nervos isquiáticos foram dissecados e imersos na mesma solução fixadora por 12 horas, mantidas a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em tampão fosfato

0,01M. O nervo isquiático esquerdo foi dividido em quatro fragmentos (proximal 1 e 2; distal 1 e 2) e o direito foi dissecado integralmente. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcool 30, 50, 70 e 100% e acetona 100%. Posteriormente, foram incluídos em acetona + resina (*Durcupan Fluka*) (2:1), por 12h em temperatura ambiente e (1:1) por mais 12h, seguindo com resina (*Durcupan Fluka*) pura em 12h e finalizando com resina pura em formas para polimerizar a (60°C). Os blocos foram desbastados e secções semifinas (0,5µm) obtidas em (ultramicrotomo *Leica, EM UC7*), coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação e aprovação da morfologia no microscópio de luz. A seguir, blocos viáveis para análise, foram selecionados para dar continuidade aos cortes semifinos os quais foram coletados em lâminas e corados com corante lipofílico, Sudan Black, para posterior análise em microscópio (*Leica DMB5500*) e documentado com uma câmera digital (*Leica DFC 295*).

### 3.7.1 Análise das secções semifinas

Em análise das secções transversais semifinas dos nervos isquiáticos, foi utilizado aumento de 1200X, considerando os resultados dos seguintes parâmetros: área total em  $\mu\text{m}^2$  dos nervos, estimativa do número de fibras mielínicas em  $100.000 \mu\text{m}^2$ , diâmetro das fibras mielínicas (DFM), espessura da bainha de mielina (EBM), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) e razão “g” (RZG), [razão do diâmetro axônio mielínico para o diâmetro da fibra mielínica, (RZG = DAM/DFM)] dos nervos contralaterais e ipsilaterais.

As medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula  $[D=P/\pi (Pi)]$ . A diferença entre o diâmetro das fibras mielínicas (DFM) e o diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) fornece a espessura da bainha de mielina (EBM) (115). A RZG corresponde ao quociente entre DAM e DFM, um parâmetro morfométrico que expressa a regeneração das fibras nervosas (116). Para os procedimentos morfométricos, foi utilizado o software adobe

Photoshop (*Adobe Systems*). As microfotografias foram utilizadas para demonstrar qualitativamente possíveis efeitos do tratamento com PGB sem lesão e após lesão nervosa periférica.

### **3.8 Testes da função motora, partes I e II.**

A análise funcional foi avaliada usando uma pista de caminhada automatizada sistema (CatWalk XT System, Noldus Inc., Holanda) em que o animal pode caminhar espontaneamente, sobre uma plataforma de vidro iluminada com uma luz verde, realçando as pegadas quando as patas contatam o caminho. Três corridas foram registradas por uma câmera de alta velocidade colocada sob a passarela, e os dados foram analisados pelo software CatWalk XT 10.6 (Noldus Inc.). O índice de função isquiática (SFI) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula (117):  $SFI = 118,9 ((ETS - NTS) / NTS) - 51,2 ((EPL - NPL) / NPL) - 7,5$ , em que N, lado normal; E, lado experimental; PL, comprimento de impressão; e TS, propagação do dedo do pé. Para adaptação, os camundongos foram colocados individualmente no sistema para caminhar 5 min dia, por três dias antes do início dos experimentos. Após quatro dias de tratamento, iniciou-se o experimento, as execuções foram adquiridas todos os dias durante vinte e quatro dias (**parte I**) e três dias antes e vinte e um dia após lesão (**parte II**), consecutivos no mesmo horário e condições ambientais para padronização na coleta dos dados de cada animal do grupo. Autorizados a mover-se livremente em ambas as direções com uma duração da corrida entre 0,50 e 5,00 a uma velocidade máxima permitida com variação de 60%. O ganho da câmera foi definido como 25,01 e a detecção limite para 0,25. Quatro execuções compatíveis foram adquiridas por teste e não restrição alimentar ou recompensa.

### **3.9 Testes de equilíbrio e coordenação motora, partes I e II.**

Experimentos que foram avaliados o equilíbrio e a coordenação motora dos camundongos, no Rota Rod EFF-412 (Insight equipamentos) que consiste em um cilindro giratório operando no sistema de velocidade contínua, com aceleração progressiva e constante de no mínimo de 5 rpm até no máximo 37 rpm, com uma rampa de 6 minutos entre a rotação mínima para a máxima. O

aparelho monitorou individualmente o desempenho de quatro animais ao mesmo tempo, sendo que cada baia possui um sistema de detecção de queda do animal através de impacto para permitir determinar o seu tempo e rotações por minuto que o animal permaneceu no cilindro. Neste ensaio o camundongo é colocado sobre o cilindro, sendo necessário realizar todos os ajustes posturais através da coordenação dos movimentos das quatro patas para se manter no aparelho. Previamente os animais C57BL10, foram treinados, para ajuste do nível da manivela que iríamos utilizar no protocolo, pois é nossa linhagem controle. Por três dias consecutivos os animais foram submetidos a uma adaptação de aceleração progressiva de 5 até 37 rpm (no nível 5 da manivela), portanto mesma aceleração utilizada nos experimentos. Primeira sessão de teste, referiu-se ao sétimo dia de tratamento, foi realizada para se estabelecer os parâmetros basais para cada animal e realizar o procedimento cirúrgico nos animais com lesão (**parte II**). Posteriormente foram realizadas mais seis sessões durante o tratamento.

### **3.10 Análises estatísticas, partes I, II e III**

Todos os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (99), e  $P < 0,05$  foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism (versão 8.0.1 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Para a imunistoquímica e quantificação de PCR, foi usada ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. Para a recuperação funcional e teste de locomoção forçada os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ao comparar veículo e tratado PGB, para eventuais diferenças intergrupos.

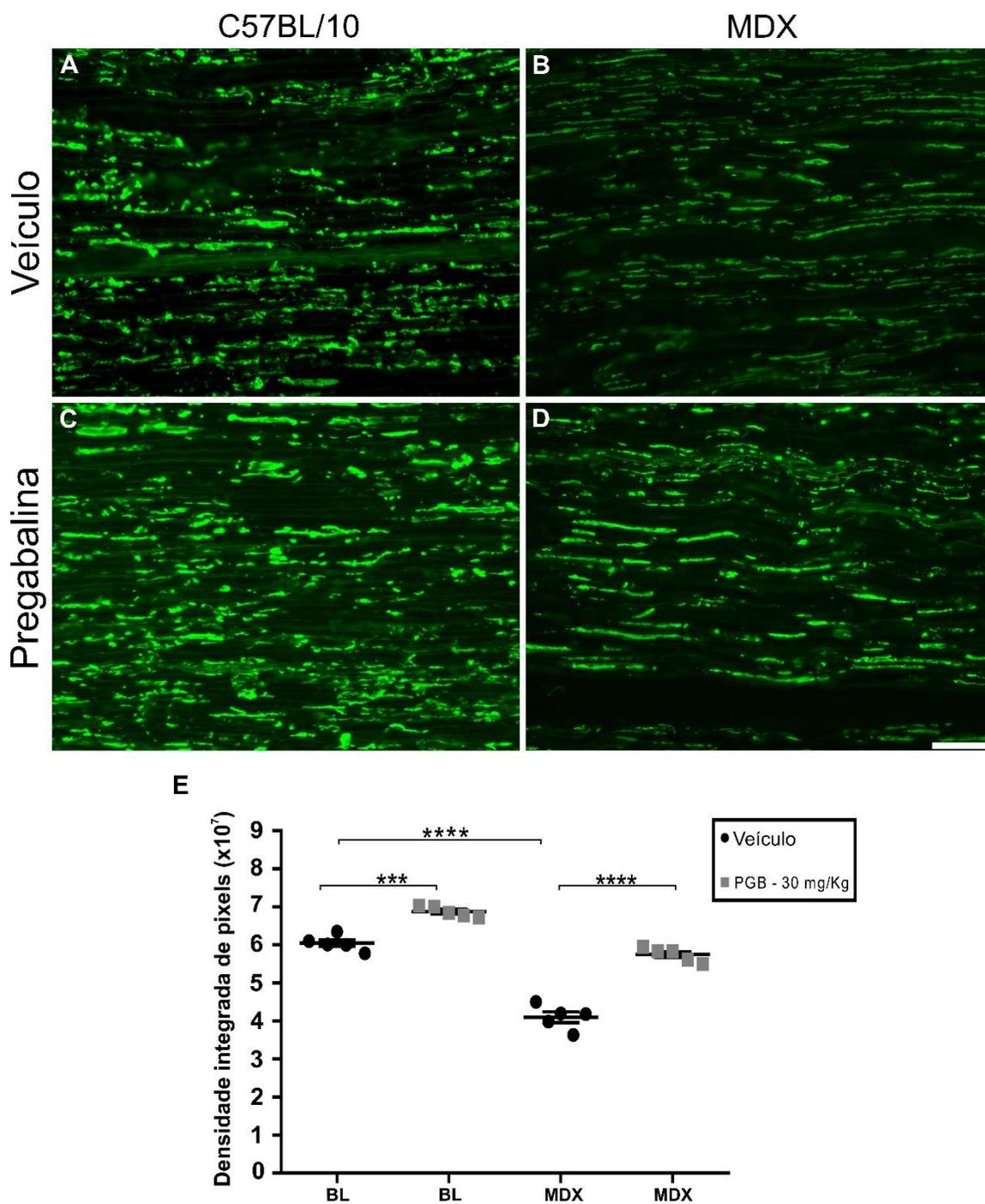
## 4. Resultados

### Parte I - Pregabalina protege axônios e placas motoras do músculo tibial cranial de camundongos MDX

#### 4.1 Pregabalina influencia a reestruturação do nervo periférico de camundongos distróficos

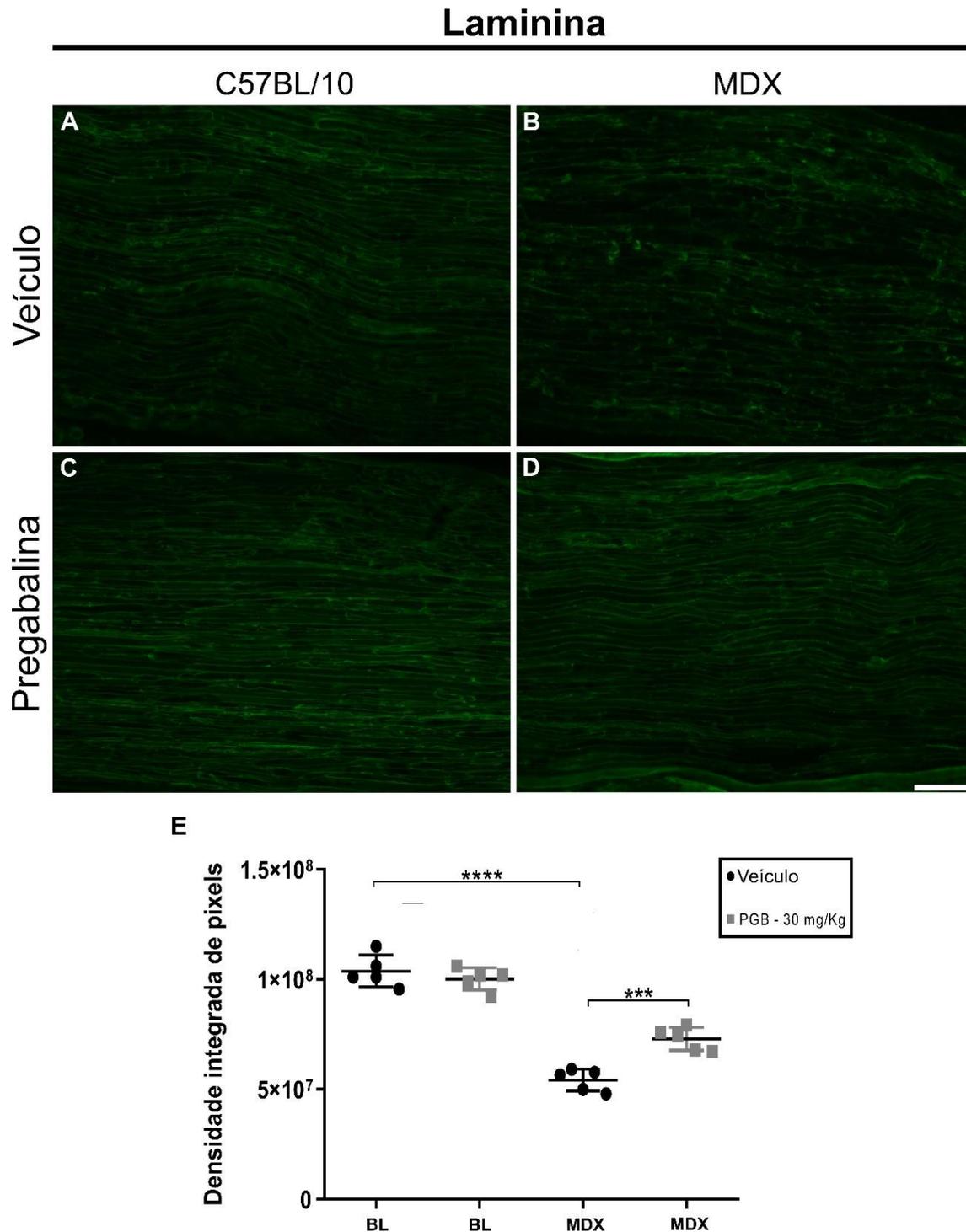
Após vinte e oito dias de tratamento, a imunoistoquímica de neurofilamentos obtida do nervo periférico de ambas as linhagens demonstra perda significativa de marcação em camundongos MDX, em comparação com a contraparte C57BL/10 (C57BL/10,  $6.0 \times 10^7 \pm 9.0 \times 10^5$  e MDX  $4.1 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^6$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 1A-E). É importante ressaltar que o tratamento com PGB resulta em expressão de neurofilamentos mais intensa tanto em C57BL/10 (C57BL/10 veículo,  $6.0 \times 10^7 \pm 9.0 \times 10^5$  e C57BL/10 PGB,  $6.8 \times 10^7 \pm 6.2 \times 10^5$  \*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 1A e C) quanto em camundongos MDX (MDX veículo,  $4.1 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^6$  e MDX PGB,  $5.7 \times 10^7 \pm 8.0 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 1B e D). A comparação entre as linhagens revelou que o PGB melhora a rotulagem MDX, embora não tenha atingido níveis de controle.

## Neurofilamento



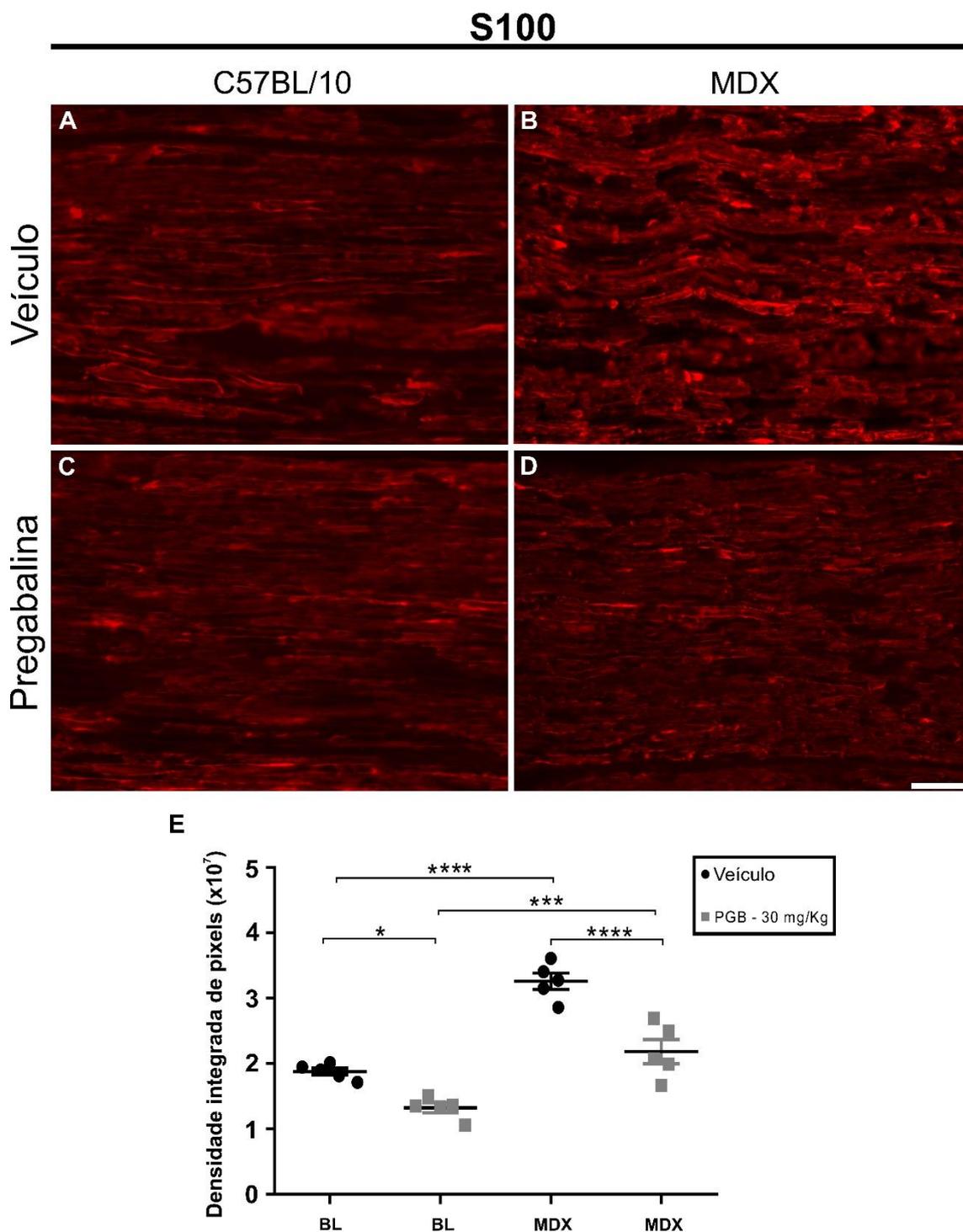
**Figura 1** - Imunoistoquímica anti-neurofilamento de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando a regulação positiva da marcação após a administração de PGB. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. Média ± SEM. Barra de escala: 50 μm.

A imunistoquímica com laminina indica baixa expressão no MDX, significativamente menor do que em camundongos C57BL/10 (C57BL/10,  $1.0 \times 10^8 \pm 3.2 \times 10^6$  e MDX,  $5.4 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 2A-E). No entanto, um aumento na expressão da laminina nos nervos periféricos de camundongos MDX devido ao tratamento com PGB pode ser observado (MDX veículo,  $5.4 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$  e MDX PGB,  $7.2 \times 10^7 \pm 2.3 \times 10^6$  \*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 2B, D e E).



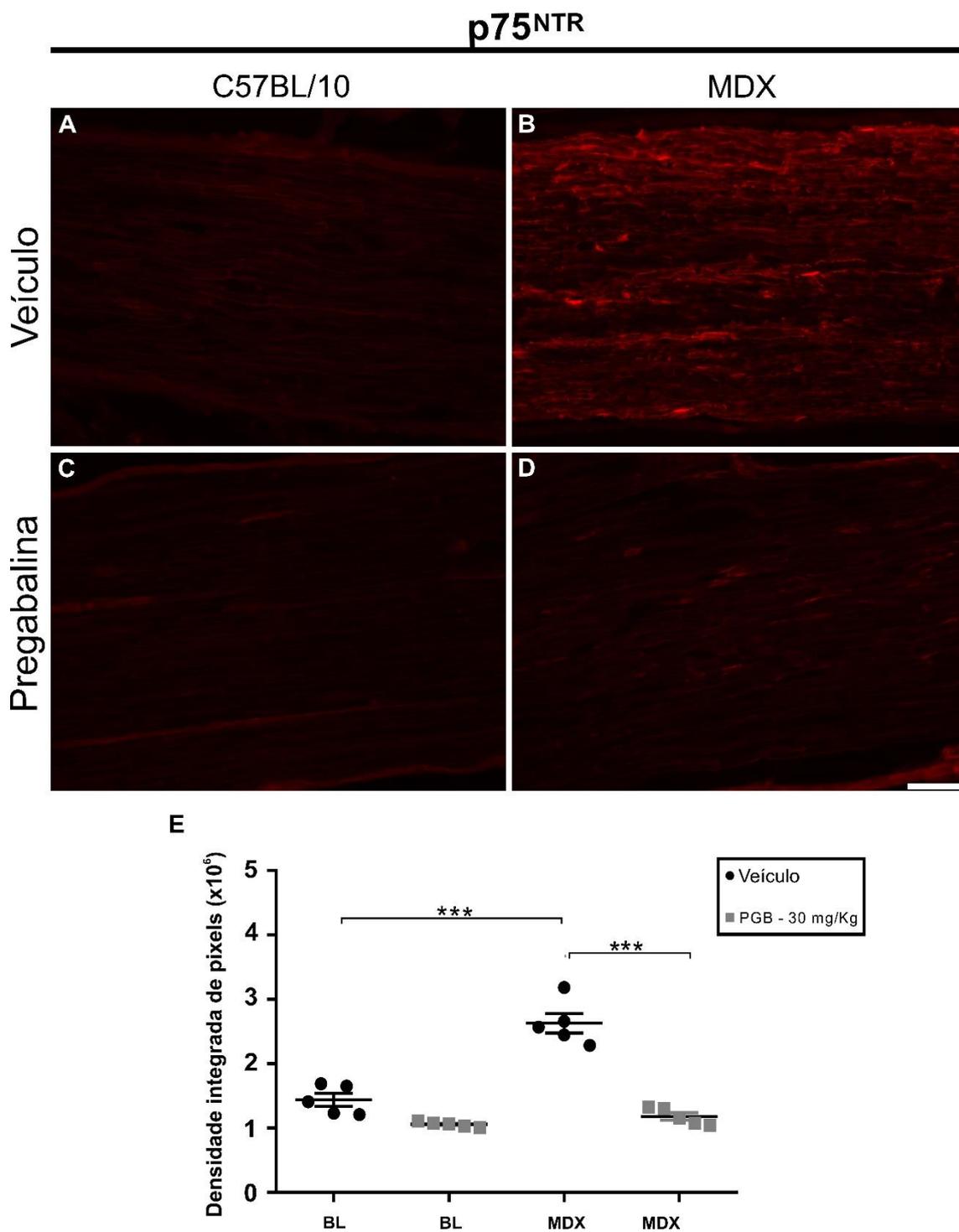
**Figura 2** - Imunoistoquímica anti-laminina de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando a regulação positiva da marcação após a administração de PGB em camundongos MDX. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Para investigar melhor os efeitos do PGB nas células de Schwann, avaliamos a imunorreatividade contra a proteína S100 de ligação ao cálcio, observada a regulação positiva significativa em camundongos MDX comparando com a linhagem controle, (MDX veículo,  $3.2 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$  e C57BL/10 veículo,  $1.8 \times 10^7 \pm 5.2 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ ) e (MDX PGB,  $2.1 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^6$  e C57BL/10 PGB,  $1.3 \times 10^7 \pm 7.3 \times 10^5$  \*\*\*  $p < 0,001$ ) Figura 3A-E. Quando tratadas com PGB, ambas as linhagens semearam a regulação negativa de S100, sendo mais significativas em camundongos MDX (C57BL/10 veículo,  $1.8 \times 10^7 \pm 5.2 \times 10^5$  e C57BL/10 PGB,  $1.3 \times 10^7 \pm 7.3 \times 10^5$  - \*  $p < 0,05$ , Figura 3A, C e E) e (MDX veículo  $3.2 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$  e MDX PGB,  $2.1 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^6$ - \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 3B, D e E).



**Figura 3** - Imunoistoquímica anti-S100 de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando a regulação negativa da expressão, após a administração de PGB. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

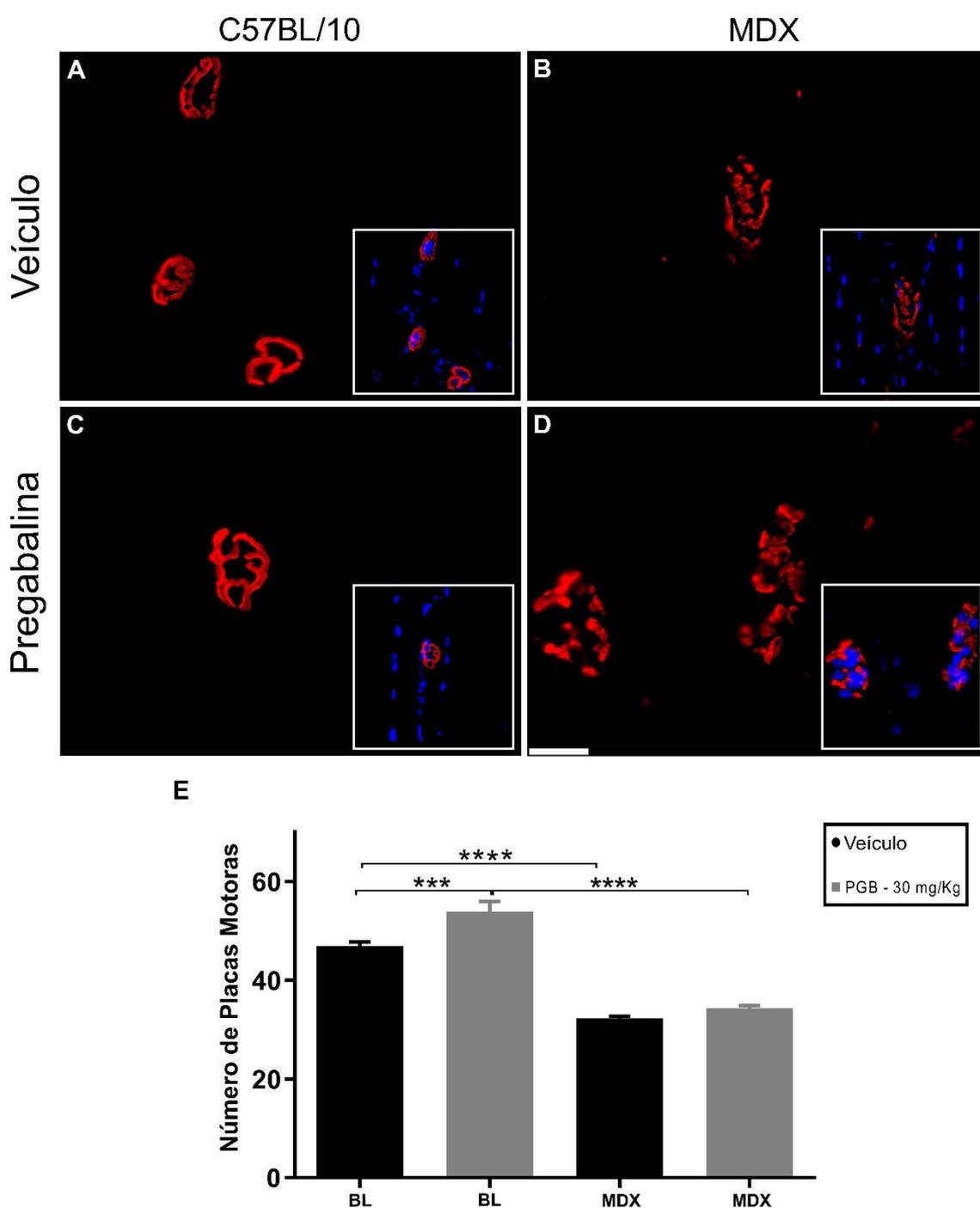
Além disso, o tratamento com PGB resulta na diminuição da expressão de p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas), sendo mais proeminente em camundongos MDX ( MDX veículo,  $2.6 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^5$  e MDX PGB,  $1.1 \times 10^6 \pm 5.7 \times 10^4$  \*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 4B, D e E), uma vez que nos animais distróficos veículo a imunorreatividade foi maior do que na linhagem controle (MDX veículo,  $2.6 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^5$  e C57BL/10 veículo,  $1.4 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^5$  \*\*\*  $p < 0,001$  Figura 4B e E).



**Figura 4** - Imunoistoquímica de p75<sup>NTR</sup> (receptor de baixa afinidade pan-neurotrofina) de seções longitudinais do nervo isquiático, revelando regulação negativa de marcação após administração de PGB em camundongos MDX. A e C - C57BL/10, B e D - MDX. E - Quantificação da densidade integrada de pixels

e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*\*  $p < 0,001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

A avaliação das placas terminais motoras representou um déficit em camundongos distróficos MDX em comparação com C57BL/10 (C57BL/10 veículo,  $46,87 \pm 0,88$  e MDX veículo,  $32,27 \pm 0,44$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 5E). Importante ressaltar que o tratamento com PGB aumentou o número de junções neuromusculares na linhagem controle (C57BL/10 veículo,  $46,87 \pm 0,88$  e C57BL/10 PGB,  $53,93 \pm 2,05$ \*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 5E), sem diferença estatística na linhagem MDX (veículo,  $32,27 \pm 0,44$  e PGB,  $34,40 \pm 0,48$ , Figura 5E). Além disso, qualitativamente preservou a morfologia das placas motoras, reduzindo suas fragmentações em músculos tibiais craniais de camundongos MDX, aumentando a celularidade nos terminais nervosos, dada a observação de núcleos positivos para DAPI, em comparação com MDX veículo (Figura 5D).

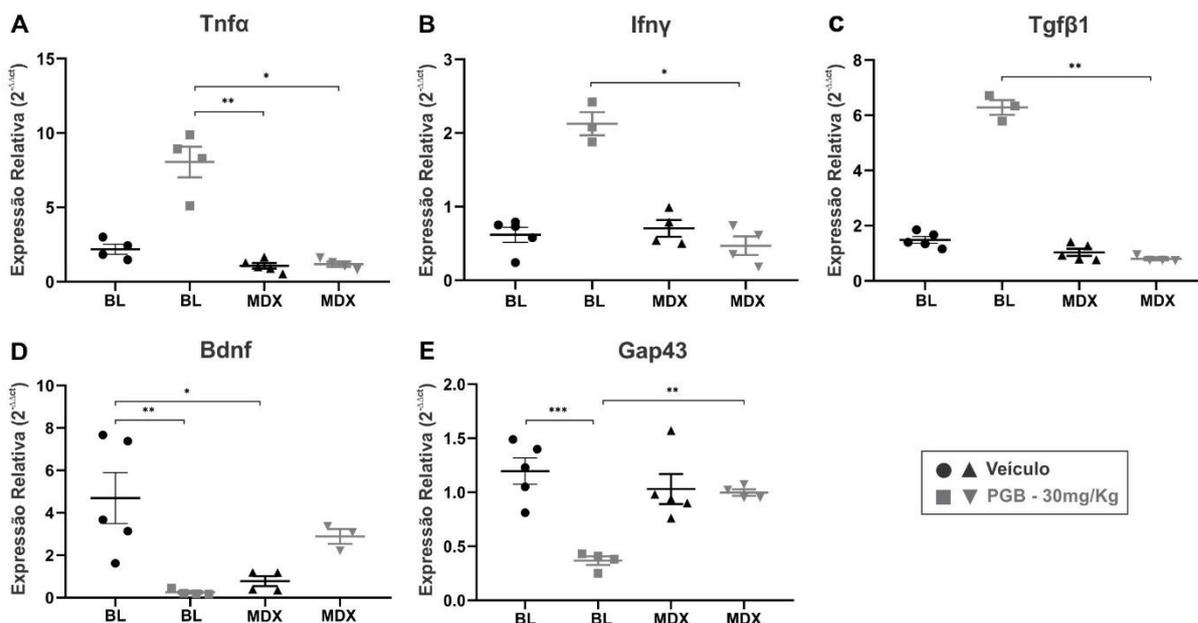
$\alpha$  - Bungarotoxina

**Figura 5** - Receptores pós-sinápticos de acetilcolina (coloração com  $\alpha$ -bungarotoxina) nas placas terminais motoras dos músculos tibiais craniais de camundongos C57BL/10 e MDX. A-D - Fotos representativas de C57BL/10 e MDX tratadas com veículo e PGB. E - Número reduzido de junções neuromusculares na linhagem MDX. A PGB aumentou o número de placas terminais encontradas em camundongos C57BL/10 e melhorou a morfologia

das placas terminais motoras em camundongos MDX. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 25 $\mu$ m.

## 4.2 Imunomodulação da medula espinhal retrógrada de citocinas por tratamento com PGB

Níveis de transcrição gênica de genes pró-inflamatórios para TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Figura 6A e 6B), transcritos anti-inflamatórios para TGF- $\beta$  (Figura 6C), fator neurotrófico BDNF (Figura 6D) e proteína associada ao crescimento - GAP43 (Figura 6E) foram avaliados 28 dias após o tratamento com PGB. TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TGF- $\beta$  mostraram um aumento significativo em C57BL/10 após o tratamento com PGB (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) em comparação com C57BL/10 veículo. Ao contrário, o PGB resulta na regulação negativa dos transcritos do gene BDNF em C57BL/10. Nesse sentido, o MDX apresentou níveis relativamente baixos desse gene, com tendência de suprarregulação após a administração de PGB. Quanto à expressão do gene GAP43, o PGB levou a uma regulação negativa significativa em camundongos C57BL/10, embora tenha permanecido inalterada em animais MDX. Todos os dados são detalhados na Tabela 4.

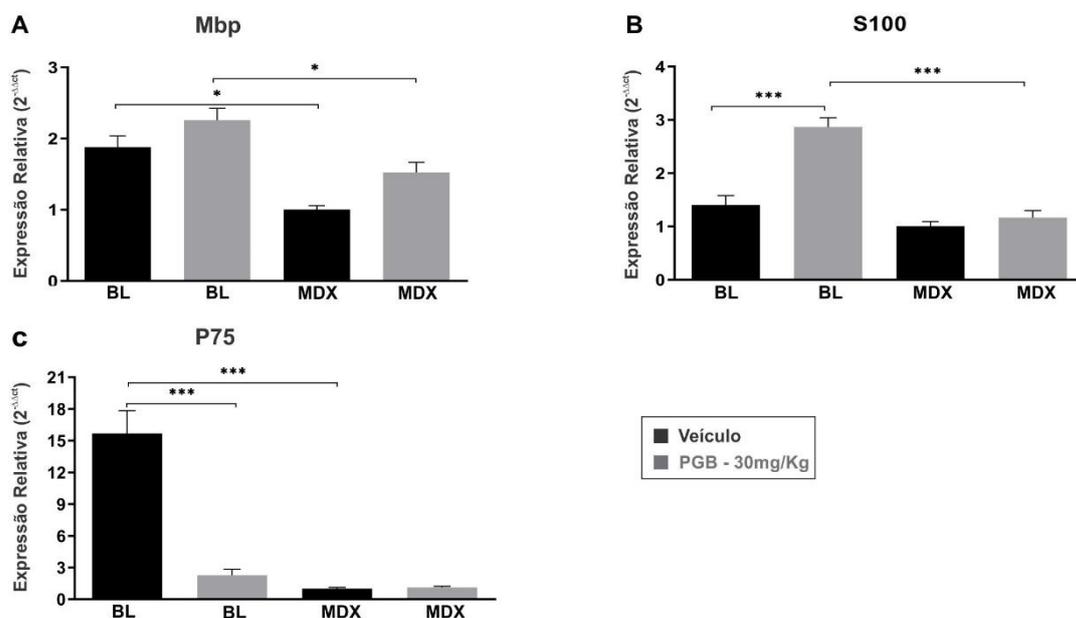


**Figura 6** - Quantificação relativa da expressão de transcritos dos genes de TNF $\alpha$  (A); IFN $\gamma$  (B); TGF $\beta$ 1 (C); BDNF (D) e GAP43 (D) da medula espinhal

lombar dos camundongos sem lesão nervosa periférica, após 28 dias de tratamento com PGB. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Média  $\pm$  SEM.

### 4.3 PGB modifica os níveis basais dos transcritos gênicos em células de Schwanns no nervo isquiático

Os níveis de transcrição da proteína básica da mielina - MBP se mostram regulados negativamente em camundongos MDX em comparação com C57BL/10, independentemente do tratamento com PGB. No entanto, a administração de PGB indicou uma tendência de regulação positiva em ambos os grupos (Figura 7A). Os níveis de transcrição do gene S100 mostraram regulação positiva significativa no grupo de controle tratado com PGB (\*\*\*)  $p < 0,001$ , Figura 7B). Análise dos transcritos do gene p75NTR demonstrou que o tratamento com PGB regulou negativamente os níveis de C57BL/10 para MDX (\*\*\*)  $p < 0,001$ , Figura 7C). Os dados de quantificação são detalhados na Tabela 4.



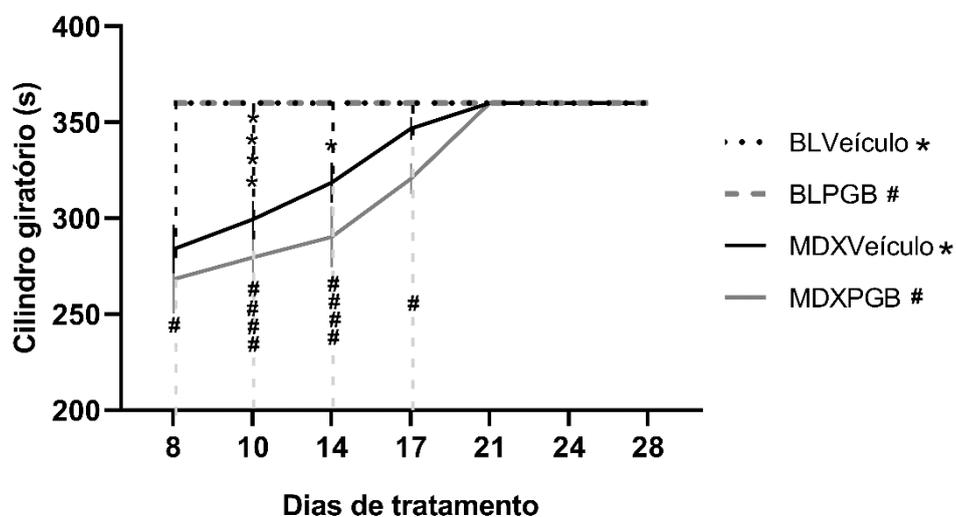
**Figura 7** - Quantificação relativa da expressão de transcritos gênicos da proteína básica da mielina MBP (A), S100 (B) e p75NTR (C) no nervo isquiático íntegro, após 28 dias de tratamento com PGB. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Média  $\pm$  SEM.

**Tabela 4** Expressão relativa de transcritos gênicos na medula espinhal e nervo isquiático após o tratamento com PGB e lesão nervosa periférica.

Grupos					
Tecido	Genes	BL-Veículo	BL-PGB	MDX-Veículo	MDX-PGB
Intumescência lombar	Tnfa	2.18 ± 0.33	8.05 ± 1.03	1.07 ± 0.19	1.18 ± 0.17
	Ifny	0.62 ± 0.10	2.12 ± 0.16	0.70 ± 0.11	0.47 ± 0.13
	Tgfβ1	1.50 ± 0.12	6.30 ± 0.27	1.03 ± 0.13	0.79 ± 0.05
	Gap43	1.20 ± 0.12	0.37 ± 0.04	1.03 ± 0.14	1.00 ± 0.30
	Bdnf	4.70 ± 1.20	0.25 ± 0.07	0.78 ± 0.23	2.90 ± 0.35
Nervos isquiáticos	Mbp	1.88 ± 0.16	2.26 ± 0.17	1.00 ± 0.05	1.52 ± 0.14
	S100	1.40 ± 0.18	2.87 ± 0.17	1.0 ± 0.09	1.17 ± 0.13
	P75	15.7 ± 2.15	2.27 ± 0.55	1.01 ± 0.11	1.11 ± 0.12

#### 4.4 PGB melhora locomoção forçada em camundongos MDX

Os camundongos MDX apresentaram déficit significativo no desempenho motor, visto pelo teste de rotarod, resultando na redução do tempo gasto na barra rotativa em relação à linhagem C57BL/10 (Figura 8 e Tabela 5). É importante ressaltar que o tratamento de camundongos MDX com grupo PGB tendeu a reduzir ainda mais o tempo no cilindro giratório, indicando um efeito colateral inesperado. No entanto, a partir do 21<sup>o</sup> dia de tratamento, os camundongos MDX melhoraram e atingiram o nível de controle de desempenho que foi mantido até o ponto final do experimento (Figura 8).



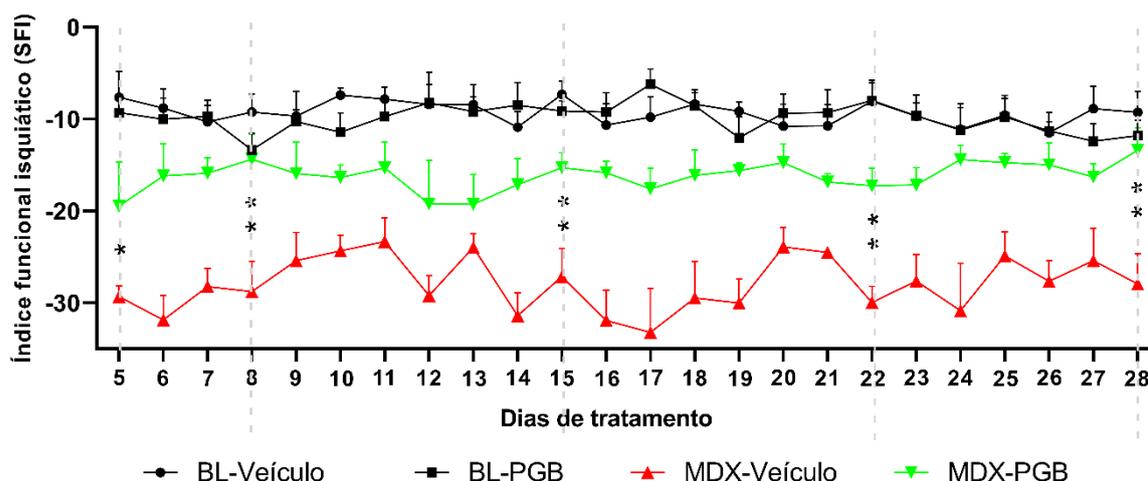
**Figura 8** - Locomoção forçada demonstrando o déficit motor na linhagem distrófica MDX. Observe a adaptação funcional em ratos MDX a partir do 21<sup>o</sup> dia de teste. C57BL/10 - n = 5 por grupo, MDX - n = 9 por grupo. \*/# p <0,05; \*\*\*\*/##### p <0,0001. Média ± SEM.

**Tabela 5** Dados do teste em Rotarod após 28 dias de tratamento com PGB.

		Grupos			
Ensaio	Dias tratamento em 7 Testes	BL-Veículo	BL-PGB	MDX-Veículo	MDX-PGB
	7 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	310 ± 13	289 ± 5
	10 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	304 ± 9	288 ± 8
	14 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	336 ± 10	306 ± 13
Rota rod	17 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	356 ± 2	326 ± 7
	21 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0
	24 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0
	28 <sup>o</sup> dia	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0

#### 4.5 O tratamento com PGB melhora o desempenho da marcha espontânea em camundongos MDX

O desempenho locomotor dos grupos experimentais foi avaliado pelo teste de trilha de caminhada espontânea (sistema CatWalk). Assim, o índice funcional do isquiático - SFI (Figura 9), confirmou dados anteriores de que a linhagem MDX apresenta déficit funcional em torno de 30% em relação aos camundongos C57BL/10. O tratamento com PGB melhorou o SFI de modo que em certos pontos de tempo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens. Isso se tornou claro no ponto final do experimento, onde os camundongos MDX tratados com veículo foram significativamente piores do que os outros grupos experimentais (\*\* p <0,01, Tabela 6).



**Figura 9** - Índice funcional isquiático (SFI) em camundongos C57BL/10 e MDX. Observe a melhoria geral dos camundongos MDX tratados com PGB em comparação com o veículo. N = 5 por grupo. \* p <0,05; \*\* p <0,01. Média ± SEM.

**Tabela 6** Índice funcional do isquiático - SFI durante os 28 dias de tratamento com PGB.

Grupos					
Ensaio	Dias tratamento	BL-Veículo	BL-PGB	MDX-Veículo	MDX-PGB
	5º dia	-7.6 ± 2.8	-9.3 ± 1.8	-29.3 ± 1.2	-19.5 ± 4.8
	8º dia	-9.2 ± 2.0	-13 ± 1.8	-29.0 ± 3.3	-14.4 ± 2.7
CatWalk	15º dia	-7.3 ± 1.5	-9.1 ± 1.1	-27.1 ± 3.0	-15.3 ± 1.6
SFI	22º dia	-8.0 ± 2.3	-8.0 ± 1.9	-30.0 ± 1.8	-17.2 ± 1.9
	28º dia	-9.3 ± 2.3	-12 ± 1.7	-28.0 ± 3.3	-13.4 ± 2.4

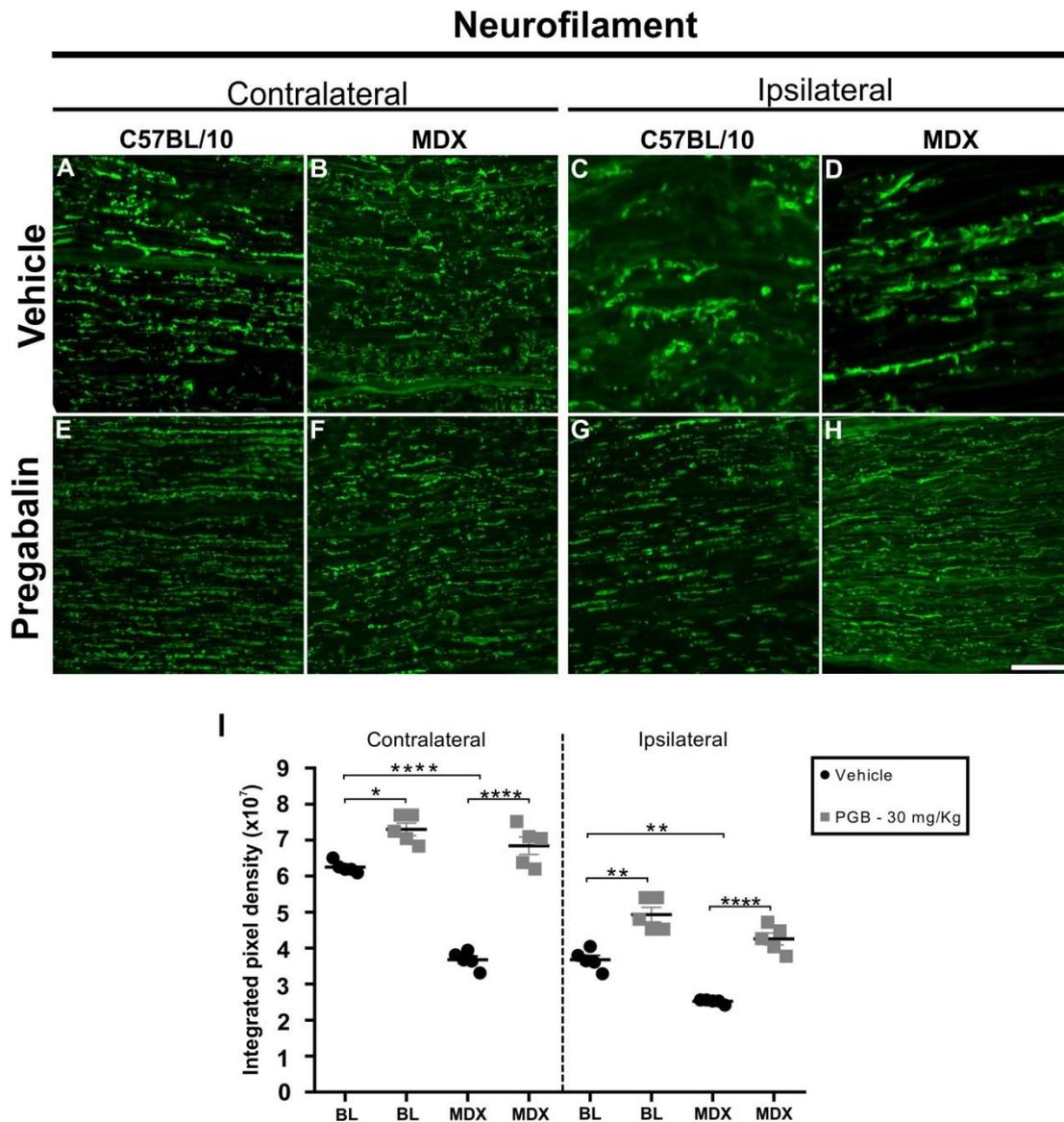
## 5. Resultados

### Parte II - Pregabalina sincroniza a regeneração axonal após lesão do nervo isquiático do músculo tibial cranial de camundongos MDX

#### 5.1 Pregabalina influência e padroniza a regeneração axonal do nervo periférico de camundongos MDX

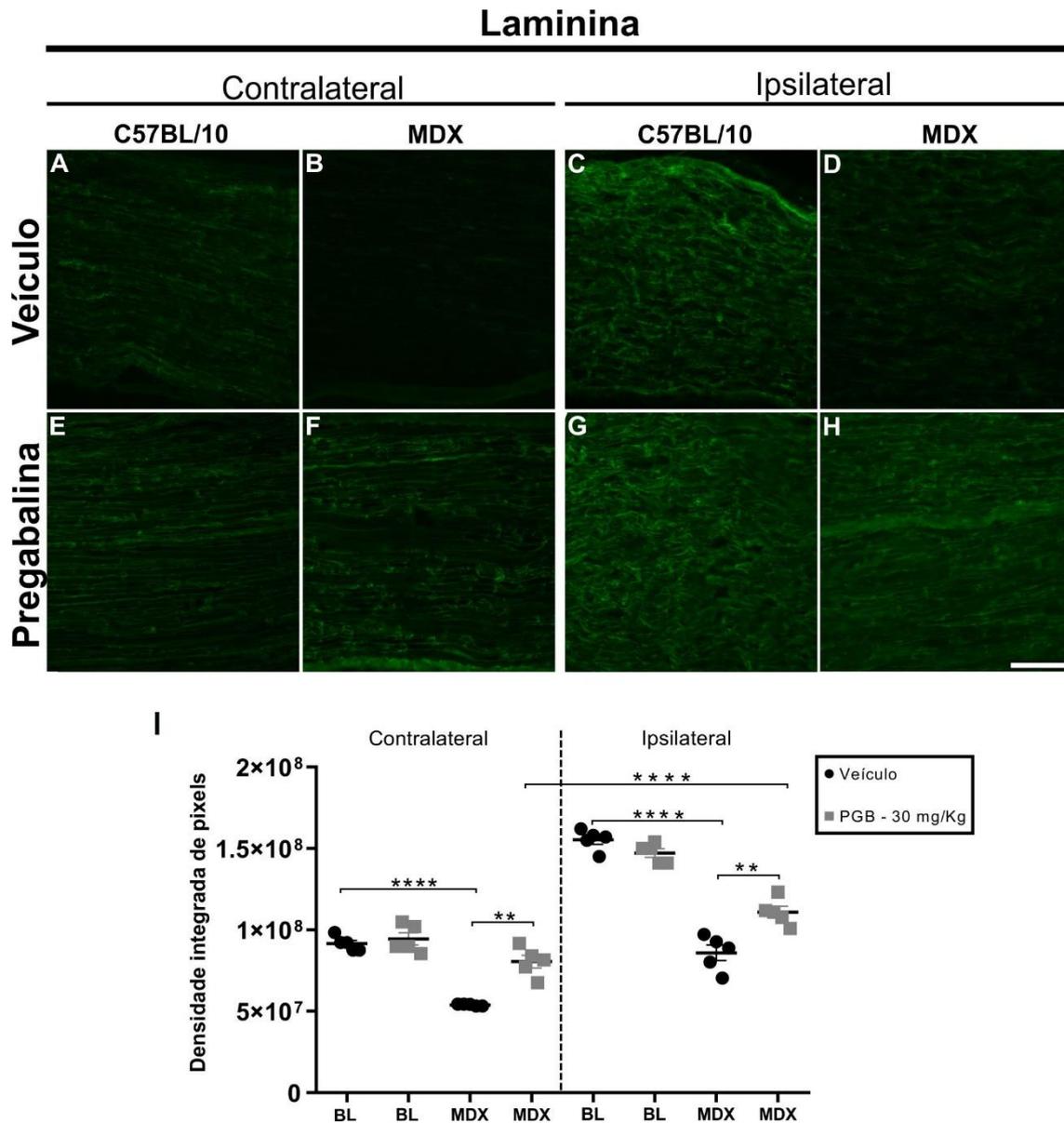
Após vinte e um dias de lesão por esmagamento do nervo isquiático e vinte oito dias de tratamentos, a Imunoistoquímica de neurofilamentos obtida do nervo periférico com lesão de ambas as linhagens, descreve uma perda significativa de marcação no nervo contralateral, MDX em comparação com o equivalente C57BL/10 (C57BL/10 veículo,  $6.2 \times 10^7 \pm 6.9 \times 10^5$  e MDX veículo,  $3.6 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^6$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 10A, B e I). Ocorrendo intensificação da perda após lesão periférica em ipsilateral (C57BL/10 veículo,  $3.6 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$  e MDX veículo,  $2.5 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^5$  \*\*  $p < 0,01$ , Figura 10C, D e I). É importante ressaltar que o tratamento com PGB resulta em expressão de neurofilamento mais intensa, tanto em C57BL/10 quanto em camundongos MDX. Contralateral (C57BL/10 PGB,  $7.3 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6$  \*  $p < 0,05$ , Figura 10E e I) e (MDX PGB,  $6.8 \times 10^7 \pm 2.4 \times 10^6$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 10F e 10I). Após lesão a intensidade aumentada de neurofilamento devido ao fármaco, também foi observada em ipsilateral de ambas as linhagens (C57BL/10 PGB,  $4.9 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^6$  \*\*  $p < 0,01$ , Figura 10G e I) e (MDX PGB,  $4.2 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p$

<0,0001, Figura 10H e I). A comparação entre as linhagens revelou que a PGB melhora a expressão de neurofilamentos nos MDX, atingindo níveis do controle veículo, nos nervos contralaterais e ipsilaterais (Figura 10F, A, H, C e I).



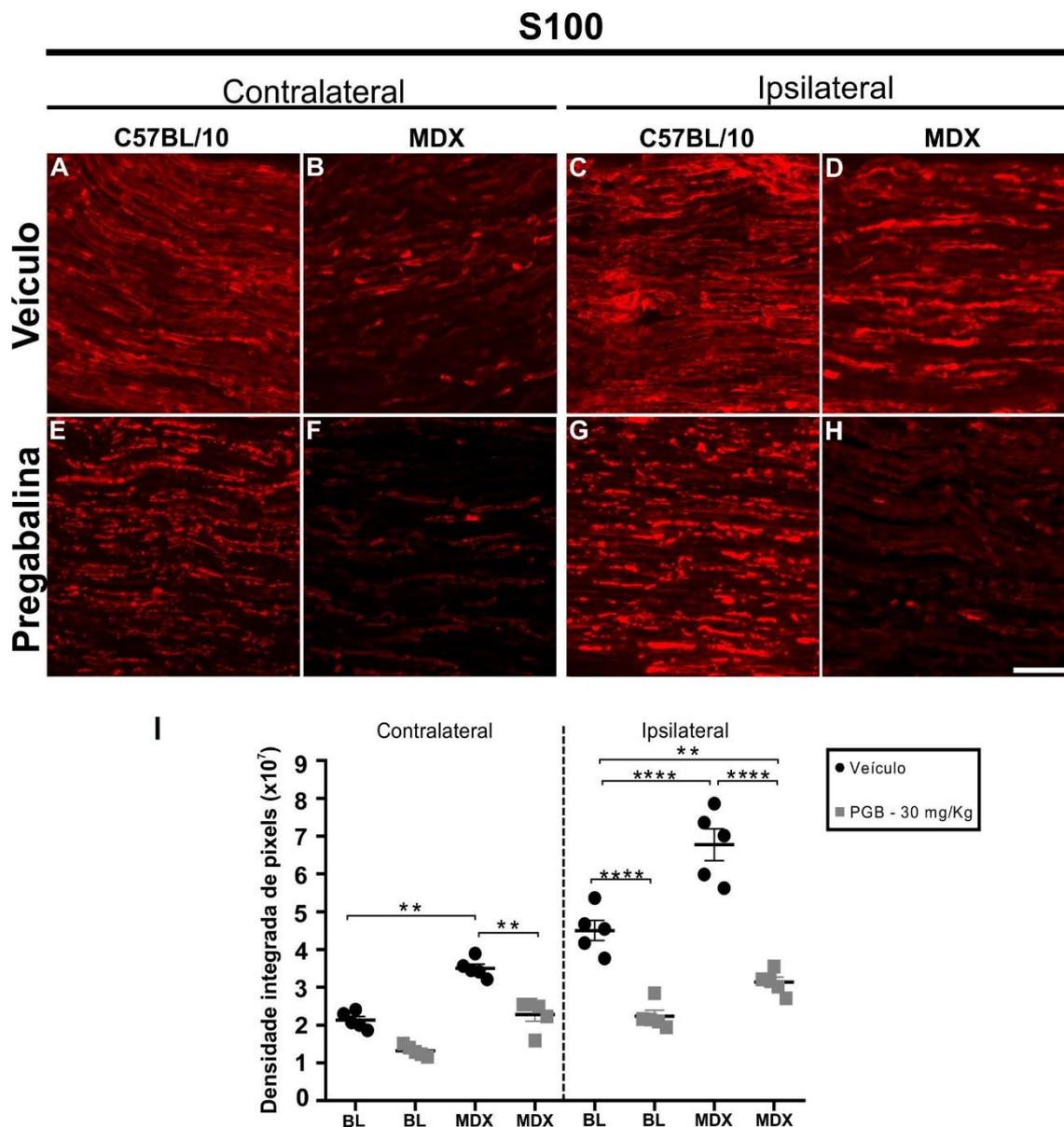
**Figura 10** - Imunoistoquímica anti-neurofilamento de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando a regulação positiva da marcação após a administração de PGB. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, ipsilateral. I - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

A imunohistoquímica com laminina indica baixa expressão no MDX com lesão contralateral e ipsilateral, significativamente menor do que em camundongos C57BL/10. Contralateral (C57BL/10 veículo,  $9.1 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^6$  e MDX veículo,  $5.3 \times 10^7 \pm 2.5 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 11A, B e I) e ipsilateral (C57BL/10 veículo,  $1.5 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^6$  e MDX veículo,  $8.5 \times 10^7 \pm 4.7 \times 10^6$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 11C, D e I). No entanto, o tratamento com PGB, aumentou a expressão de laminina nos nervos periféricos de camundongos MDX, contralateral (MDX PGB,  $8.0 \times 10^7 \pm 3.9 \times 10^6$  \*\*  $p < 0,01$ , Figura 11F e I) e ipsilateral (MDX PGB,  $1.1 \times 10^8 \pm 3.6 \times 10^6$  \*\*  $p < 0,01$ , Figura 11H e I), demonstrando que a expressão de laminina no nervo lesionado MDX PGB, foi significativamente maior do que em contralateral MDX PGB (ipsilateral,  $1.1 \times 10^8 \pm 3.6 \times 10^6$  e contralateral,  $8.0 \times 10^7 \pm 3.9 \times 10^6$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 11H, F e I).



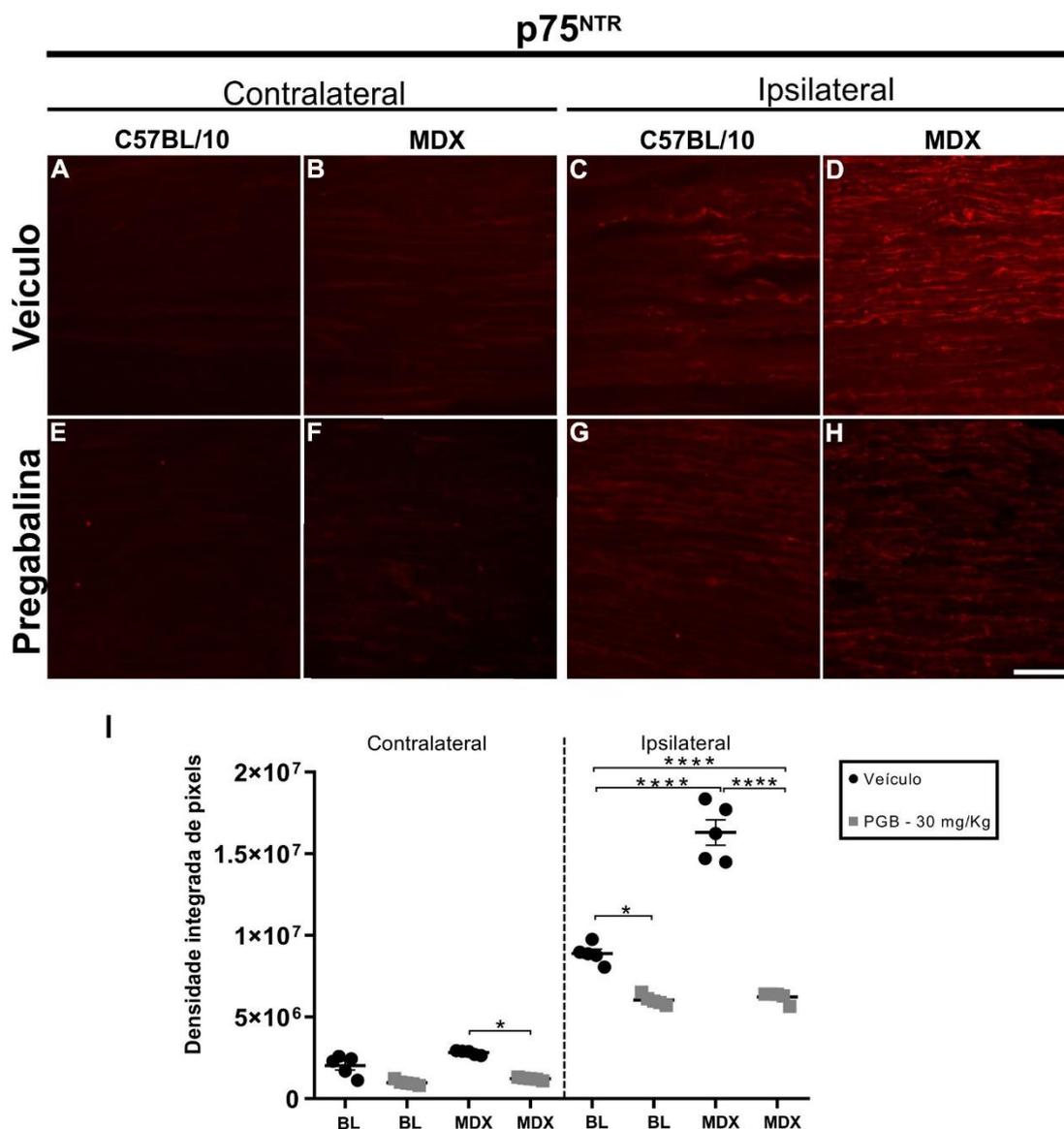
**Figura 11** - Imunoistoquímica anti-laminina de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando a regulação positiva da marcação após administração de PGB em camundongos MDX, B e F - MDX, contralateral. D e H - MDX, Ipsilateral. I - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Para investigar melhor os efeitos da PGB nas células de Schwann pró-mielinizantes, após lesão periférica, avaliamos a imunorreatividade contra a proteína S100 de ligação ao cálcio, observada sobre a regulação positiva em camundongos MDX com lesão nervosa periférica, contralateral (MDX veículo,  $3.5 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$  e C57BL/10 veículo,  $2.1 \times 10^7 \pm 9.9 \times 10^5$  \*\*p <0,01 Figura 12B, A e I) e ipsilateral (MDX veículo,  $6.7 \times 10^7 \pm 4.1 \times 10^6$  e C57BL/10 veículo,  $4.5 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^6$  \*\*\*\* p <0,0001 Figura 12D e I). Quando tratadas com PGB, ambas as linhagens semearam a regulação negativa de S100, sendo mais significativas em camundongos MDX, em nervo contralateral (MDX PGB,  $2.2 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^6$  \*\* p <0,01, Figura 12F e I) e ipsilateral (C57BL/10 PGB,  $2.2 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^6$  \*\*\*\* p <0,0001, Figura 12G e I e MDX PGB,  $3.1 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^6$  \*\*\*\* p <0,0001, Figura 12H e I). Podemos observar que a PGB em camundongos MDX ipsilateral induziu menor expressão de S100 do que na linhagem C57BL/10 ipsilateral veículo (MDX PGB,  $3.1 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^6$  e C57BL/10 veículo,  $4.5 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^6$  \*\* p <0,01 Figura 12H, C e I).



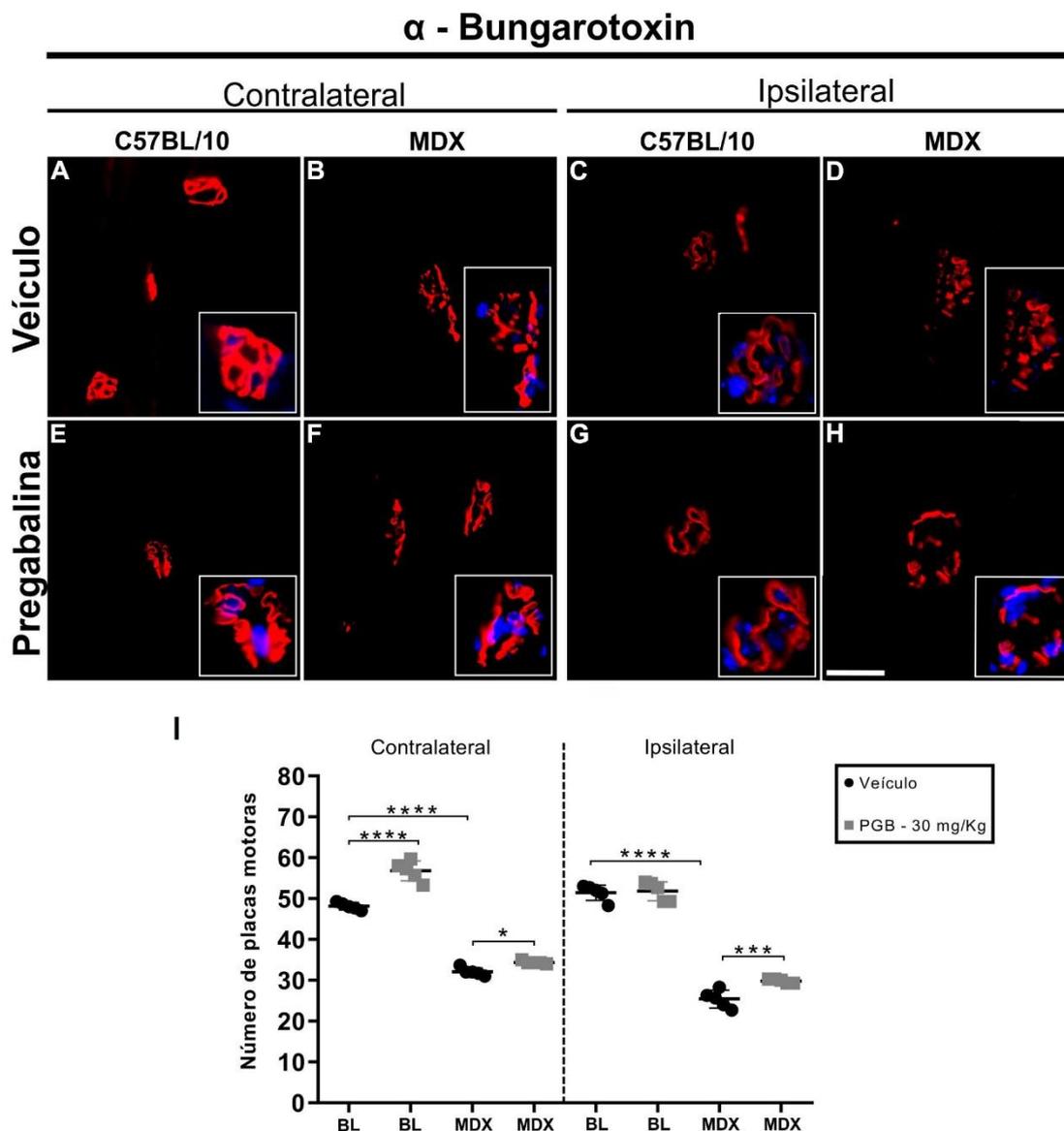
**Figura 12** - Imunoistoquímica anti-S100 de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando a regulação negativa da expressão, após administração de PGB. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. I - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Além disso, o tratamento com PGB resultou na diminuição da expressão de p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas), vinte e um dias após lesão nervosa, em ambas as linhagens, camundongos MDX (contralateral PGB,  $1.2 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^4$  \*  $p < 0,05$ , Figura 13F e I), camundongos C57BL/10 (ipsilateral PGB,  $6.0 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$  \*  $p < 0,05$ , Figura 13G e I) e sendo mais proeminente em MDX (ipsilateral PGB,  $6.2 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 13H e I), uma vez que nos animais distróficos veículo a imunorreatividade foi maior do que na contraparte PGB (MDX veículo contralateral  $2.8 \times 10^6 \pm 5.9 \times 10^4$  \*  $p < 0,05$ , Figura 13B e I e ipsilateral veículo  $1.6 \times 10^7 \pm 7.7 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 13D e I). Notamos que após lesão na linhagem distrófica, a PGB reduziu a expressão de receptores de baixa afinidade, abaixo da linhagem controle veículo (MDX PGB ipsilateral,  $6.2 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$  e C57BL/10 veículo ipsilateral,  $8.8 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^5$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 13H, C e I).



**Figura 13** - Imunoistoquímica de p75<sup>NTR</sup> (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas) de seções longitudinais do nervo isquiático, três semanas após o esmagamento, revelando regulação negativa de marcação após administração de PGB em camundongos C57BL/10 e MDX. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. E - Quantificação da densidade integrada de pixels e significância estatística das comparações intergrupos. \*p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001. Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

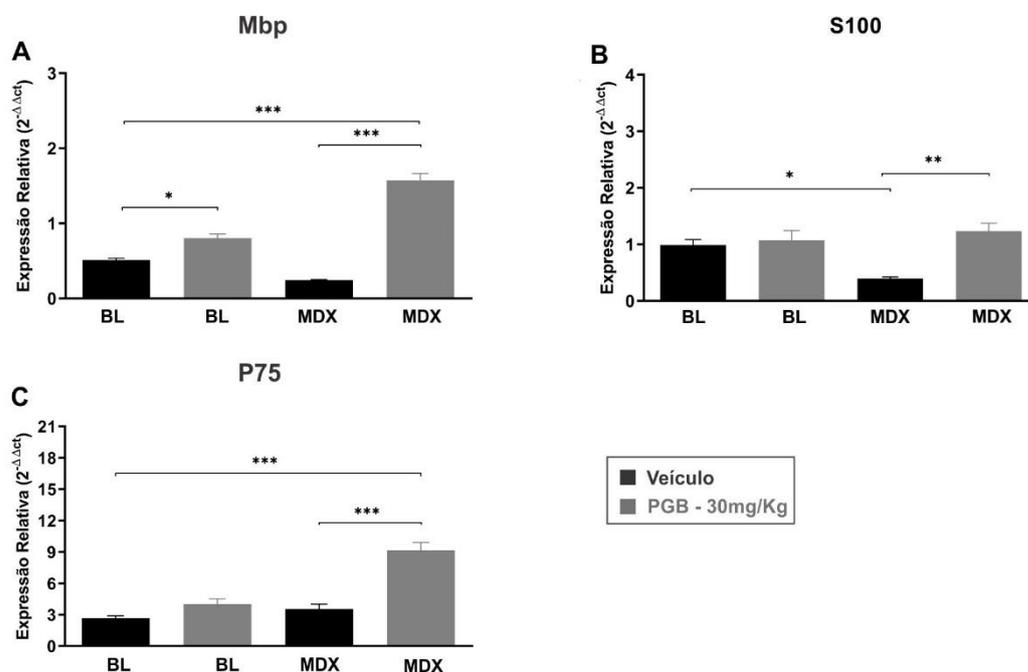
A avaliação das placas motoras representou um déficit em camundongos distróficos MDX confirmado em grupos sem lesão e agora após lesão nervosa, em comparação com C57BL/10 contralateral ( C57BL/10 veículo,  $48,13 \pm 0,40$  e MDX veículo,  $32,07 \pm 0,44$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 14I) e ipsilateral ( C57BL/10 veículo,  $51,47 \pm 0,83$  e MDX veículo,  $25,40 \pm 0,97$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Figura 14I). Porém é importante observar que o tratamento com PGB associado a regeneração axonal após lesão, aumentou o número de junções neuromusculares na linhagem controle C57BL/10 contralateral (C57BL/10 PGB,  $56,80 \pm 1,07$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 14I). E na linhagem distrófica MDX, contralateral (MDX PGB,  $34,40 \pm 0,16$  \*  $p < 0,05$ , Figura 14I) e ipsilateral (MDX PGB,  $29,86 \pm 0,22$  \*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 14I). Além disso, também preservou a morfologia das placas motoras reduzindo a fragmentação e área de contato com a fibra muscular, comparando com MDX veículo (Figura 14F e B; 14H e D; dados não quantificados), aumentando a celularidade nos terminais nervosos, dado a observação de núcleos positivos para DAPI (Figura 14F e B; 14H e D).



**Figura 14** - Receptores pós-sinápticos de acetilcolina (coloração com  $\alpha$ -bungarotoxina) nas placas terminais motoras dos músculos tibiais craniais de camundongos C57BL/10 e MDX, três semanas após o esmagamento. A e E - C57BL/10, B e F - MDX, contralateral. C e G - C57BL/10, D e H - MDX, Ipsilateral. I - Número reduzido de junções neuromusculares na linhagem MDX tratada veículo. Porém a PGB aumentou o número de placas terminais encontradas em camundongos C57BL/10 e MDX melhorando a morfologia das placas terminais motoras destes camundongos distróficos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM. Barra de escala: 25 $\mu$ m.

## 5.2 PGB modificam níveis basais dos transcritos gênicos de células de Schwann no nervo isquiático em regeneração após lesão periférica

Os níveis de transcrição da proteína básica da mielina - MBP foram regulados positivamente em camundongos C57BL/10 e MDX após tratamento com PGB e lesão periférica (C57BL/10 \*  $p < 0,05$ , Figura 15A e MDX \*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 15A). Além disso, as células de Schwann dos camundongos MDX tratados com PGB aumentaram os transcritos MPB após lesão, transpondo da linhagem controle veículo (\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 15A). Os níveis de transcrição do gene S100 foram regulados negativamente em camundongos MDX em comparação com C57BL/10 (\*  $p < 0,05$ , Figura 15B). E mostraram regulação positiva significativa no grupo MDX tratado com PGB (\*\*  $p < 0,01$ , Figura 15B). A análise dos transcritos do gene p75<sup>NTR</sup> demonstrou que o tratamento com PGB regulou positivamente os níveis em MDX, (\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 15C) após lesão nervosa, ultrapassando os níveis também da linhagem controle veículo (\*\*\*  $p < 0,001$ , Figura 15C). Os dados de quantificação são detalhados na Tabela 7.



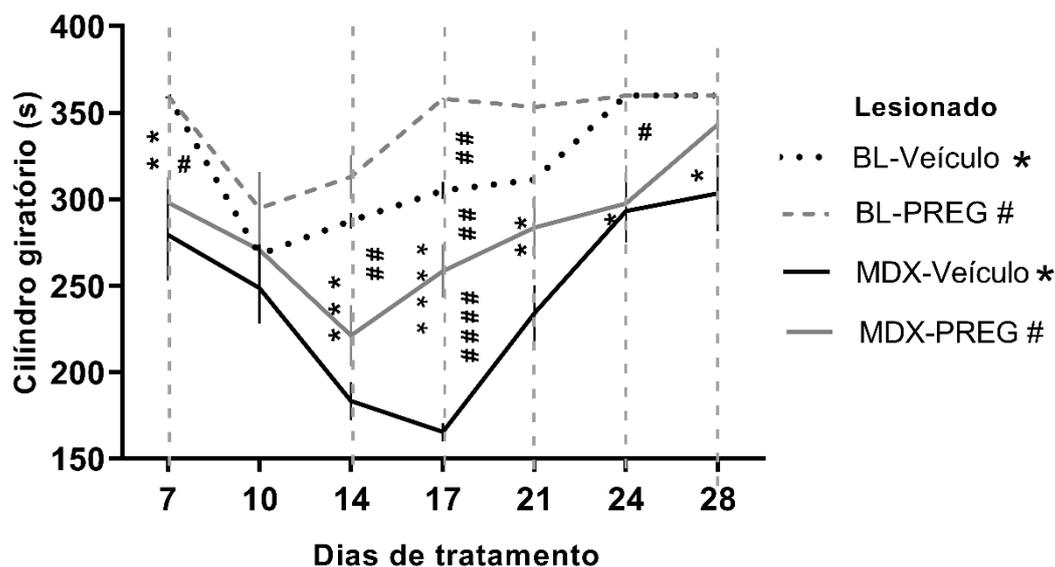
**Figura 15** - Quantificação relativa da expressão de transcritos gênicos da proteína básica da mielina Mbp (A), S100 (B) e P75<sup>NTR</sup> (C) no nervo isquiático, três semanas após o esmagamento e tratamento com PGB, iniciando uma semana antes da lesão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Média  $\pm$  SEM.

**Tabela 7** Expressão relativa de transcritos gênicos no nervo isquiático após o tratamento com PGB e lesão nervosa periférica.

		Grupos			
Tecido	Genes	BL-Veículo	BL-PGB	MDX-Veículo	MDX-PGB
Nervos isquiáticos Ipsilaterais	Mbp	0.51 ± 0.02	0.80 ± 0.05	0.24 ± 0.00	1.57 ± 0.09
	S100	0.99 ± 0.09	1.07 ± 0.17	0.39 ± 0.02	1.23 ± 0.14
	P75	2.68 ± 0.21	4.01 ± 0.51	3.54 ± 0.48	9.17 ± 0.74

### 5.3 Tratamentos com PGB pode ser associado ao crescimento axonal após lesão e melhora o desempenho da marcha em camundongos MDX

Os camundongos MDX possuem déficit significativo no desempenho motor, com nervos periféricos íntegros (Figura 8) ou visto no sétimo dia de tratamento que antecede a lesão e todos os dias de testes após (Figura 16), relatado através de locomoção forçada pelo teste do rotarod, reduzindo o tempo gasto na barra rotativa em relação ao C57BL/10 veículo (\*\* p <0,01, 7º dia; \*\*\* p <0,001, 14º; \*\*\*\* p <0,0001, 17º; \*\* p <0,01, 21º; \* p <0,05, 24º e 25º dia, Fig. 16, Tabela 8). Porém é importante ressaltar que camundongos distróficos e com axônios em regeneração após lesão nervosa periférica, quando tratados com PGB, notadamente aumentaram o tempo de permanência no cilindro giratório. Isso pode ser confirmado no 17º dia de tratamento com PGB, e 10º dia, após lesão nervosa periférica (\*\*\*\* p <0,0001, Figura 16), sem diferenças estatísticas e atingindo o nível de C57BL/10, veículo e PGB de performance no 28º dia.



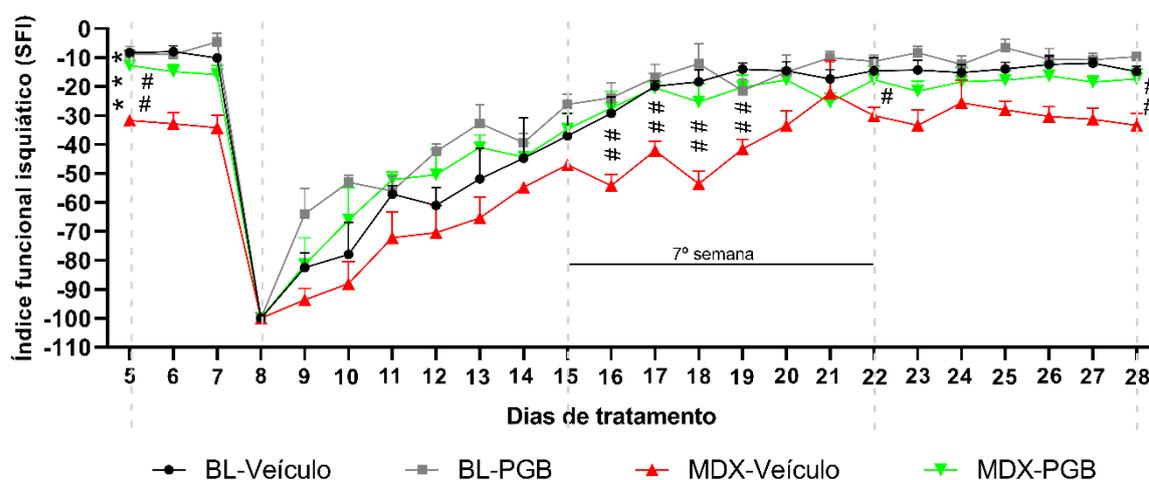
**Figura 16** - Locomoção forçada demonstrando o déficit motor na linhagem distrófica MDX, aumentada após esmagamento do nervo isquiático. Observe a melhora funcional com tratamento PGB, no 17º dia de teste e subsequente adaptação dos camundongos MDX. C57BL/10 - n = 5 por grupo, MDX - n = 9 por grupo. \*/# p <0,05; \*\*/## p <0,01; \*\*\*p <0,001; \*\*\*\*/#### p <0,0001. Média ± SEM.

**Tabela 8** - Dados do teste do Rotarod, 21 dias após lesão e 28 dias de tratamento com PGB em camundongos controles e distróficos.

		Grupos			
Ensaio	Dias tratamento em 7 Testes	BL-Veículo	BL-PGB	MDX-Veículo	MDX-PGB
Rota rod	7º dia	360 ± 0	360 ± 0	279,5 ± 26,47	298,1 ± 14,71
	10º dia	268,1 ± 11,31	294,9 ± 21,06	248,7 ± 20,41	270,7 ± 10,76
	14º dia	287,6 ± 4,65	312,9 ± 12,69	183,4 ± 10,98	221,3 ± 17,70
	17º dia	305,1 ± 4,97	358 ± 0,51	165,5 ± 5,28	258,5 ± 15,37
	21º dia	311,4 ± 2,72	353,4 ± 3,47	234,2 ± 16,2	283,6 ± 18,08
	24º dia	360 ± 0	360 ± 0	293,2 ± 18,25	297,5 ± 22,01
	28º dia	360 ± 0	360 ± 0	303,5 ± 22,17	343,2 ± 8,71

#### **5.4 Tratamentos com PGB pode ser associado a fatores neurais pró-regenerativos e induzem melhora no desempenho da marcha espontânea em camundongos MDX**

O desempenho locomotor dos grupos experimentais com lesão nervosa periférica, também foi avaliado pelo teste de trilha de caminhada espontânea (sistema CatWalk). Assim, o índice funcional do isquiático - SFI (Figura 17), confirmou dados anteriores do grupo sem lesão (Figura 9) de que a linhagem MDX apresenta déficit funcional em relação aos camundongos C57BL/10, (\*\*\*)  $p < 0,001$ , Figura 17, Tabela 9), devido aos constantes ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares e potencializada com a lesão no nervo por esmagamento. Porém no pré-tratamento, ou seja, antes da lesão a PGB já demonstrou melhora no SFI, de camundongos MDX, (\*\*  $p < 0,01$ , 5º dia de tratamento, Figura 17) influenciando rapidamente a recuperação funcional, observada pela ascensão da curva a partir do segundo dia após lesão (9º dia de tratamento) de modo que em certos pontos de tempo foi observado diferenças estatisticamente significativas comparando com MDX veículo, principalmente do 16º até o 19º e 22º dia de tratamento (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , Figura 17, 7º semana de vida). Atingindo o nível de caminhada espontânea dos grupos C57BL/10 veículo e PGB, em vários testes consecutivos e no 28º dia de tratamento e ponto final do experimento, onde os camundongos MDX tratados com veículo foram significativamente piores do que os outros grupos experimentais (\*\*  $p < 0,01$ , Tabela 9).



**Figura 17** - Índice funcional isquiático (SFI) em camundongos C57BL/10 e MDX. Observe a melhora geral dos camundongos MDX tratados com PGB após lesão nervosa periférica, na sexta semana de vida. Principalmente na 7ª semana de vida em comparação com o veículo (\*Veículo e # PGB). N = 5 por grupo. #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Média  $\pm$  SEM.

**Tabela 9** - Índice funcional do isquiático - SFI após 21 dias de lesão e durante os 28 dias de tratamento com PGB.

Grupos					
Ensaio	Dias tratamento	BL-Veículo	BL-PGB	MDX-Veículo	MDX-PGB
	5º dia	-8,28 $\pm$ 1,47	-8,71 $\pm$ 2,51	-31,7 $\pm$ 1,8	-12,72 $\pm$ 5,11
	8º dia	-100 $\pm$ 0,0	-100 $\pm$ 0,0	-100 $\pm$ 0,0	-100 $\pm$ 0,0
	15º dia*	-36,99 $\pm$ 7,78	-26,16 $\pm$ 3,51	-46,95 $\pm$ 1,90	-34,64 $\pm$ 5,52
Índice	16º dia*	-29,21 $\pm$ 5,56	-23,91 $\pm$ 5,25	-54,27 $\pm$ 3,98	-27,41 $\pm$ 5,75
Funcional	17º dia*	-19,87 $\pm$ 1,91	-16,91 $\pm$ 4,65	-42,09 $\pm$ 3,29	-20,4 $\pm$ 5,06
Isquiático	18º dia*	-18,32 $\pm$ 4,07	-12,14 $\pm$ 7,04	-53,61 $\pm$ 4,35	-25,29 $\pm$ 6,25
	19º dia*	-14 $\pm$ 2,06	-21,42 $\pm$ 3,95	-41,59 $\pm$ 3,36	-20,17 $\pm$ 4,15
	22º dia*	-14,52 $\pm$ 4,50	-11,26 $\pm$ 2,05	-30,0 $\pm$ 2,82	-17,63 $\pm$ 4,70
	28º dia	-13,45 $\pm$ 1,65	- 8,52 $\pm$ 1,65	-30,82 $\pm$ 4,40	-20,04 $\pm$ 4,67

\* Referente a 7ª semana de vida

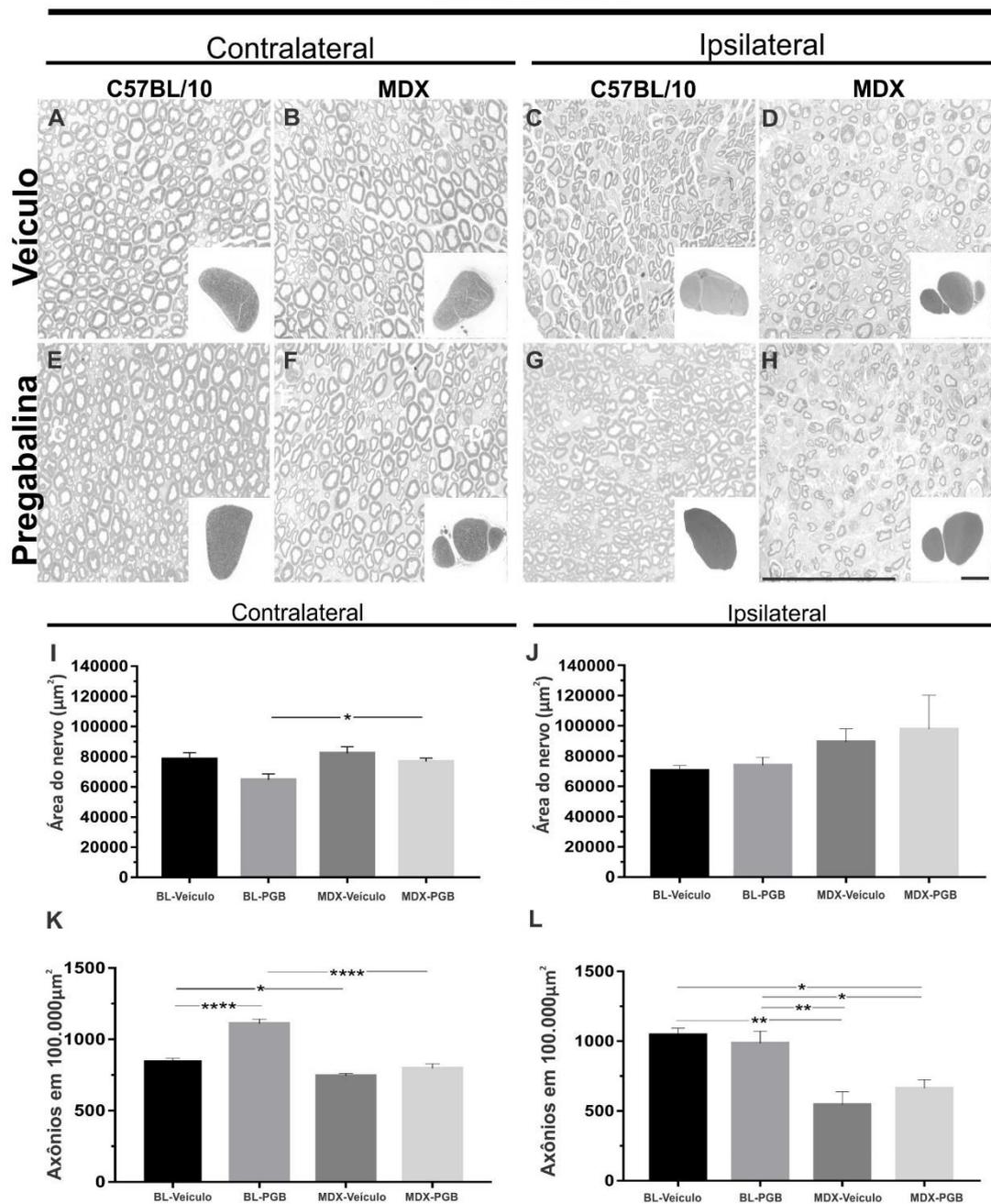
## 6. Resultados

**Parte III - Pregabalina melhora a mielinização, otimizando a regeneração axonal após lesão do nervo isquiático, influenciando positivamente o músculo tibial cranial em camundongos MDX.**

### 6.1 Pregabalina influencia mielinização axonal no nervo periférico de camundongos MDX e controle.

Figura 18, mostra as imagens de cortes semifinos de nervo contralateral e ipsilateral vinte e um dia após a lesão por esmagamento, demonstrando que área do nervo contralateral MDX tratado com PGB é maior em comparação com o grupo controle C57BL/10-PGB (MDX  $8 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ; C57BL/10  $6 \times 10^4 \pm 4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ , \* $p < 0,05$ , Figura 18e 18I) e tendência em aumentar a área do nervo em MDX-PGB, após lesão, comparando com grupo controle veículo ipsilateral, ( MDX  $10 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ; C57BL/10,  $7 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ , Figura 18H e 18J). Para relacionar a área ao número de axônios, calculamos o número médio de axônios regenerados por  $100.000 \mu\text{m}^2$  (Figura 18K-L). Essa proporção deu que a linhagem MDX contralateral, ambos tratamentos veículo e PGB, possui menor número de fibras mielínicas em comparação com a linhagem controle (veículo MDX,  $744 \pm 16$  axônios/ $100.000 \mu\text{m}^2$ ; C57BL/10,  $854 \pm 13$  \* $p < 0,05$ , Figura 18B-A e 18K; PGB MDX,  $795 \pm 34$ ; C57BL/10,  $1109 \pm 33$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Figura 18F-E e 18K). E na linhagem controle contralateral tratado com PGB mostrou aumento do número de fibras mielínicas em comparação com veículo (PGB,  $1109 \pm 33$ ; veículo,  $854 \pm 13$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Figura 18E-A e 18K). Ocorrendo também redução do número de fibras mielínicas entre a linhagem MDX comparando com C57BL/10, após lesão em ipsilateral veículo (MDX,  $545 \pm 92$ ; C57BL/10,  $1044 \pm 49$  \*\* $p < 0,01$ , Figura 18D-C e 18L). Porém, quando tratamos os camundongos MDX com PGB a redução foi menor em relação a linhagem controle veículo (MDX,  $662 \pm 62$ ; C57BL/10,  $1044 \pm 49$  \* $p < 0,05$ , Figura 18H-C e 18L).

## Morfometria

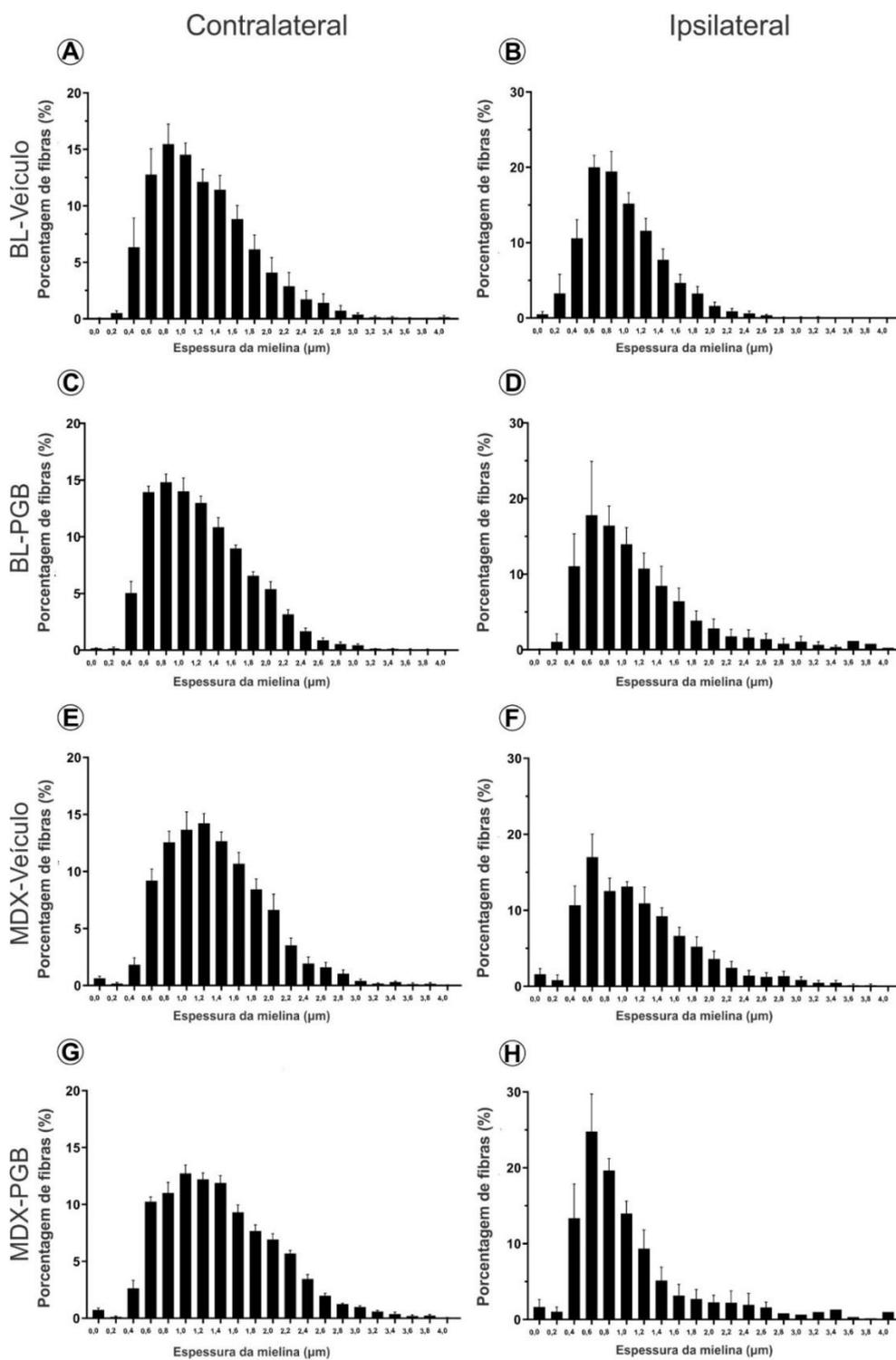


**Figura 18** – Vistas ampliadas e panorâmicas de secções transversais dos nervos de camundongos C57BL/10 e MDX, contralaterais (A e B, veículos); (E e F, PGB) e regenerados, ipsilaterais (C e D, veículos) e (G e H, PGB). Barra de escala: 100 $\mu\text{m}$  e 25 $\mu\text{m}$ . Gráficos representando em contralaterais (I) e ipsilaterais (J) a área total dos nervos em  $\mu\text{m}^2$ . E gráficos contralaterais (K) e

ipsilaterais (L), apresentando estimativa do número de fibras mielínicas em  $100.000 \mu\text{m}^2$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Média  $\pm$  SEM.

## **6.2 Análises morfométricas da espessura da bainha de mielina dos axónios**

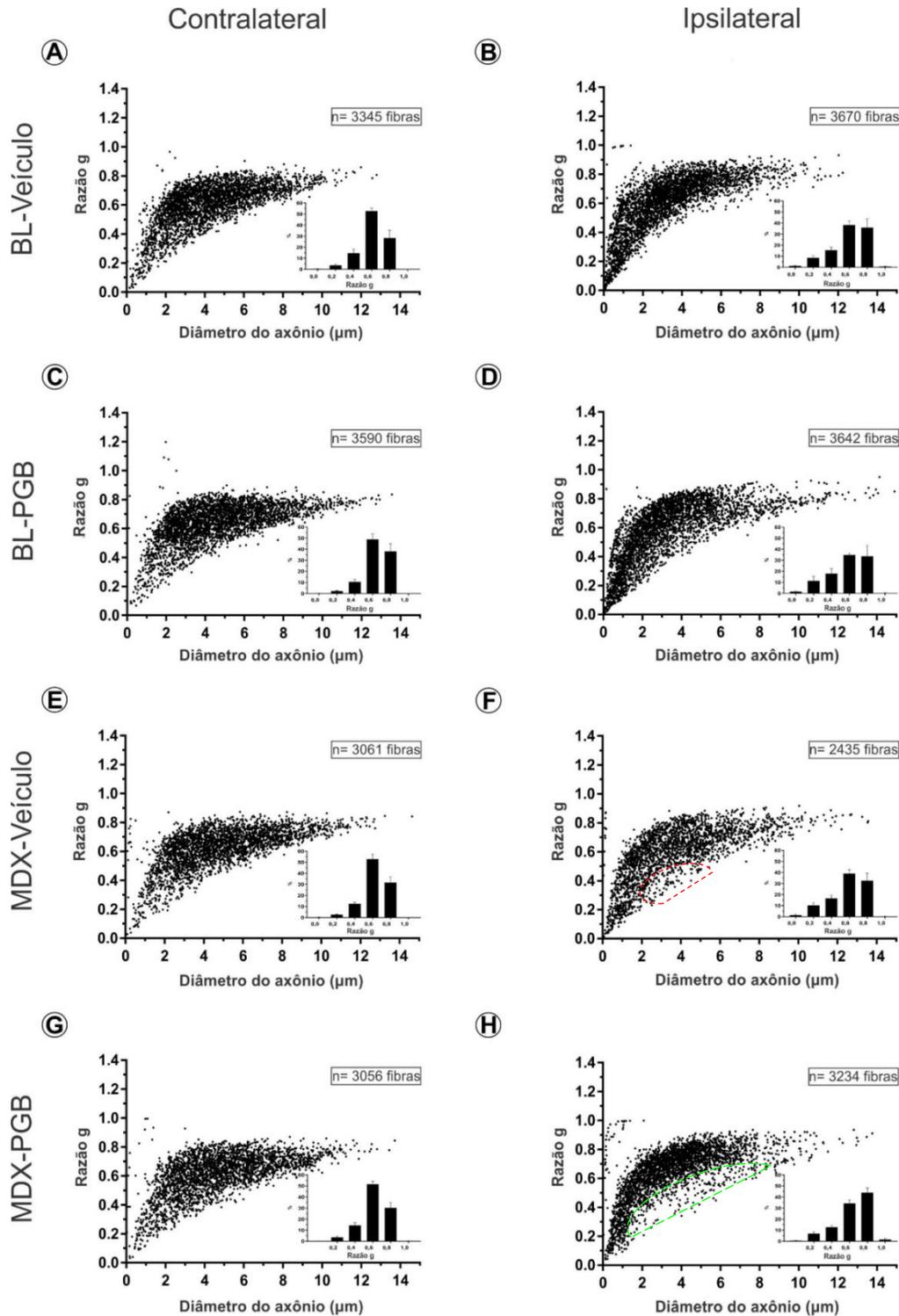
Os nervos contralaterais apresentaram fibras nervosas com espessura da bainha de mielina (EM) variando entre 0,0 e 4,0  $\mu\text{m}$  com média de  $1.30 \pm 0.20 \mu\text{m}$  C57BL10 veículo,  $1.21 \pm 0.06 \mu\text{m}$  C57BL10 PGB,  $1.34 \pm 0.10 \mu\text{m}$  MDX veículo e  $1.39 \pm 0.05 \mu\text{m}$  MDX PGB. A curva de distribuição de (EM), dos nervos contralaterais, mostra maiores percentuais de fibras estavam nos intervalos de 0,4 a 1,8  $\mu\text{m}$ , total de (88%) das fibras em controle veículo e controle PGB, 0,4 a 1,8  $\mu\text{m}$ , (93%). Figura 19A e 19C. Em MDX veículo, 0,6 a 2,0  $\mu\text{m}$ , (88%) e MDX-PGB, 0,6 a 2,0  $\mu\text{m}$ , (88%). Figura 19E e 19G. Vinte e um dia após lesão nervosa periférica, axónios regenerados foram apresentados com (EM) variando entre 0,0 a 4,0  $\mu\text{m}$ . Com (EM) média de ( $0,90 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ) em nervos ipsilaterais, controle veículo, com curva de distribuição de maiores percentuais de fibras nervosas em intervalos de 0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$ , (77%). Figura 19B. Média de ( $1,09 \pm 0,33 \mu\text{m}$ ) em ipsilaterais controle PGB, com maiores percentuais de intervalos de 0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$ , (70%). Figura 19. Agora, nervos de camundongos MDX ipsilaterais veículo ficaram com a média de ( $1,18 \pm 0,20 \mu\text{m}$ ), com percentuais maiores em 0,4 a 1,4  $\mu\text{m}$ , (73%). Figura 19F. E MDX-PGB, com média de ( $0,92 \pm 0,28 \mu\text{m}$ ), e maiores percentuais entre 0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$ , (81%) com ênfase na porcentagem da (EM) de 0,6  $\mu\text{m}$ , (25%). Figura 19H.



**Figura 19** - Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina de fibras nervosas dos nervos contralateral (A,C,E,G) e ipsilateral (B,D,F,H) em diferentes grupos experimentais. Média  $\pm$  SEM.

### 6.3 Análises morfométricas da frequência geral da espessura da mielina

Qualitativamente, a distribuição de frequência geral da espessura da bainha de mielina em camundongos MDX, apresentou mais próxima do grupo controle contralateral, independente do tratamento, apesar de que, a frequência de fibras maiores tenha sido reduzida devido a lesão periférica mostrado em ipsilateral, exceto MDX-PGB, pelo qual, a razão "g" (razão do diâmetro axonal para o diâmetro da fibra), utilizado como um índice de mielinização ideal, mostrou que o tratamento com PGB, resulta em maior número de axônios maiores, 0,8  $\mu\text{m}$  de (RG) em animais distróficos comparando com os outros grupos contra e ipsilateral (Figura 20). Além da ausência de proeminência encontrada exclusivamente em ipsilateral MDX veículo, em intervalos entre 0,2 - 0,6 de razão g, como destacado em (F e H, Figura 20).



**Figura 20** - Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios e razão “g” (razão do diâmetro axonal pelo diâmetro da fibra) de cortes transversais dos nervos contralateral (A,C,E,G) e ipsilateral (B,D,F,H) em diferentes grupos experimentais. Observamos em (F e H), entre 0,2 - 0,6 de razão g, MDX tratado com PGB, demonstrando ausência da proeminência neste intervalo.

## 7. Discussão

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença que causa degeneração muscular progressiva, induzida por deficiência genética da proteína distrofina (118). Em animais jovens, o pico da doença é visto em torno de 6-8 semanas de vida, quando as miofibrilas dos músculos dos membros pélvicos, em camundongos distróficos MDX, mostram degeneração generalizada, inflamação crônica, combinada com ciclos de regeneração (119). Ressalte-se que, durante a degeneração e regeneração das miofibras, a comunicação bidirecional entre o axônio motor e as fibras musculares é prejudicada devido à fragmentação da placa motora. Por sua vez, as junções neuromusculares são afetadas e o terminal axonal entra em um ciclo de degeneração/regeneração (120). Além disso, também ocorre redução da área ativa dos terminais pré-sinápticos em associação com a membrana pós-sináptica, resultando no declínio da contratilidade muscular (121, 122).

Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que as alterações neuromusculares afetam retrogradamente o microambiente do sistema nervoso periférico. Assim, encontramos axônios mielinizados aberrantes no nervo isquiático de camundongos MDX de 8 semanas, juntamente com sinais de hipomielinização (75, 123). É importante ressaltar que neurônios de camundongos distróficos apresentam alterações no desenvolvimento de axônios e rede sináptica no sistema nervoso central. Estudos mostram que a gravidade da DMD não se restringe ao componente muscular, mas também afeta o sistema nervoso central e periférico (85, 111, 124-127). A esse respeito, dados anteriores mostraram destacamento sináptico mais intenso e diminuição significativa na expressão de sinaptofisina em motoneurônios alfa da medula espinhal de camundongos MDX. Isso foi interpretado como redução da atividade sináptica, conectada com aumento da astrogliose reativa e da reação microglial (123).

Os presentes resultados sobre a morfologia do nervo isquiático demonstram imunistoquímica significativamente reduzida anti-neurofilamento. Tal proteína estrutural contribui para a citoarquitetura do axônio e serve de arcabouço para o transporte de metabólitos e moléculas nas direções retrógrada e anterógrada, sendo que a regulação negativa observada indica

uma condição patológica em camundongos MDX comparativamente à linhagem C57BL/10, em linha com dados anteriores (75). Em consonância com isso, a diminuição da expressão da laminina tem sido relacionada a neuropatias periféricas, contribuindo para o déficit na condução nervosa, principalmente em humanos e animais MDX (15, 16, 40, 74).

O tratamento com PGB resultou em expressão de neurofilamento mais intensa em C57BL/10 e MDX, sugerindo brotamento axonal e formação mais organizada de cones de crescimento, que por sua vez aumentaram os mecanismos de reparo, mielinização e ganho de função, especialmente em camundongos MDX (127, 128). Igualmente, a expressão aumentada de laminina em animais distróficos, proteína da matriz extracelular que dá suporte às fibras mielinizadas (127, 128), indica efeito positivo do tratamento sobre as células de Schwann.

É importante notar que a administração de PGB resulta na regulação negativa da proteína de ligação ao cálcio S100 em camundongos distróficos jovens. Isso está de acordo com dados anteriores da literatura (15, 16), indicando uma melhora no metabolismo das células de Schwann, sendo mais significativa em camundongos MDX. Essa possível redução do influxo de cálcio pelo tratamento com PGB resultou na diminuição de p75NTR, um pan receptor de neurotrofinas. Isso foi significativamente mais proeminente em camundongos MDX, o que reforça a degeneração diminuída do axônio. Dados compatíveis com a presente pesquisa foram realizados em nosso laboratório mostrando que o aumento da expressão de p75NTR em nervos isquiáticos de animais MDX está associado a processos degenerativos (75, 127). Um achado importante do presente trabalho é que a administração de PGB preservou a morfologia das placas motoras em camundongos MDX, aumentando o número e a celularidade nas terminações nervosas, dada a observação de núcleos DAPI positivos. Isso pode indicar uma resposta reparadora do neurônio e das células de Schwann, como brotamento axonal em direção às fibras musculares regeneradas, contribuindo para a manutenção das junções neuromusculares funcionais (129, 130). Além disso, a PGB não alterou a expressão do gene GAP43 em animais MDX e mostrou níveis relativamente baixos de transcrição do gene BDNF, reforçando a homeostase aumentada (131, 132). O aumento

significativo de TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TGF- $\beta$  em animais C57BL/10, entretanto, apontam para possíveis efeitos colaterais da droga em animais normais (133, 134).

Em linha com o acima discutido, os níveis de transcritos gênicos, também dos nervos periféricos, como a proteína básica da mielina – MBP, se mostraram regulados negativamente em camundongos MDX em comparação com C57BL/10, na ausência de tratamento com PGB. No entanto, a administração de PGB indicou uma tendência de regulação positiva em ambos os grupos. Por sua vez, a regulação positiva da transcrição do gene para S100 nos forneceu evidências de possíveis influências homeostáticas da PGB em reduzir o influxo de cálcio, no metabolismo das células de Schwann. Tal fato contribui, possivelmente, para a homeostase do microambiente do nervo periférico de camundongos C57BL/10, influenciando o contato axonal e maturação dos mecanismos de mielinização (133, 134). Tais resultados se associaram à regulação negativa dos transcritos do gene p75NTR, indicando que a PGB acelerou a maturação dos nervos em ambas as linhagens, uma vez que a transcrição elevada de p75NTR está relacionada com neurodegeneração (135-137).

Digno de nota destaca-se a ausência de correlação direta entre os resultados da imunistoquímica e do RT-PCR, em relação ao S100 e ao p75NTR, indicando que o perfil de expressão gênica é significativamente diferente dos níveis proteicos. Assim, é possível que mecanismos intermediários ocorram entre a expressão do mRNA e a tradução da proteína. Uma vez que não investigamos tais eventos, mais estudos serão necessários para compreender tais achados. No entanto, os dados de imunistoquímica se correlacionaram melhor com o comportamento homólogo, reforçando que a PGB produz expressão de proteínas-chave e próxima à função motora normal.

Nossos resultados confirmaram que camundongos MDX possuem déficit significativo no desempenho motor, conforme visto pelo teste de locomoção forçada no rotarod, que foi momentaneamente agravado pela administração de PGB. Esse efeito colateral, por um lado, era esperado devido à tontura e sonolência relacionadas aos análogos da gabapentina. Por outro lado, a prostração em camundongos MDX pode ser mioprotetora, evitando o

agravamento da fragmentação da placa motora, como visto na marcação de alfa-bungarotoxina (138, 139). Apesar disso, os animais MDX demonstraram adaptação funcional ao treinamento forçado após a terceira sessão de treinamento, atingindo níveis de controle a partir do 21<sup>o</sup> dia de tratamento.

O desempenho locomotor medido pelo teste de trilha de caminhada (sistema CatWalk), confirmou que a linhagem MDX apresenta déficit de marcha (75, 127). É importante ressaltar que o tratamento com PGB melhorou a função motora, resultando em um padrão de deambulação mais regular em camundongos MDX, de modo que, em certos casos, nenhuma diferença estatística foi observada entre as linhagens. Isso ficou claro no ponto final do experimento, onde camundongos MDX, tratados com veículo, foram significativamente piores do que os outros grupos experimentais, possivelmente devido à fase aguda bem estabelecida dos ciclos de degeneração muscular (85, 140-142).

Diante dos resultados apresentados na parte I do presente trabalho, demonstramos que a PGB induz efeitos benéficos ao microambiente axonal periférico e sobre as células de Schwann. Em sequência, implementamos as partes II e III da proposta experimental, introduzindo a axotomia periférica. Assim, a possibilidade de realizarmos lesão do nervo isquiático para maximizar o quadro clínico do camundongo MDX se justifica no sentido de sincronizar a desnervação muscular, em analogia aos déficits motores em pacientes DMD. Para melhor elucidarmos os efeitos da PGB, em sincronizar a retração e regeneração axonal com a regeneração das fibras musculares, optamos pelo esmagamento do nervo isquiático, que permite regeneração espontânea e relativamente rápida em animais normais. Como relatado em estudo anterior, pela mesma técnica de lesão, tratamento farmacológico e dose. Isto é, por esmagamento de nervo isquiático e PGB, 30mg/Kg/dia, demonstrando regeneração nervosa periférica e melhora no (SFI), após 28 dias da lesão (143). Esta abordagem permitiu avaliar se o tratamento com PGB acelera respostas fisiológicas do sistema nervoso de camundongos MDX, mesmo na presença de ciclos de desnervação e reinervação muscular.

Nosso estudo enfocou em análises de nervos isquiáticos das linhagens MDX e C57BL/10, após vinte e oito dias de tratamento com PGB e vinte e um

dias após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo. Inicialmente, através da imunistoquímica de neurofilamentos, observamos perda significativa de marcação no nervo contralateral MDX em comparação com o equivalente C57BL/10. Além disso, intensificamos essa perda, após lesão periférica em ipsilateral, reforçando resultados anteriores (75). No entanto, o tratamento com PGB atuando na redução do influxo de cálcio, interrompeu a perda e aumentou a expressão de neurofilamentos. Tal fato, limitou a degeneração e fortaleceu o citoesqueleto axonal, em razão do aumento de cálcio, participar da ruptura de neurofilamentos e microtúbulos axonais (144), melhorando a proteção e regeneração das fibras nervosas no microambiente dos nervos contralaterais e principalmente ipsilaterais, tanto em C57BL/10, como em camundongos MDX. Visto que, podemos observar neurofilamentos atingindo níveis de expressão da linhagem controle veículo, em axônios alinhados, reorganizados e direcionados, exibindo assim, regeneração satisfatória em busca das placas motoras das fibras musculares.

Além disso, sugerimos que essa modulação pela PGB, possa estar auxiliando os neurônios adaptados aos excessos deste íon nos processos de desnervação e inervação aleatória e lenta em camundongos MDX. Para uma melhor resposta, após outra lesão axonal, porém homogênea, induzida pelo esmagamento. Protegendo o microambiente, através da redução de atividade glial e cromatólise exacerbadas, melhorando e acelerando a homeostase pró-regenerativa. Com eficiência na reconstituição dos filamentos intermediários dos axônios, devido o suporte neuro-filamentar eficiente, como visto em nossos resultados no tratamento com PGB. Otimizando o brotamento axonal e a formação organizada de cones de crescimento, dentro dos envoltórios, constituídos por CS.

Por sua vez, outras moléculas estão envolvidas no processo de regeneração de fibras nervosas, como a proteína laminina das CS, na matriz extracelular, que auxiliam na orientação, prolongamento e mielinização axonal (74) e sua diminuição ou deleção, desencadeia redução da proliferação e/ou aumento da apoptose de CS, resultando em falhas na regeneração axonal, desmielinização, hipomielinização, mielinização anormal e redução da condução nervosa, em humanos e animais distróficos (48, 145-151). Esta

diminuição de laminina, foi observada nos nervos contralaterais e ipsilaterais da linhagem MDX, comparando com camundongos controles. Compatíveis com a literatura que demonstra deficiência na síntese de laminina em nervos isquiáticos de camundongos MDX (15, 16, 74, 152). De modo a reduzir esses danos, a PGB, aumentou a expressão da laminina nos nervos periféricos de camundongos MDX, contralaterais e principalmente ipsilaterais, superando a expressão do nervo contralateral. Efeitos benéficos, demonstrando que a PGB, atua na atividade metabólica pró-mielinizante das CS, dos animais distrofos. Uma vez que, camundongos knockout para laminina  $\gamma 1$  demonstram apoptose de CS e redução da mielinização axonal periférica (48, 153).

Na intenção de investigar e compreender os efeitos da PGB nas CS pró-mielinizantes, após lesão periférica, avaliamos a imunorreatividade contra a proteína S100 beta de ligação ao cálcio. Esta foi regulada positivamente em nervos de camundongos MDX, contralateral e ipsilateral em relação a linhagem controle, indicando distúrbios nas atividades das CS e/ou em maior número, associados ao brotamento e ramificações em JNM distróficas e acúmulo de proteínas devido autofagia prejudicada (15). Porém, em relatos da literatura, espera-se essa maior atividade e proliferação na primeira semana após lesão, principalmente nas primeiras 48h (154, 155). Nesse contexto, os animais tratados com PGB, tiveram regulação negativa da proteína S100, responsiva, por aumentar concentrações intracelulares de cálcio livre em células gliais e neuronais (156), sendo mais significativa a diminuição em camundongos MDX ipsilaterais, em comparação com a linhagem controle veículo no nervo ipsilateral. Sugerindo que a PGB, esteja conduzindo, melhor adaptação homeostática das CS, no microambiente retrogradamente distrófico e após lesão nervosa periférica.

Desta forma, as CS sob os efeitos do fármaco, reduziu a expressão de  $p75^{NTR}$  (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas), vinte e um dia após lesão, em nervos MDX contralaterais e ipsilaterais de ambas linhagens, mostrando-se mais proeminente essa redução no nervo MDX ipsilateral, abaixo da linhagem controle veículo, sugerindo a fase de finalização do processo de mielinização. Em contraste, os nervos MDX veículo contra e ipsilaterais, a imunorreatividade foi maior, do que na contraparte PGB. Indicando que as

células de Schwann no nervo distrófico em regeneração estão funcionalmente ativas, expressando receptores p75<sup>NTR</sup> (157). Semelhantemente a dados achados e relatados anteriormente em nosso laboratório (75), no qual, demonstraram uma atividade mais prolongada das CS, em camundongos MDX, em relação aos camundongos C57BL/10. Indicando uma resposta regenerativa mais lenta nesses camundongos devido a mielinogênese axonal ainda em curso, para regeneração dos nervos após lesão.

Neste sentido é importante ressaltar, para somarmos com os resultados das imunistoquímicas de cortes dos nervos isquiáticos, que o tratamento com PGB, influenciou mecanismos pró-regenerativos dos neurônios e CS. Resultando no aumento do número de junções neuromusculares nas linhagens C57BL/10 e MDX contralateral e principalmente em MDX ipsilateral. Além disso, também preservou a morfologia das placas motoras reduzindo a fragmentação e área de contato com a fibra muscular em comparação com MDX veículo, tendo potencial para associar com o aumento da celularidade dos terminais nervosos, dado a observação de núcleos positivos para DAPI. Visto que, células de Schwann após desnervação, crescem em locais sinápticos vizinhos inervados, guiando a formação de brotos axonais (158, 159). Supondo, que realmente sejam núcleos de CS, tendo como função orientar a reinervação das fibras musculares após a desnervação (retração) e/ou lesão nervosa. Formando pontes adjacentes com fibras musculares inervadas, para que os brotos axonais terminais atinjam regiões de AchR desnervadas em fibras musculares regeneradas (160, 161). Em razão, de brotos axonais surgirem em resposta a lesão nervosa periférica (162). Sugerindo o mesmo em ciclos de degeneração-regeneração muscular de camundongos MDX. Dado que a incidência de brotamento já é esperada para ser maior em neurônios motores de fibras musculares regeneradas de animais distróficos (163).

Em consonância com os resultados anteriores, com CS ativas, nos nervos isquiáticos após lesão nervosa periférica, observamos alterações em seus transcritos, devido tratamento com PGB. Como aumento do gene codificador da proteína básica da mielina - Mbp, em ambas as linhagens, com ênfase em camundongos distróficos, ultrapassando os transcritos da linhagem controle veículo. Tal fato, está associado a compactação da mielina, garantindo

a transmissão eficiente de impulsos nervosos (53, 164). Secretando-a na fase mielinizante e tornando-se mais acentuada no estágio final da diferenciação das células de Schwann (165, 166), sincronicamente reativas, devido aos processos simultâneos de degeneração Walleriana distal e regeneração das fibras nervosas (167). Uma vez que, os transcritos do gene S100 e p75NTR, também foram modulados positivamente em camundongos MDX. Evidências parciais demonstrando que células de Schwann estão em contato com o axônio em regeneração. Porém, insuficientes, devido os resultados da imunohistoquímica e do RT-qPCR, em relação ao S100 e ao p75NTR na linhagem MDX, serem divergentes em relação aos níveis proteicos reduzidos com a PGB.

Com base nas diferenças moleculares e morfológicas relatadas anteriormente, sobretudo em camundongos MDX, após lesão nervosa periférica, podemos sugerir que a redução do influxo de cálcio, na evolução da doença, alterou o fenótipo neurodegenerativo, como visto no grupo MDX veículo, para pró-regenerativo nos neurônios e CS, em tubo epineural livre, atuando no processo de reparo das fibras nervosas. Em busca de células musculares normais e/ou regeneradas, visto positivamente na otimização das respostas funcionas forçadas de camundongos distróficos, observadas na recuperação motora sete dias após lesão (14<sup>o</sup> dia de tratamento). E notavelmente, aumentando o tempo de permanência no cilindro giratório (Rota rod) no 17<sup>o</sup> dia de tratamento, não apresentando diferença estatística e atingindo o nível de performance dos camundongos controles veículo e PGB, no 28<sup>o</sup> dia de tratamento. Com movimentos respiratórios reduzidos, visto que, o músculo diafragma de camundongos MDX, carece completamente de distrofina, apresentando severa necrose de fibras musculares, que resulta em perda de força respiratória por volta de 4-8 semanas de vida (19, 168). Contrariando os efeitos colaterais da PGB, vistos nos resultados dos testes rota rod sem lesão. Resultados que demonstrou funcionalmente a sincronização na regeneração e mielinização axonal, devido a redução do influxo de cálcio, pelo qual, altas concentrações deste íon facilita a liberação de glutamato, que pode induzir morte celular (169).

Ensaio neuromotor, confirmado pelo teste de trilha, que permite a

caminhada dos animais em velocidade intrínseca, fornecendo desta forma, dados precisos, através do (sistema CatWalk). Pelo qual, o tratamento com PGB, iniciado sete dias antes da lesão e vinte e um dia após, minimizou os efeitos dos traumas no microambiente central e periférico de camundongos MDX. Assim, o índice funcional do isquiático - SFI, confirmou dados anteriores dos grupos sem lesão de que a linhagem MDX apresenta déficit funcional em relação aos camundongos controles. Devido aos constantes ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares, potencializados com a lesão do nervo. Porém no pré-tratamento, ou seja, antes da lesão a PGB já demonstra melhora no SFI de camundongos MDX, influenciando rapidamente a recuperação funcional. Observado, pela ascensão da curva a partir do segundo dia após lesão (9º dia de tratamento), de modo que em certos pontos de tempo foi analisado diferenças estatisticamente significativas, comparando com MDX-veículo. Principalmente no 16º até o 19º e 22º dias de tratamentos (7ª semana de vida). Idade em que os músculos distróficos, demonstram extensa degeneração e regeneração de suas fibras, com fenótipo interessante para perda de força de pressão e velocidade de caminhada, confirmado em MDX veículo (170).

Semelhante aos efeitos da Gabapentina, os resultados protetores e estimuladores da PGB, na regeneração nervosa periférica, em camundongos MDX, foram devidos ao bloqueio da subunidade  $\alpha 2/\delta$ . Atenuando o excesso do influxo de cálcio e conseqüentemente, reduzindo a excitotoxicidade de glutamato, uma vez que, este neurotransmissor em alta, leva a neurodegeneração (171-173). Atingindo os camundongos distróficos no nível de marcha espontânea dos grupos C57BL/10 veículo e PGB, em vários testes consecutivos. E no 28º dia de teste, ou seja, análise final do experimento, os camundongos MDX tratados com veículo foram significativamente piores do que os outros grupos experimentais.

Nas lesões, em que há perda de continuidade axonal, diversas modificações celulares e moleculares se desenvolvem imediatamente após a lesão. Com finalidade de remover o segmento danificado e promover regeneração axonal do coto proximal para o distal, procura-se recuperação eficiente das fibras nervosas (174). De fato, os efeitos moduladores da PGB no

metabolismo dos neurônios e CS, no microambiente periférico após lesão, foram confirmados pelas análises morfométricas, demonstrando que a área do nervo contralateral MDX tratado com PGB é maior em comparação com o grupo controle PGB, indicando um crescimento do volume interno deste e tendência de aumento em ipsilateral MDX tratado com PGB, comparando com grupo controle veículo. Nesse sentido, com o tratamento PGB, sugerimos que durante o processo de regeneração do nervo isquiático em camundongos distróficos, ocorra aumento da área do nervo, devido ao aumento de matriz extracelular, células inflamatórias, edema nervoso, multiplicação da vascularização endoneural e proliferação das células de Schwann (175-177), associado aos axônios em regeneração em busca do direcionamento correto para as fibras musculares desnervadas, normais e/ou regeneradas.

Além disso, múltiplas lesões experimentais no nervo, induz aumento no número de fibras mielínicas (175-177). Contudo, calculando o número médio de axônios, íntegros ou regenerados por  $100.000\mu\text{m}^2$ , observamos na linhagem MDX contralateral, com os tratamentos veículo e PGB, menor número de fibras mielínicas em comparação com a linhagem controle. Sugerindo que seja devido à falta de sinalização das junções neuromusculares de fibras musculares degeneradas para direcionar as fibras nervosas até seu sítio alvo (158), visto que, na linhagem controle não distrófica contralateral a PGB, aumentou o número de fibras mielínicas. Em comparação com veículo, acreditamos que seja devido à compactação das fibras nervosas que reduziu a área do nervo. A redução do número de axônios mielínicos também ocorreu em nervos ipsilaterais MDX veículo comparando com controle. Porém, efeitos da PGB e da lesão nos camundongos MDX, retardaram essa perda, sendo menor a redução em relação à linhagem controle veículo. Isso corrobora com os atuais achados morfológicos dos nervos ipsilaterais, da imunistoquímica onde a PGB melhora a organização das fibras. Evento comprovado pelo aumento de axônios regenerados, por  $100.000\mu\text{m}^2$  em ambas as linhagens. Tal processo é essencial em fibras nervosas aferentes e eferentes, permitindo rápida propagação do impulso nervoso (178-180), (181). Esses resultados foram acompanhados, pela curva de distribuição da espessura da mielina (EM), observados em nervos contralaterais com (EM), maiores, em 88% das fibras

controle veículo e 93% em controle PGB. Em MDX veículo e PGB, em 88% das fibras. Vinte e um dias após lesão nervosa periférica, axônios regenerados foram apresentados com (EM) maiores, em 77% das fibras ipsilaterais, controle veículo e 70% em ipsilaterais controle PGB. Axônios ipsilaterais veículo, regenerados de camundongos MDX, apresentaram (EM) maiores, em 73% das fibras e PGB 81%, com ênfase na porcentagem da (EM) de 0,6  $\mu\text{m}$ , (25%). Demonstrando que a PGB em camundongos distróficos nos nervos ipsilaterais, deslocou a (EM) de axônios maiores. Com isso, não encontramos diferenças relevantes que demonstram déficits na mielinogênese com tratamento PGB, em nervos de ambas as linhagens, pelo qual, uma razão g irregular, utilizada como um índice de mielinização ideal, pode sugerir condução nervosa prejudicada (124, 182). Assim, qualitativamente o fármaco, resultou em maior número de axônios com 0,8  $\mu\text{m}$  de (RG) em animais distróficos, comparando com os outros grupos contra e ipsilaterais. E ausência da proeminência encontrada exclusivamente em ipsilateral MDX veículo, em intervalos entre 0,2 - 0,6 de razão g. Visto que, com PGB, os nervos isquiáticos após lesão, apresentaram fibras nervosas 0,6  $\mu\text{m}$ , com regulação para baixo, que sugere axônios autótrofos.

Além disso, a mielinização ocorreu espontaneamente normal após lesão, podendo ser aperfeiçoada em animais e pacientes distróficos utilizando a PGB como tratamento coadjuvante, induzindo eficiência no metabolismo e propagação de impulsos nervosos. Como nosso estudo mostrou em análises funcionais de marcha forçada (Rota rod) e espontâneas (Catwalk).

Em resumo, os resultados em conjunto do nosso projeto, mostraram pela primeira vez, que o tratamento com a PGB é capaz de estimular o metabolismo neuroprotetor e reparador dos neurônios em seus axônios periféricos e das células de Schwann. Resultando no aperfeiçoamento da mielinogênese em ambas as linhagens, contribuindo para estabilização da retração e brotamento axonal. Principalmente, nos animais distróficos, pelo qual, sincronizamos a retração axonal, degeneração Walleriana e melhoramos os mecanismos moleculares e morfofuncionais pró-regenerativos após lesão nervosa periférica.

## 8. Conclusão

Os resultados apresentados no presente estudo sustentam que a PGB promove microambiente favorável para a homeostase neuronal e glial, levando à proteção, regeneração e melhor integração do sistema nervoso periférico de camundongos MDX (109, 112, 143).

- A linhagem distrófica tratada com veículo, ficou sempre abaixo da linhagem controle C57BL/10, reflexo do curso da doença.
- A PGB induziu efeitos moduladores em axônios periféricos e células de Schwann, melhorando a comunicação bidirecional entre os neurônios e o músculo alvo.
- A PGB não alterou a expressão dos genes da medula espinhal lombar de animais MDX, porém mostrou tendência em aumentar os níveis do gene BDNF, reforçando a hipótese de homeostase melhorada.
- A PGB, no microambiente do nervo periférico, induziu melhora na regeneração de fibras nervosas, incluindo junções neuromusculares, refletindo positivamente na funcionalidade das fibras musculares de ambas as linhagens, sobretudo em camundongos MDX.
- A PGB, na avaliação morfométrica se mostrou alinhada com a melhor morfologia das fibras nervosas, resultando na preservação das placas motoras.
- A PGB otimizou a função neuromotora forçada, que exige eficiência neuromuscular e respiratória.
- A PGB melhorou a marcha espontânea dos camundongos MDX, assim, possível transposição para clínica, aumentando o tempo de deambulação de pacientes DMD, principalmente no início dos sintomas.
- A PGB foi eficaz em prevenir degeneração axonal e muscular, observados a partir das análises imunoistoquímicas, moleculares e comportamentais.
- A dose de 30mg/Kg/dia, i.p de PGB, é eficaz na proteção e regeneração de fibras nervosas do SNP durante o desenvolvimento da DMD, melhorando a coordenação motora, indicando possível tradução para a clínica.

## 9. Referências

1. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997;90(4):717-27.
2. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(14):4778-82.
3. Pearce JM. Early observations on duchenne-meryon muscular dystrophy. *Eur Neurol*. 2005;54(1):46-8.
4. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1985;318(6047):672-5.
5. McDouall RM, Dunn MJ, Dubowitz V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the neurological sciences*. 1990;99(2-3):199-217.
6. Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol*. 2001;98(2):235-43.
7. Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, Partridge TA. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1988;14(4):299-314.
8. Dangain J, Vrbova G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle & nerve*. 1984;7(9):700-4.
9. De la Porte S, Morin S, Koenig J. Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol*. 1999;191:99-148.
10. Muntoni F, Mateddu A, Marchei F, Clerk A, Serra G. Muscular weakness in the mdx mouse. *Journal of the neurological sciences*. 1993;120(1):71-7.
11. Dupont-Versteegden EE, Baldwin RA, McCarter RJ, Vonlanthen MG. Does muscular dystrophy affect metabolic rate? A study in mdx mice. *Journal of the neurological sciences*. 1994;121(2):203-7.

12. Radley-Crabb HG, Marini JC, Sosa HA, Castillo LI, Grounds MD, Fiorotto ML. Dystropathology increases energy expenditure and protein turnover in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *PloS one*. 2014;9(2):e89277.
13. Ribeiro AF, Jr., Souza LS, Almeida CF, Ishiba R, Fernandes SA, Guerrieri DA, et al. Muscle satellite cells and impaired late stage regeneration in different murine models for muscular dystrophies. *Scientific reports*. 2019;9(1):11842.
14. Terada M, Lan YB, Kawano F, Ohira T, Higo Y, Nakai N, et al. Myonucleus-related properties in soleus muscle fibers of mdx mice. *Cells, tissues, organs*. 2010;191(3):248-59.
15. Krishnan VS, Aartsma-Rus A, Overzier M, Lutz C, Bogdanik L, Grounds MD. Implications of increased S100 $\beta$  and Tau5 proteins in dystrophic nerves of two mdx mouse models for Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Neurosci*. 2020;105:103484.
16. Krishnan VS, Thanigaiarasu LP, White R, Crew R, Larcher T, Le Guiner C, et al. Dystrophic Dmd(mdx) rats show early neuronal changes (increased S100 $\beta$  and Tau5) at 8 months, supporting severe dystropathology in this rodent model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Neurosci*. 2020;108:103549.
17. Simões GF, Oliveira AL. Alpha motoneurone input changes in dystrophic MDX mice after sciatic nerve transection. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010;36(1):55-70.
18. Nagel A, Lehmann-Horn F, Engel AG. Neuromuscular transmission in the mdx mouse. *Muscle & nerve*. 1990;13(8):742-9.
19. Personius KE, Sawyer RP. Terminal Schwann cell structure is altered in diaphragm of mdx mice. *Muscle & nerve*. 2005;32(5):656-63.
20. Tierney M, Garcia C, Bancone M, Sacco A, Personius KE. Innervation of dystrophic muscle after muscle stem cell therapy. *Muscle & nerve*. 2016;54(4):763-8.
21. Aldskogius H, Liu L, Svensson M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *Journal of neuroscience research*. 1999;58(1):33-41.

22. Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *International review of neurobiology*. 1971;14:49-124.
23. Torvik A, Heding A. Effect of actinomycin D on retrograde nerve cell reaction. Further observations. *Acta neuropathologica*. 1969;14(1):62-71.
24. Cullheim S, Wallquist W, Hammarberg H, Lindå H, Piehl F, Carlstedt T, et al. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. *Brain research Brain research reviews*. 2002;40(1-3):309-16.
25. Lindå H, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidsson U, Cullheim S, et al. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Experimental brain research*. 1992;91(2):284-95.
26. Piehl F, Hammarberg H, Tabar G, Hökfelt T, Cullheim S. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. *Experimental brain research*. 1998;119(2):191-204.
27. Robinson LR. *Trauma rehabilitation*: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
28. Seddon HJ. THREE TYPES OF NERVE INJURY. *Brain : a journal of neurology*. 1943;66(4):237-88.
29. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain : a journal of neurology*. 1951;74(4):491-516.
30. Waldram M. Peripheral nerve injuries. *Trauma*. 2003;5(2):79-96.
31. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand clinics*. 2013;29(3):317-30.
32. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004;1(2):177-85.
33. Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *Journal of Neuroscience Methods*. 2015;243:39-46.
34. Llobet Rosell A, Neukomm LJ. Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease. *Open Biol*. 2019;9(8):190118-.

35. Romanes GJ. Motor localization and the effects of nerve injury on the ventral horn cells of the spinal cord. *Journal of anatomy*. 1946;80(Pt 3):117-31.
36. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(5):314-24.
37. Tona A, Perides G, Rahemtulla F, Dahl D. Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on the localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1993;41(4):593-9.
38. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annual review of neuroscience*. 1990;13:43-60.
39. Lundborg G. Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* 2004;36(1):1-7.
40. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 14):3257-63.
41. Ouyang H, Nauman E, Shi R. Contribution of cytoskeletal elements to the axonal mechanical properties. *Journal of biological engineering*. 2013;7(1):21.
42. Kriz J, Zhu Q, Julien JP, Padjen AL. Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain research*. 2000;885(1):32-44.
43. Laser-Azogui A, Kornreich M, Malka-Gibor E, Beck R. Neurofilament assembly and function during neuronal development. *Current opinion in cell biology*. 2015;32:92-101.
44. Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histology and histopathology*. 2000;15(2):593-601.
45. Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain research Brain research reviews*. 1997;23(1-2):1-27.

46. Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *The Journal of cell biology*. 1997;139(6):1507-21.
47. Previtali SC, Nodari A, Taveggia C, Pardini C, Dina G, Villa A, et al. Expression of laminin receptors in schwann cell differentiation: evidence for distinct roles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(13):5520-30.
48. Yu WM, Yu H, Chen ZL. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Molecular neurobiology*. 2007;35(3):288-97.
49. Bray GM, Perkins S, Peterson AC, Aguayo AJ. Schwann cell multiplication deficit in nerve roots of newborn dystrophic mice. A radioautographic and ultrastructural study. *Journal of the neurological sciences*. 1977;32(2):203-12.
50. Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, et al. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *The Journal of cell biology*. 2002;156(1):199-209.
51. Jaros E, Bradley WG. Development of the amyelinated lesion in the ventral root of the dystrophic mouse. Ultrastructural, quantitative and autoradiographic study. *Journal of the neurological sciences*. 1978;36(3):317-39.
52. Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(42):9250-60.
53. Liu B, Xin W, Tan JR, Zhu RP, Li T, Wang D, et al. Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(44):22347-52.
54. Araque A, Perea G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*. 2004;47(3):241-8.
55. Derouiche A, Anlauf E, Aumann G, Mühlstädt B, Laviaille M. Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of a specialized astrocyte compartment. *Journal of physiology, Paris*. 2002;96(3-4):177-82.

56. Hanani M, Huang TY, Cherkas PS, Ledda M, Pannese E. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience*. 2002;114(2):279-83.
57. Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. 2008;56(14):1552-65.
58. Wagstaff LJ, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Otto GW, Kilpatrick AM, Michael K, et al. Failures of nerve regeneration caused by aging or chronic denervation are rescued by restoring Schwann cell c-Jun. *eLife*. 2021;10.
59. Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland)*. 1998;23(4):433-7.
60. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397-405.
61. Brushart TM, Aspalter M, Griffin JW, Redett R, Hameed H, Zhou C, et al. Schwann cell phenotype is regulated by axon modality and central-peripheral location, and persists in vitro. *Experimental neurology*. 2013;247:272-81.
62. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of anatomy*. 1999;194 ( Pt 1)(Pt 1):1-14.
63. Salonen V, Röyttä M, Peltonen J. The effects of nerve transection on the endoneurial collagen fibril sheaths. *Acta neuropathologica*. 1987;74(1):13-21.
64. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in neurobiology*. 2000;61(3):267-304.
65. Jessen KR, Mirsky R. Why do Schwann cells survive in the absence of axons? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;883:109-15.
66. Jessen KR, Mirsky R. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):402-10.
67. Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, et al. Schwann cells as regulators of nerve development. *Journal of physiology, Paris*. 2002;96(1-2):17-24.
68. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual review of biomedical engineering*. 2003;5:293-347.

69. Zochodne DW, Cheng C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *Journal of anatomy*. 2000;196 ( Pt 2)(Pt 2):279-83.
70. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2000;10(3):381-91.
71. Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11(3):281-6.
72. Barker PA. p75NTR Is Positively Promiscuous: Novel Partners and New Insights. *Neuron*. 2004;42(4):529-33.
73. Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annual review of neuroscience*. 1995;18:223-53.
74. Court FA, Wrabetz L, Feltri ML. Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(5):501-7.
75. Simões GF, Benitez SU, Oliveira AL. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) positive effects on muscle fiber degeneration and gait recovery after nerve lesion in MDX mice. *Brain Behav*. 2014;4(5):738-53.
76. Osborne NR, Anastakis DJ, Davis KD. Peripheral nerve injuries, pain, and neuroplasticity. *Journal of hand therapy : official journal of the American Society of Hand Therapists*. 2018;31(2):184-94.
77. Lehning EJ, Doshi R, Isaksson N, Stys PK, LoPachin RM, Jr. Mechanisms of injury-induced calcium entry into peripheral nerve myelinated axons: role of reverse sodium-calcium exchange. *Journal of neurochemistry*. 1996;66(2):493-500.
78. LoPachin RM, Lehning EJ. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;143(2):233-44.
79. Mandolesi G, Madeddu F, Bozzi Y, Maffei L, Ratto GM. Acute physiological response of mammalian central neurons to axotomy: ionic regulation and electrical activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(15):1934-6.

80. Li JY, Wang X, Ji PT, Li XF, Guan GH, Jiang XS, et al. Peripheral nerve injury decreases the expression of metabolic glutamate receptor 7 in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience letters*. 2012;531(1):52-6.
81. Li M, Shi J, Tang JR, Chen D, Ai B, Chen J, et al. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1beta and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005;26(2):192-8.
82. Pane M, Messina S, Bruno C, D'Amico A, Villanova M, Brancalione B, et al. Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscul Disord*. 2013;23(4):313-5.
83. Razzoli M, Lindsay A, Law ML, Chamberlain CM, Southern WM, Berg M, et al. Social stress is lethal in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *EBioMedicine*. 2020;55:102700.
84. Snow WM, Anderson JE, Jakobson LS. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(5):743-52.
85. Caudal D, François V, Lafoux A, Ledevin M, Anegon I, Le Guiner C, et al. Characterization of brain dystrophin absence and impact in dystrophin-deficient Dmdmdx rat model. *PloS one*. 2020;15(3):e0230083.
86. Stay TL, Miterko LN, Arancillo M, Lin T, Sillitoe RV. In vivo cerebellar circuit function is disrupted in an mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech*. 2019;13(2).
87. Tuckett E, Gosetti T, Hayes A, Rybalka E, Verghese E. Increased calcium in neurons in the cerebral cortex and cerebellum is not associated with cell loss in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport*. 2015;26(13):785-90.
88. Gailly P, Boland B, Himpens B, Casteels R, Gillis JM. Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. *Cell Calcium*. 1993;14(6):473-83.
89. Bertorini TE, Bhattacharya SK, Palmieri GM, Chesney CM, Pifer D, Baker B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 1982;32(10):1088-92.

90. Tassone DM, Boyce E, Guyer J, Nuzum D. Pregabalin: a novel gamma-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders. *Clin Ther.* 2007;29(1):26-48.
91. Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, et al. Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain research.* 2006;1075(1):68-80.
92. Ha KY, Carragee E, Cheng I, Kwon SE, Kim YH. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats: biochemical analysis and effect on glial cells. *J Korean Med Sci.* 2011;26(3):404-11.
93. Ha KY, Kim YH, Rhyu KW, Kwon SE. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur Spine J.* 2008;17(6):864-72.
94. Dooley DJ, Donovan CM, Pugsley TA. Stimulus-dependent modulation of [(3)H]norepinephrine release from rat neocortical slices by gabapentin and pregabalin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2000;295(3):1086-93.
95. Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chauhan N, Duffy S, Clusmann H, et al. Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology.* 2002;42(2):229-36.
96. Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, Dooley DJ, Jones RS. Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *The European journal of neuroscience.* 2004;20(6):1566-76.
97. Joshi I, Taylor CP. Pregabalin action at a model synapse: Binding to presynaptic calcium channel  $\alpha 2\text{-}\delta$  subunit reduces neurotransmission in mice. *European Journal of Pharmacology.* 2006;553(1):82-8.
98. Patel AM, Wierda K, Thorrez L, van Putten M, De Smedt J, Ribeiro L, et al. Dystrophin deficiency leads to dysfunctional glutamate clearance in iPSC derived astrocytes. *Translational psychiatry.* 2019;9(1):200.
99. Daneshdoust D, Khalili-Fomeshi M, Ghasemi-Kasman M, Ghorbanian D, Hashemian M, Gholami M, et al. Pregabalin enhances myelin repair and attenuates glial activation in lysolecithin-induced demyelination model of rat optic chiasm. *Neuroscience.* 2017;344:148-56.

100. Silva GA, Pradella F, Moraes A, Farias A, dos Santos LM, de Oliveira AL. Impact of pregabalin treatment on synaptic plasticity and glial reactivity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav.* 2014;4(6):925-35.
101. Sałat K, Gdula-Argasińska J, Malikowska N, Podkowa A, Lipkowska A, Librowski T. Effect of pregabalin on contextual memory deficits and inflammatory state-related protein expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 2016;389(6):613-23.
102. Sherafat MA, Javan M, Mozafari S, Mirnajafi-Zadeh J, Motamedi F. Castration attenuates myelin repair following lysolecithin induced demyelination in rat optic chiasm: an evaluation using visual evoked potential, marker genes expression and myelin staining. *Neurochemical research.* 2011;36(10):1887-95.
103. Abu-Rub M, Miller RH. Emerging Cellular and Molecular Strategies for Enhancing Central Nervous System (CNS) Remyelination. *Brain Sci.* 2018;8(6):111.
104. Butt AM, Papanikolaou M, Rivera A. Physiology of Oligodendroglia. *Advances in experimental medicine and biology.* 2019;1175:117-28.
105. Erskine E, Smaila BD, Plunet W, Liu J, Raffaele EE, Tetzlaff W, et al. Skilled reaching deterioration contralateral to cervical hemicontusion in rats is reversed by pregabalin treatment conditional upon its early administration. *Pain reports.* 2019;4(3):e749.
106. Hundehege P, Fernandez-Orth J, Römer P, Ruck T, Müntefering T, Eichler S, et al. Targeting Voltage-Dependent Calcium Channels with Pregabalin Exerts a Direct Neuroprotective Effect in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *Neuro-Signals.* 2018;26(1):77-93.
107. Meymandi MS, Sepehri G, Abdolsamadi M, Shaabani M, Heravi G, Yazdanpanah O, et al. The effects of co-administration of pregabalin and vitamin E on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in male rats. *Inflammopharmacology.* 2017;25(2):237-46.
108. Moshiri M, Moallem SA, Attaranzadeh A, Saberi Z, Etemad L. Injury to skeletal muscle of mice following acute and sub-acute pregabalin exposure. *Iranian journal of basic medical sciences.* 2017;20(3):256-9.

109. Tedeschi A, Dupraz S, Laskowski CJ, Xue J, Ulas T, Beyer M, et al. The Calcium Channel Subunit Alpha2delta2 Suppresses Axon Regeneration in the Adult CNS. *Neuron*. 2016;92(2):419-34.
110. Di Guilmi MN, Urbano FJ, Inchauspe CG, Uchitel OD. Pregabalin modulation of neurotransmitter release is mediated by change in intrinsic activation/inactivation properties of ca(v)2.1 calcium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;336(3):973-82.
111. Licursi V, Caiello I, Lombardi L, De Stefano ME, Negri R, Paggi P. Lack of dystrophin in mdx mice modulates the expression of genes involved in neuron survival and differentiation. *The European journal of neuroscience*. 2012;35(5):691-701.
112. Assis AD, Chiarotto GB, Simões GF, Oliveira ALR. Pregabalin-induced neuroprotection and gait improvement in dystrophic MDX mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2021;114:103632.
113. Lu X, Skamene E, Richardson PM. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. *Brain research*. 1994;652(1):174-6.
114. Xin L, Richardson PM, Gervais F, Skamene E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain research*. 1990;510(1):144-6.
115. Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. *Journal of anatomy*. 1984;139 ( Pt 1)(Pt 1):45-58.
116. Smith RS, Koles ZJ. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *The American journal of physiology*. 1970;219(5):1256-8.
117. Inerra MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*. 1998;18(2):119-24.
118. Chan S, Head SI. The role of branched fibres in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol*. 2011;96(6):564-71.
119. Grinnell AD. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junctions. *Physiol Rev*. 1995;75(4):789-834.

120. Sadeh M, Stern LZ, Czyzewski K. Changes in end-plate cholinesterase and axons during muscle degeneration and regeneration. *Journal of anatomy*. 1985;140 ( Pt 1)(Pt 1):165-76.
121. Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron*. 2000;25(2):279-93.
122. Pratt SJP, Shah SB, Ward CW, Inacio MP, Stains JP, Lovering RM. Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *The Journal of physiology*. 2013;591(2):559-70.
123. Zeman RJ, Sandow A. Denervation effects on dystrophic and normal muscles and the etiology of dystrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1979;317:171-86.
124. Dhindsa JS, McCall AL, Strickland LM, Fusco AF, Kahn AF, ElMallah MK. Motor axonopathies in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific reports*. 2020;10(1):8967.
125. Lidov HG. Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol*. 1996;6(1):63-77.
126. Miranda R, Laroche S, Vaillend C. Reduced neuronal density in the CA1 anterodorsal hippocampus of the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(11):775-81.
127. Simões GF, de Oliveira AL. Granulocyte-colony stimulating factor improves MDX mouse response to peripheral nerve injury. *PloS one*. 2012;7(8):e42803.
128. Marques MJ, Taniguti AP, Minatel E, Neto HS. Nerve terminal contributes to acetylcholine receptor organization at the dystrophic neuromuscular junction of mdx mice. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007;290(2):181-7.
129. Briguet A, Ruegg MA. The Ets transcription factor GABP is required for postsynaptic differentiation in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(16):5989-96.
130. Lyons PR, Slater CR. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *Journal of neurocytology*. 1991;20(12):969-81.

131. Blum R, Konnerth A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:70-8.
132. Comim CM, Ventura L, Freiburger V, Dias P, Bragagnolo D, Dutra ML, et al. Neurocognitive Impairment in mdx Mice. *Molecular neurobiology*. 2019;56(11):7608-16.
133. Lainetti RD, Pereira FC, Da-Silva CF. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 1995;28(7):781-5.
134. Liu Z, Jin YQ, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, et al. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS one*. 2015;10(4):e0123278.
135. Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM, Jr. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(11):4094-8.
136. Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson EM, Jr. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988;8(2):664-81.
137. Underwood CK, Coulson EJ. The p75 neurotrophin receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(9):1664-8.
138. Domon Y, Arakawa N, Inoue T, Matsuda F, Takahashi M, Yamamura N, et al. Binding Characteristics and Analgesic Effects of Mirogabalin, a Novel Ligand for the  $\alpha(2)\delta$  Subunit of Voltage-Gated Calcium Channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2018;365(3):573-82.
139. Tzellos TG, Papazisis G, Toulis KA, Sardeli C, Kouvelas D. A2delta ligands gabapentin and pregabalin: future implications in daily clinical practice. *Hippokratia*. 2010;14(2):71-5.
140. Allen DG, Gervasio OL, Yeung EW, Whitehead NP. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(2):83-91.

141. Larcher T, Lafoux A, Tesson L, Remy S, Thepenier V, François V, et al. Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PloS one*. 2014;9(10):e110371.
142. Wells DJ. Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech*. 2018;11(6).
143. Celik M, Kose A, Kose D, Karakus E, Akpinar E, Calik M, et al. The double-edged sword: effects of pregabalin on experimentally induced sciatic nerve transection and crush injury in rats. *The International journal of neuroscience*. 2015;125(11):845-54.
144. Martinez AM, Ribeiro LC. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibres undergoing Wallerian degeneration: an oxalate-pyroantimonate and X-ray microanalysis study. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*. 1998;30(3):451-8.
145. Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *The Journal of cell biology*. 2003;163(4):889-99.
146. Bradley WG, Jenkison M. Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. *Journal of the neurological sciences*. 1973;18(2):227-47.
147. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, et al. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *The Journal of cell biology*. 2005;168(4):655-66.
148. Yu WM, Feltri ML, Wrabetz L, Strickland S, Chen ZL. Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(18):4463-72.
149. Rasminsky M, Kearney RE, Aguayo AJ, Bray GM. Conduction of nervous impulses in spinal roots and peripheral nerves of dystrophic mice. *Brain research*. 1978;143(1):71-85.
150. Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V. Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Journal of child neurology*. 1995;10(6):472-5.
151. Sunada Y, Bernier SM, Utani A, Yamada Y, Campbell KP. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for

muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. *Human molecular genetics*. 1995;4(6):1055-61.

152. Vidal CJ, Montenegro MF, Muñoz-Delgado E, Campoy FJ, Cabezas-Herrera J, Moral-Naranjo MT. The AChE membrane-binding tail PRiMA is down-regulated in muscle and nerve of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. *Chemico-biological interactions*. 2013;203(1):330-4.

153. Kuang W, Xu H, Vachon PH, Liu L, Loechel F, Wewer UM, et al. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(4):844-52.

154. Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(1):101-9.

155. Spreca A, Rambotti MG, Rende M, Saccardi C, Aisa MC, Giambanco I, et al. Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1989;37(4):441-6.

156. Barger SW, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(14):9689-94.

157. Song XY, Zhou FH, Zhong JH, Wu LL, Zhou XF. Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *Journal of neurochemistry*. 2006;96(3):833-42.

158. Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *Journal of neurocytology*. 2003;32(5-8):975-85.

159. Son Y-J, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in neurosciences*. 1996;19(7):280-5.

160. Son YJ, Thompson WJ. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron*. 1995;14(1):133-41.

161. Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in neurosciences*. 1996;19(7):280-5.

162. van Mier P, Lichtman JW. Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: studies in living mice. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1994;14(9):5672-86.

163. Pratt SJP, Shah SB, Ward CW, Kerr JP, Stains JP, Lovering RM. Recovery of altered neuromuscular junction morphology and muscle function in mdx mice after injury. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2015;72(1):153-64.

164. Asipu A, Blair GE. Regulation of myelin basic protein-encoding gene transcription in rat oligodendrocytes. Gene. 1994;150(2):227-34.

165. Leitman EM, Tewari A, Horn M, Urbanski M, Damanakis E, Einheber S, et al. MLCK regulates Schwann cell cytoskeletal organization, differentiation and myelination. Journal of cell science. 2011;124(Pt 22):3784-96.

166. Matsuoka H, Tanaka H, Sayanagi J, Iwahashi T, Suzuki K, Nishimoto S, et al. Neurotrophin(®) Accelerates the Differentiation of Schwann Cells and Remyelination in a Rat Lysophosphatidylcholine-Induced Demyelination Model. International journal of molecular sciences. 2018;19(2).

167. Câmara CC, Araújo CV, de Sousa KKO, Brito GAC, Vale ML, Raposo RDS, et al. Gabapentin attenuates neuropathic pain and improves nerve myelination after chronic sciatic constriction in rats. Neuroscience letters. 2015;607:52-8.

168. Burns DP, Murphy KH, Lucking EF, O'Halloran KD. Inspiratory pressure-generating capacity is preserved during ventilatory and non-ventilatory behaviours in young dystrophic mdx mice despite profound diaphragm muscle weakness. The Journal of physiology. 2019;597(3):831-48.

169. Gurkoff G, Shahlaie K, Lyeth B, Berman R. Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). 2013;6(7):788-812.

170. Kwak D, Wei G, Thompson LV, Kim JH. Short-Term ONX-0914 Administration: Performance and Muscle Phenotype in Mdx Mice. International journal of environmental research and public health. 2020;17(14).

171. Prasad KN, Bondy SC. Common biochemical defects linkage between post-traumatic stress disorders, mild traumatic brain injury (TBI) and penetrating TBI. Brain research. 2015;1599:103-14.

172. Rossi AR, Angelo MF, Villarreal A, Lukin J, Ramos AJ. Gabapentin administration reduces reactive gliosis and neurodegeneration after pilocarpine-induced status epilepticus. *PloS one*. 2013;8(11):e78516.
173. Taylor CP, Angelotti T, Fauman E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy research*. 2007;73(2):137-50.
174. Gordon T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(22).
175. Mira JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezings. *Journal of anatomy*. 1979;129(Pt 1):77-93.
176. Mizisin AP, Kalichman MW, Myers RR, Powell HC. Role of the blood-nerve barrier in experimental nerve edema. *Toxicologic pathology*. 1990;18(1 Pt 2):170-85.
177. Welcher AA, Suter U, De Leon M, Bitler CM, Shooter EM. Molecular approaches to nerve regeneration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1991;331(1261):295-301.
178. Glenn TD, Talbot WS. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Current opinion in neurobiology*. 2013;23(6):1041-8.
179. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature reviews Neuroscience*. 2005;6(9):683-90.
180. Zochodne DW. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2012;17(1):1-18.
181. Duncan ID, Radcliff AB. Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology. *Experimental neurology*. 2016;283(Pt B):452-75.
182. Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PloS one*. 2009;4(11):e7754.

## 10. Apêndice - Publicação do artigo na revista Molecular and Cellular Neuroscience

Molecular and Cellular Neuroscience xxx (xxxx) 103632



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Neuroscience

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymcne](http://www.elsevier.com/locate/ymcne)



### Pregabalin-induced neuroprotection and gait improvement in dystrophic MDX mice

Alex Dias Assis<sup>a</sup>, Gabriela Bortolança Chiarotto<sup>a, b</sup>, Gustavo Ferreira Simões<sup>a</sup>, Alexandre Leite Rodrigues Oliveira<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Nerve Regeneration, University of Campinas - UNICAMP, Cidade Universitária "Zyferino Vaz", Rua Monteiro Lobato, 255, 13063-970 Campinas, SP, Brazil  
<sup>b</sup> Biomedical Sciences Graduate Program, University Center of Meritino Gerson Foundation/FUNO, Araras, SP, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 DMD  
 Therapy  
 MDX  
 Nervous system  
 Pregabalin

#### ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a genetic disease linked to the X chromosome induced by mutations in the dystrophin gene. Neuroprotective drugs, such as pregabalin (PGB), can improve motor function through the modulation of excitatory synapses, together with anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. The present work studied the effects of PGB in the preservation of dystrophic peripheral nerves, allowing motor improvements in MDX mice. Five weeks old MDX and C57BL/10 mice were treated with PGB (30 mg/kg/day, i.p.) or vehicle, for 28 consecutive days. The mice were sacrificed on the 9th week, the sciatic nerves were dissected out and processed for immunohistochemistry and qRT-PCR, for evaluating the expression of proteins and gene transcripts related to neuronal activity and Schwann cell function. The lumbar spinal cords were also processed for qRT-PCR to evaluate the expression of neurotrophic factors and pro- and anti-inflammatory cytokines. Cranial tibial muscles were dissected out for endplate evaluation with  $\alpha$ -bungarotoxin. The recovery of motor function was monitored throughout the treatment, using a spontaneous walking track test (Catwalk system) and a forced locomotion test (Rotarod). The results showed that treatment with PGB reduced the retrograde effects of muscle degeneration/regeneration on the nervous system from the 5th to the 9th week in MDX mice. Thus, PGB induced protein expression in neurons and Schwann cells, protecting myelinated fibers. In turn, better axonal morphology and close-to-normal motor endplates were observed. Indeed, such effects resulted in improved motor coordination of dystrophic animals. We believe that treatment with PGB improved the balance between excitatory and inhibitory inputs to spinal motoneurons, increasing motor control. In addition, PGB enhanced peripheral nerve homeostasis, by positively affecting Schwann cells. In general, the present results indicate that pregabalin is effective in protecting the PNS during the development of DMD, improving motor coordination, indicating possible translation to the clinic.

#### 1. Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic disease of recessive character, where the X chromosome undergoes spontaneous mutations generating a defect in the coding of the gene responsible for the

production of dystrophin (Deconinck et al., 1997; Kunkel et al., 1985; Pearce, 2005; Ray et al., 1985). Such protein has a fundamental role during muscle contractions, which maintains the integrity of the fibers. Its absence is characterized by progressive muscle weakness and degeneration, caused by myonecrosis, which also occurs in muscle fibers of

**Abbreviations:** BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor; CNS, Central Nervous System; CEMIB, Multidisciplinary Center for Biological Research; CEUA, Ethics Committee on the Use of Animals; cDNA, Complementary deoxyribonucleic acid; DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole; DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; EAE, Experimental Allergic Encephalomyelitis; EPL, Experimental print length; ETS, Experimental toe spread; GABA, Gamma-aminobutyric acid; Gapdh, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Gap43, Growth-associated protein 43; Hprt1, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IB, Institute of Biology; IFN $\gamma$ , Interferon gamma; MBP, Basic Myelin Protein; NPL, Normal print length; NTS, Normal toe spread; p75NGFR, Low affinity pan-nerve growth factor receptor; PBS, Phosphate buffered saline; PGB, Pregabalin; PNS, Peripheral Nervous System; qRT-PCR, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; RNA, Ribonucleic acid; RPM, Rotations per minute; SFI, sciatic function index; S100 $\beta$ , Calcium-binding protein B; Tgfb1, Transforming growth factor beta 1; Tnf $\alpha$ , Tumor necrosis factor alpha

\* Corresponding author.

E-mail address: [aleolive@unicamp.br](mailto:aleolive@unicamp.br) (A.L.R. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103632>

Received 16 March 2021; Received in revised form 16 May 2021; Accepted 25 May 2021  
 1044-7431/© 2021

**Table 1**  
Experimental groups, and survival times during pregabalin (PGB) treatment. Techniques used and animals per group are also described.

	28 days immunohistochemistry of the sciatic nerve	28 days (qRT-PCR) lumbar immunofluorescence and sciatic nerve	28 days Behavioral testing - Catwalk	28 days Behavioral testing - Rotarod
CS7BL/10 - vehicle	5*	5	5*	5
CS7BL/10 - PGB 30 mg/kg	5*	5	5*	5
MDX - vehicle	5*	5	5*	9
MDX PGB - 30 mg/kg	5*	5	5*	9

\* The same mice were used for both techniques.

**Table 2**  
Primary antibodies used throughout the study.

Antibody/neurotoxin	Manufacturer	Host	Cat. number	Concentration
Neurofilament	milipore	Rabbit	ab1989	1:2000
Laminin 6	Abcam	Rabbit	ab11575	1:1500
S100	Abcam	Rabbit	ab8668	1:1500
p75 <sup>N</sup> NGFR	Santa Cruz	Rabbit	SC271708	1:1500
$\alpha$ -bungarotoxin	ThermoFisher	-	E35451	1:500

**Table 3**  
TaqMan assays used for the qRT-PCR technique.

Tissue	Gene	Codes
Spinal cord	Tnfr1	Mm00443258_m1
	IFN $\gamma$	Mm01168134_m1
	Tgfb1	Mm01178820_m1
	IL6	Mm04230607_s1
	Gap43	Mm00500404_m1
Sciatic nerve	S100	Mm01149792_m1
	P75	Mm00446296_m1
	Mpb	Mm01266402_m1

MDX mice (an animal model for the Duchenne muscular dystrophy). Fiber degeneration is frequently preceded by a collapse and detachment of the basal lamina of the sarcolemma, associated with an extensive inflammatory process (McDonnell et al., 1990; Spencer et al., 2001). Therefore, most studies on DMD are directed exclusively to the muscular system. One of these studies (Ray et al., 1985), investigated muscle degeneration/regeneration cycles, from 2 weeks to 10 weeks of life. Their results showed that already at 2 weeks of life the changes were in small scattered foci of degenerating myofibrils, surrounded by cellular infiltrates, "pale" muscle fibers, and small groups of regenerated muscle fibers with a central cell nucleus. Evidence that, between 2 and 5 weeks of life, peak muscle degeneration occurs in MDX mice, so there is an increase in necrosis, myofibril regeneration, and marked muscle weakness making the fiber susceptible to contraction-induced injuries (Coulton et al., 1988; Dangain and Vrbova, 1984; Porte S et al., 1999; Muntoni et al., 1993). In this context, the critical period occurs from 6 to 8 weeks of life, in the hindlimbs of the MDX mice, which undergo morphological abnormalities such as high and rapid muscle regeneration, ramifications of the muscle fibers, and functional deficit attributed to the reduction of the metabolic rate (Dupont-Versteegden et al., 1994; Radley-Crabb et al., 2014). In addition, muscle degeneration/regeneration processes that occur in MDX mice, promote retrograde changes in the neuromuscular junctions and peripheral nervous system, with an increase in S100 $\beta$  proteins at 8 and 13 months of age, inducing neurodegenerative changes (Krishnan et al., 2020a; Krishnan et al., 2020b). They specifically affect the spinal alpha motoneurons, where an increase in astrogliosis, reduction of synaptophysin and partial and/or to-

tal retractions of presynaptic terminals were detected, mainly type 5 boutons (excitatory/glutamatergic), indicating a reduction in synaptic activity in nine-month-old dystrophic animals (Simoes and Oliveira, 2010). All events mentioned above, represent that motor and behavioral deficits in DMD patients and MDX mice are probably not limited to muscle fiber, we suggest that the mechanisms occur in a commutative way with the central and peripheral nervous system. Such events are also associated with homeostatic instability, related to an increased influx of calcium ions, at rest and due to prolonged opening of voltage-dependent channels in dystrophic muscle fibers at the onset of the disease in MDX mice (De Backer et al., 2002; Lansman and Franco-Obregón, 2006; Suchyna and Sachs, 2007). In addition, calcium saturation occurs in the nervous system of these dystrophic animals. Thus, high calcium ion intracellular concentration, due to the deficit of dystrophin in the Purkinje granular and cerebellar cells, alters the cellular communication output, responsible for motor and non-motor functions (Caudal et al., 2020; Stay et al., 2019; Tuckett et al., 2015). In conjunction with changes in calcium release, without full-length dystrophin in MDX, absorption, and reduction of clusters of receptors on the postsynaptic membrane take place, due to failure of the actin-binding dystrophin framework, in GABAergic inhibitory synapses (Caudal et al., 2020; Brünig et al., 2002; Kueh et al., 2011; Kueh et al., 2008; Lévi et al., 2002). This, in turn, leads to an imbalance in the excitatory and inhibitory glutamatergic pathways, resulting in abnormal activity of the action potentials, inducing neurological disorders and behavioral changes, together with the aggravations of myonecrosis in MDX mice, similarly to the DMD individuals (Pane et al., 2013; Razzoli et al., 2020; Snow et al., 2013). One possibility of treatment to alleviate this clinical condition is the use of neuroprotective drugs, such as pregabalin (PGB). PGB is a drug analogous to GABA (Tassone et al., 2007), which acts as an anticonvulsant, via the  $\alpha 2\delta$  (type I) subunit of voltage-gated calcium channels (Bian et al., 2006) and thus attenuates the influx of calcium into the neuronal cell (Ha et al., 2011; Ha et al., 2008). We hypothesize that using 30 mg/kg of PGB for such a reduction, calcium excitotoxicity can be minimized, improving the regeneration and recovery of motor function via the modulation of excitatory synapses, together with anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. (Ha et al., 2011; Ha et al., 2008; Di Guilmi et al., 2011; Lieursi et al., 2012; Meymandi et al., 2017; Erskine et al., 2019; Hudechege et al., 2018; Tedeschi et al., 2016). In a previous study in our laboratory, we observed protective effects of PGB through the preservation of the synaptic network, in the microenvironment of the alpha spinal motoneurons, during the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Silva et al., 2014). In the same study, we show that glial reactivity was reduced in the group treated with pregabalin. Thus, since PGB promotes a microenvironment favorable to motoneurons, we hypothesize that it can protect and assist axonal growth in the dystrophic nerve since loss of synapses and gliosis have been described in MDX mice (Silva et al., 2014). In turn, the present work aimed at a better understanding of the molecular, morphological, and functional responses of the peripheral nervous system after PGB treatment, optimizing the bi-directional communication with the muscular system in response to the constant muscular degeneration that occurs in MDX mice. We believe that the results herein contribute to the development of new pharmacological strategies, aiming to alleviate the symptoms of DMD patients, providing improvement of the motor conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

CS7BL/10 and MDX mice (male, 5 weeks old, 15-20 g) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research of the University of Campinas (CEMIB/UNICAMP) and housed in the Laboratory of Nerve Regeneration, Institute of Biology, UNICAMP. The ani-

**Table 4**

Quantification of the integrated density of pixels in sciatic nerves of 9-week-old mice treated with vehicle and PGB. Number of motor endplates was obtained after  $\alpha$ -bungarotoxin staining.

Antibody	Groups	28 days of treatment- 30 mg/Kg
Neurofilament	ELvehicle	$6.0 \times 10^7 \pm 9.0 \times 10^5$
	ELPGB	$6.8 \times 10^7 \pm 6.2 \times 10^5$
	MDXvehicle	$4.1 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^6$
	MDXPGB	$5.7 \times 10^7 \pm 8.0 \times 10^5$
Laminin 6	ELvehicle	$1.0 \times 10^8 \pm 3.2 \times 10^6$
	ELSLPGB	$1.0 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^6$
	MDXvehicle	$5.4 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$
	MDXPGB	$7.2 \times 10^7 \pm 2.3 \times 10^6$
5100	ELvehicle	$1.8 \times 10^7 \pm 5.2 \times 10^5$
	ELPGB	$1.3 \times 10^7 \pm 7.3 \times 10^5$
	MDXvehicle	$3.2 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$
	MDXPGB	$2.1 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^6$
p75NTR	ELvehicle	$1.4 \times 10^8 \pm 1.0 \times 10^6$
	ELPGB	$1.0 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^6$
	MDXvehicle	$2.6 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^6$
	MDXPGB	$1.1 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^5$
$\alpha$ -bungarotoxin	ELvehicle	46,87 $\pm$ 0,88
	ELPGB	53,93 $\pm$ 2,05
	MDXvehicle	32,27 $\pm$ 0,44
	MDXPGB	34,40 $\pm$ 0,48

mice were kept under a light-dark cycle (12/12h) with controlled temperature and humidity and with water and pelleted food ad libitum. The experiments were approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals (Institute of Biology - CEUA/IB/UNICAMP, protocol No. 3769-1(A)/2017) and carried out according to the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation. In total, 68 mice were used and optimized for different techniques, groups, and experimental analyzes are detailed in Table 1.

## 2.2. Drug treatment

The mice were treated with PGB (Lyrica, Pfizer) 30 mg/kg/day diluted in 200  $\mu$ l of 0.9% NaCl phosphate-buffered solution (Meymandi et al., 2017; Erskine et al., 2019; Hundehage et al., 2018; Tedeschi et al., 2016; Ha et al., 2011; Ha et al., 2008). In vehicle-treated mice, 200  $\mu$ l of 0.9% NaCl phosphate-saline buffered solution (Vehicle) was administered. Both treatments started on the first day of the 5th week of age and ended on the last day of the 8th week of life. Both pregabalin and vehicle solutions were administered intraperitoneally, always at the same time of the day. All mice were euthanized on the first day of the ninth week of life.

## 2.3. Collection and preparation of tissues

The mice were anesthetized with an overdose of xylazine (30 mg/Kg) and ketamine (300 mg/Kg) and underwent thoracotomy followed by transcardial perfusion with 0.1 M sodium phosphate-buffered saline (PBS, with 0.9% NaCl; pH 7.38) for RT-qPCR analysis. Mice designated for walking track test and immunohistochemical analyses were perfused with a fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS) following the PBS rinse. After fixation, the sciatic nerves were dissected out and immersed in the same fixative solution overnight at 4 °C. In sequence, the specimens were washed three times with 0.1 M PBS, then immersed in a series of sucrose solutions (10%, 20%, and 30%, 24 h each) for cryopreservation. The samples were then soaked in Tissue-Tek, frozen in n-hexane at a controlled temperature (-25 °C to -30 °C), and stored at -20 °C.

## 2.4. Immunohistochemistry

Longitudinal sections of sciatic nerves and cranial tibial muscles, 12  $\mu$ m thick, were obtained using a cryostat (Microm, HM525) and transferred to gelatinized microscopic slides, and stored at -20 °C until use. For immunohistochemistry, the slides were placed at room temperature, and the sections were delineated with a hydrophobic pen (PAP pen, Sigma Z377821). The slides were transferred to a moist chamber protected from light. The sections were immersed in 0.01 M PBS (3  $\times$  5 min each), and incubated with 150  $\mu$ l of blocking solution (3% serum bovine albumin in 0.1 M PBS) for 45 min. Subsequently, the primary antibodies (Table 2) were diluted in an incubation solution (1.5% serum bovine albumin and 0.2% Tween in 0.1 M PBS), and the sections were incubated for 4 h at room temperature. After the incubation with the primary antibodies, the sections were washed with 0.01 M of PBS and incubated with the appropriate secondary antibody (anti-rabbit-Cy2 or anti-mouse-Cy3; Jackson Immunoresearch, 1:500) for 45 min. The sections were again washed with 0.01 M PBS and covered with a coverslip with glycerol/PBS (3:1). The slides were observed with an epifluorescence microscope (Leica DMB5500) and documented with a digital camera (Leica DFC345FX), using specific filters according to secondary antibodies. For quantification, three representative images of each specimen from each experimental group were selected. The integrated density of pixels, representing the intensity of immunostaining, was measured in longitudinal sections of the sciatic nerve and the quantification of motor endplates of cranial tibial muscles was carried out using ImageJ software (version 1.33u, National Institutes of Health, USA). The measurements were acquired for each animal, and then the mean  $\pm$  standard error of the mean of each experimental group was calculated, and, using these values, comparisons between groups were made.

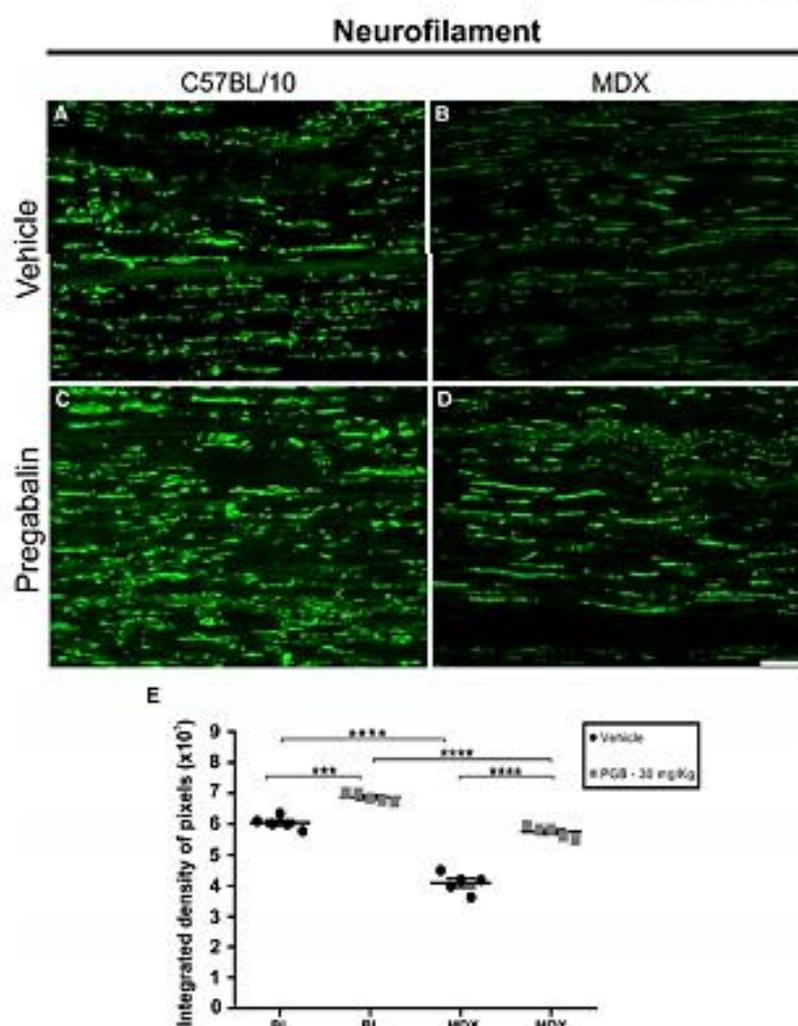
## 2.5. Real-time PCR (qRT-PCR)

### 2.5.1. Spinal cord

The total RNA was extracted using the TRIzol<sup>TM</sup> reagent (Invitrogen, catalog number 15596026), following the manufacturer's instructions. For that, 1 mL of TRIzol was added to the samples, followed by homogenization with Poltron<sup>®</sup>. The concentration of RNA and quality of the samples were measured in a nanophotometer considering the ratios A260/280 and A260/230. The cDNA was synthesized from 1.0  $\mu$ g of total RNA with the High Capacity kit (Thermo Fisher Scientific, code 4368814) according to the manufacturer's instructions. For PCR reactions, cDNA was used as a sample in a 10  $\mu$ l reaction containing nuclease-free water, TaqMan assays (Table 3), and TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied biosystems, code 4369016), always in triplicates. The entire RT-qPCR procedure was performed on the Stratagene Mx3005P (Agilent) instrumentation platform. The thermal cycling conditions used were 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The reference gene Hprt1 was tested and validated by the Best-Keeper software and used as the normalizer. The results were calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method.

### 2.5.2. Sciatic nerve

The total RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen, 74004) following the manufacturer's instructions. The concentration of RNA and quality of the samples were measured in a nanophotometer considering the ratios A260/280 and A260/230. The cDNA was synthesized from 170 ng of total RNA with the High Capacity kit (Thermo Fisher Scientific, code 4368814), according to the manufacturer's instructions. For PCR reactions, cDNA was used as a sample in a 10  $\mu$ l reaction containing nuclease-free water, TaqMan assays (Table 3), and TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied biosystems, code 4369016). The entire RT-qPCR procedure was performed on the Stratagene Mx3005P (Agilent) instrumentation platform. The thermal cycling



**Fig. 1.** Anti-neurofilament immunostaining of longitudinal sciatic nerve sections, revealing labeling upregulation following PGB administration. A and C – C57BL/10, B and D – MDX. E – quantification of the integrated density of pixels and statistical significance of intergroup comparisons. \*\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Mean  $\pm$  SEM. Scale bar: 50  $\mu$ m.

conditions used were 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The reference gene *Gapdh* was tested and validated by the Best-Keeper software and used as a normalizer. The results were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

## 2.6. Motor function test

The functional analysis was evaluated using an automated walking track system (CatWalk System, Noldus Inc., Netherlands) in which the animal can walk spontaneously, on a glass platform illuminated with a green light, highlighting the footprints when the paws contact the walkway. Three runs were recorded by a high-speed camera placed under the catwalk, and the data was analyzed using CatWalk XT 10.6 software (Noldus Inc.). The sciatic function index (SFI) was calculated according to the following formula:  $SFI = \frac{(EPL - NPL)/NPL}{-7, 5}$ , where N - normal side; E - experimental side; PL - print length; and TS - toe spread. For adaptation, the mice were placed individually in the system to walk for 10 min for three days before the beginning of the experiments. After four days of

treatment from the beginning of the experiment, the footprints of spontaneous walk were collected every day for twenty-four consecutive days at the same time and environmental conditions. Mice were allowed to move freely in both directions with a running time between 0.50 and 5 s at a maximum allowed speed with a 60% variation. The camera gain was set to 25.01 and the limit detection to 0.25. Four compatible runs were kept and analyzed.

## 2.7. Balance and motor coordination test

Balance and motor coordination were evaluated on the Rota Rod (Insight, Brazil), which consists of a rotating cylinder operating in the system of continuous speed, with progressive and constant acceleration from a minimum of 5 RPM to a maximum of 37 RPM, with a 6-min ramp between minimum to maximum rotation. The device individually monitored the performance of four animals at the same time, and each compartment has a system for detecting the fall of the animal through impact to allow determining its time and revolutions per minute that the animal remained in the cylinder. In this test, the mouse is placed on

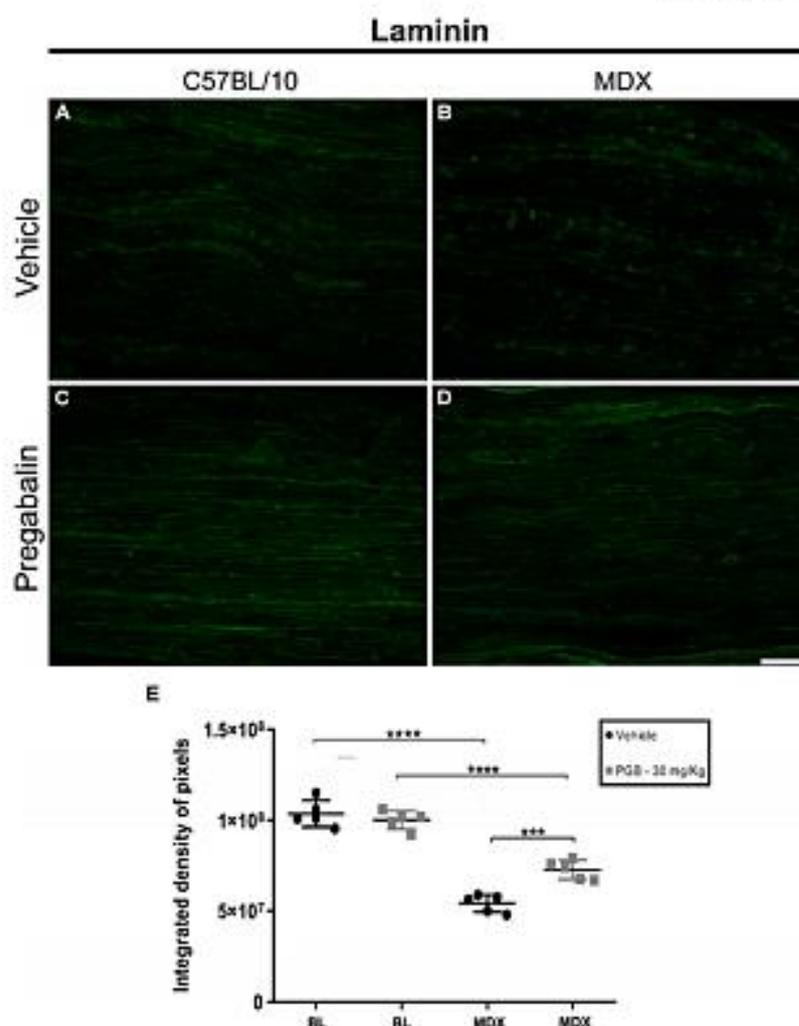


Fig. 2. Anti-laminin immunostaining of longitudinal sciatic nerve sections, revealing labeling upregulation following PGB administration in MDX mice. A and C - C57BL/10, B and D - MDX. E - quantification of the integrated density of pixels and statistical significance of intergroup comparisons. \*\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Mean  $\pm$  SEM. Scale bar: 50  $\mu$ m.

the cylinder, making it necessary to carry out all postural adjustments by coordinating the movements of the four limbs to remain in the device. Previously, C57BL/10 animals were trained to adjust the level of difficulty used in the protocol, as it is the control strain. For three consecutive days, the animals were subjected to a progressive acceleration adaptation from 5 to 37 rpm, therefore the same acceleration used in the experiments. The first test session, on the eighth day of treatment, was performed to establish baseline parameters for each animal. Subsequently, six more sessions were performed during treatment, one week apart.

### 2.8. Statistical analysis

All data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and  $P < 0.05$  was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 7.05 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, California, USA). For immunostaining and quantification of PCR, one-way ANOVA was used followed by the Tukey multiple comparison test. For functional recovery and forced lo-

comotion test, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test when comparing vehicle and Pregabalin treatment, for possible intergroup differences.

## 3. Results

### 3.1. Pregabalin protects axons and motor plates of the cranial tibial muscle of MDX mice

After twenty-eight days of treatment, the neurofilament immunostaining obtained from the peripheral nerve of both strains (Table 4) depicts a significant loss of labeling in MDX mice, as compared to C57BL/10 counterpart (C57BL/10 and MDX, \*\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 1A-E). Importantly, treatment with PGB, result in more intense neurofilament expression both in C57BL/10 (C57BL/10 vehicle and C57BL/10 PGB, \*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 1A and C) and in MDX mice (MDX vehicle and MDX PGB, \*\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 1B and D). The comparison between strains revealed that PGB improve MDX labeling, although it has not reached control levels.



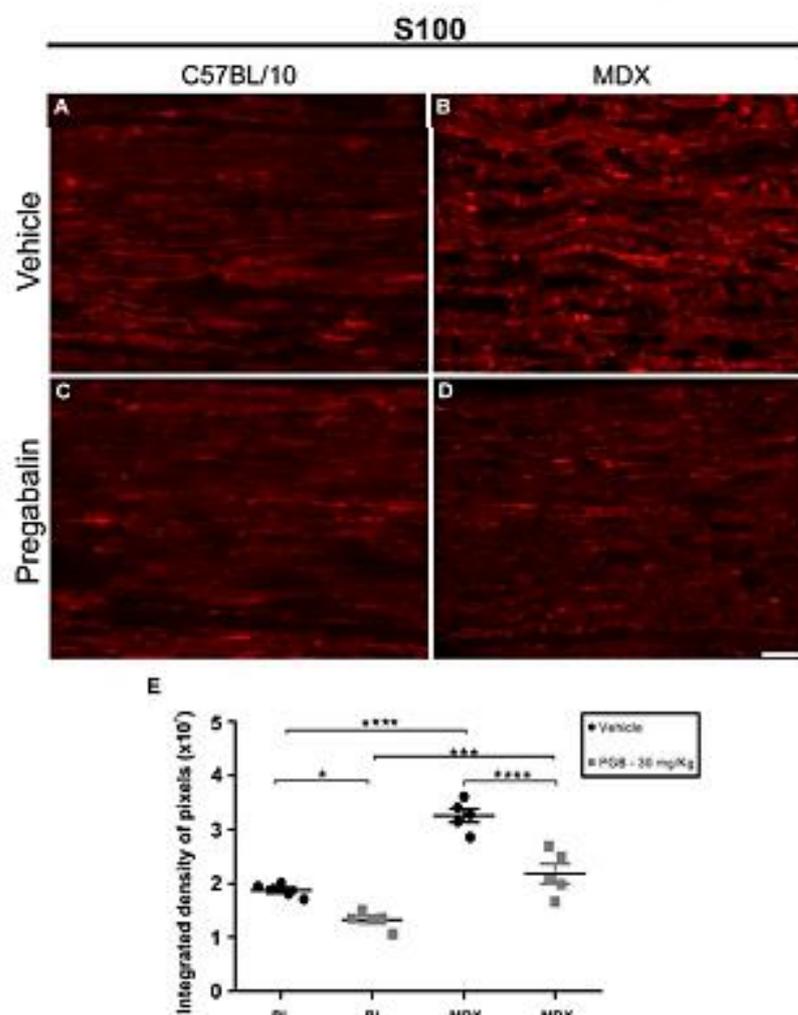


Fig. 3. Anti-S100 immunostaining of longitudinal sciatic nerve sections, revealing labeling downregulation following PGB administration. A and C - C57BL/10, B and D - MDX. E - quantification of the integrated density of pixels and statistical significance of intergroup comparisons. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Mean  $\pm$  SEM. Scale bar: 50  $\mu$ m.

Laminin immunolabeling indicates low expression in the MDX, significantly lower than in C57BL/10 mice (\*\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 2A–E). However, an increase in laminin expression in the peripheral nerves of MDX mice due to treatment with PGB could be observed (\*\* $p < 0.001$ , Fig. 2B, D, and E).

To better investigate the effects of PGB on Schwann cells, we evaluated the immunoreactivity against calcium-binding S100 protein, observed significant upregulation in MDX mice, (vehicle, \*\*\*\* $p < 0.001$ ; PGB, \*\*\* $p < 0.001$  Fig. 3A and E). When treated with PGB both strains showed downregulation of S100, being more significant in MDX mice (C57BL/10 - \* $p < 0.05$ , Fig. 3A, C and E; MDX - \*\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 3B, D and E). Data are detailed in Table 4.

In addition, PGB treatment results in decreased expression of p75NTR (low-affinity receptor for neurotrophins) being more prominent in MDX mice (\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 4B, D and E, Table 3), since in the vehicle dystrophic animals the immunoreactivity was greater than in the PGB counterpart (\*\*\* $p < 0.001$  MDX vehicle, Fig. 4B and E).

The motor endplates evaluation depicted a deficit in MDX dystrophic mice as compared to C57BL/10 (\*\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 5E, Table

4). Importantly, treatment with PGB increased the number of neuromuscular junctions in the control strain (\*\*\* $p < 0.001$ , Fig. 5E), but also preserved the morphology of the motor plates in MDX mice, increasing cellularity in the nerve terminals, given the DAPI positive nuclei observation (Fig. 5D).

### 3.2. Cytokine retrograde spinal cord immunomodulation by PGB treatment

Gene transcript levels of pro-inflammatory genes for TNF- $\alpha$  and IFN $\gamma$  (Fig. 6A and B), anti-inflammatory transcripts for TGF- $\beta$  (Fig. 6C), neurotrophic factor BDNF (Fig. 6D), and growth associated protein - GAP43 (Fig. 6E) were evaluated 28 days after treatment with PGB. TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  and TGF- $\beta$  showed a significant increase in C57BL/10 following PGB treatment (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). On the contrary, PGB results in downregulation of BDNF gene transcripts in C57BL/10. In this regard, MDX presented relatively low levels of such gene, with a trend of upregulation following PGB administration. As for GAP43 gene expression, PGB led to a significant downregulation in C57BL/10 mice, al-

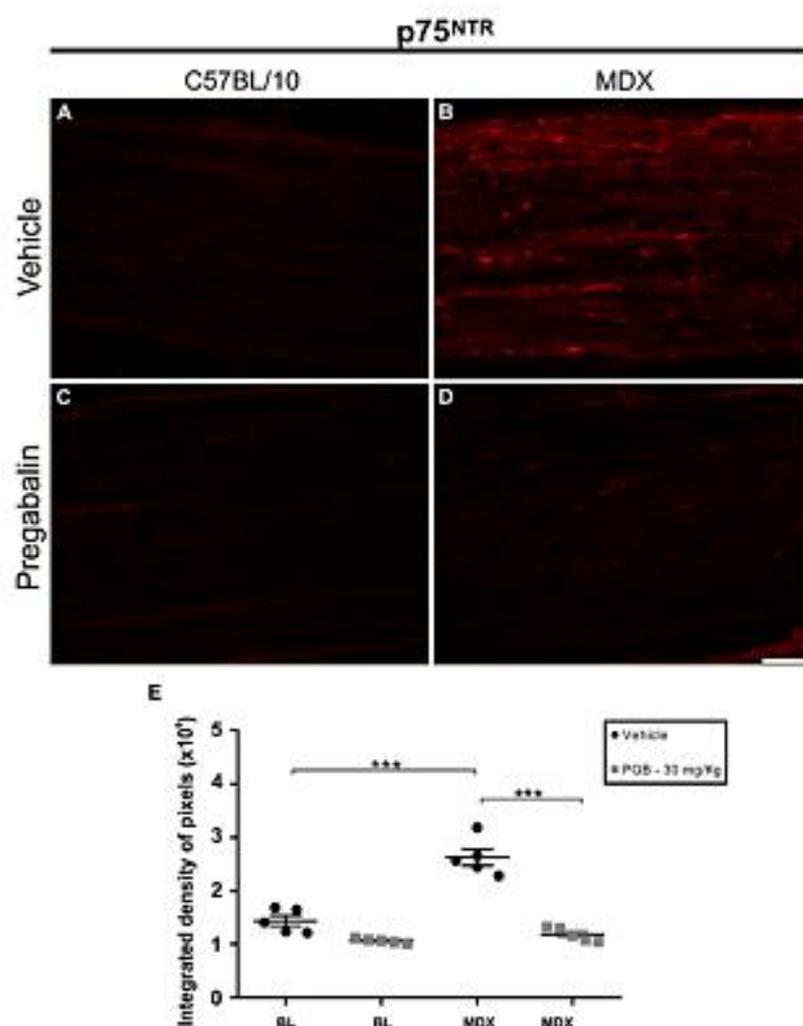


Fig. 4. p75NTR (low-affinity pan-neurotrophin receptor) immunostaining of longitudinal sciatic nerve sections, revealing labeling downregulation following PGB administration. A and C – C57BL/10, B and D – MDX. E – quantification of the integrated density of pixels and statistical significance of intergroup comparisons. \*\*\* $p < 0.01$ . Mean  $\pm$  SEM. Scale bar: 50  $\mu$ m.

though it was unchanged in MDX animals. All data are detailed in Table 5.

### 3.3. PGB modifies basal levels of Schwann cell gene transcripts in the sciatic nerve

Transcript levels of myelin basic protein - MBP were downregulated in MDX mice as compared to C57BL/10 regardless PGB treatment. Nevertheless, PGB administration indicated a trend of upregulation in both groups (Fig. 7A).

S100 gene transcript levels showed significant upregulation in the control group treated PGB (\*\* $p < 0.001$ , Fig. 7B). Analysis of the p75NTR gene transcripts demonstrated that PGB treatment downregulated C57BL/10 to MDX levels (\*\* $p < 0.001$ , Fig. 7C). The quantification data are detailed in Table 5.

### 3.4. Treatment with PGB improves gait performance in MDX mice

MDX mice showed a significant deficit in motor performance, seen by the rotarod test, resulting in the reduction of the time spent on the rotating bar as compared to the C57BL/10 (Fig. 8 and Table 6). Importantly, the treatment of MDX mice with PGB group tended to reduce even more the time on the rotating cylinder, indicating an unexpected side effect. Nevertheless, from the 21st day of treatment, MDX mice improved and reach control level of performance that was kept until the experiment endpoint (Fig. 8).

The locomotion performance of the experimental groups was evaluated by the spontaneous walking track test (CarWalk system). Thus, the functional sciatic functional index - SFI (Fig. 9), confirmed previous data that MDX strain presents around 30% functional deficit as compared to the C57BL/10 mice. PGB treatment improved SFI so that at certain timepoints no statistically significant differences could be seen among strains. That became clear in the experiment endpoint, where vehicle-treated MDX mice were significantly worse than the other experimental groups (\*\* $p < 0.01$ , Table 7).

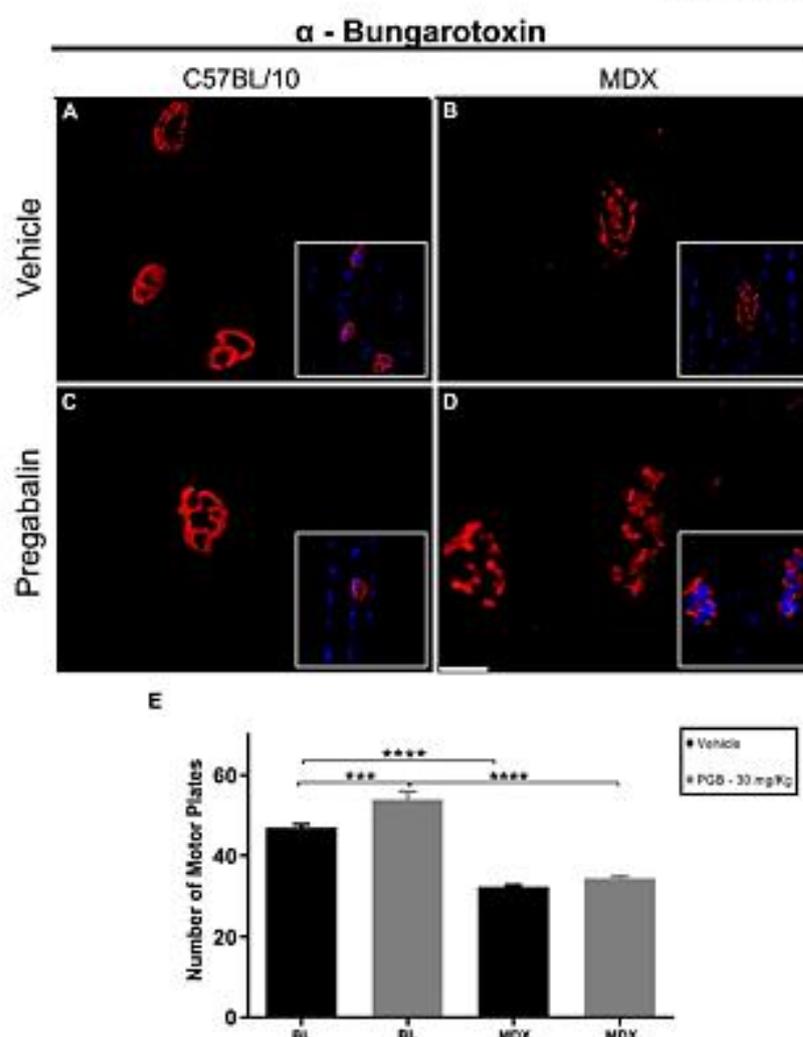


Fig. 5. Post-synaptic acetylcholine receptors ( $\alpha$ -bungarotoxin staining) in the motor endplates of cranial tibial muscles of C57BL/10 and MDX mice. A-D - Representative pictures from C57BL/10 and MDX treated with vehicle and PGB. E - Reduced number of neuromuscular junctions in the MDX strain. PGB increased the number of endplates found in C57BL/10 mice and improved the morphology of motor endplates in MDX mice. \*\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ . Mean  $\pm$  SEM. Scale bar: 25  $\mu$ m.

#### 4. Discussion

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a disease that causes progressive muscle degeneration, induced by a genetic deficiency of dystrophin (Chan and Head, 2011). In young animals, peak disease is seen around 6–8 weeks of life, when myofibrils of the hind limb muscles, in MDX dystrophic mouse, show widespread degeneration, chronic inflammation, myonecrosis, combined with cycles of regeneration (Grinnell, 1995). It is emphasized that during myofiber degeneration and regeneration, the bidirectional communication between the motor axon and the muscle fibers is impaired due to fragmentation of the motor endplate. In turn, the neuromuscular junctions are affected and the axonal terminal enters in a degeneration/regeneration cycle (Sadeh et al., 1985). In addition, there is also a reduction in the active area of pre-synaptic terminals in association with the postsynaptic membrane, resulting in the decline of muscle contractility (Grady et al., 2000; Pratt et al., 2013). Previous studies in our laboratory showed that neuromuscular changes retrogradely affect the microenvironment of the peripheral

nervous system. In line with that, we found aberrant myelinated axons in the sciatic nerve of 8-week-old MDX mice, together with signs of hypomyelination (Simões et al., 2014; Zeman and Sandow, 1979). The severity of DMD is, in turn, not restricted to the muscular component but also affects the central and peripheral nervous system (Caudal et al., 2020; Licursi et al., 2012; Dhindsa et al., 2020; Lidov, 1996; Miranda et al., 2016; Simoes and de Oliveira, 2012). Importantly, neurons from dystrophic mice show alterations in the development of axons and synaptic networks in the central nervous system. In this regard, previous data have shown more intense synaptic detachment and a significant decrease in synaptophysin expression in spinal cord alpha motoneurons of MDX mice. This has been interpreted as a reduction in synaptic activity, in addition to an increased reactive astrogliosis and microglial reaction (Zeman and Sandow, 1979).

The present results on sciatic nerve morphology demonstrate significantly reduced neurofilaments immunolabeling in MDX mice. Since they contribute to the axon cytoarchitecture and regulate transport of metabolic and structural elements in both retrograde and anterograde

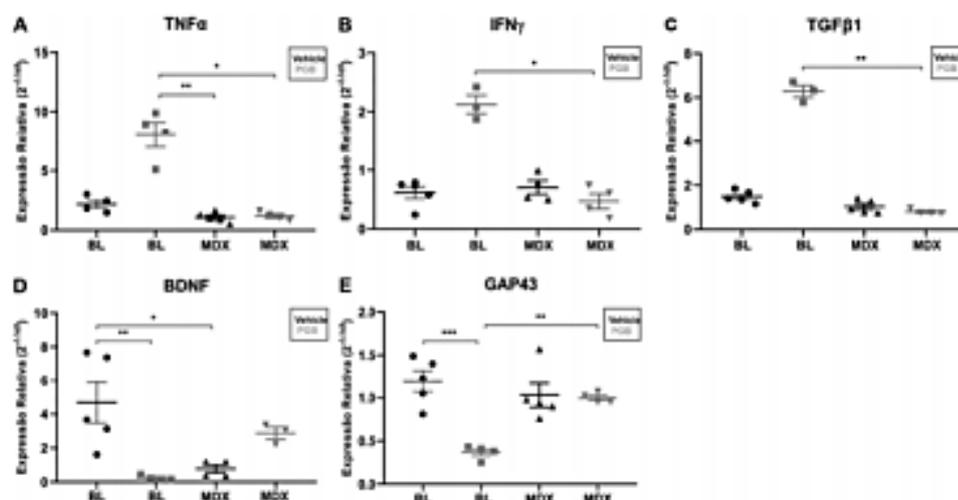


Fig. 6. Relative quantification of gene transcript expression of TNF $\alpha$  (A); IFN $\gamma$  (B); TGF $\beta$ 1 (C); BDNF (D), and GAP43 (E) in the lumbar spinal cord after 28 days of treatment with PGB. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Mean  $\pm$  SEM.

Table 5

Relative transcript gene expression in the spinal cord and sciatic nerve after PGB treatment.

Groups					
Tissue	Genes	BL/Vehicle	BL/PGB	MDX/Vehicle	MDX/PGB
Spinal cord	Tnfa	2.18 $\pm$ 0.33	8.05 $\pm$ 1.03	1.07 $\pm$ 0.19	1.18 $\pm$ 0.17
	Ifny	0.62 $\pm$ 0.10	2.12 $\pm$ 0.16	0.70 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.13
	Tgfβ1	1.50 $\pm$ 0.12	6.30 $\pm$ 0.27	1.03 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.05
	Gap43	1.20 $\pm$ 0.12	0.37 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.30
	Bdnf	4.70 $\pm$ 1.20	0.25 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.23	2.90 $\pm$ 0.35
Sciatic nerve	S100	1.40 $\pm$ 0.18	2.87 $\pm$ 0.17	1.0 $\pm$ 0.09	1.17 $\pm$ 0.13
	P75	15.7 $\pm$ 2.15	2.27 $\pm$ 0.55	1.01 $\pm$ 0.11	1.11 $\pm$ 0.12
	Mpb	1.88 $\pm$ 0.16	2.26 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.05	1.52 $\pm$ 0.14

directions, the downregulation observed indicates a pathological condition. In line with that, decreased laminin expression, has been related to peripheral neuropathies, contributing to the deficit in nerve conduction, especially in humans and MDX animals as compared to C57BL/10

(Krishnan et al., 2020a; Krishnan et al., 2020b; Simões et al., 2014; Court et al., 2006; Rasminsky et al., 1978; Shorer et al., 1995; Sunada et al., 1995; Vidal et al., 2013; Yu et al., 2007; Yuan et al., 2012). Treatment with PGB resulted in more intense neurofilament expression in both C57BL/10 and MDX mice, suggesting axonal sprouting and more organized formation of growth cones, which in turn enhanced repair mechanisms, myelination, and gain of function especially in MDX mice (Simoes and de Oliveira, 2012; Marques et al., 2007). Of note is the absence of a direct correlation between the immunohistochemistry and qRT-PCR results, regarding S100 and p75NTR, indicating that gene expression profile is significantly different than the protein levels. Thus, it is possible that intermediate mechanisms take place in between the mRNA expression and the protein translation. Since we did not investigate such events, further studies will be necessary to understand such findings. Nevertheless, the immunohistochemistry data correlated better with the behavior counterpart, reinforcing that PGB treatment results in key protein expression and close to normal motor function.

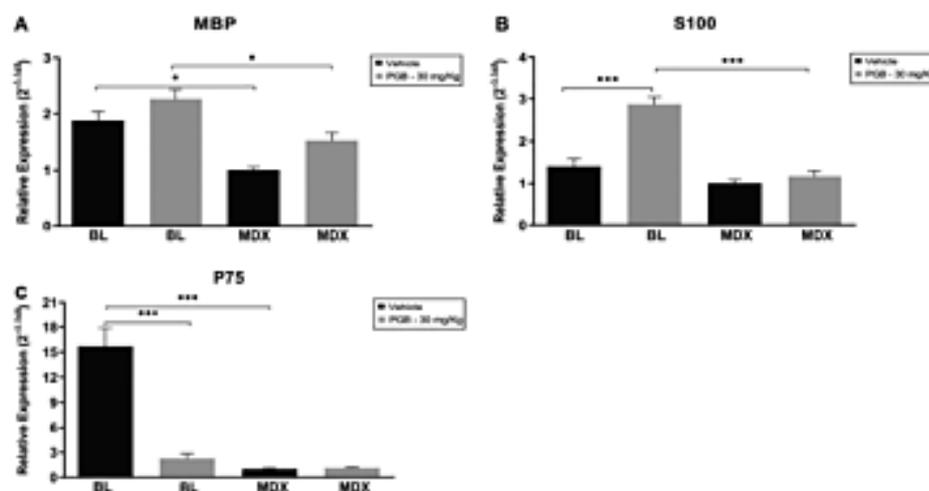


Fig. 7. Relative quantification of gene transcript expression of myelin basic protein MBP (A), S100 (B), and p75NTR (C) in the sciatic nerve, following 28 days of treatment with PGB. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Mean  $\pm$  SEM.

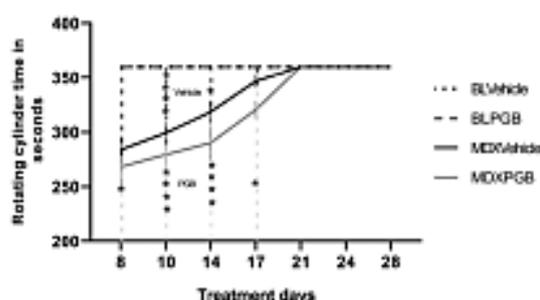


Fig. 8. Forced locomotion demonstrating the motor deficit in the MDX dystrophic strain. Observe functional adaptation in MDX mice from the 21st day of testing. C57BL/10 -  $n = 5$  per group, MDX -  $n = 9$  per group.

Table 6

Rotarod test data after 28 days of treatment with PGB.

Groups					
Assay	Treatment days	BLVehicle	BLPGB	MDXVehicle	MDXPGB
Rota rod	8th day	360 ± 0	360 ± 0	310 ± 13	289 ± 5
	10th day	360 ± 0	360 ± 0	304 ± 9	288 ± 8
	14th day	360 ± 0	360 ± 0	326 ± 10	306 ± 13
	17th day	360 ± 0	360 ± 0	356 ± 2	326 ± 7
Seconds	21st day	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0
	24th day	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0
	28th day	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0	360 ± 0

An important finding of the present work is that the administration of PGB preserved the morphology of the motor endplates in MDX mice, increasing the number and the cellularity in the nerve endings, given the observation of positive DAPI nuclei. This may indicate reparative responses of neurons and Schwann cells, such as axon sprouting towards regenerated muscle fibers, contributing to the MDX mice improvements seen herein (Marques et al., 2007; Briguët and Ruegg, 2000; Lyons and Slater, 1991). Further, PGB did not alter the expression of the GAP43 gene in MDX animals and showed relatively low levels of BDNF gene transcription, reinforcing the enhanced homeostasis (Blum and Konnerth, 2005; Comlin et al., 2019). The significant increase in TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and TGF- $\beta$  in C57BL/10 animals, however, point to possible side effects of the drug in normal animals (Goswami et al., 1999; Lainetti et al., 1995; Liu et al., 2015).

MDX mice showed a significant deficit in motor performance, as seen by the forced locomotion test on the rotarod, which was momentarily aggravated by PGB administration. Such side effect, in one hand, was expected due to dizziness and somnolence related to gabapentin analog drugs. On the other hand, prostration in MDX mice may protect striated muscle, preventing the aggravation of motor plate fragmentation, as seen in the alpha-bungarotoxin labeling (Domon et al., 2018; Tzellos et al., 2010). Nevertheless, the MDX animals demonstrated functional adaptation to forced training after the third training session, reaching control levels from the 21st day of treatment.

The locomotor performance measured by the walking track test (CatWalk system), confirmed that the MDX strain has a gait deficit (Simões et al., 2014; Simões and de Oliveira, 2012). Importantly, treatment with PGB improved motor function, resulting in a more regular walking pattern in MDX mice, so that at certain instances, no statistical differences were observed between strains. This became clear at the experiment endpoint, where vehicle-treated MDX mice were significantly worse than the other experimental groups, possibly due to the well-established acute phase of the degeneration cycles (Caudal et al., 2020; Allen et al., 2010; Larcher et al., 2014; Wells, 2018).

In conclusion, the results presented herein support that PGB promotes a favorable microenvironment for neuronal and glial homeostasis leading to protection, regeneration, and strengthening of MDX mice (Tedeschi et al., 2016). Equally, PGB induced modulating effects in peripheral axons and Schwann cells, improving bidirectional communication between neurons and the target muscle. In turn, the present results indicate that pregabalin is effective in protecting the PNS during the development of DMD, improving motor coordination, suggesting possible translation to the clinic.

#### Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation - FAPESP [grant numbers 2018/05006-0, and 2015/14385-7]; and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grant numbers 303085/2017-7, and 446609/2014-5].

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

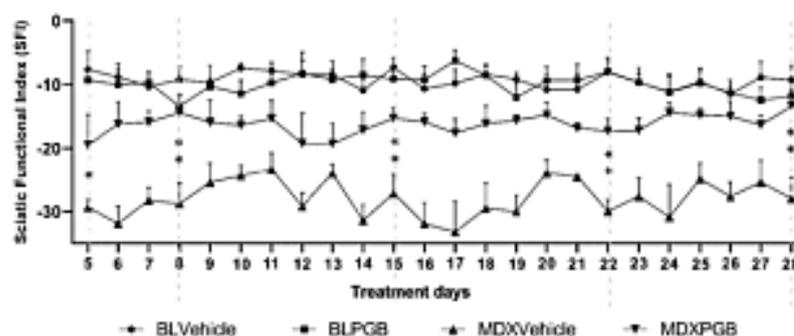


Fig. 9. Sciatic functional index (SFI) in C57BL/10 and MDX mice. Observe the overall improvement of MDX mice treated with PGB as compared to the vehicle. \*\* $p < 0.01$ . Mean  $\pm$  SEM.  $N = 5$  per group.

**Table 7**  
Sciatic functional index - SFI during the 28 days of treatment with PGB.

Groups					
Assay	Treatment days	BLVehicle	BLPGB	MDXVehicle	MDXPGB
	5th day	-7.6 ± 2.8	-9.3 ± 1.8	-29.3 ± 1.2	-19.5 ± 4.8
	8th day	-9.2 ± 2.0	-13 ± 1.8	-29.0 ± 3.3	-14.4 ± 2.7
CaWalk	15th day	-7.3 ± 1.5	-9.1 ± 1.1	-27.1 ± 3.0	-15.3 ± 1.6
SFI	22nd day	-8.0 ± 2.3	-8.0 ± 1.9	-30.0 ± 1.8	-17.2 ± 1.9
	28th day	-9.3 ± 2.3	-12 ± 1.7	-28.0 ± 3.3	-13.4 ± 2.4

## References

- Allen, D.G., Gerrada, G.L., Young, E.W., Whitehead, N.P., 2010. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88 (2), 83–91.
- Bian, F., Li, Z., Offord, J., Davis, M.D., McCormick, J., Taylor, C.P., et al., 2006. Calcium channel  $\alpha 2$ -delta type 1 subunit is the major binding protein for progabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an *in vivo* autoradiographic study in  $\alpha 2$ -delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res.* 1075 (1), 68–80.
- Blum, R., Koenigs, A., 2005. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20, 70–78.
- Briguet, A., Raugg, M.A., 2000. The *Dn* transcription factor GMP is required for postsynaptic differentiation *in vivo*. *J. Neurosci.* 20 (16), 5989–5996.
- Brinig, L., Suter, A., Knusel, I., Lüscher, B., Fréchet, J.M., 2002. GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J. Neurosci.* 22 (12), 4805–4813.
- Casali, D., François, V., Lafoux, A., Ladevèze, M., Anegón, L., Le Guiner, C., et al., 2020. Characterization of brain dystrophin absence and impact in dystrophin-deficient *Dmdmdx* rat model. *PLoS One* 15 (3), e0230983.
- Chen, S., Head, S.I., 2011. The role of branched fibres in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Exp. Physiol.* 96 (6), 564–571.
- Cozlin, C.M., Venema, L., Freilinger, V., Diaz, P., Emagagnolo, D., Datta, M.L., et al., 2019. Neurocognitive impairment in *mdx* mice. *Mol. Neurobiol.* 56 (11), 7606–7616.
- Coulton, G.R., Curtin, N.A., Morgan, J.E., Patridge, T.A., 1988. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Genetically progressive. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14 (4), 299–314.
- Court, F.A., Wabnitz, L., Feltri, M.L., 2006. Basal lamina Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16 (5), 501–507.
- Dargatzis, J., Vrbova, G., 1984. Muscle development in *mdx* mouse mice. *Muscle Nerve* 7 (9), 700–704.
- De Backer, F., Vandebrouck, C., Gally, P., Gillis, J.M., 2002. Long-term study of  $Ca^{2+}$  homeostasis and of survival in collagenase-isolated muscle fibres from normal and *mdx* mice. *J. Physiol.* 542 (Pt 3), 825–865.
- Decostre, A.E., Rafail, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Pomer, A.C., Metzinger, L., et al., 1997. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90 (4), 717–727.
- Dhinda, J.S., McCabe, A.L., Strickland, L.M., Fueno, A.F., Kahn, A.F., Elmali, M.K., 2020. Motor axonopathies in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.* 10 (1), 8967.
- Di Gallini, M.N., Urbano, F.J., Inchausti, C.G., Uchitel, G.D., 2011. Progabalin modulation of neuromuscular release is mediated by changes in intrinsic activation/inactivation properties of  $Ca_v2.2$  calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336 (3), 973–982.
- Dizon, Y., Arakawa, N., Inoue, T., Miranda, F., Takahashi, M., Yamamura, N., et al., 2018. Binding characteristics and analgesic effects of nitrogabalin, a novel ligand for the  $\alpha 2$  subunit of voltage-gated calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 365 (3), 573–582.
- Dupont-Versteegden, E.E., Baldwin, R.A., McCarter, R.J., Vozianthen, M.G., 1994. Does muscular dystrophy affect metabolic rate? A study in *mdx* mice. *J. Neurosci.* 12 (2), 203–207.
- Erköse, E., Srodka, B.D., Pham, W., Liu, J., Foddele, E.E., Trivitt, W., et al., 2019. Skilled reaching deterioration contralateral to cervical hemisection in rat is reversed by progabalin treatment conditioned upon its early administration. *Pain Rep.* 4 (3), e749.
- Gonzalez, R., Rilkes, J., Dawson, S.A., Dawson, G., 1999. Overexpression of Akt (protein kinase B) confers protection against apoptosis and prevents formation of ceramide in response to pro-apoptotic stimuli. *J. Neurosci.* 19 (5), 884–893.
- Grady, R.M., Zhou, H., Cunningham, J.M., Henry, M.D., Campbell, K.P., Saxe, J.R., 2000. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron* 25 (2), 279–293.
- Grinsell, A.D., 1995. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 75 (4), 789–824.
- Ha, K.Y., Kim, Y.H., Rhyu, K.W., Kwon, S.E., 2008. Progabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur. Spine J.* 17 (6), 864–872.
- Ha, K.Y., Carragee, E., Cheng, I., Kwon, S.E., Kim, Y.H., 2011. Progabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats: Biochemical analysis and effect on glial cells. *J. Korean Med. Sci.* 26 (3), 404–411.
- Händelberg, P., Fernandez-Ortiz, J., Römer, P., Back, T., Mikolajewicz, T., Eichler, S., et al., 2018. Targeting voltage-dependent calcium channels with progabalin exerts a direct neuroprotective effect in an animal model of multiple sclerosis. *Neurobiol.* 26 (3), 77–91.
- Inaura, M.M., Blach, D.A., Terrie, D.J., 1998. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* 18 (2), 119–124.
- Ertzbach, V.S., Aarssen-Ras, A., Overzier, M., Lutz, C., Bogdahn, L., Grounds, M.D., 2020a. Implications of increased 5100b and Tau5 proteins in dystrophic nerves of two *mdx* mouse models for Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Cell. Neurosci.* 105, 103484.
- Ertzbach, V.S., Thanigalarasu, L.P., White, R., Crew, R., Larcher, T., Le Guiner, C., et al., 2020b. Dystrophic *Dmdmdx* rats show early neuronal changes (increased 5100b and Tau5) at 8 months, supporting severe dystropathology in this rodent model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Cell. Neurosci.* 108, 103549.
- Erich, S.L., Head, S.I., Morley, J.W., 2008. GABA(A) receptor expression and inhibitory postsynaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 (2), 207–210.
- Erich, S.L., Dempster, J., Head, S.I., Morley, J.W., 2011. Reduced postsynaptic GABA(A) receptor number and enhanced glycoacid induced change in holding currents in Purkinje cells of the dystrophin-deficient *mdx* mouse. *Neurobiol. Dis.* 43 (3), 558–564.
- Erskoff, L.M., Monaco, A.P., Middleton, W., Ochs, H.D., Lan, S.A., 1983. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (14), 4778–4782.
- Laird, R.D., Pereira, F.C., De-Silva, C.F., 1995. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. *Res. J. Med. Biol. Res.* 28 (7), 783–785.
- Lucasman, J.B., Franco-Chavez, A., 2006. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle: a link in the membrane pathology of muscular dystrophy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33 (7), 649–656.
- Larcher, T., Lafoux, A., Trépo, L., Ferry, S., Thépenier, V., François, V., et al., 2014. Characterization of dystrophin-deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9 (10), e110371.
- Lövi, S., Grady, R.M., Henry, M.D., Campbell, K.P., Saxe, J.R., Craig, A.M., 2002. Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J. Neurosci.* 22 (31), 4274–4285.
- Lisciani, V., Casella, I., Lombardi, L., De Stefano, M.E., Negri, P., Paggi, P., 2012. Lack of dystrophin in *mdx* mice modulates the expression of genes involved in neuron survival and differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 25 (5), 693–701.
- Lisak, H.G., 1996. Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol.* 6 (1), 63–77.
- Liu, Z., Jin, Y.Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., et al., 2015. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture *in vitro*. *PLoS One* 10 (4), e0123278.
- Lyons, P.R., Slater, C.R., 1991. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult *mdx* mice. *J. Neurocytol.* 20 (12), 959–961.
- Margus, M.J., Tarigati, A.P., Mizuno, E., Seta, H.S., 2007. Nerve terminal cytoskeleton acetylcholine receptor organization at the dystrophic neuromuscular junction of *mdx* mice. *Anat. Rec. (Hoboken)* 290 (2), 181–187.
- McDonald, R.M., Dunn, M.J., Dubowitz, V., 1990. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 99 (2–3), 199–217.
- Moynihan, M.S., Sopher, G., Abdolrazzaki, M., Shostakov, M., Hevri, G., Yandrapati, O., et al., 2017. The effects of co-administration of progabalin and vitamin E on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in male rats. *Inflammopharmacology* 25 (2), 237–246.
- Miranda, F., Laroche, S., Vailland, C., 2016. Reduced neuronal density in the CA1 anteromedial hippocampus of the *mdx* mouse. *Neuroscience* 326 (11), 775–781.
- Musoni, F., Masoldi, A., Marchi, F., Cleri, A., Sora, G., 1993. Muscular weakness in the *mdx* mouse. *J. Neurosci.* 12 (1), 71–77.
- Pani, M., Mouton, S., Bruno, C., D'Amico, A., Villanova, M., Brunarone, E., et al., 2013. Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuroscience* 23 (4), 313–315.
- Pencev, J.M., 2005. Early observation on duchenne-myotonic muscular dystrophy. *Eur. Neurol.* 54 (1), 46–48.
- Pere S, D,la Morin, S, Koenig, J, 1999. Characteristics of skeletal muscle in *mdx* mutant mice. *Int. Rev. Cytol.* 191, 99–148.
- Pratt, S.J.P., Shah, S.B., Ward, C.W., Macle, M.P., Stains, J.F., Lovett, R.M., 2013. Effects of *in vivo* injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *J. Physiol.* 591 (2), 559–570.
- Radley-Crabb, H.G., Narid, J.C., Sosa, H.A., Casella, L.I., Grounds, M.D., Florio, M.L., 2014. Dystropathology increases energy expenditure and protein turnover in the *mdx* mouse model of duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9 (2), e89277.
- Ramirez, M., Kramsey, R.E., Aguayo, A.J., Bray, G.M., 1978. Conduction of nervous impulses in spinal roots and peripheral nerves of dystrophic mice. *Brain Res.* 143 (3), 71–85.
- Ray, P.N., Belzil, B., Duff, C., Lopez, C., Kwon, V., Thompson, M.W., et al., 1985. Cloning of the locus of an X23 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 318 (6047), 672–675.
- Razzoli, M., Lindsay, A., Law, M.L., Chamberlain, C.M., Southern, W.M., Berg, M., et al., 2020. Social stress is lethal in the *mdx* model of Duchenne muscular dystrophy. *EBioMedicine* 55, 102700.
- Sadeh, M., Stern, L.Z., Ceylan, K., 1985. Changes in end-plate cholinesterase and axons during muscle degeneration and regeneration. *J. Anat.* 140 (Pt 1), 165–176.
- Shover, Z., Philpot, J., Manzoni, F., Sewry, C., Dubowitz, V., 1995. Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J. Child Neurol.* 10 (6), 472–475.
- Silva, G.A., Padella, F., Moraes, A., Farias, A., dos Santos, L.M., de Oliveira, A.L., 2014. Impact of progabalin treatment on synaptic plasticity and glial reactivity during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav.* 4 (5), 925–935.
- Simoes, G.F., de Oliveira, A.L., 2012. Granulocyte-colony stimulating factor improves MDX mouse response to peripheral nerve injury. *PLoS One* 7 (8), e42803.
- Simoes, G.F., Oliveira, A.L., 2010. Alpha motoneuron input changes in dystrophic MDX mice after sciatic nerve transection. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 36 (1), 55–70.
- Simões, G.F., Benito, S.U., Oliveira, A.L., 2014. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) positive effects on muscle fiber degeneration and gait recovery after nerve lesion in MDX mice. *Brain Behav.* 4 (5), 738–751.

- Genov, W.M., Anderson, J.E., Johnson, L.C., 2013. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37 (5), 743–752.
- Spencer, M.J., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K., Tidball, J.G., 2001. Helper (CD4<sup>+</sup>) and cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin. Immunol.* 98 (2), 235–243.
- Soy, T.L., Milerko, L.N., Arancillo, M., Liu, T., Sillitoe, R.V., 2019. In vivo cerebellar circuit function is disrupted in an mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Neurobiol.* 59 (6), 1171–1185.
- Sachyna, T.M., Sachs, F., 2007. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J. Physiol.* 581 (Pt 3), 369–387.
- Suzada, Y., Bernier, S.M., Utari, A., Yamada, Y., Campbell, K.P., 1995. Identification of a novel mutant transcript of beta-tubulin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in *dy2J* mice. *Hum. Mol. Genet.* 4 (6), 1055–1063.
- Tassone, D.M., Boyce, E., Gayzer, J., Nazam, D., 2007. Pregabalin: a novel gamma-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, post-herpetic neuralgia, and restless leg syndrome. *Clin. Ther.* 29 (7), 930–940.
- Tedeschi, A., Dupraz, S., Lukowski, C.J., Xie, J., Ullas, T., Beyer, M., et al., 2016. The calcium channel subunit  $\alpha$ 2delta2 suppresses axon regeneration in the adult CNS. *Neuron* 92 (2), 479–494.
- Tuckers, E., Cassini, T., Hayes, A., Rybakos, E., Verghese, E., 2015. Increased excitotoxicity in the cerebral cortex and cerebellum is not associated with cell loss in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport* 26 (13), 785–790.
- Tzellas, T.G., Papatzidis, G., Tzilas, E.A., Sardeli, C., Kotrovas, D., 2010. Alpha2delta ligands gabapentin and pregabalin: future implications in daily clinical practice. *Hippokratia* 14 (2), 71–75.
- Vidal, C.J., Montenegro, M.F., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F.J., Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M.T., 2013. The AChE membrane-binding tail PRIMA is down-regulated in muscle and nerve of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. *Chem. Biol. Interact.* 203 (1), 330–334.
- Wells, D.J., 2018. Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* 11 (6).
- Yu, W.M., Yu, H., Chen, Z.L., 2007. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol. Neurobiol.* 35 (3), 288–297.
- Yuan, A., Rao, M.V., Venanna, N.R.A., 2012. Neurofilaments at a glance. *J. Cell Sci.* 125 (Pt 14), 3257–3263.
- Zeman, R.J., Sandow, A., 1979. Denervation effects on dystrophic and normal muscles and the etiology of dystrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 317, 171–186.

## 11. Anexo

## 11.1. Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais - Instituto de Biologia - CEUA / IB / UNICAMP

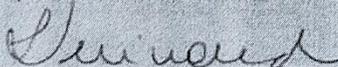
**CERTIFICADO**

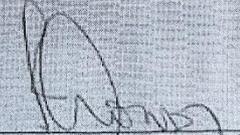
Certificamos que a proposta intitulada Estudo da estabilidade sináptica no microambiente medular e da integridade do sistema nervoso periférico e sistema muscular esquelético de camundongos MDX tratados com pregabalina, registrada com o nº 3769-1(A)/2017 sob a responsabilidade de Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira / Prof. Dr. Gustavo Ferreira Simões / Alex Dias Assis / Iris Stefano Teixeira / Simone Alves da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 06 de fevereiro de 2017.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2015-15/02/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	06/02/2017-15/02/2021
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	470
Peso / Idade:	04 semanas / 12g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-ScCr/PasUnib
No. de animais:	470
Peso / Idade:	04 semanas / 12g
Sexo:	machos
Origem:	Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Regeneração Nervosa, DBEF/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 06 de fevereiro de 2017.

  
 Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
 Presidente

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Cx. Postal 6109 – Campinas – 13083-971 SP – Brasil  
Fones: 019-3788-6358 - FAX: 019-3788-6354  
<http://www.ib.unicamp.br>



## DECLARAÇÃO

Em observância ao § 5º do artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada “**Efeitos protetores da pregabalina no sistema nervoso periférico e sistema muscular esquelético de camundongos MDX**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do aluno: Alex Dias Assis

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Data: 28/07/2021

## 12. Declaração de direitos autorais

### DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, **“Efeitos protetores da pregabalina no sistema nervoso periférico e sistema muscular esquelético de camundongos MDX”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autorial de qualquer editora.

Campinas, 28 de julho de 2021.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do aluno: Alex Dias Assis  
RG n.º 11.363.147

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
RG n.º 20.989.922-x