



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**JULIANO ALVES PEREIRA**

**EFEITO DA DOXICICLINA SOBRE A MIONECROSE E FIBROSE NO  
MÚSCULO ESQUELÉTICO E CARDÍACO DE CAMUNDONGOS  
DISTRÓFICOS *MDX***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Juliano Alves  
Pereira  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título  
de Mestre em Biologia Celular e  
Estrutural, na área de Anatomia.

**Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto**

**Campinas, 2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>P414e</b>	<p>Pereira, Juliano Alves Efeito da doxiciclina sobre a mionecrose e fibrose no músculo esquelético e cardíaco de camundongos distróficos <i>mdx</i> / Juliano Alves Pereira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Humberto Santo Neto. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Doxiciclina. 3. Camundongo <i>mdx</i>. I. Santo Neto, Humberto, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Effect of doxycycline on myonecrosis and fibrosis in skeletal muscle and heart of mice *mdx* dystrophy.

**Palavras-chave em inglês:** Duchenne muscular dystrophy; Doxycycline; *Mdx* mice.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Humberto Santo Neto, Luiz Fernando Takase, Selma Maria Michelin Matheus.

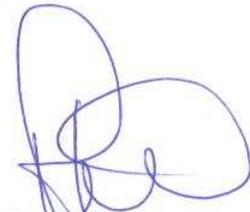
**Data da defesa:** 24/02/2011.

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

Campinas, 24 de fevereiro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

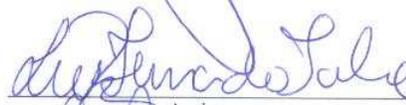
Prof. Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)



---

Assinatura

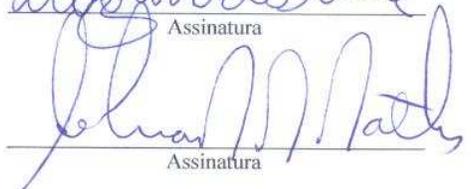
Prof. Dr. Luiz Fernando Takase



---

Assinatura

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus



---

Assinatura

Prof. Dr. Edison Duarte

---

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

---

Assinatura

*Agradecimento especial...*

**Ao professor Dr. Humberto Santo Neto, pela orientação, acolhimento, confiança e pelo aprimoramento didático-científico compartilhado.**

## ***AGRADECIMENTOS***

Agradeço a **Deus** pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas abençoadas e lugares interessantes, mas também por ter vivido momentos difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado.

Aos meus pais, **Osmundo e Maria Tania**, e irmãos, **Josiene e Fernando** e as minhas sobrinhas **Thays e Geovana** e minha vó **Leonor** pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos e que foram indispensáveis para realização de mais uma importante etapa de minha vida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela contribuição no desenvolvimento pessoal e profissional.

À **Profa. Dra. Maria Julia Marques** pela colaboração, conhecimento, incentivo e sugestões dadas durante a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Elaine Minatel** pela colaboração na execução deste trabalho, e pela inestimável amizade.

Aos **docentes do Departamento de Anatomia** pela contribuição dada para a minha formação e pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas** e ao seu orientado **Luiz** pelos seus ensinamentos e por ceder seu laboratório para realização do eletrocardiograma.

Aos Professores Doutores **Alexandre Rodrigues de Oliveira, Cristina Pontes Vicente e Adriana Pertille**, pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Aos Professores Doutores **Ana Maria Aparecida Guaraldo, Edison Duarte, Luiz Fernando Takase, Selma Maria Michelin Matheus**, pelas importantes considerações e sugestões feitas durante o exame de pré-banca, que enriqueceram esse trabalho.

À **Profa. Laurecir Gomes** pelo seu profissionalismo e sensibilidade.

À **Sra. Liliam Alves Senne Panagio** pela atenção e auxílio durante todo o mestrado e por sua inestimável sensibilidade.

Aos funcionários do Depto. de Anatomia, **Sr. Norivaldo Celestino, Sr. Marco Aurélio Ribeiro de Paula, Sr. Paulo Afonso Bernardes, Sr. Paulo Francisco dos Santos, Sr. Toni Donizeti dos Santos, Sra. Marlene Lima Francisco, Sr. Carlos Roberto Gonçalves** *in memória*, **Srta. Stella Maris Fick de Ferraz, Srta. Érika da Silva Campos** pela disposição em ajudar durante minha formação.

Aos amigos do **Laboratório de Biologia da Reprodução, Regeneração Nervosa, Plasticidade e Regeneração Óssea, Bioquímica da Matriz Extracelular** pela amizade e bons momentos compartilhados durante o mestrado.

Aos amigos **Adriana Maurício, Ana Paula Taniguti, Cíntia Matsumura, Drielen de Oliveira, Érica Benjamim, Isabel Chagas, Jean Shiratori, Letícia Montanholi, Livia Riberti, Luiz Henrique Pucci, Matheus Revere, Natália Pinheiro, Pâmela Dias, Paula Perez, Rafael Machado, Renato Ferretti, Samara Carvalho** pela importante contribuição para a realização deste trabalho e pela amizade e convívio nestes dois anos.

A todos os **amigos, colegas, docentes e funcionários** que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq, CAPES-Proex e FAPESP** o apoio financeiro, indispensável.

**“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem  
concentração e auto-sacrifício, esforço e dúvida.”**

**(Max Beerbohm)**

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	1
1.2 CAMUNDONDO <i>MDX</i> COMO MODELO DA DMD.....	3
1.3 CARDIOMIOPATIA NA DMD E NO CAMUNDONGO <i>MDX</i> .....	4
1.4 DOXICICLINA.....	6
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
3.1 ANIMAIS.....	10
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM A DOXICICLINA.....	10
3.3 ANÁLISE FUNCIONAL: Força de tração do membro torácico.....	11
3.4 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS MÚSCULOS.....	12
3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA: Determinação da Creatina Cinase no plasma sanguíneo...	13
3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	14
<b>3.6.1 Avaliação da integridade do sarcolema: Azul de Evans.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6.2 Avaliação da Mionecrose, Inflamação, Regeneração: H&amp;E.....</b>	<b>15</b>
<b>3.6.3 Avaliação da Fibrose intersticial: Tricômico de Masson.....</b>	<b>16</b>
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
4.1 ACHADOS CLÍNICOS E MASSA CORPORAL.....	18
4.2 ANÁLISE FUNCIONAL: Força de tração do membro torácico.....	20

4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA: Determinação da Creatina Cinase no plasma sanguíneo...	22
4.4 ANÁLISE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	23
<b>4.4.1 Análise Histopatológica e Morfométrica: Estudo em <i>mdx</i> jovens.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.2 Análise Histopatológica e Morfométrica: Estudo em <i>mdx</i> idosos.....</b>	<b>25</b>
4.5 ANÁLISE NO MÚSCULO CARDÍACO: Análise histopatológica e morfométrica....	28
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
5.1 A DOX ROTEGEU CONTRA O INÍCIO DA MIONECROSE.....	32
5.2 A DOX AMENIZOU A PROGRESSÃO DA DISTROFINOPATIA.....	33
5.3 A DOX DIMINUIU A INFLAMAÇÃO E FIBROSE NO CORAÇÃO DISTRÓFICO.....	34
5.4 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS.....	35
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>8. COMISSÃO DE ÉTICA: CERTIFICADO.....</b>	<b>53</b>

**ABREVIATURAS**

DMD	-	Distrofia Muscular de Duchenne
CDG	-	Complexo distrofina-glicoproteína
nNOS	-	Óxido nítrico sintase
Ca <sup>2+</sup>	-	Íons cálcio
<i>mdx</i>	-	X chromossome-linked muscular dystrophy
TTCS	-	Tetraciclinas
DOX	-	Doxiciclina
(N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	-	Radical dimetilamino
CMTs	-	4-De-dimetilamino tetraciclina
MMPs	-	Metaloproteinases da matriz
Zn <sup>2+</sup>	-	Íons zinco
MEC	-	Matriz extracelular
EROs	-	Espécies Reativas de Oxigênio
BB	-	Bíceps braquial
DIA	-	Diafragma
TA	-	Tibial anterior
COR	-	Coração
CK	-	Enzima creatina cinase
U/L	-	Unidade Internacional
AE	-	Azul de Evans
H&E	-	Hematoxilina & Eosina
NP	-	Núcleo periférico
NC	-	Núcleo central

## RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é o tipo mais comum de miopatia caracterizado pela perda da deambulação aproximadamente aos 10 anos de idade, levando a óbito por volta da segunda década de vida devido à insuficiência cardiorespiratória. A degeneração muscular e a fibrose estão associadas com a inflamação nos músculos distróficos em pacientes DMD e no camundongo *mdx*, modelo experimental para a DMD. Sendo assim, a identificação de fármacos que possam amenizar a severidade e retardar a progressão da doença é necessária. Neste trabalho foi examinado o efeito da doxiciclina (DOX), um membro da família das tetraciclinas, na mionecrose e na fibrose intersticial nos músculos esquelético e cardíaco, além da função muscular de camundongos *mdx* jovens e idosos. No grupo *mdx* jovem, o tratamento com a DOX (Sandoz) foi administrado na água de beber 6mg/ml, para a mãe e seus recém-nascidos. Iniciou-se o tratamento no dia do nascimento e a mãe foi mantida na gaiola com os filhotes durante os 36 dias de tratamento (n=9). O grupo *mdx* controle recebeu apenas água (n=9). No grupo *mdx* idoso, o tratamento com a DOX (Sandoz) foi administrado na água de beber 6mg/ml, para os camundongos durante 9 meses. Este tratamento foi iniciado aos 8 meses e finalizado aos 17 meses de idade (n=8). O grupo *mdx* controle recebeu apenas água, durante o mesmo período (n=8). Através da avaliação histopatológica no músculo esquelético (bíceps braquial, diafragma e tibial anterior) e cardíaco foram identificadas e quantificadas, fibras em degeneração, fibras com núcleo central e com núcleo periférico, área de regeneração, área de inflamação e área de fibrose. Foi realizada análise bioquímica, através da determinação dos níveis séricos da Creatina Cinase (CK) no plasma sanguíneo e análise funcional da força de tração do membro torácico. Os resultados quantitativos foram comparados entre os camundongos *mdx*-DOX e os *mdx* controles. Nossos resultados mostram que a DOX amenizou o fenótipo distrófico na musculatura esquelética e

cardíaca e melhorou a força muscular do membro torácico nos camundongos *mdx*. A DOX protegeu as fibras musculares contra a mionecrose acompanhada por uma diminuição dos níveis de CK e reduziu a área de inflamação. Além disso, a DOX retardou a progressão da fibrose miocárdica e a fibrose no músculo esquelético. Dado que a DOX apresenta compostos bem tolerados e aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) esta droga surge como um potencial agente para o tratamento da DMD.

**Palavras-chave:** Distrofia muscular de Duchenne, doxiciclina, camundongo *mdx*.

**ABSTRACT**

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common myopathy characterized by loss of ambulation at about 10 years of age with death by twenties due to respiratory and cardiac insufficiency. Muscle degeneration and fibrosis are associated with inflammation in dystrophic muscles of Duchenne muscular dystrophy and in the *mdx* mice. The identification of prompt-to-use drugs that can reduce the severity and slow down the progression of the disease is required. We examined whether doxycycline (DOX), a member of tetracycline family, can improve histopathology and muscle function of the *mdx* mice, an experimental model for DMD. For the short term study, DOX was administered to mothers and newborns in drinking water at 6mg/ml beginning at 1 days of birth, for 5 weeks (n=9). Control *mdx* mice received water only (n=9). For the long term study, DOX was given in drinking water at 6mg/ml (n=8) during 9 months (starting at 8 months age). Control *mdx* mice received water only (n=8). Skeletal (biceps brachii, diaphragm and tibialis anterior) and cardiac muscles were submitted to histopathological (degenerating fibers, fibers with central nucleus and nucleus with peripheral areas of inflammation and fibrosis area), biochemical (serum creatine kinase – CK) and functional studies. Quantitative results were compared between treated and untreated *mdx* mice. We found that DOX significantly minimized dystrophic phenotype in skeletal and cardiac muscles and improved forelimb muscle strength. The drug protected muscle fibers against myonecrosis and decreased inflammation accompanied by a decrease serum CK. Furthermore, DOX slowed down the progression of myocardial fibrosis and skeletal muscle. Given that DOX is well tolerated and approved by the Food and Drug Administration this drug emerges as a potential agent for DMD therapy.

**Key words:** Duchenne muscular dystrophy, doxycycline, *mdx* mice.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

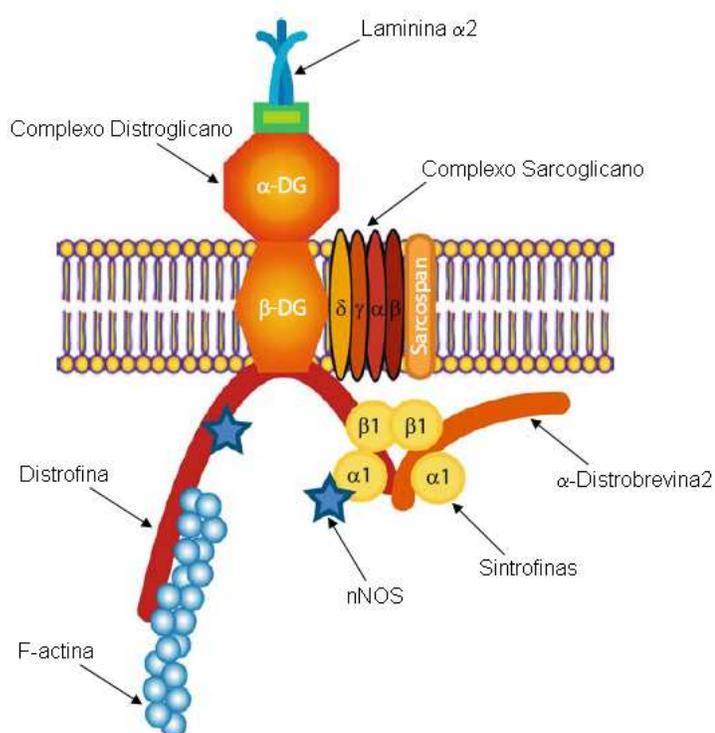
### **1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X cujos primeiros sinais clínicos manifestam-se na infância, afetando os músculos esquelético e cardíaco (ENGEL et al., 1994). A doença acomete uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. Caracteriza-se por fraqueza muscular progressiva seguida por perda da deambulação e óbito por comprometimento cardiorrespiratório em torno da segunda ou terceira década de vida (ENGEL et al, 1994; PETROF, 1998; BIGGAR et al, 2002). Esses sinais clínicos são decorrentes pela falta da distrofina, proteína estrutural do sarcolema, com peso molecular de 427 kDa, que desempenha papel importante na manutenção de sua estabilidade (HOFFMAN et al., 1987; BONILLA et al., 1988; KOENING & KUNKEL, 1990).

Localizada na face citoplasmática do sarcolema, a distrofina está associada à glicoproteínas resultando na formação do complexo distrofina-glicoproteína (CDG), que atravessa o sarcolema e estabelece conexão do citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular da fibra muscular (BROWM & DPHIL, 1997; PETROF, 2002; SPENCER & MELLGREN, 2002). Fazem parte deste complexo as distroglicanas, as sarcoglicanas, e outras glicoproteínas, como as distrobrevinas, as sintrofinas, o óxido nítrico sintase (nNOS) e o sarcospan (Figura 1). A ausência da distrofina altera esta conexão, causando desorganização dos componentes do CDG e instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento, levando a lesão do sarcolema e degeneração da fibra muscular (GROUNDS et al., 2005). Foi sugerido que a falta da distrofina facilitaria a entrada de grandes quantidades de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na fibra muscular, levando à mionecrose (MARIOL & SÉGALAT, 2001).

Acredita-se que a fragilidade do sarcolema, o estresse mecânico, o maior influxo de cálcio na fibra muscular (FRANCO-OBREGON & LANSMAN, 1994; MATSUMURA et al., 2009) e a presença de micro-rupturas do sarcolema, estejam relacionados à patogênese da DMD (GROUNDS et al., 2005; MARQUES et al., 2008).

Adicionalmente, a diminuição da estabilidade na fibra muscular devido à falta da distrofina leva à ativação de diversos processos secundários como a degeneração muscular com subsequente invasão por células inflamatórias tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T e posteriormente à fibrose intersticial (MORRISON et. al., 2000; MORRISON et. al., 2005).



**Figura 1:** Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema. Adaptado de PILGRAM et al., *Molecular Neurobiology*, 41, p.1-21, 2010.

No início da distrofinopatia, a mionecrose é compensada pela capacidade de regeneração das fibras musculares, decorrentes da ativação de células satélites (ENGEL et al., 1994). As células satélites localizam-se entre a lâmina basal e o sarcolema, e são responsáveis pela regeneração muscular. Ao longo do tempo, a capacidade de regeneração pelas células satélites entra em exaustão, e a substituição progressiva do tecido muscular por tecido fibroadiposo em pacientes distróficos, é um dos fatores de inabilidade das células satélites em compensar os danos na fibra muscular distrófica (WALLACE & MCNALLY, 2009).

## 1.2 CAMUNDONGO *MDX* COMO MODELO DA DMD

Camundongos *mdx* são utilizados como modelo animal da DMD pela ausência na expressão da distrofina e necrose das fibras musculares (HOFFMAN et al., 1987; TORRES & DUCHEN, 1987). Devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção, os camundongos *mdx* tem sido o modelo animal preferido para estudos da DMD (TANABE et al., 1986; HAMER et al., 2002; SASAOKA et al., 2003). Esta linhagem surgiu a partir de uma mutação espontânea identificada na linhagem de camundongos C57BL/10ScSn, denominada C57BL/10 *mdx*: “x chromossome-linked muscular dystrophy”, ocorrendo em animais machos e fêmeas, os quais são isogênicos (BULFIELD et al., 1984; ENGEL et al., 1994).

Diferente da DMD onde o músculo esquelético perde a capacidade regenerativa, no *mdx* passa por sucessivos ciclos de degeneração/regeneração. Acredita-se que o início do processo de mionecrose nesses animais, o qual é notado por volta dos 20 dias após o nascimento, seja devido ao aumento da atividade muscular, o que aumentaria a susceptibilidade das fibras musculares à lesão (TANABE et al., 1986; CULLEN & JARROS, 1988). Entre a 5ª e 12ª semana de vida, a degeneração muscular atinge seu ápice e após 16ª semana de idade, a incidência de mionecrose é reduzida, estando à maioria das fibras

musculares com núcleo central, o qual indica regeneração das miofibras (TANABE et al., 1986; LEFAUCHEUR et al., 1995). Após os 20 meses de idade a capacidade de regeneração muscular decresce, devido ao aumento da fibrose intersticial, diminuição gradual da quantidade e capacidade de proliferação das células satélites (LUZ et al, 2002). A evolução e a intensidade da miopatia variam de acordo com o músculo estudado. Assim, o músculo diafragma é acometido de forma mais severa que os demais músculos esqueléticos assemelhando-se ao diafragma humano (PASTORET & SEBILLE, 1995a; GROUNDS et al, 2005; MARQUES et al, 2008). Esta diferença pode ser causada pelo trabalho contínuo do músculo durante atividade respiratória (STEDMAN et al, 1991) e pela diminuição da capacidade regenerativa após lesão muscular (MATECKI et al, 2004).

### **1.3 CARDIOMIOPATIA NA DMD E NO CAMUNDONGO *MDX***

A cardiomiopatia é uma manifestação clínica comum das desordens neuromusculares, particularmente das distrofinopatias (HERMANS et al., 2010). Cerca de um terço dos pacientes de DMD apresenta alterações cardíacas na primeira década de vida e, em idade mais avançada todos desenvolvem cardiomiopatia (FINSTERER & STOLLBERGER, 2008).

A sequência de eventos associadas à lesão do músculo esquelético e cardíaco provavelmente envolve mecanismos distintos. Por exemplo, o músculo esquelético passa por ciclos de degeneração e regeneração, com a capacidade regenerativa diminuída com a idade, resultando em fraqueza e perda da função muscular ao longo do tempo. O músculo cardíaco, por outro lado, apresenta pouca capacidade regenerativa e, sua progressiva patogênese pode ocorrer pela combinação de fibrose e/ou perda de cardiomiócitos (LEFEROVICH et al., 2001; POSS et al. 2002; SPURNEY et al., 2008).

Histologicamente o músculo cardíaco caracteriza-se por apresentar acúmulo progressivo de fibrose intersticial, substituindo dessa forma os cardiomiócitos, após ocorrência degenerativa com subsequente processo inflamatório (BAXTER, 2006; COX & KUNKEL, 1997). Desse modo, o coração demonstra progressiva fibrose miocárdica e perda dos cardiomiócitos (LEFEROVICH et al., 2001; POSS et al. 2002). A fibrose miocárdica tem um importante papel na falência cardíaca em paciente DMD, devido ao comprometimento da arquitetura geral do coração e do seu sistema de condução, provocando arritmias e cardiomiopatia dilatada, levando o paciente a óbito ao redor dos 20 anos de idade (NIGRO et al., 1990; MUNTONI, 2003). A insuficiência cardíaca corresponde a 20% das causas de óbito na DMD e é resultado da cardiomiopatia que se desenvolve concomitantemente à degeneração dos músculos esqueléticos (NIGRO et al., 1990). Sugere-se que a fibrose do miocárdio distrófico seja consequência da resposta inflamatória decorrente da degeneração progressiva de cardiomiócitos causada pela falta da distrofina (WEHLING-HENRICKS et al., 2005).

A cardiomiopatia no camundongo *mdx* evolui de forma semelhante à cardiomiopatia observada em humanos com DMD. Até 8 meses de idade o coração apresenta-se normal sob o ponto de vista funcional. Com a idade é possível detectar fibrose miocárdica; ao redor de 17 meses o coração apresenta hipertrofia e necrose dos cardiomiócitos, inflamação e extensas áreas de fibrose (QUINLAN et al, 2004).

Enquanto as terapias celulares e genéticas estão em desenvolvimento para corrigir o gene codificador da distrofina, a identificação de fármacos que possam retardar o início da mionecrose e bloquear o processo inflamatório é de grande importância na DMD (TIDBALL & WEHLING-HENRIKS, 2004; GROUNDS & TORRISI, 2004).

## 1.4 DOXICICLINA

As tetraciclinas (TTCS) são antibióticos de amplo espectro de ação. Duas das mais comuns TTCS usadas clinicamente como antibióticos são a Doxiciclina (DOX) e a Minociclina, as quais apresentam compostos seguros e bem tolerados. A DOX possui alto índice de lipossolubilidade (5 a 10 vezes mais lipossolúvel que outros membros das TTCS), alta capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas, sendo altamente estável no soro humano (FRANKLIN & SNOW, 1975). Os níveis séricos da DOX administrada por via oral atingem seu pico 2 horas após sua ingestão, com tempo de meia vida entre 18 e 22 horas (THADEPALLI et al., 1978). Devido a sua propriedade lipofílica, a DOX pode ser excretada pelo leite materno, além de ser eliminada pela urina e/ou fezes (FABRE et al., 1967).

De acordo com suas propriedades químicas, o radical dimetilamino ( $N(CH_3)_2$ ) ligado ao carbono 4 das tetraciclinas, possui capacidade antimicrobiana (Figura 2). Entretanto, o 4-De-dimetilamino tetraciclina (CMTs), também chamado de tetraciclina quimicamente modificado que compreende toda a estrutura química, retém a habilidade para ligar-se a outros alvos não bacterianos, como as metaloproteínas da matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs), facilitando seu uso no tratamento de outras doenças (GOLUB et al., 1987).

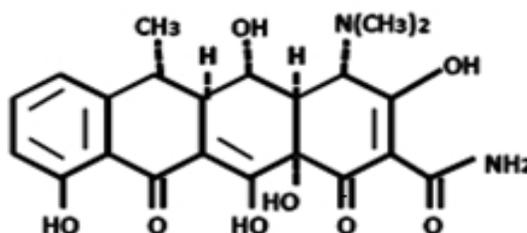


Figura 2: Estrutura química da doxiciclina (GRIFFIN et al., 2010).

Além disso, o CMTs confere a esse grupo de fármaco uma importante função de quelar íons metálicos como zinco ( $Zn^{2+}$ ) e cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (GRIFFIN et al., 2010). Na família das TTCS, a DOX apresenta uma relativa superioridade para inibir as MMPs, devido à alta afinidade pelo íon  $Zn^{2+}$  (BURNS et. al., 1989). As metaloproteinases são uma família de proteases zinco-dependentes, capazes de degradar os componentes da matriz extracelular (MEC), e que estão envolvidas em muitas patogêneses incluindo inflamação, remodelamento cardíaco e invasão tumoral (NAGASE & WOESSNER, 1999). A inibição de MMP-9 no camundongo *mdx* é benéfica em muitas condições patológicas, como inflamação e fibrose (LI et al., 2009). O mecanismo pelo qual a DOX inibe as MMPs não foi completamente elucidado (GRIFFIN et al., 2010). Sugere-se, que o efeito antiproteolítico da DOX ocorra através da inibição direta das MMPs e pela inibição de sua expressão, impedindo a síntese dessas proteases (YU et. al., 1991). Outra propriedade não microbiana da DOX é a habilidade antioxidante através da inibição das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), pelos radicais hidroxilas situados nos anéis fenólicos de sua estrutura química. A excessiva produção de EROs pela célula ocorre sob muitas condições patológicas, como isquemia do miocárdio e no processo inflamatório, podendo levar a destruição oxidativa ou à disfunção de muitos constituintes celulares (GRIFFIN et al., 2010).

Outro mecanismo de ação da DOX é a propriedade antiapoptótica, mediada pela inibição da cascata apoptótica das caspases, uma família de protease cisteíne e pela estabilização mitocondrial (LEE et al., 2009; GIRGENRATH et al., 2009). Adicionalmente, os compostos presentes nas TTCS que atuam como antiproteolíticos e na inibição das EROs contribuem provavelmente para sua ação antiinflamatória (GRIFFIN et al., 2010). A inibição farmacológica da DOX sobre a atividade das MMPs demonstrou atenuar a patogênese em modelo animal para distrofia muscular oculofaríngea (DAVIES et al., 2005; DAVIES et al.,

2006). O uso da DOX tem-se mostrado benéfico também no tratamento de outra miopatia (distrofia muscular congênita). Isso ocorre, provavelmente pela redução de células inflamatórias, principalmente a linhagem de monócitos e macrófagos, nas fibras musculares (GIRGENRATH et. al., 2009). Desse modo, as TTCS têm sido reconhecidas ao longo do tempo como um gênero de fármaco com relevantes propriedades pleiotrópicas (GRIFFIN et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS**

---

Examinar o efeito da Doxiciclina na mionecrose e na fibrose intersticial nos músculos esquelético e cardíaco de camundongos *mdx* jovens e idosos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/10-Dmd<sup>mdx</sup>/PasUnib de ambos os sexos, obtidos a partir do acasalamento de animais mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia, UNICAMP. As matrizes foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) – UNICAMP. Durante o período experimental, os animais permaneceram em caixas plásticas padrão sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) e com ração e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) nº 2007-1.

#### **3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM A DOXICICLINA**

**Grupo *mdx* Jovem:** Formado por *mdx* controle (n=9) e *mdx*-DOX (n=9), os quais foram submetidos à eutanásia com 5 semanas de idade. O tratamento com a DOX (Sandoz) foi administrado na água de beber 6mg/ml, para a mãe e seus recém-nascidos. Iniciou-se o tratamento no dia do nascimento e mãe foi mantida na gaiola com os filhotes durante os 36 dias de tratamento (DAVIES et al., 2005; GIRGENRATH et al., 2009). O grupo *mdx* controle recebeu apenas água durante o mesmo período.

**Grupo *mdx* Idoso:** Formado por *mdx* controle (n=8) e *mdx*-DOX (n=8), os quais foram submetidos à eutanásia com 17 meses de idade. O tratamento com a DOX (Sandoz) foi

administrado na água de beber 6mg/ml para os camundongos, durante 9 meses. Este tratamento foi iniciado aos 8 meses e finalizado aos 17 meses de idade. O grupo *mdx* controle recebeu apenas água durante o mesmo período.

Em ambos os grupos, a solução com a DOX foi trocada duas vezes por semana devido ao seu curto tempo de meia-vida na água (ERRAMI et al., 2008).

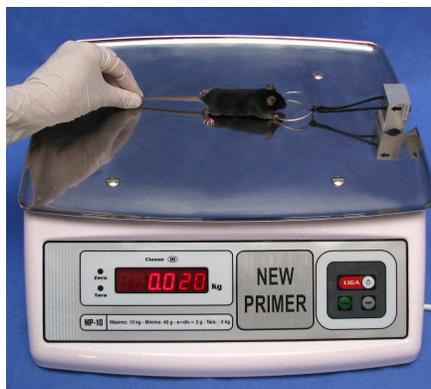
### **3.3 ANÁLISE FUNCIONAL: Força de tração do membro torácico**

A análise funcional do membro torácico foi avaliada usando Medidor de Esforço Horizontal (NEW PRIMER, São Paulo, Brasil). Este instrumento mede a força de tração nos camundongos, os quais, instintivamente agarram uma rede de nylon fixada em um anel semicircular de metal unido a um transdutor de força no aparelho. É possível avaliar a força de tração do membro torácico, por existir uma força de tração oposta determinada pelo avaliador, que segura gentilmente a cauda do animal (Figura 3).

No grupo *mdx* jovem, foi utilizada a força de tração medida inicialmente no 18° e no 36° dia de vida, nos *mdx* controle (n=9) e *mdx*-DOX (n=9).

No grupo *mdx* idoso, a força de tração foi mensurada mensalmente, iniciando-se no 8° mês até o 17° mês de vida, nos *mdx* controle (n=8) e *mdx*-DOX (n=8).

Para cada animal, cinco picos de força foram obtidos e expressos como força absoluta. Cada força absoluta foi normalizada com a massa corporal em gramas, e obtida a força normalizada, expressa como força em gramas dividida pela massa corporal em gramas - (g/g). (KEELING, et al., 2007; TANIGUIT et al., 2010).



**Figura 3:** Balança digital adaptada para medir a força de tração do membro torácico nos camundongos.

### 3.4 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS MÚSCULOS

Após o término do tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia via intraperitoneal de anestésico composto de cloridrato de cetamina (Francotar®; Virbac) e cloridrato de xylazina (Virbaxyl®; Virbac), na proporção 1:1 e dose de 0,1mg/30g de peso corporal, e uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca para determinação da creatina cinase. Os músculos bíceps braquial (BB), diafragma (DIA), tibial anterior (TA) e o músculo cardíaco (COR), foram dissecados e retirados bilateralmente (exceto o COR) para análise histopatológica.

Para o congelamento, os músculos foram fixados em suportes de madeira com tragacanth gum, em seguida foram imersos em n-hexano (Vetec, Rio de Janeiro) por 60 segundos e imediatamente transferidos para nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram então retirados do nitrogênio e mantidos à -70°C no biofreezer.

A obtenção dos cortes foi realizada em criostato (Microm®-HS505E), sendo os músculos mantidos previamente à temperatura de  $-26^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após esse tempo, foram realizados cortes transversais semi-seriados com  $7\ \mu\text{m}$  de espessura, do terço médio nos músculos esqueléticos e, de  $8\ \mu\text{m}$  de espessura no músculo cardíaco.

Foram obtidas três lâminas para cada músculo, sendo uma para análise da integridade do sarcolema por meio do azul de Evans, e as demais para as técnicas de hematoxilina-eosina e de tricrômico de Masson. Para cada músculo, dois cortes aleatórios foram analisados para obtenção dos dados quantitativos, no caso do músculo esquelético a análise foi realizada de ambos os antímeros.

### **3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA: Determinação da Creatina Cinase no plasma sanguíneo**

Para verificar o efeito da DOX sobre a mionecrose foram quantificados os níveis plasmáticos da enzima creatina cinase (CK) em ambos os grupos: *mdx* jovem ( $n=8$ ) e *mdx* idoso ( $n=6$ ). O sangue foi coletado por punção cardíaca (0,8 ml) sob anestesia com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 RCF (Força centrífuga relativa à aceleração da gravidade),  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Foi utilizado o kit para quantificação de CK (Cinético Crystal, Bioclin).

As absorvâncias das amostras foram lidas a  $25^{\circ}\text{C}$  utilizando-se espectrofotômetro UV (Thermo Electron Corporation Spectrophotometer Genesys 20) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores são expressos em Unidade Internacional – (U/L).

## 3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

### 3.6.1 Avaliação da integridade do sarcolema: Azul de Evans

O azul de Evans (AE) é um corante impermeável ao sarcolema de fibras musculares normais. O corante liga-se a albumina sérica e penetra na fibra muscular quando o sarcolema perde sua integridade. Desse modo, a marcação *in vivo* com este corante evidencia fibras que iniciaram o processo de degeneração (Figuras 4, 5 e 6).

Foi utilizada solução 1% de AE (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) em Tampão Fosfato Salina, injetada via intraperitoneal na concentração de 0,1mL de solução para cada 10g de peso corporal do animal. (MATSUDA et al., 1995; MATSUMURA et al., 2009). A injeção ocorreu 12 horas antes da eutanásia dos animais. Em ambos os grupos foram analisados os músculos BB e DIA. Além disso, o músculo TA foi utilizado para análise no grupo jovem, enquanto que o músculo COR foi analisado no grupo idoso.

As lâminas para avaliação da integridade do sarcolema por meio do AE, foram incubadas por 15 minutos com acetona à -20°C e montadas em meio para fluorescência DABCO (Sigma®).

A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico de fluorescência (*Nikon Express Series*, Tokyo, Japão) acoplado a vídeo câmera Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Iwata, Shizuoka, Japão) para captura de imagens. No músculo esquelético, a quantificação do número de fibras positivas ao AE foi determinada com um contador manual, observadas com objetiva de 20X e ocular de 10X. A média dessa quantificação foi expressa como percentual do total de fibras contadas em cada secção transversa. No músculo cardíaco, foi realizada morfometria das áreas com fibras positivas ao AE, observadas com objetiva e ocular de 10X.

A média da área com fibras positivas ao AE foi expressa como percentual da área de secção transversa total.

### **3.6.2 Avaliação da Mionecrose, Inflamação e Regeneração: Hematoxilina & Eosina**

Em ambos os grupos foram analisados os músculos BB e DIA. Além disso, o músculo TA foi utilizado para análise no grupo jovem, enquanto que o músculo COR foi analisado no grupo idoso.

Os cortes congelados foram inicialmente fixados com solução de Bouin por meia hora e em seguida, lavados com etanol durante doze horas. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e os cortes corados com hematoxilina de Harris por 7 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água corrente por 10 minutos. Após, novas lavagens em água corrente as lâminas foram imersas em solução de eosina por 8 minutos e posteriormente o excesso de eosina foi removido em água destilada. Em seguida, os cortes foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados com xilol e as lâminas montadas com Entellan (Sigma).

No músculo esquelético, foi quantificado o número total de fibras musculares considerando-se, fibras normais, identificadas pela presença de núcleo periférico (NP); e o número de fibras com núcleo central (NC - indicativo de regeneração muscular), identificadas com tamanho semelhante ao de uma fibra normal (Figuras 4F e 5F). A quantificação do número de fibras com NC e NP foi realizada utilizando-se um contador manual, observadas com objetiva de 20X e ocular de 10X, contendo retículo quadrilátero de 100 pontos acoplado ao microscópio de luz binocular. A média dessa quantificação foi expressa como percentual do total de fibras contadas em cada secção transversa.

Foram mensuradas as áreas de secção transversa do músculo, de inflamação e de regeneração, através de análise morfométrica. A área de regeneração foi mensurada apenas no grupo *mdx* jovem. A classificação das áreas musculares foi realizada seguindo-se critérios morfológicos descritos em SPURNEY et al., 2009. A área de inflamação foi caracterizada por um grupo intersticial de pequenas células inflamatórias com núcleo basófilo, também descrito como infiltrado inflamatório (Figura 4C-D). A área de regeneração foi caracterizada por fibras musculares com citoplasma basófilo, núcleo central, aumento aparente da proporção núcleo/citoplasma, menor diâmetro quando comparadas a células com NC e NP além, de escassa quantidade de infiltrado inflamatório (Figura 4E). A média da área de inflamação e de regeneração foi expressa como percentual da área de secção transversa total. Para o músculo cardíaco foi mensurada a área de inflamação nos ventrículo direito e esquerdo e, obtido o percentual para cada área.

As lâminas coradas com H&E foram analisadas utilizando-se microscópio Nikon Eclipse E-400 com objetiva de 20X no músculo esquelético e 10X no músculo cardíaco, acoplado a um computador e vídeo-câmera (Nikon Express Series, Shinagawa, Tokyo, Japão) para a captação de imagens. A análise morfométrica foi realizada com software Image Pro-Express Version 4.

### **3.6.3 Avaliação da fibrose intersticial: coloração pelo tricrômico de Masson**

Para avaliação da área de fibrose intersticial utilizou-se o músculo esquelético (BB e DIA) e o músculo cardíaco do grupo idoso (Figuras 5 e 6).

Os cortes congelados foram inicialmente fixados com solução de Bouin por meia hora e em seguida, lavados com etanol durante doze horas. Após esta etapa, as lâminas foram

lavadas em água corrente por 10 minutos e os cortes corados com hematoxilina de Harris por 7 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e imersas em solução de Masson por 17 minutos. Em seguida, as lâminas foram banhadas em solução de ácido acético a 0,2%, mergulhadas em solução de azofloxina (AFO) por 11 minutos e em solução de verde luz (Light Green, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), por 18 minutos. Após esta etapa, os cortes foram novamente banhados em ácido acético a 0,2% para serem submetidos à desidratação em série de etanol e à diafanização com xilol.

Foram mensuradas as áreas de secção transversa do músculo e a de fibrose intersticial, através de análise morfométrica. A média da área de fibrose foi expressa como percentual da área de secção transversa total. Para o músculo cardíaco foi mensurada a área de fibrose nos ventrículo direito e esquerdo e, obtido o percentual para cada área.

As lâminas coradas com tricrômico de Masson foram analisadas utilizando-se microscópio Nikon Eclipse E-400 com objetiva de 20X no músculo esquelético e 10X no músculo cardíaco, acoplado a um computador e vídeo-câmera (Nikon Express Series, Shinagawa, Tokyo, Japão) para a captação de imagens. A análise morfométrica foi realizada com software Image Pro-Express Version 4.

### **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos dados foi feita pela aplicação do test-t de *Student*, com significância  $p \leq 0,05$ , entre os grupos experimentais avaliados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

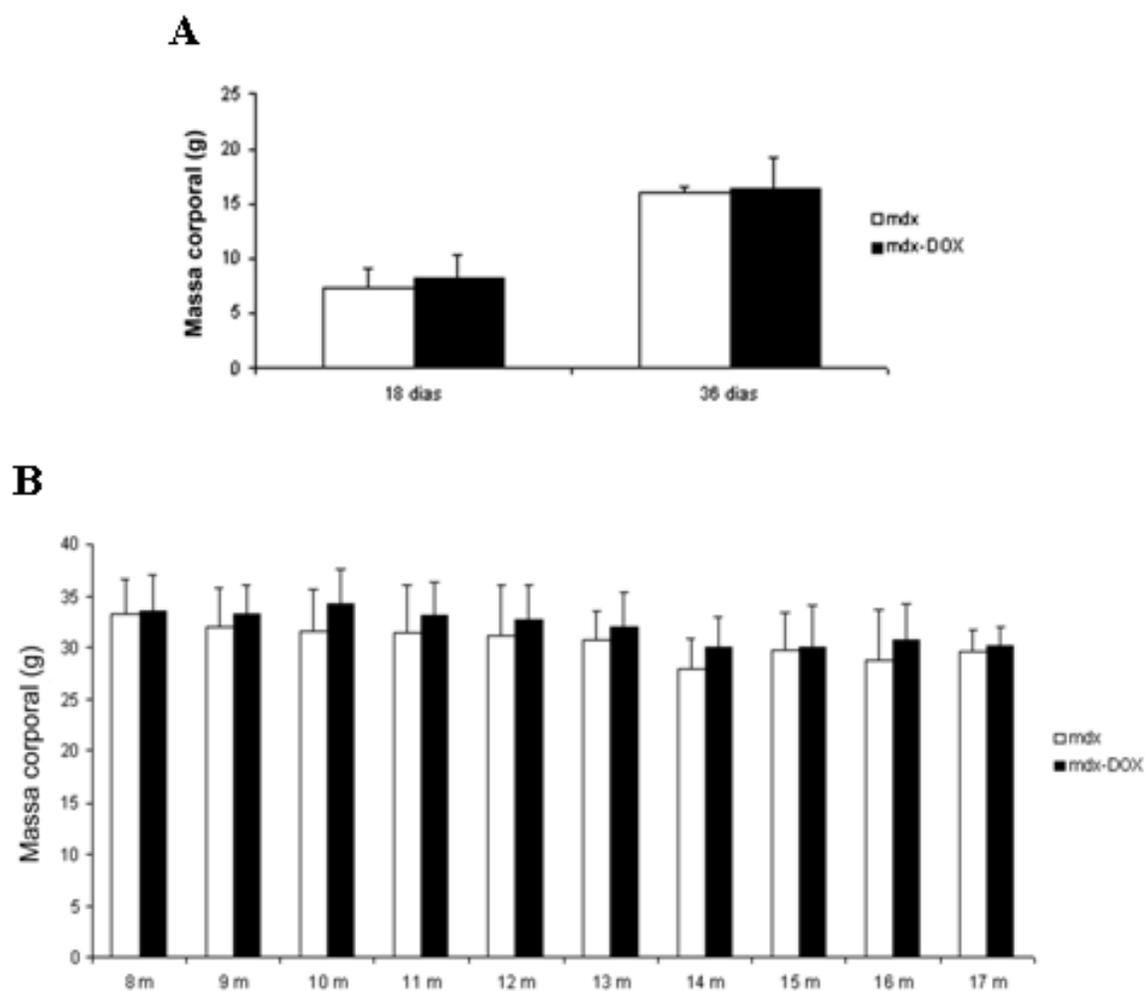
## 4. RESULTADOS

---

### 4.1 ACHADOS CLÍNICOS E MASSA CORPORAL

Durante todo o período de estudo, observou-se que não houve diferença na ingestão de ração, na aparência física, no comportamento dos animais na gaiola ou durante seu manuseio, e na morbidade ou mortalidade entre os grupos *mdx* controle e *mdx*-DOX.

Para investigar se o tratamento com a DOX afetou o crescimento somático, foi comparada a massa corporal dos camundongos *mdx* obtidos em diferentes períodos de tratamento (Gráfico 1). No final de 36 dias a média da massa corporal foi de  $17,7 \pm 3,1$ g e  $16,0 \pm 0,6$ g para os grupos *mdx*-DOX e *mdx* controle, respectivamente ( $p > 0,1$ ), (Gráfico 1A). Ao final de 9 meses de tratamento com a DOX a média da massa corporal foi de  $30,2 \pm 1,8$ g para os *mdx*-DOX e de  $29,6 \pm 1,9$ g para os *mdx* controles ( $p > 0,3$ ), (Gráfico 1 B). No grupo *mdx* jovem houve um aumento da massa corporal quando comparado entre a medida inicial no 18º dia e na final no 36º dia de vida ( $p < 0,05$ ). No grupo *mdx* idoso houve uma diminuição da massa corporal quando comparada entre a medida inicial aos 8 meses e na final aos 17 meses de vida, para os *mdx* controles ( $p = 0,07$ ) e para os *mdx*-DOX ( $p = 0,06$ ), ( $p < 0,05$ ; teste t de student ).

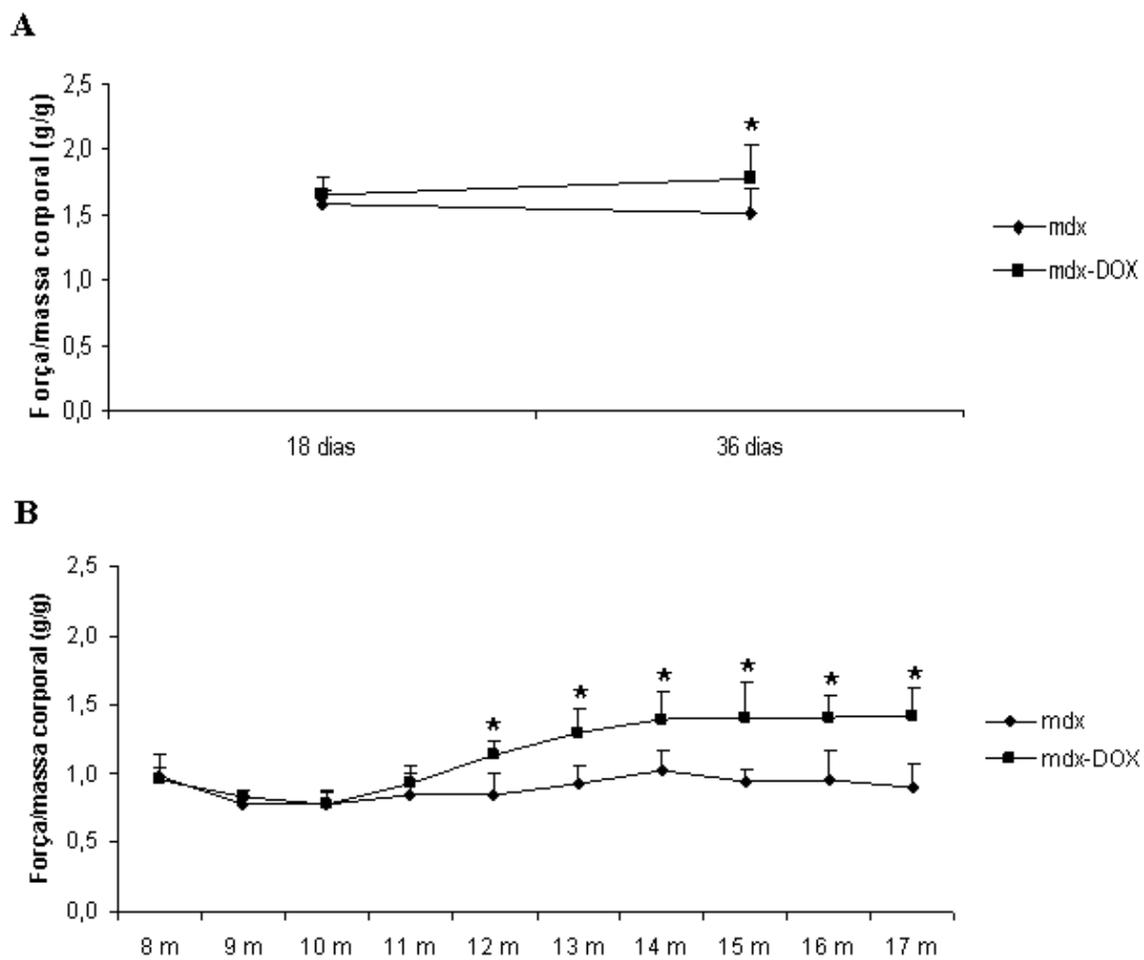


**Gráfico 1:** Efeito da DOX no crescimento somático de camundongos distróficos. Média  $\pm$ desvio padrão. Em (A) massa corporal (g) nos camundongos *mdx* jovens, n=9. Em (B) massa corporal (g) nos *mdx* idosos, n=8. Em ambos os grupos \*p<0,05; teste t de *student*.

## 4.2 ANÁLISE FUNCIONAL: Força de tração do membro torácico

No grupo *mdx* jovem (36 dias) a medida de força muscular iniciada no 18° dia entre os *mdx* controle e *mdx*-DOX, não houve diferença significativa ( $p>0,08$ ). A DOX aumentou significativamente (17,1%;  $p=0,01$ ) a força muscular normalizada no final do tratamento, quando comparado com os *mdx* controles de mesma idade (Gráfico 2A).

No grupo *mdx* idoso (9 meses) a DOX, impediu a perda da força observada ao longo do tempo. Houve uma progressiva melhora da força muscular verificada a partir do 4° mês de tratamento com a DOX, com um aumento de 36% na força muscular. No final da terapia com a DOX houve um aumento de 58% da força muscular normalizada comparada entre o grupo experimental e seu respectivo controle ( $0,90\pm 0,17$ g/g em *mdx* controle vs  $1,42\pm 0,20$  em *mdx*-DOX;  $p<0,05$ ), (Gráfico 2B).



**Gráfico 2:** Força de tração do membro torácico normalizada com a massa corporal de camundongos distróficos. Média  $\pm$ desvio padrão. Em (A) camundongos *mdx* jovens, n=9. Em (B) camundongos *mdx* idosos, n=8. Em ambos os grupos \* $p < 0,05$ ; teste t de *student*.

### 4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA: Determinação da Creatina Cinase no plasma sanguíneo

Como um indicador total da degeneração muscular, os níveis séricos da enzima creatina cinase (CK), foram determinados nos grupos *mdx* controle e *mdx*-DOX. O tratamento com a DOX nos camundongos jovens resultou em uma diminuição significativa (25%;  $p=0,009$ ) dos níveis de CK no plasma sanguíneo em comparação com os *mdx* controles (Tabela 1). Nos *mdx* idosos que receberam a DOX por 9 meses, a redução foi de (33%;  $p=0,03$ ) quando comparados ao controle de mesma idade (Tabela 1). Este resultado evidencia que a diminuição dos valores de CK nos *mdx* tratados com a DOX é consequência da redução da mionecrose observada nos diferentes músculos.

**Tabela 1** - Níveis plasmáticos da enzima Creatina Cinase (U/L) de camundongos distróficos em diferentes idades.

Idade	Grupos	
	<i>mdx</i>	<i>mdx</i> -DOX
<b>36 dias</b>	1292±223	<b>973±242*</b>
<b>17 meses</b>	1414±119	<b>942±294*</b>

Média ±desvio padrão; \* $p<0,05$ ; teste t de *student*.

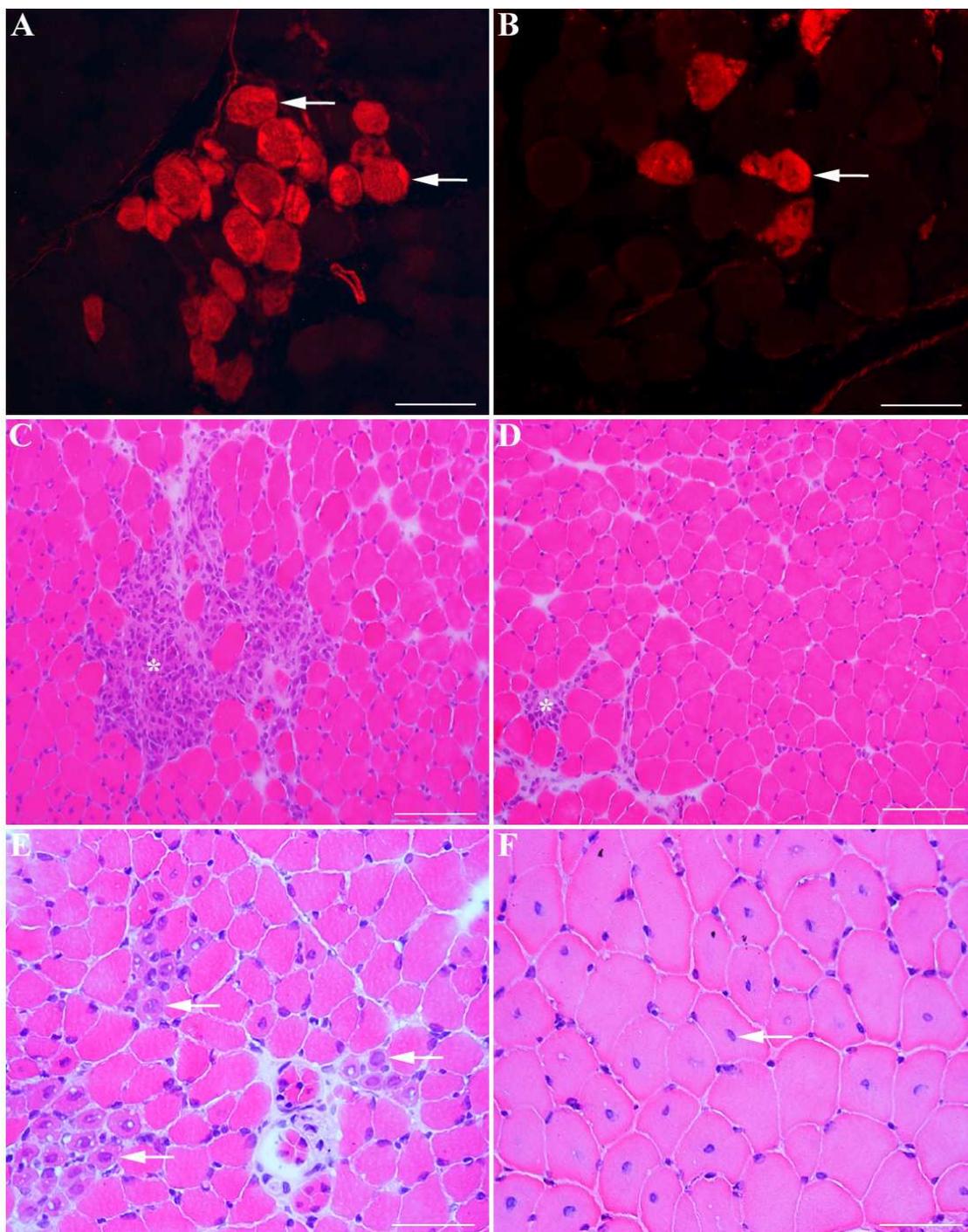
## 4.4 ANÁLISE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

### 4.4.1 Análise Histopatológica e Morfométrica: Estudo em *mdx* jovens

Os músculos BB, DIA e TA dos grupos *mdx* controle e *mdx*-DOX apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras em processo de degeneração, fibras com núcleo periférico, fibras em regeneração e fibras completamente regeneradas (Figura 4).

Foram utilizados os níveis plasmáticos de CK e a mensuração de fibras com azul de Evans como indicadores complementares da alteração da permeabilidade do sarcolema e mionecrose nos camundongos distróficos. As fibras positivas ao AE foram observadas em grupos ou isoladas nos músculos BB, DIA e TA de *mdx*-DOX e de *mdx* controle. A DOX diminuiu significativamente os níveis de CK (Tabela 1) e o AE no DIA (58.2% de redução) e no BB (68,2% de diminuição) em comparação com os *mdx* controle (Tabela 2). No TA embora houve uma redução de 49% de fibras marcadas com AE nos *mdx*-DOX, essa diferença não foi significativa. A DOX aumentou significativamente acerca de 10% no BB e de 20% no DIA a população de fibras musculares com núcleo periférico, um indicador de fibras que não passaram pelo processo de mionecrose. Em ambos os grupos as fibras musculares em processo de regeneração não apresentou diferença significativa (Tabela 2).

A média da área de inflamação foi drasticamente reduzida em todos os músculos do grupo *mdx*-DOX. Em comparação com os *mdx* controles, houve um decréscimo do percentual da área de inflamação de 52,4% no DIA, 62,9% no BB e de 69% no TA observado nos camundongos tratados com a DOX (Tabela 2).



**Figura 4:** Características histopatológicas encontradas em músculos de camundongos jovens (36 dias) *mdx* controle (A, C, E) e tratados com DOX (B, D, F). Em A e B, músculo diafragma com fibras em degeneração positivas ao AE (setas); Barra=81  $\mu$ m. Em C e D, músculo bíceps braquial com área de inflamação (\*) caracterizada por abundante infiltrado inflamatório com núcleo basófilo; Barra=130  $\mu$ m. Em E, músculo bíceps braquial com área em processo de regeneração, caracterizada por fibras musculares com citoplasma basófilo e núcleo central (setas). Em F, músculo tibial anterior com fibras musculares de núcleo periférico com formato poligonal e fibras musculares regeneradas com contorno arredondado e núcleo centralizado (seta); Barra=100  $\mu$ m. Aumento 20X (A-D) e 40X (E-F); Coloração H&E (C-F).

**Tabela 2** - Análise quantitativa do percentual de fibras positivas ao azul de Evans (%AE), fibras com núcleo periférico (%NP) e com núcleo central (%NC). Análise morfométrica do percentual da área de inflamação (%Infl) e da área de regeneração (%Reg); dos músculos bíceps braquial (BB), diafragma (DIA) e tibial anterior (TA) de camundongos distróficos com 36 dias de idade; n=5 em cada grupo.

		%AE	%NP	%NC	%Infl	%Reg
<b>BB</b>	<i>mdx</i>	3,83±2,2	66,7±7,3	29,5±6,6	5,37±4,5	0,54±0,5
	<i>mdx-DOX</i>	<b>1,22±0,5*</b>	<b>80,1±5,9*</b>	<b>19,5±6,1*</b>	<b>1,99±0,8*</b>	0,47±0,5
<b>DIA</b>	<i>mdx</i>	2,89±1,2	72,4±8,0	27,5±8,0	5,41±2,1	0,09±0,1
	<i>mdx-DOX</i>	<b>1,21±1,1*</b>	<b>82,7±3,2*</b>	<b>17,2±3,2*</b>	<b>2,57±1,4*</b>	0,03±0,0
<b>TA</b>	<i>mdx</i>	1,37±0,9	53,7±5,8	44,7±6,4	2,91±1,5	0,13±0,1
	<i>mdx-DOX</i>	0,69±0,6	55,5±5,5	44,4±5,5	<b>0,90±0,8*</b>	0,08±0,0

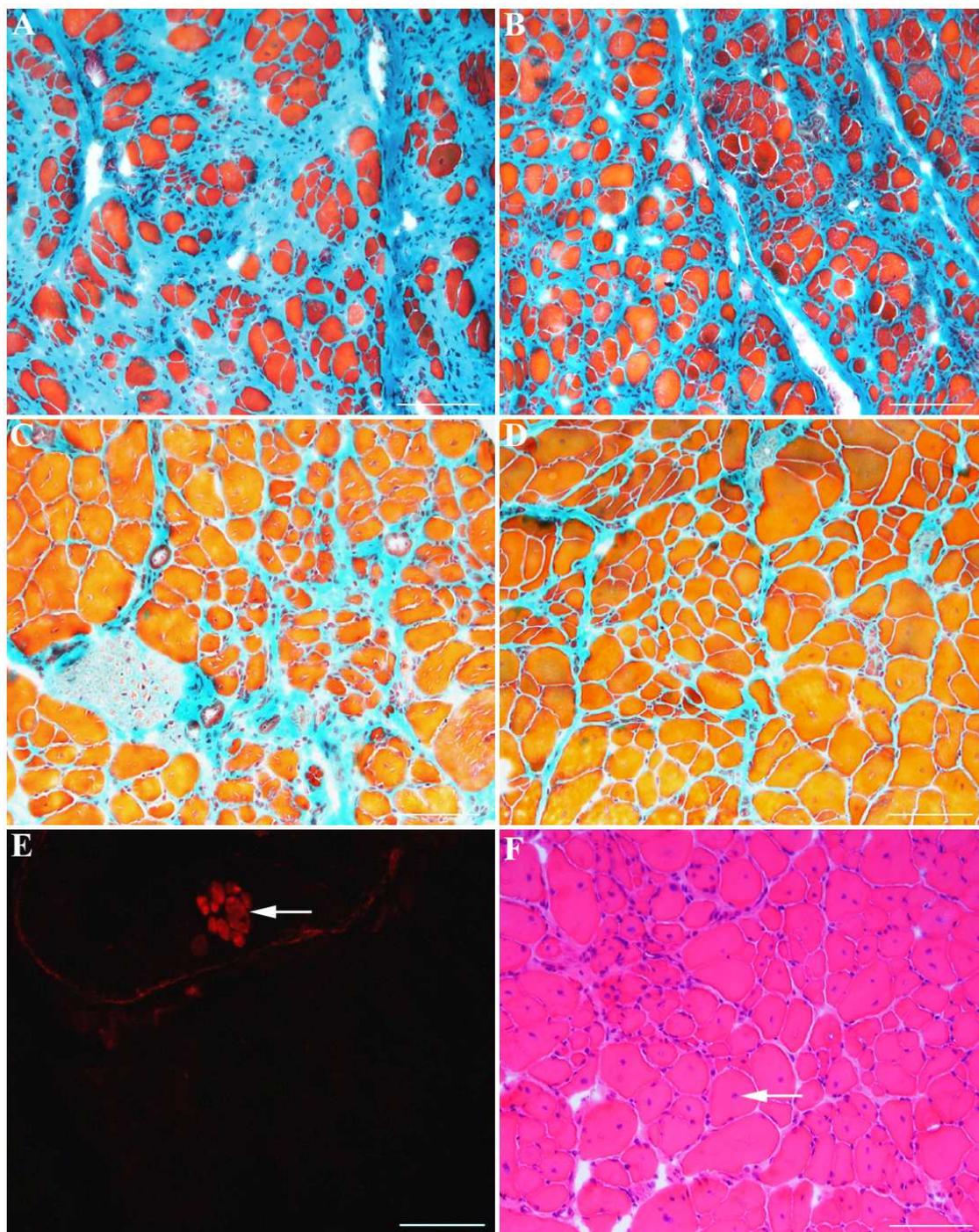
Média ± desvio padrão; \*p<0,05; teste t de *student*.

#### 4.4.2 Análise Histopatológica e Morfométrica: Estudo em *mdx* idosos

A distrofinopatia apresentada em camundongos *mdx* idosos é a que mais se aproxima à miopatia em pacientes DMD (LEFAUCHEUR et al., 1995). As fibras musculares regeneradas são um indicativo da mionecrose ocorrida no músculo de camundongos distróficos (Figura 5F). Fibras com essa característica foram encontradas predominantemente no DIA (74% de fibras com núcleo central) e no BB (77% de fibras com núcleo central) de *mdx* idosos controles (Tabela 3), o qual está em conformidade com PASTORET & SEBILLE, 1995b. Aos

17 meses de idades a fibrose intersticial alcançou um percentual de 54% no músculo DIA e de 12% no músculo BB da área de secção transversa nos *mdx* controle (Tabela 3). Observa-se nessa idade que o músculo diafragma é excessivamente comprometido devido à perda de miofibras e posterior substituição por fibrose (Figura 5A-B). A média da área de fibrose foi reduzida em 14,6% para o DIA e 52% para o BB (Tabela 3) e (Figura 5C-D). A identificação de fibras positivas ao AE demonstra que a mionecrose ainda está ativa aos 17 meses de idades (Figura 5E), embora o percentual encontrado nos diferentes músculos seja pequeno, houve diferença significativa entre os grupos *mdx*-DOX e *mdx* controle (Tabela 3). Em ambos os grupos a área de inflamação não apresentou diferença significativa (Tabela 3).

O tratamento em longo prazo com a DOX atenuou a progressão da distrofinopatia em ambos os músculos, como indicado por uma redução significativa do percentual de fibras com NC, acerca de 12,5% no BB e DIA ( $p < 0,05$ ) em comparação com os *mdx* controles. Houve uma diminuição de fibras positivas ao AE, com concomitante aumento de fibras com núcleo periférico (Tabela 3).



**Figura 5:** Características histopatológicas encontradas em músculos de camundongos idosos (17 meses) *mdx* controle (A, C, E,) e tratados com doxiciclina (B, D, F). Em A e B, músculo diafragma com área de fibrose muscular corada em azul pela técnica de tricrômico de Masson. Em C e D, músculo bíceps braquial com área de fibrose corada em azul pela técnica de tricrômico de Masson. Em E, músculo diafragma com fibras em degeneração positivas ao AE (seta). Em F, músculo bíceps braquial com fibras musculares de núcleo periférico com formato poligonal e fibras musculares regeneradas com contorno arredondado e núcleo centralizado (seta) corarada com H&E. Aumento 20X; Barra=130  $\mu$ m.

**Tabela 3** - Análise quantitativa do percentual de fibras positivas ao azul de Evans (%AE), fibras com núcleo periférico (%NP) e com núcleo central (%NC). Análise morfométrica do percentual da área de fibrose (%) e da área de inflamação (%Infl); dos músculos bíceps braquial (BB), diafragma (DIA) de camundongos distróficos com 17 meses de idade. n=5 em cada grupo.

		%AE	%NP	%NC	%Fibrose	%Infl
<b>BB</b>	<i>mdx</i>	0,55±0,4	22,8±2,1	76,8±1,8	12,1±3,2	0,29±0,05
	<i>mdx-DOX</i>	0,13±0,1*	32,8±2,3*	67,1±2,3*	5,8±1,9*	0,06±0,09
<b>DIA</b>	<i>mdx</i>	0,37±0,07	25,6±8,0	74,2±4,1	54,6±5,5	0,18±0,2
	<i>mdx-DOX</i>	0,11±0,1*	35,7±2,4*	64,1±2,1*	46,6±5,6*	0,08±0,09

Média ± desvio padrão; \*p<0,05; teste t de *student*.

#### 4.5 ANÁLISE NO MÚSCULO CARDÍACO: Análise histopatológica e morfométrica

A área de inflamação e focos de degeneração foram observadas ao longo dos ventrículos direito e esquerdo e no septo interventricular. Após 9 meses de administração da DOX, o percentual da área de inflamação (Gráfico 3A) diminuiu em 67,2% em relação à área total do coração, com semelhante redução nos ventrículos esquerdo (71,3%) e direito (64,8%), em comparação com os *mdx* controle (Figura 6C-D). A área dos cardiomiócitos com alteração da permeabilidade evidenciada pelo AE diminuiu em 50% ( $p \leq 0,05$ ) nos *mdx-DOX* em relação à área total do coração quando comparado aos *mdx* controles (Figura 6E-F). A redução da área

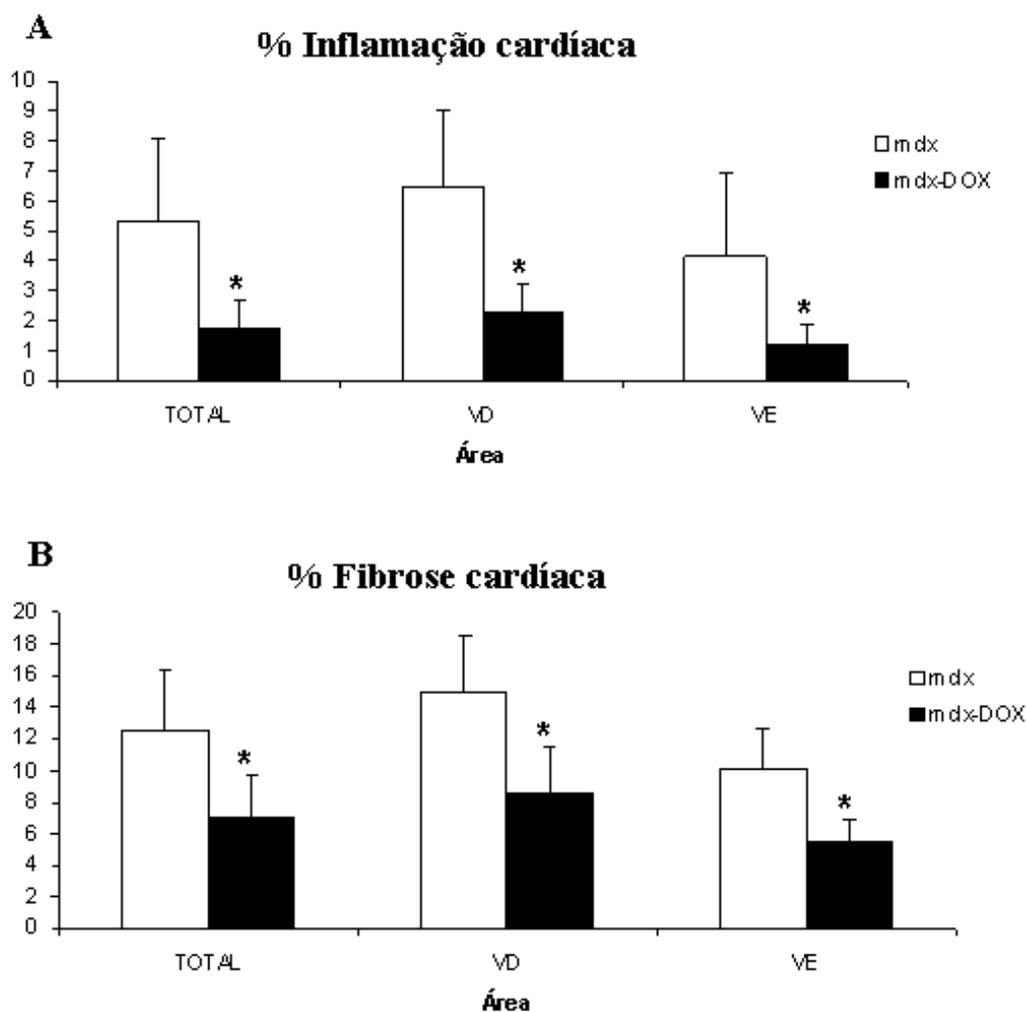
positiva ao AE também foi observada nos ventrículo direito ( $p=0,1$ ) e no esquerdo ( $p=0,07$ ) em comparação aos camundongos não tratados (Tabela 4).

Através da coloração de tricômico de Masson mostraram-se evidentes áreas de fibrose distribuídas amplamente nos ventrículos e no septo interventricular de camundongos *mdx* idosos com 17 meses de idade (Figura 6A-B). A terapia com a DOX levou a uma redução significativa da fibrose miocárdica acerca de 44% ( $p<0,05$ ) nos ventrículos direito e esquerdo e em relação à área total do coração, em comparação com os *mdx* controles (Gráfico 3B).

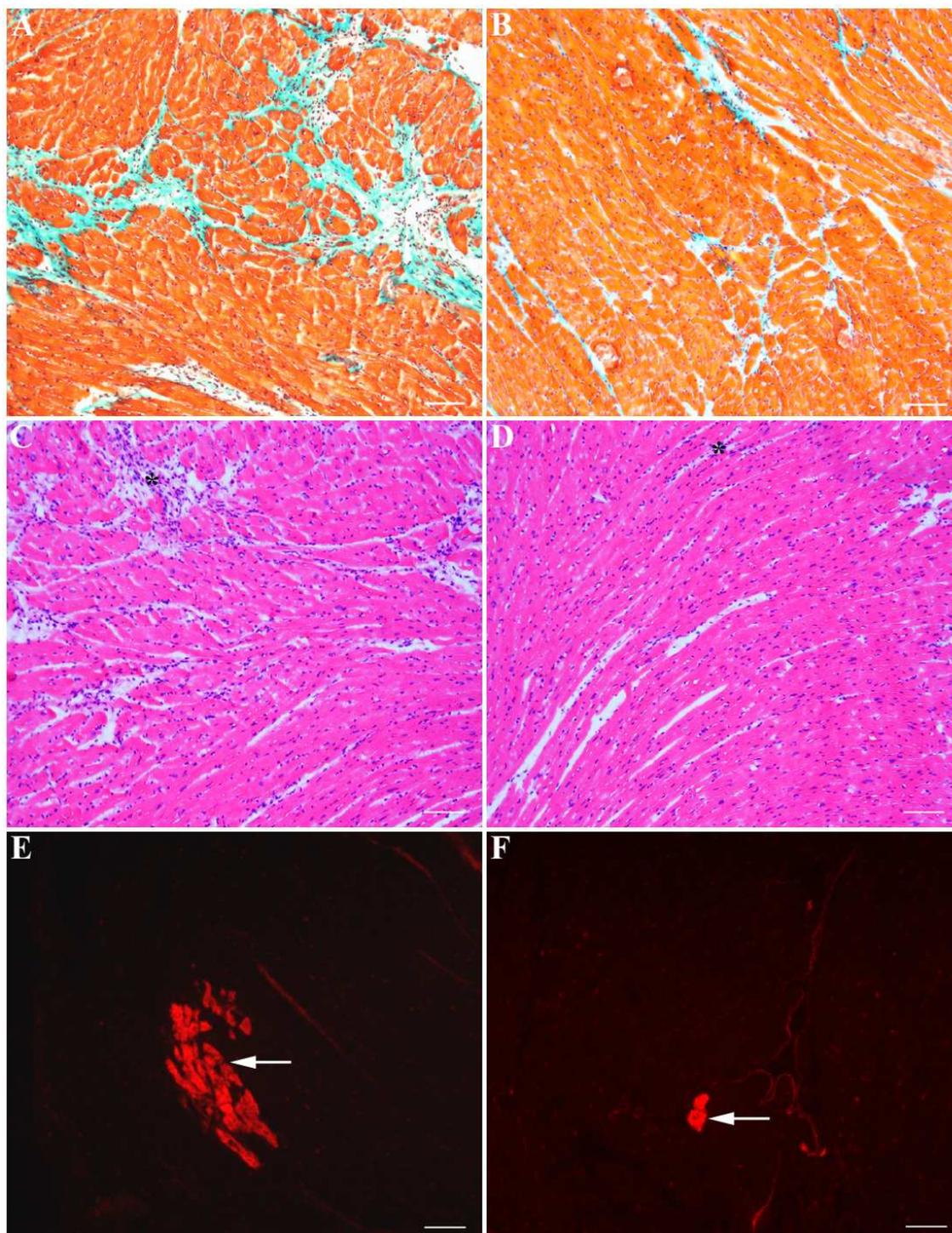
**Tabela 4** - Análise morfométrica da área (%) dos cardiomiócitos com alteração na permeabilidade do sarcolema positivos ao AE, de camundongos distróficos com 17 meses de idade.  $n=5$  em cada grupo.

		<b>%TOTAL</b>	<b>%VD</b>	<b>%VE</b>
<b>COR</b>	<i>mdx</i>	0,12±0,22	0,009±0,02	0,24±0,29
	<i>mdx-DOX</i>	<b>0,06±0,13*</b>	0,001±0,002	0,13±0,18

Média  $\pm$  desvio padrão; \* $p<0,05$ ; teste t de *student*.



**Gráfico 3:** Análise morfométrica do percentual da área de inflamação em (A) e de fibrose em (B) do músculo cardíaco de camundongos distróficos com 17 meses de idade. Média  $\pm$  desvio padrão; \* $p < 0,05$ ; teste t de *student*.  $n=5$  em cada grupo.



**Figura 6:** Características histopatológicas encontradas no músculo cardíaco de camundongos distróficos com 17 meses. Em (A, C, E) *mdx* controle. Em (B, D, F) *mdx* tratados com doxiciclina. Em A e B, área de fibrose intersticial corada em azul pela técnica de tricrômico de Masson. Em C e D, área de inflamação (\*) corada com H&E. Em E e F, cardiomiócitos em degeneração positivos ao AE (seta). Aumento 10X; Barra=100  $\mu$ m.

## **5. DISCUSSÃO**

---

### **5.1 A DOX PROTEGEU CONTRA O INÍCIO DA MIONECROSE**

No camundongo *mdx*, o início da mionecrose ocorre por volta dos 21 dias de vida nos músculos dos membros e no diafragma (PASTORET & SEBILLE, 1995a; PORTER et al., 2003) e a inflamação parece exacerbar a mionecrose após lesão muscular em pacientes DMD e no camundongo *mdx* (GOROSPE et al., 1994; GUSSONI et al., 1994 TIDBALL, 2005). Neste estudo, foi realizado o tratamento com a DOX antes do início dos ciclos de degeneração/regeneração muscular, desde o 1º dia pós-natal até o 36º dia de vida. Os resultados mostram que, a DOX foi eficaz em proteger contra o início da mionecrose, como demonstrado pelo aumento da população de fibras com núcleo periférico, um indicativo de fibras não degeneradas. Possivelmente, esse efeito está relacionado à capacidade da DOX em quelar os íons cálcio (SANCHEZ et al., 2004; SORSA, et al., 2006) ou por inibir as proteases cálcio-dependentes (GRIFFIN et al, 2010), as quais são ativadas pelo excesso de cálcio e estão envolvidas na mionecrose tanto em pacientes DMD quanto no camundongo *mdx* (TURNER et al., 1991; MALLOUK et al., 2000; ROBERT et al., 2001). Além disso, o tratamento precoce com a DOX reduziu a inflamação nos músculos TA, DIA e BB, com concomitante aumento da força muscular do membro torácico. Sendo que o processo inflamatório colabora com a evolução da mionecrose, é possível que a DOX também tenha atuado através de sua ação antiinflamatória. Em geral, estes achados sugerem que a terapia em curto prazo com a DOX é capaz de prevenir o início precoce da mionecrose no músculo distrófico de camundongos *mdx*.

## 5.2 A DOX AMENIZOU A PROGRESSÃO DA DISTROFINOPATIA

O diagnóstico da DMD geralmente é realizado entre dois e cinco anos de idade, quando uma quantidade significativa de necrose e fibrose estão presentes, pelo menos nos músculos dos membros (ENGEL et al., 1994). Dessa forma, com propósitos clínicos, uma questão relevante é se a DOX poderia retardar a progressão da distrofinopatia uma vez que a necrose já esteja estabelecida. Para responder essa questão, procedeu-se o tratamento em longo prazo (9 meses) com a DOX em camundongos *mdx* idosos, com idade inicial de 8 meses. No *mdx* jovem, ao contrário da DMD, existe uma marcante capacidade regenerativa e alterações funcionais são encontradas principalmente em camundongos senis (COULTON et al., 1988; MUNTONI et al., 1993; DE LUCA et al., 2003).

Observamos que o fenótipo distrófico melhorou consideravelmente com a terapia em longo prazo com DOX. Conforme comprovado, a DOX impediu o declínio da força muscular do membro torácico ao longo do tempo. A histopatologia do diafragma em *mdx*, que mais se assemelha à observada em pacientes DMD (STEDMAN et al., 1991), foi significativamente melhorada pelo tratamento com a DOX.

A fibrose do diafragma resulta em insuficiência respiratória que por sua vez contribui para a mortalidade de 75% pacientes com DMD (EAGLE et al., 2002). A inflamação desempenha importante papel na evolução da distrofinopatia no *mdx* e na DMD (GOROSPE et al., 1994; GUSSONI et al., 1994; VILLALTA et al., 2008). O efeito inibitório da DOX sobre as células inflamatórias (JANTZIE et al., 2005; GIRGENRATH et al., 2009) pode explicar a observação, de que a terapia em longo prazo com a DOX foi eficaz para atenuar a progressão da doença incluindo o músculo diafragma, o mais comprometido no camundongo *mdx*.

### 5.3 A DOX DIMINUIU A INFLAMAÇÃO E FIBROSE NO CORAÇÃO DISTRÓFICO

Os corticóides são considerados padrão-ouro para o tratamento da fraqueza muscular na DMD (KHAN, 1993; BUSHBY et al., 2004), mas a incerteza de seus efeitos cardioprotetores tem levado à descontinuidade do tratamento quando se inicia a perda da deambulação em garotos (BIGGAR et al., 2002; WAGNER et al., 2007). A maioria das estratégias terapêuticas promissora para a DMD tem como principal alvo a distrofia no músculo esquelético. Essas estratégias têm freqüentemente pouca ou nenhuma capacidade de compensar ausência da distrofina no músculo cardíaco (TOWNSEND et al., 2008; VITIELLO et al., 2008; TOWNSEND et al., 2009). No presente estudo, mostramos que a DOX também tem efeito positivo no músculo cardíaco. A progressão da fibrose miocárdica foi retardada pelo tratamento em longo prazo com a DOX; um achado importante, considerando que a fibrose miocárdica contribui diretamente entre 20% a 30% de todo óbito em pacientes com DMD (NIGRO et al., 1990). Possivelmente, a inibição das metaloproteinases da matriz pela ação reguladora da DOX (GOLUB et al., 1987; FUJITA et al., 2006; LEE et al., 2009; GRIFFIN et al., 2010) pode ajudar a explicar os resultados encontrados neste estudo, uma vez que as MMPs estão associadas ao desenvolvimento da fibrose miocárdica (VILLARREAL et al., 2003; HUEBNER et al., 2008). A MMP-9 é uma das mais importantes mediadoras da inflamação e está relacionada ao remodelamento da matriz extracelular levando à fibrose miocárdica (DUCHARME et al., 2000; LIM et al., 2006). A MMP-9 também está envolvida no processamento proteolítico de muitas citocinas pró-inflamatórias incluindo a liberação local e ativação do fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor beta*; TGF- $\beta$ ) (YU & STAMENKOVIC, 2000; PAGE-MCCAW et al., 2007), o principal mediador da

fibrose nas distrofinopatias (BERNASCONI et al., 1995). De um modo geral, os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o tratamento de longo tempo com a DOX poderia ter um efeito anti-fibrótico nas nossas condições experimentais.

#### 5.4 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Os corticóides são um grupo de fármacos utilizados atualmente para a DMD, principalmente porque tem como alvo o aspecto inflamatório da distrofia. A DOX, dadas as suas propriedades pleiotrópicas, pode afetar vários mecanismos do músculo distrófico. A DOX é aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) e seus ensaios clínicos em andamento têm demonstrado que é um antibiótico bem tolerado em tratamento crônico, para estabilizar aneurisma abdominal em adultos (DING et al., 2005) ou prevenir síndromes coronarianas agudas em dosagem subantimicrobial (KARDARA et al., 2006). A dose usada nesse estudo é de 10 a 15 vezes maior do que o equivalente alométrico em humanos (DAVIES et al., 2005; ERRAMI et al., 2008). Esta dose foi escolhida porque se mostrou eficaz para reduzir a patogênese no modelo animal para o tipo da distrofia muscular oculofaríngea (DAVIES et al., 2005; DAVIES et al., 2006) e assegurar que os efeitos observados seriam reproduzíveis. A DOX em dose subantimicrobial pode ser um candidato apropriado para a terapia da DMD.

A maioria dos estudos experimentais que avalia os efeitos dos fármacos no camundongo *mdx* concentra-se apenas no início precoce da mionecrose (DE LUCA et al., 2003; GROUNDS & TORRISI 2004; MATSUMURA et al., 2009; MARQUES et al., 2008). Um ponto importante do presente estudo está no fato de examinarmos o efeito da DOX em

camundongos que alcançaram 17 meses de idade. Dado que a média de vida dos camundongos *mdx* é de 22 meses (CHAMBERLAIN et al., 2007), os 17 meses estudados aqui representam aproximadamente 85% de sua vida. A principal limitação deste estudo está intrinsecamente associada ao modelo animal. Mesmo quando os parâmetros distróficos são acentuadamente melhorados nos *mdx*, transpor os benefícios observados no modelo animal para o tratamento clínico em pacientes DMD requer cautela e novos estudos serão necessários.

## **6. CONCLUSÃO**

---

A DOX protegeu o início da mionecrose e a progressão da distrofinopatia em camundongos *mdx*, diminuiu a inflamação e a fibrose no músculo distrófico esquelético e cardíaco, além de melhorar a força muscular. Dado a segurança e a compatibilidade da DOX, o presente estudo abre novas perspectivas para a experimentação clínica potencialmente útil no tratamento da DMD.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

BAXTER, P. Treatment of the heart in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. v.48, p.163, 2006.

BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERI, P.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MORANDI, L; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J. Clin. Invest.*, 96 1137–1144, 1995.

BIGGAR, W.D.; KLAMUT, H.J.; DEMACIO, P.C.; STEVENS, D.J.; RAY, P.N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 401, p. 88-106, 2002.

BONILLA, E.; SAMIT, C.E.; MIRANDA, A.F.; HAYS, A.P.; SALVIATI, G.; DIMAURO, S.; KUNKEL, L.M.; HOFFMAN, E.P.; ROWLAND, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, v. 54, p. 447-452, 1988.

BROWN, R.H.; DPHIL JR, M.D. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Annual Review Medicine*, v. 48, p. 457-466, 1997.

BULFIELD, G; SILLER, WG; WIGTH, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-like muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v .81, p. 1189-1192, 1984.

BUSHBY, K.; MUNTONI, F.; URTIZBEREA, A. et al. Report on the 124<sup>th</sup> ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. 2–4 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*;14:526–534, 2004.

BURNS, F.R.; STACK, M.S.; GRAY, R.D.; PATERSON, C.A. Inhibition of purified collagenase from alkali- burned rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:1569-1575, 1989.

CHAMBERLAIN, J.S.; METZGER, J.; REYES, M.; TOWNSEND, D.W.; FAULKNER, J.A.; Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J*; 21:2195–2204, 2007.

COULTON, G.R.; CURTIN, N.A.; MORGAN, J.E; PARTRIDGE, T.A. The *mdx* mouse skeletal muscle myopathy:II. Contractile properties.*Neuropathol Appl Neurobiol*;14:299–314, 1988.

COX, G.F.; KUNKEL, L.M. Dystrophies and heart disease. *Current opinion Cardiology*. v.12, p.329–343, 1997.

CULLEN, M.J.; JARROS, E. Ultrastructure of the muscle in the X-chromosome linked dystrophic (*mdx* mouse). Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica*, v. 77, p. 69-81, 1988.

DAVIES, J.E.; WANG, L.; GARCIA-OROZ, L.; COOK, L.J.; VACHER, C.; O'DONOVAN, D.G.; RUBINSZTEIN, D.C. Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat. Med.* 11,672–677, 2005.

DAVIES, J.E.; BERGER, Z.; RUBINSZTEIN, D.C. Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1457–1462, 2006.

DE LUCA, A.; PIERNO, S.; LIANTONIO, A.; CETRONE, M.; CAMERINO, C.; FRAYSSE, B.; MIRABELA, M.; SERVIDEI, S.; RÜEGG, U.T.; CAMERINO, D.C. Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 304, n. 1, 453-463, 2003.

DING, R.; MCGUINNESS, C.L.; BURNAND, K.G.; SULLIVAN, E.; SMITH, A. Matrix metalloproteinases in the aneurysm wall of patients treated with low-dose doxycycline. *Vascular*. 13 (5), p.290-297, 2005.

DUCHARME, A.; FRANTZ, S.; AIKAWA, M.; RABKIN, E.; LINDSEY, M.; ROHDE, L.E.; SCHOEN, F.J.; KELLY, R.A.; WERB, Z.; LIBBY, P. et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J. Clin. Invest.*, 106, 55–62, 2000.

EAGLE, M.; BAUDOUIN, S.V.; CHANDLER, C. et al. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord*;12:926-929, 2002.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. New York: McGraw-Hill. p1133-1187, 1994.

ERRAMI, M.; GALINDO, C.L.; TASSA, A.T.; DIMAIO, J.M.; HILL, J.A.; GARNER, H.R. Doxycycline Attenuates Isoproterenol- and Transverse Aortic Banding-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *JPET* 324:1196–1203, 2008.

FABRE, J.; PITTON, J.S.; VIRIEUX, C.; LAURENCET, F.L.; BERNHARDT, J.P.; GODEL, J.C. Doxycycline Absorption, distribution and excretion of a new broad spectrum antibiotic in man. *Schweiz Med Wochenschr.* v. 28 p. 915-24, 1967.

FINSTERER, J.; STOLLBERGER, C. Primary myopathies and the heart. *Scandinavian Cardiovascular Journal.* v.42, p.9-24, 2008.

FRANCO-OBREGON JR, A.; LANSMAN, J.B. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol*; 481:299 –309, 1994.

FRANKLIN, T.J.; SNOW, G.A. *Biochemistry of antimicrobial action.* 2 ed. London: Chapman & Hall. p. 123-126, 1975.

FUJITA, M.; YE, Q.; OUCHI, H.; HARADA, E.; INOSHIMA, I.; KUWANO, K.; NAKANISHI, Y. Doxycycline attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 739–743, 2006.

GIRGENRATH, M.; BEERMANN, M.L.; VISHNUDAS, V.K.; HOMMA, S.; MILLER, J.B. Pathology Is Alleviated by Doxycycline in *Laminin $\alpha$ -2*-Null Model of Congenital Muscular Dystrophy. *Ann Neurol*; 65: 47–56, 2009.

GOLUB, L.M.; MCNAMARA, T.F.; D'ANGELO, G.; GREENWALD, R.A.; RAMAMUR-THY, N.S. A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* 66: 1310 -1314, 1987.

GOROSPE, J.R.; THARP, M.D.; HINCKLEY, J. et al. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy - Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs and mice. *J Neurol Sci*;122:44–56, 1994.

GRIFFIN, M.O.; FRICOVSKY, E.; CEBALLOS, G.; VILLAREAL, F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *AM J Physiol Cell Physiol*; 299: C539-C548, 2010.

GROUND, M.D.; TORRISI, J. Anti-TNF $\alpha$  (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*; 18:676–682, 2004.

GROUND, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, v. 15, p. 381-391, 2005.

GUSSONI, E.; PAVLATH, G.K.; MILLER, R.G. et al. Specific T cell receptor gene rearrangements at the site of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Immunol*;153:4798–4805, 1994.

HAMER, P.W.; McGEACHIE, J.M.; DAVIES, M.J.; GROUND, M.D. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *Journal of Anatomy*, v. 200, p. 69-79, 2002.

HERMANS, M.C.E.; PINTO, Y.M.; MERKIES, I.S.J.; DIE-SMULDERS, C.E.M.; CRIJNS, H.J.G.M.; FABER, C.G. Hereditary muscular dystrophies and heart. *Neuromuscular Disorders*, 20, 479-492, 2010.

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

HUEBNER, K. D.; JASSAL, D.S.; HALEVY, O.; PINES, M.; ANDERSON, J.E. Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofugione. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294: H1550-H1561, 2008.

JANTZIE, L.L.; CHEUNG, P.Y.; TODD, K.G. Doxycycline reduces cleaved caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia–ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 314–324, 2005.

KARDARA, M.; PAPAZAFIROPOULOU, A.; KATSAKIORI, P.; PETROPOULOS, C.; JELASTOPULU, E. Protective effect of doxycycline use on coronary artery disease. *J Infect.* 52 (4) : 243-246, 2006.

KEELING, R.M.; GOLUMBEEK, P.T.; STREIF, E.M.; CONNOLLY, A.M. Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. *Muscle Nerve.*35:43–8, 2007.

KHAN, M. A. Corticosteroid therapy in duchenne dystrophy. *J Neurol Sci*; 120:8–14, 1993.

KOENIG, M.; KUNKEL, L.M. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*,265,8, p.4560-6, 1990.

LEE, H; PARK, JW; KIM, SP; LO, E H; LEE, SR. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease* v. 34 (2):189-198, 2009.

LEFAUCHEUR, J.P.; PASTORET, C.; SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. *Anat Rec*; 242:70–76, 1995.

LEFEROVICH, J.M.; BEDELBAEVA, K.; SAMULEWICZ, S.; ZHANG, X.M.; ZWAS, D.; LANKFORD, E.B.; HEBER-KATZ, E. Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;98(17):9830-5, 2001.

LI, H.; MITTAL, A; MAKONCHUK, D.Y.; BHATNAGAR, S.; KUMAR, A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics.* 18, n°.14: 2584–2598, 2009.

LIM, D.H.; CHO, J.Y.; MILLER, M.; MCELWAIN, K.; MCELWAIN, S. and BROIDE, D.H. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 291 L265–L271, 2006.

LUZ, M.; MARQUES, M.; NETO, H. Impaired regeneration of dystrophindeficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazilian Journal of Medical Biology Research.* v. 35(6), p. 691-695, 2002.

MALLOUK, N.; JACQUEMOND, V.; ALLARD, B. Elevated subsarcolemmal  $Ca^{2+}$  in *mdx* mouse skeletal muscle fibers detected with  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 97, p.4950-4955, 2000.

MARIOL, M.C.; SÉGALAT, L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol.*, v.11, n.21, p.1691-1694, 2001.

MARQUES, M.J.; MACHADO, R.V.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in mdx sternomastoid, diafrgm and tibialis anterior. *Muscle & Nerve* 37: p.61-67, 2008.

MATECKI, S.; GUIBINGA, G.H.; PETROF, B.J. Regenerative capacity of the dystrophy (*mdx*) diaphragm after induced injury. *American Journal of physiology, regulatory, integrative and Comparative Physiology*, v.287, p.R961-R968, 2004.

MATSUDA, R.A.; NISHIKAWA, A.; TANAKA, H. Vizualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *The Journal of Biochemistry*, v.118, p.959-964, 1995.

MATSUMURA, C.Y.; PERTILLE, A.; ALBUQUERQUE, T.C.P.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of mdx mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability. *Muscle Nerve* 39: 167–176, 2009.

MORRISON, J.; PALMER, D.B.; COBBOLD, S.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. Effects of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the mdx mouse. *Am. J. Pathol.*, 166 1701–1710, 2005.

MORRISON, J.; LU, Q.L.; PASTORET, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab. Invest.*, 80 881–891, 2000.

MUNTONI, F.; MATEDDU, A.; MARCHEI, F.; CLERK, A.; SERRA, G. Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci*;120:71–77, 1993.

MUNTONI, F. Cardiomyopathy in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 16:577-83, 2003.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494, 1999.

NIGRO, G.; COMI, L.I.; POLITANO, L.; BAIN, R.J.I. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. 26, p.271-277, 1990.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 221–233, 2007.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Science*, v. 129, p. 97-105, 1995a.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle & Nerve*, v. 18, p.-1147-1154, 1995b.

PETROF, B.J.; The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 179, n. 1-2, p. 111-123, 1998.

PETROF, B.J.; Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. American Journal Physical Medicine and Rehabilitation, v. 81 (Suppl), p. S162–S174, 2002

PILGRAM, G.S.K.; POTIKANOND, S.; BAINES, R.A.; FRADKIN, L.G. NOORDERMEER, J.N. The Roles of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex at the Synapse. Mol Neurobiol; 41:1–21, 2010.

PORTER, J.D.; MERRIAN, A.P.; LEAHY, P.; GONG, B.; KHANNA, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. Hum Mol Genet. 12 (15), p.1813-1821, 2003.

POSS, K.D.; WILSON, L.G.; KEATING, M.T. Heart regeneration in zebrafish. Science. 13; 298(5601): 2188-90, 2002.

QUINLAN, J.G.; WENISCH, A.S.; WONG, B.L.; HAHN, H.S.; LORENZ, J.N. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. Neuromuscular disorders. v.14, p. 491-494, 2004.

ROBERT, V.; MASSIMINO, M.L.; TOSELLO, V. et al. Alterations in calcium handling at the subcellular level in *mdx* myotubes. J Biol Chem;276:4647-4651, 2001.

SANCHEZ, A.R.; ROGERS, R.S.; SHERIDAN, P.J. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. Int J Dermatol; 43: 709 –715, 2004.

SASAOKA, T.; IMAMURA, M.; ARAISHI, K.; NOGUCHI, S.; MIZUNO, Y.; TAKAGOSHI, N.; HAMA, H.; WAKABAYASHI-TAKAI, E.; YOSHIMOTO-MATSUDA, Y.; NONAKA, I.; KANEKO, K.; YOSHIDA, M.; OZAWA, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in  $\gamma$ -sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscul Disord.* v.13, p.193-206, 2003.

SORSA, T.; TJADERHANE, L.; KONTTINEN, Y.T. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med;* 38:306–21, 2006.

SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet.*, v.11, n.21, p.2645-2655, 2002.

SPURNEY, C.F.; KNOBLACH, S.; PISTILLI, E.E.; NAGARAJU, K.; MARTIN, G.R.; HOFFMAN, E.P. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul Disor;*18:371–381, 2008.

SPURNEY, C.F.; GORDISH-DRESSMAN, H.; GUERRON, A.D.; SALI, A.; PANDEY, G. S.; RAWAT, R.; VAN DER MEULEN, J.H.; CHA, H-J.; PISTILLI, E.E.; PARTRIDGE, T. A.; HOFFMAN, E.P.; NAGARAJU, K. Preclinical Drug Trials In The *Mdx* Mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. *Muscle Nerve* 39: 591–602, 2009

STEDMAN, H.H.; SWEENEY, H.L.; SHRAGER, J.B.; MAGUIRE, H.C.; PANETTIERI, R.A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J.T.; KELLY, A.M..The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, v. 352, n.6335, p.536-9, 1991.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathologica*, v. 69, n. 1-2, p. 91-95, 1986.

TANIGUTI, A. P. PERTILLE, A. MATSUMURA, C.Y. SANTO NETO, H. MARQUES, M.J. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx by suramin, a TGF-B1 blocker. *Muscle & Nerve*; 43:82-87, 2010.

TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRIKS, M. Evolving therapeutics strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. *Pediatr Res*; 56:831– 841, 2004.

TIDBALL, J.G. Inflammatory process in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, p. R345-R353, 2005.

THADEPALLI, H.; WEBB, D.; HVANG, J.T. Anaerobic lung infections treated with doxycycline. *Bull N Y Acad Med*. 54(2) p. 165-176, 1978.

TORRES, L.F.; DUCHEN, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, v. 110, p. 269-299, 1987.

TOWNSEND D, YASUDA S, LI S, et al. Emergent dilated cardiomyopathy caused by targeted repair of dystrophic skeletal muscle. *Mol Ther*;16:832-835, 2008.

TOWNSEND, D.; YASUDA, S.; CHAMBERLAIN, J. et al. Cardiac consequences to skeletal muscle-centric therapeutics for Duchenne muscular dystrophy. *Trends Cardiovasc Med*;19:50-55, 2009.

TURNER, P.R.; FONG, P.; DENETCLAW, W. STEINHARDT, R.A. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol*;115: 1701–1712, 1991.

VILLALTA, A.; NGUYEN, H.X.; DENG, B.; TOMOMI, G.; TIDBALL, J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18: 482-496, 2008.

VILLARREAL, F.J.; GRIFFIN, M.; OMENS, J.; DILLMANN, W.; NGUYEN, J.; COVELL, J. Early shortterm treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 108, 1487–1492, 2003.

VITIELLO, L.; BASSI, N.; CAMPAGNOLO, P. et al. In vivo delivery of naked antisense oligos in aged mdx mice: analysis of dystrophin restoration in skeletal and cardiac muscle. *Neuromuscul Disord*;18:597-605, 2008.

YU, L.P.; SMITH, G.N.; HASTY, K.A.; BRANDT, K.D. Doxycycline inhibits type XI collagenolytic activity of extracts from human osteoarthritic cartilage and of gelatinase. *J Rheumatol* 18: 1450 -1452, 1991.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.*14,163–176, 2000.

WAGNER, K.R.; LECHTZIN, N.; JUDGE, D.P. Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*;1772:229–237, 2007.

WALLACE, G.Q.; MCNALLY, E.M. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.*; 71:37–57, 2009.

WEHLING-HENRICKS, M.; JORDAN, M.C.; ROOS, K.P.; DENG, B.; TIDBALL, J.G. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Hum Mol Genet.*14,1921-1933, 2005.

**DECLARAÇÃO**

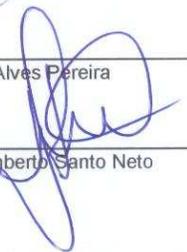
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada **"EFEITO DA DOXICICLINA SOBRE A MIONECROSE E FIBROSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E CARDÍACO DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS MDX"**:

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( X ) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança\*: Comissão de Ética no uso de Animais CEUA/Unicamp, sob Protocolo(s) nº 2007-1.

*\* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

  
\_\_\_\_\_  
Juliano Alves Pereira

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

  
\_\_\_\_\_  
Nome:  
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UNICAMP