

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

# **DRIELEN DE OLIVEIRA MOREIRA**

# "FIBROSE CARDÍACA EM CAMUNDONGOS *MDX* IDOSOS: EFEITO DA SURAMINA, UM BLOQUEADOR DO TGF-β1"

Este	exemplar corresponde à redação final
da t	tese defendida pelo(a) candidato (a)
Д	rielen de Oliveira Moreira
e ap	rovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Campinas, 2012

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M813f	Moreira, Drielen de Oliveira, 1985- Fibrose cardíaca em camundongos <i>mdx</i> idosos: efeito da suramina, um bloqueador do TGF-β1 / Drielen de Oliveira Moreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.
	Orientador: Maria Julia Marques. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	<ol> <li>Camundongo <i>mdx.</i> 2. Fibrose endomiocárdica.</li> <li>Suramina. 4. Eletrocardiografia. 5. Fator transformador de crescimento beta 1. I. Marques, Maria Julia, 1961 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</li> </ol>

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Cardiac fibrosis in older mdx mice: effects of suramin, a blocker of TGF-β1 Palavras-chave em Inglês: Mdx mice Endomyocardical fibrosis Suramin Electrocardiography Transforming growth factor beta 1 Área de concentração: Anatomia Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Maria Julia Marques [Orientador] Regiane Luz Carvalho Rosana Macher Teodori Data da defesa: 16-02-2012 Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

#### **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

Profa. Dra. Regiane Luz Carvalho

is Assinatura MEODOR Assinatura

grane Ly Convollo. Assinatura

Prof. Dr. Edison Duarte

Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa De Souza

Assinatura

Assinatura

### DEDICATÓRIA

# À DEUS

"Por estar sempre me abençoando e me oferecendo oportunidades de crescimento e aprendizagem. Por cada passo dado adiante e por cada dificuldade superada com força de vontade e determinação me fazendo seguir em frente na estrada da vida."

# À MINHA AVÓ APARECIDA (in memorian)

"Pelo exemplo de vida, amor e incentivo; por ter sido a melhor avó do mundo!"

#### AOS MEUS PAIS, GUILHERME E ELIANA

"Serei eternamente grata pela educação que me proporcionaram, e por terem me apoiado incondicionalmente em mais uma etapa da minha vida. Pelo amor, carinho, amizade e ajuda nos momentos de dificuldade. Vocês são o meu porto seguro."

# À MINHA IRMÃ, KERULINE

"Pelo amor, cumplicidade, troca de experiências, apoio e sincera amizade".

#### **AO MEU CACHORRO, LUCKY**

"Por a cada volta para casa me receber com enorme alegria e carinho."

# Agradecimento especial...

À Professora Dra. **Maria Julia Marques** pelo respeito, confiança, colaboração e incentivo. Pelos conhecimentos passados e por ter me guiado na vida acadêmica, visando aprimoramento didático e científico.

#### AGRADECIMENTOS

À toda minha família pelo incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural** pelo acolhimento e excelência na formação profissional de seus alunos.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** pela colaboração e pelas importantes considerações para a realização deste trabalho.

Aos **docentes do Departamento de Anatomia** pela contribuição em minha formação e por terem compartilhado seus conhecimentos nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

Aos **Professores Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Dr. Henrique Marques de Souza e a Dra. Elaine Minatel** pelas importantes considerações no exame de qualificação.

Aos **Professores Dr. Edison Duarte, Dra. Regiane Luz Carvalho e Dra. Rosana Macher Teodori** pelas considerações no exame de pré-banca e banca.

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

À Sra. Liliam Alves Senne Panagio pela atenção e auxílio durante todo o mestrado.

Aos funcionários do Departamento 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 memorian*, Srta. Stella Maris Fick de Ferraz, Srta. Érika da Silva Campos pela contribuição durante minha formação. Aos amigos Adriana Fogagnolo Maurício, Ana Paula Tiemi Taniguti, Cíntia Yuri Matsumura, Isabel Cristina Chagas Barbin, Juliana Pedrosa, Juliano Alves Pereira, Letícia Montanholi Apolinario, Luiz Henrique Rapucci, Matheus Revere, Natália Pinheiro, Paula Perez, Rafael Machado, Renato Ferretti, Samara Camaçari de Carvalho pela importante contribuição para a realização deste trabalho e pela amizade e convívio nestes anos.

À todos os amigos e colegas que mesmo distantes nunca me abandonaram.

À **CAPES** pela concessão de bolsa e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor."

Johann Goethe

# SUMÁRIO

ABREVIATURAS xi
RESUMO xii
ABSTRACT xiii
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne 1
1.2 Modelos animais para a Distrofia Muscular de Duchenne 2
1.2.1 Camundongo mdx
1.3 Alterações no músculo cardíaco na DMD 3
1.3.1 Alterações no músculo cardíaco do mdx 5
1.4 Fibrose cardíaca e o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1 5
1.5 Suramina
2 OBJETIVOS
2.1 Objetivos específicos
3 MATERIAL E MÉTODOS 10
3.1 Animais 10
3.2 Protocolo experimental 10
3.3 Tratamento com suramina 10
3.4 Medida de força muscular 11
3.5 Avaliação da função cardíaca: eletrocardiograma (ECG) 12
3.6 Determinação da creatina cinase total no plasma sangüíneo 13
3.7 Análise Histológica 13
3.7.1 Tricrômio de Masson
3.7.2 Hematoxilina e eosina (H&E)
3.8 Marcação de fibras necróticas 15
3.9 Western blotting 16
3.10 Determinação semiquantitativa dos níveis de corpos cetônicos e proteína na
urina
3.11 Análise estatística 19
4 RESULTADOS 20

4.1 Massa corporal e medida de força 20
4.2 Avaliação da função cardíaca: eletrocardiograma (ECG) 21
4.3 Determinação da creatina cinase total no plasma sangüíneo 24
4.4 Análise Histológica 25
4.4.1 Músculo cardíaco
4.4.2 Diafragma
4.5 Western blotting
4.6 Determinação semiquantitativa dos níveis de corpos cetônicos e proteína na
urina 33
5 DISCUSSÃO 34
5.1 Efeito da suramina na função muscular e na função cardíaca de animais
distróficos 34
5.2 Efeito da suramina nas características histopatológicas do músculo estriado
esquelético e cardíaco e nos níveis de TGF-β1 36
5.3 Dosagem e efeitos colaterais da suramina 38
6 CONCLUSÃO 40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 41
8 ANEXO COMISSÃO DE ÉTICA: CERTIFICADO 54

#### ABREVIATURAS

- AE Azul de Evans
- CK Creatina cinase
- Cor Coração
- Dia Diafragma
- DMD Distrofia Muscular de Duchenne
- ECG Eletrocardiograma
- H&E Hematoxilina & Eosina
- *mdx* X chromossome-linked muscular dystrophy
- NC Núcleo central
- NP Núcleo periférico
- PBS Tampão fosfato salina
- SI Septo interventricular
- TGF- $\beta$ 1 fator de crescimento transformador-beta 1
- VE ventrículo esquerdo
- VD ventrículo direito
- U/L Unidade Internacional

#### **RESUMO**

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doenca caracterizada pela fraqueza muscular progressiva que leva à insuficiência respiratória e cardíaca, resultando em morte por volta dos 30 anos de idade. No camundongo mdx, modelo experimental da DMD, os músculos diafragma e cardíaco são severamente afetados apresentando fibrose semelhante à observada na patologia humana. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento a longo prazo com suramina, uma droga anti-fibrótica, nos músculos diafragma e cardíaco de camundongos mdx idosos. Camundongos mdx (n=20; 8 meses de idade) receberam injeções intraperitoneais de suramina (60 mg/kg), durante 3 meses. Controles mdx  $(n=20; 8 \text{ meses}) \in C57BL/10$  (n=18; 8 meses) foram injetados com solução salina. Os camundongos da linhagem C57BL/10 expressam distrofina e são utilizados como controle da linhagem mdx. A suramina diminuiu os níveis de CK e atenuou a perda da força muscular. No músculo diafragma, a suramina reduziu a área de fibrose e a mionecrose. No músculo cardíaco, houve redução da fibrose, da inflamação e melhora significativa de parâmetros funcionais cardíacos (amplitude das ondas P, Q, R e S do eletrocardiograma). Sugere-se que a suramina possa ser potencialmente útil nas distrofinopatias, atenuando a miopatia nos músculos mais afetados, o coração e o diafragma, nos estágios tardios da doença.

**Palavras-chave:** camundongo *mdx*, fibrose endomiocárdica, suramina, eletrocardiografia, fator transformador de crescimento beta-1

#### ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a disease characterized by progressive muscle weakness leading to respiratory and cardiac failure, resulting in death around 30 years of age. In the mdx mice model of DMD, diaphragm and cardiac muscles are severely affected in the later stages of the disease, showing intense fibrosis similar to that observed in human pathology. The aim of the present study was to investigate the effects of long-term treatment with suramin, an anti-fibrotic agent, in the diaphragm and cardiac muscles of the mdx mice. Mdx mice (n=20; 8 months of age) received intraperitoneal injections of suramin (60 mg/kg) for 3 months. Mdx controls (n=20; 8 months) and C57BL/10 (n=18; 8 months old) were injected with saline. C57BL/10 mice express dystrophin and are the control strain for the mdx mice. Suramin decreased CK levels and reduced the loss of muscle strength. Suramin reduced fibrosis and myonecrosis in diaphragm. In the cardiac muscle, suramin decreased fibrosis, inflammation and improved cardiac functional parameters (P, Q, R and S waves of the electrocardiogram). It is suggested that suramin may be a potential therapy for distrophinopaties, attenuating the dystrophic phenotype of the most affected cardiac and diaphragm muscles of the mdx mice, during later stages of the disease.

**Key words:** mdx mice, endomyocardial fibrosis, suramin, electrocardiography, transforming growth factor beta-1

#### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética causada por mutação em um único gene do cromossomo X que leva a ausência da proteína distrofina (Cyrulnik & Hinton, 2008).

Aproximadamente um em cada 3500 nascidos vivos do sexo masculino é afetado pela DMD. Entre os 2-5 anos de idade observam-se os primeiros sinais clínicos da doença, caracterizados por dificuldade para correr, subir escadas, instabilidade na marcha e quedas frequentes, com subsequente pseudo-hipertrofia dos músculos das panturrilhas e fraqueza muscular progressiva (Bogdanovich et al., 2003).

O paciente distrófico geralmente perde a capacidade de deambular e necessita de cadeira de rodas por volta dos 10-12 anos de idade. A maioria dos pacientes com DMD apresenta cardiomiopatia, que pode ser detectada a partir dos 10 anos de idade e observada em 100% dos pacientes com mais de 18 anos. A cardiomiopatia é acentuada por problemas respiratórios causados por escoliose e fraqueza dos músculos diafragma e intercostais. Na maioria dos casos, o óbito decorre de insuficiência cardíaca e respiratória, em torno da terceira década de vida (Kaspar, Allen & Montanaro, 2009).

A DMD é causada por mutações no gene da distrofina, que conduzem à ausência desta proteína no sarcolema. A distrofina localiza-se na face citoplasmática do sarcolema, ligada aos miofilamentos e a um complexo de glicoproteínas da membrana das fibras musculares esqueléticas (Bernasconi et al., 1995), cardíacas e lisas (Hainsey et al., 2002) (Figura 1). O complexo de glicoproteínas desempenha papel essencial na manutenção estrutural do sarcolema durante o estresse imposto pela contração muscular (Ervasti, 2007). Na ausência da distrofina, as proteínas do complexo estão diminuídas, ou são rapidamente degradadas ou ainda encontram-se dispersas no citosol (Gillis, 1999).

A falta da distrofina resulta na instabilidade do sarcolema, no aumento de influxo de cálcio, ativação de proteases e necrose (Deconinck & Dan, 2007). No coração, além da

perda da integridade da membrana, a ausência da distrofina afeta os canais voltagemdependente de cálcio tipo-L, localizados na membrana dos túbulos transversos (Jorgensen et al., 2011). Essas anormalidades contribuem para aumentar o cálcio intracelular. O excesso de cálcio pode estimular ainda mais sua liberação e ativar proteases, como as calpaínas que degradam as proteínas contráteis (Whitehead, Yeung & Allen, 2006). Tal como acontece no músculo esquelético, isso leva a um ciclo de inflamação, mionecrose e fibrose. A ausência de fibras miocárdicas íntegras leva ao estresse da parede do coração, aumento da demanda de oxigênio, morte contínua de cardiomiócitos e aumento de fibrose (Spurney, 2011).



Figura 1: Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas.

#### 1.2 Modelo animal para a Distrofia Muscular de Duchenne

#### 1.2.1 Camundongo mdx

O camundongo *mdx* foi descoberto em 1984 em uma colônia de camundongos C57/BL10 ScSn, denominada C57BL/10 *mdx*: "x chromossome-linked muscular

dystrophy". Eles foram identificados por apresentarem níveis elevados das enzimas creatina cinase e piruvatoquinase, decorrente da degeneração muscular característica de distrofia muscular (Bulfield et al., 1984).

Apesar da falta da distrofina, o fenótipo do camundongo *mdx* é mais suave do que o de pacientes distróficos (Tanabe, Esaki, & Nomura, 1986). A patologia muscular é pronunciada no *mdx* entre duas e oito semanas de idade, um período caracterizado pela presença de focos de necrose, fibras recém-regeneradas com núcleo central e altas concentrações plasmáticas da enzima creatina cinase. O ciclo de degeneração-regeneração tem seu pico por volta da terceira ou quarta semana de vida do animal (Partridge et al., 1988).

Ao redor de 1-3 meses de vida, a necrose atinge seu ápice e após o quarto mês a incidência de fibras necróticas é reduzida (Tanabe, Esaki, & Nomura, 1986).

Nos camundongos adultos, a fraqueza muscular nos membros é bastante pronunciada e acompanhada por progressiva deterioração estrutural e funcional do músculo diafragma (Stedman et al., 1991; Ishizaki et al., 2008) e alterações degenerativas nas fibras musculares cardíacas, com focos de fibrose nos ventrículos, átrios e sistema de condução (Engel, 1994; Hainsey et al., 2002).

#### 1.3 Alterações do músculo cardíaco na DMD

O músculo cardíaco é comumente afetado na DMD (Engel, 1994; Zhu et al., 2002; Gulati et al., 2005) e, durante a progressão clínica da doença, aproximadamente 90% dos pacientes desenvolvem sérios problemas na função cardíaca, sendo a cardiomiopatia a causa de morte em cerca de 20% dos casos (Lohan et al., 2005; Wehling-Henricks et al., 2005; Au et al., 2010; Spurney et al., 2011).

O desenvolvimento da cardiomiopatia na DMD pode ser influenciado por parâmetros extrínsecos associados à progressão da doença, como por exemplo, o aparecimento de lordose e escoliose decorrentes da distrofia nos músculos posturais, o que consequentemente limita o desempenho respiratório. Adicionalmente, o comprometimento do músculo diafragma e também dos músculos intercostais, leva à doença pulmonar restritiva, hipoxemia e hipertensão pulmonar que por sua vez pode desencadear cardiomiopatia secundária ou o *cor pulmonale* (Menegey et al., 1999; Zhu et al., 2002).

Dentre as manifestações clínicas da doença cardíaca na DMD, têm-se descrito a taquicardia, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva e alterações eletrocardiográficas (Manning & Cropp, 1958). Anormalidades no sistema de condução cardíaco podem ser demonstradas em cerca de 50% dos pacientes. Alterações na condução intra-atrial são comuns, na condução infranodal aparecem em 10% dos pacientes e mais de um tipo ocorrem em um terço dos pacientes (Engel, 1994).

O eletrocardiograma (ECG) revela ondas R de amplitudes anormalmente altas nas derivações V1 e V3, onda Q profunda vista principalmente nas derivações V1, aVL e V6 e menos freqüentemente em V2, V3 e aVF ou V1 e V4. Outros achados incluem intervalo PR diminuído, prolongamento do intervalo QT, ondas R polifásicas, redução da razão R:S e contrações atriais e ventriculares prematuras (Slucka, 1968; Bia et al., 1999; Wehling-Henricks et al., 2005; Branco et al., 2007; Bostick et al., 2008; Bostick et al., 2009; Spurney, 2011).

Ao exame *pos morten*, o coração de pacientes com DMD apresenta extrema fibrose, geralmente localizada na parede póstero-basal do ventrículo esquerdo (Moriuchi et al., 1993). O tecido fibrótico, por ser inflexível diminui a eficiência da contração do miocárdio. A região de fibrose gradativamente torna-se mais delgada, perde a capacidade de contratilidade, levando a cardiomiopatia dilatada. A dilatação do coração aumenta o volume ventricular esquerdo, compromete a função sistólica e muitas vezes leva à regurgitação mitral, que consequentemente acarreta diminuição do débito cardíaco (Kaspar, Allen & Montanaro, 2009).

A fibrose cardíaca, caracterizada por acúmulo excessivo de matrix extracelular no miocárdio, forma-se por ação de citocinas pró-fibróticas, como o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e o fator de crescimento de tecido conjuntivo (cTGF). Na DMD e nos camundongos *mdx*, o TGF- $\beta$ 1 é um importante mediador da fibrose em ambos músculos esquelético e cardíaco (Turgeman et al., 2008; Au et al., 2010).

#### 1.3.1 Alterações do músculo cardíaco no mdx

Assim como na DMD, o animal *mdx* apresenta anormalidades no ECG, disfunção autonômica, condução prejudicada, arritmias, função ventricular esquerda deteriorada e cardiomiopatia dilatada (Bia et al., 1999; Chu et al.; 2002; Hainsey et al., 2002; Quinlan et al., 2004; Lohan et al., 2005). O acúmulo progressivo de tecido conjuntivo no coração do animal sugere que a fibrose pode ser responsável por algumas características da cardiomiopatia do *mdx* (Hainsey et al., 2002; Wehling-Henricks et al., 2005).

Funcionalmente, o coração do *mdx* exibe taquicardia e diminuição significativa da variabilidade da freqüência cardíaca (Chu et al.; 2002) e tem suas propriedades contráteis alteradas (Sapp et al., 1996).

O coração de camundongos mdx jovens (3 meses de idade) raramente exibe mudanças degenerativas e focos limitados de inflamação (Grady et al., 1997; Burelle et al., 2010). Por volta dos 6-8 meses de idade começa a apresentar moderada necrose miocárdica e fibrose. Já a diminuição da função cardíaca ocorre por volta de 9-10 meses (Cohn et al., 2001; Duan, 2006; Hoffman et al., 2008; Burelle et al., 2010), havendo aumento significativo do volume ventricular esquerdo (Quinlan et al., 2004). A falta de tecido muscular funcional e a fibrose resultante podem levar a diminuição da função cardíaca sistólica e diastólica (Hoffman et al., 2008). No entanto, o camundongo mdx apresenta patologia cardíaca proeminente ao redor dos 12 meses de idade, que se agrava com o envelhecimento (Wehling-Henricks et al., 2005).

#### 1.4 Fibrose cardíaca e o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF-β1)

Vários fatores contribuem para a deterioração dos cardiomiócitos na DMD. O músculo cardíaco contrai repetidamente e as contrações contínuas resultam em constante influxo de cálcio. O aumento de cálcio intracelular acelera o processo de injúria, levando a

degradação e conseqüente morte dos cardiomiócitos (Kaspar, Allen & Montanaro, 2009; Ameen & Robson, 2010).

A morte dos cardiomiócitos inicia a resposta inflamatória, na qual macrófagos migram para a região e removem as células. Posteriormente, fibroblastos cardíacos invadem a área danificada e iniciam a formação de tecido cicatricial ou fibrose no músculo cardíaco. A fibrose na DMD é primeiramente formada na parede ventricular esquerda e a seguir na parede ventricular direita, do epicárdio para o endocárdio, espalhando-se a seguir por todo o coração (Frankel & Rosser, 1976). A região com fibrose perde a contratilidade, levando a cardiomiopatia dilatada (kaspar, Allen & Montanaro, 2009).

Sugere-se que a fibrose em músculos distróficos esteja relacionada à elevada expressão do fator de crescimento transformador beta-1 (*transforming growth factor beta-1*; TGF- $\beta$ 1) (Yamazaki et al., 1994; Bernasconi et al., 1995; Gosselin et al., 2004; Zhou et al., 2006; Khan & Sheppard, 2006).

Nos mamíferos, o TGF- $\beta$  é encontrado em três isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. O TGF- $\beta$ 1 é expresso em miofibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos (Jiao et al., 2005). É uma citocina multifuncional de 25 kDa (Budasz-Swiderska et al., 2005) que desempenha papel importante na inflamação, na cicatrização de feridas e na fibrose (Bernasconi et al., 1995). Sua expressão elevada resulta no aumento de síntese de proteínas da matriz extracelular e este excesso de proteínas promove a fibrose (Khan & Sheppard, 2006).

No coração, altas concentrações de TGF-β1 levam a hipertrofia cardíaca acompanhada por fibrose intersticial (Biernacka & Frangogiannis., 2011), resultando em disfunção sistólica e diastólica, espessamento das paredes valvulares, além de tornar o tecido cardíaco um meio não homogêneo para a propagação elétrica, podendo levar ao desenvolvimento de arritmia cardíaca (Khan & Sheppard, 2006).

Pelo fato dos pacientes com DMD apresentarem cardiomiopatia dilatada nos estágios tardios da doença, o uso de agentes anti-fibróticos que regulem a expressão do TGF-β1 são uma escolha importante para atenuar a evolução da doença.

#### 1.5 Suramina

A suramina foi inicialmente descrita em 1920 como uma droga para o tratamento de indivíduos com tripanossomíase africana mostrando-se eficiente também contra alguns tipos de tumores (McNally et al., 2000; Bisaggio et al., 2006; Kathir et al., 2006; Aragão et al., 2009), incluindo o câncer prostático metastático, o linfoma, o carcinoma do córtex adrenal e o carcinoma renal metastático (Yoneda et al., 1995; Erguven et al., 2008).



Figura 2: Estrutura molecular da suramina.

A suramina possui inúmeras ações biológicas, tais como (a) bloquear os receptores de vários fatores, citando como exemplos o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o fator de crescimento  $\beta$ ; (b) inibir a angiogênese, a atividade enzimática esteroidogênica e a atividade de diferentes enzimas, tais como a DNA polimerase, a topomerase e a proteína quinase C e (c) interferir no catabolismo de glicolipídeos, levando a morte celular por apoptose de células tumorais. Adicionalmente, a suramina é considerada um antagonista de receptores purinérgicos (La Rocca et al., 1990; McNally et al. 2000; Bhargava et al., 2007; Li et al., 2010).

A suramina foi utilizada para impedir a formação de tecido cicatricial e antagonizar o TGF- $\beta$ 1 liberado no local da lesão, impedindo que ele atue nos fibroblastos (Chan et al., 2005; Nozaki et al., 2008). Seu uso em músculos esqueléticos lesados diminuiu a expressão do TGF- $\beta$ 1 (Stein et al., 1993; Chan et al., 2005), promoveu regeneração muscular, diminuiu a formação de fibrose e aumentou a força muscular após a lesão (Nozaki et al., 2008). Por atuar como um bloqueador de fatores de crescimento sugere-se que a suramina pode ser usada também na terapia de miocardites e outras doenças cardiovasculares (Shiono et al., 2002).

Estudos realizados em nosso laboratório por Taniguti et al., 2011, revelaram a potencialidade da suramina na prevenção da fibrose muscular e da mionecrose em diferentes músculos esqueléticos distróficos do camundongo mdx idoso (7 meses). Foi sugerido que a suramina seria potencialmente útil para a terapia das distrofinopatias. Entretanto, como algumas drogas que melhoram o fenótipo de músculos estriados distróficos levam a efeitos negativos no músculo cardíaco (Whitehead et al., 2006), seria importante verificar os efeitos da suramina no coração distróficos.

#### **2 OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do tratamento a longo prazo com suramina na histopatologia do músculo cardíaco e diafragma de camundongos *mdx* idosos.

### 2.1 Objetivos específicos

1) Verificar os efeitos do tratamento a longo prazo com suramina na função cardíaca de camundongos *mdx* idosos.

2) Verificar se a suramina altera os níveis de TGF- $\beta$ 1 no músculo cardíaco e diafragma de camundongos *mdx* idosos.

3) Verificar se a suramina altera os níveis de corpos cetônicos e proteínas na urina de camundongos *mdx* idosos.

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/10ScCr/PasUnib (n=18) e camundongos da linhagem *mdx* (n=40) com 8 meses de idade, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia, em caixas plásticas sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) nº 2255-1.

#### **3.2 Protocolo experimental**

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: C57BL/10 tratados com solução salina (n=18); camundongos mdx tratados com solução salina (mdx-sal; n=20); camundongos mdx tratados com suramina (mdx-sur; n=20).

#### 3.3 Tratamento com suramina

Os camundongos foram tratados com suramina durante três meses, duas vezes por semana. A suramina foi injetada intraperitonealmente na dose de 60mg/kg (Lossos et al.,

2000; Taniguti et al., 2011) diluída em solução salina. Camundongos tratados somente com solução salina, pela mesma via e período, serviram de controle.

Após o término do protocolo experimental, os animais foram sacrificados com anestesia intraperitoneal de cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg). Os músculos cardíaco e diafragma foram coletados e processados de acordo com as técnicas descritas a seguir.

#### 3.4 Medida da força muscular

A força dos membros anteriores foi mensurada utilizando-se o medidor de força (New Primer, São Paulo, Brasil) (Figura 3). Os camundongos foram posicionados sobre o medidor, apreendidos pela cauda e estimulados a tracionar com os membros anteriores um anel metálico acoplado ao dinamômetro do medidor de força. A força de tração exercida pelo animal foi expressa como a média das cinco maiores medidas de força em gramas dividida pelo peso corporal em gramas (g/g de peso corporal; Payne et al., 2006; Taniguti et al., 2011).

As medidas da força foram realizadas no início e no final do protocolo experimental pelo mesmo examinador.



**Figura 3:** Medida de força dos membros anteriores. O animal é mantido na posição ilustrada. Ao ser gentilmente tracionado para trás, segura a argola, puxando-a para trás, exercendo assim força muscular que é registrada no visor digital, em kilogramas.

#### 3.5 Avaliação da função cardíaca: eletrocardiograma (ECG)

Para avaliação eletrocardiográfica, camundongos controle а C57BL/10ScCr/PasUnib (n=6), mdx-sal (n=6) e mdx-sur (n=6) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (5,0 mg/Kg). Os registros foram feitos com eletrodos na forma de agulhas hipodérmicas conectadas a um eletrocardiógrafo computadorizado de quatro canais (MLS360/7 ECG Analysis Module, ADInstruments -Austrália). As agulhas foram introduzidas subcutaneamente, duas na junção ventral da caixa torácica com os membros anteriores direito e esquerdo e uma terceira agulha na junção do abdome e o membro posterior esquerdo (Figura 4). Os traçados foram obtidos com o animal em decúbito dorsal. As amplitudes das ondas foram mensuradas em milivolts (mV) e as durações dos intervalos em milissegundos (ms), considerando-se a derivação em DII do plano frontal. No registro eletrocardiográfico foi analisada a média de dez ciclos sucessivos, durante 5 minutos, para determinar os seguintes parâmetros: intervalo PR, definido como o tempo de despolarização do átrio (do início da onda P ao início do complexo QRS); duração do complexo QRS, definido como o tempo de despolarização ventricular; intervalo QT, definido como a sístole elétrica ventricular (início do complexo QRS ao final da onda T) e QTc, intervalo QT, corrigido pela freqüência cardíaca, segundo a equação de Bazett: QTc= QT(s)/RR(s) £ 1/2 e mensuração da amplitude das ondas P, Q, R, S e T e a razão R:S (Bia et al., 1999). O índice de cardiomiopatia foi determinado pela divisão do intervalo QT pelo segmento PQ (QT/PQ) (Bostick et al., 2008).



**Figura 4:** Camundongo *mdx* sob anestesia com eletrodos subcutâneos para realização do eletrocardiograma.

#### 3.6 Determinação de creatina cinase total no plasma sanguíneo

Para verificar o efeito da suramina sobre a degeneração muscular de camundongos *mdx* idosos foi quantificada a enzima creatina cinase (CK) total em 6 animais de cada grupo experimental. O sangue foi coletado por punção cardíaca sob anestesia com cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3600 RCF (força centrífuga relativa a aceleração da gravidade) à 4°C por 10 minutos. Utilizou-se um kit para quantificação de CK total (CK Cinético Crystal, Bioclin, Quibasa, Brasil). As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation Genesys 20, Krackeler Scientific, Albany, New York, USA) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores de CK foram expressos em unidades internacionais (U/L).

#### 3.7 Análise Histológica

Os músculos diafragma e cardíaco foram removidos, lavados em PBS e embebidos em meio de inclusão para baixas e médias temperaturas (*Tissue Freezing Medium; Triangle Biomedical Sciences*), pré-congelados em N-hexano a 90°C negativos por um minuto e em seguida imersos em nitrogênio líquido e mantidos a 80°C negativos.

Em seguida, foram realizados cortes transversais de 7µm de espessura do terço médio do músculo diafragma e cortes frontais de 8µm de espessura do músculo cardíaco em criostato (HM 505 *E Microm*) a 24°C negativos. Os cortes foram corados com Tricrômio de Masson e com Hematoxilina & Eosina (HE).

A coloração com Tricrômio de Masson foi utilizada para evidenciar a fibrose. Os cortes congelados foram inicialmente fixados com solução de Bouin por uma hora e, em seguida, lavados com etanol durante doze horas. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por dez minutos e os cortes corados com hematoxilina de Harris por oito minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente e imersas em solução de Masson por quinze minutos. Depois, as lâminas foram banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de azofloxina (AFO) por cinco minutos e em seguida, em solução de verde luz (*light green*) por cinco minutos. Após esta etapa, os cortes foram banhados em ácido acético a 0,2% para serem submetidos à desidratação em série de etanol e à diafanização com xilol.

As lâminas foram montadas em resina e os cortes observados ao microscópio de luz Nikon Eclipse E400, com objetiva de 20X, conectado a um computador com software NIS-Elements 5.0, utilizado para medida da área de fibrose e da área total de cada corte, em imagens captadas pela vídeo câmera (Nikon Express Series) acoplada ao microscópio de luz.

A análise morfométrica da fibrose foi feita em cortes do músculo diafragma e do coração, separadamente nos ventrículos cardíacos e no septo interventricular. No músculo cardíaco foram analisados 5 cortes não-seriados de cada animal dos respectivos grupos experimentais: C57BL/10 (n=6), mdx-sal (n=6) e mdx-sur (n=6).

#### 3.7.2 Hematoxilina & eosina (HE)

Os cortes foram fixados conforme o protocolo de Tricrômio de Masson. Em seguida, foram lavados em água corrente por dez minutos e corados com hematoxilina de Harris, seguida por eosina. Os cortes foram desidratados em séries de etanol, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em resina para observação em microscopia de luz. As

lâminas coradas com HE foram analisadas com objetiva de 20X e oculares de 10X contendo retículo quadrilátero de 100 pontos, acopladas ao microscópio de luz binocular (Carl Zeiss®). Foi quantificado o número de fibras com núcleo central e o número de fibras com núcleo periférico utilizando-se um contador manual. Para a quantificação das fibras com núcleo periférico, foi utilizada a fórmula NP = (nº. total de fibras) – (NC + AE) (MARQUES et al., 2008). No músculo diafragma foram escolhidos cinco campos aleatórios de cada corte para quantificar o percentual de fibras com núcleo central, núcleo periférico e áreas de regeneração.

No músculo cardíaco, as lâminas coradas com HE foram utilizadas para obtenção da área de inflamação nos ventrículos, septo interventricular, bem como da área total do músculo em 5 cortes não-seriados de cada animal dos respectivos grupos experimentais: C57BL/10 (n=6), *mdx*-sal (n=6) e *mdx*-sur (n=6).

#### 3.8 Marcação de fibras necróticas

O corante azul de Evans (AE) é uma molécula impermeável à membrana plasmática que se liga a albumina sérica e penetra na fibra muscular quando a membrana não está integra. A sua marcação *in vivo* evidencia fibras com alteração de permeabilidade do sarcolema e fibras em degeneração (Matsuda et al., 1995; Marques; Matsumura & Santo Neto, 2007).

Para marcação das fibras necróticas animais C57BL/10 (n=6), *mdx*-sal (n=6) e *mdx*sur (n=6) foram injetados intraperitonealmente com solução de azul de Evans (Evans blue dye; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a 1% diluída em tampão fosfato salina (PBS), na concentração de 0,1ml de solução de azul de Evans por 10g de peso do animal (Matsuda et al., 1995; Marques et al., 2007). Doze horas após a injeção, os camundongos foram sacrificados com dose letal de anestésico (cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de quetamina) e exsanguinados. Os músculos diafragma e cardíaco foram coletados, congelados e seccionados como descrito acima. As lâminas foram montadas em meio de montagem para fluorescência DABCO [1,4-diazabiciclo (2.2.2)octano; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA] e a observação realizada em microscópio óptico de fluorescência (*Nikon Express Series* Nikon, Tokyo, Japão) acoplado a vídeo câmera Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Iwata, Shizuoka, Japão) para captação de imagens, no comprimento de onda de 568nm (verde), onde o azul de Evans emite fluorescência vermelha.

#### **3.9** Western blotting

Para a quantificação do TGF-β1 foram utilizados seis camundongos de cada grupo experimental. Os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg) e perfundidos com PBS. Os músculos diafragma e cardíaco foram retirados e homogeneizados em tampão para homogeneização (Tris-HCl 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, 10 µg/ml aprotinin, PMSF 1 mM, e Na3VO 0,25 mM) a 4°C usando homogeneizador Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, Westbury, New York, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rotações por minutos a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação da proteína foi realizada pelo método de Bradford et al., 1976.

As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,04 mg/ml eTris-HCl 0,12 M, glicerol 20%, SDS 2% e ß-mercaptoetanol 0,28 M) e aquecidas por 5 minutos. Em seguida, 30 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida 8-15% em aparelho para eletroforese (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V em aparelho de transferência (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,02%) contendo 3% de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de

proteínas. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário diluído em 10 ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado a 4°C, durante 12 horas. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5 µl de anticorpo secundário conjugado a peroxidase por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce) por 5 minutos e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Maryland-USA). As densidades das bandas foram quantificadas pelo software de análise GeneTools (Syngene, Maryland-USA).

Após obtenção de bandas do TGF- $\beta$ 1, as membranas foram lavadas com solução basal (3x10 minutos) e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7.5; \_-Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1h, à 60°C. Em seguida, foi realizada uma incubação em Tris-HCl 1M pH 7.5 por 30min para neutralizar o *stripping*. As membranas foram lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas. As bandas marcadas com GAPDH foram utilizadas para normalização das bandas do TGF- $\beta$ 1.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: 1) TGF-β1 (mouse monoclonal; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), 2) GAPDH (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Foi utilizado o anticorpo secundário IgG mouse ou rabbit conjugado à peroxidadse correspondente (H+L) (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA). 3.10 Determinação semiquantitativa dos níveis de corpos cetônicos e proteínas na urina

Para avaliar se o tratamento a longo prazo com suramina alteraria os níveis de corpos cetônicos e induziria a proteinúria, camundongos de todos os grupos experimentais foram submetidos ao exame de urina, no início e ao término do protocolo experimental. O exame de urina foi realizado através de fita fotométrica de reflexão Urisys<sup>\*</sup> 1100 (Combur<sup>10</sup>Test UX).

As amostras de urina foram obtidas após leve pressão na região abdominal inferior dos camundongos e coletadas em lâminas. Em seguida, as fitas-teste foram passadas rapidamente nas amostras de urina previamente coletadas (cerca de 1 segundo), garantindo que todas as zonas reativas fossem umedecidas, sendo aguardado tempo de secagem de 60 segundos. Para leitura visual do teste, as fitas foram colocadas sobre a escala de cor vertical da etiqueta do frasco, que corresponde às cores de reação presentes nas zonas reativas das tiras de teste (Figura 5).



Figura 5: Leitura visual do exame de urina por meio de fitas fotométricas.

#### 3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A comparação direta entre as médias de dois grupos foi realizada utilizando-se test-t de *Student* com significância p $\leq$ 0,05. A comparação entre os três grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA; p $\leq$ 0,05) seguida do pós-teste de *Bonferroni*.

#### **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Massa corporal e medida de força

Verificamos que os animais C57BL/10 e os mdx-sal não apresentaram diferença na massa corporal ao término do protocolo experimental (p>0,05). Os animais tratados com suramina sofreram diminuição de 10% da massa corporal quando comparados aos animais mdx-sal no final do protocolo experimental (Figura 6).

Em relação à força muscular, não observamos alterações ao compararmos as médias iniciais e as médias finais dos animais C57BL/10 (p>0,05). A análise da força muscular do grupo *mdx*-sal indicou que houve diminuição da força, ao término do estudo. A suramina preveniu a perda de força muscular ao comparamos o grupo *mdx*-sal com o *mdx*-sur ao final do protocolo experimental (Figura 7).



**Figura 6:** Massa corporal (g) de camundongos C57BL/10, *mdx*-sal e *mdx*-sur no início (8 meses) e ao final (11 meses) do protocolo experimental. (\*) diferença significativa quando comparada aos valores finais do grupo *mdx*-sal ( $p \le 0,05$ ; test t de *Student*).



**Figura 7:** Força normalizada (força, g/massa corporal, g) de camundongos C57BL/10, *mdx*-sal e *mdx*-sur no início (8 meses de idade) e ao final (11 meses de idade) do tratamento. (\*) diferença significativa quando comparada aos valores do início ( $p \le 0,05$ , teste t de *Student*). (\*\*) diferença significativa quando comparada aos valores finais do grupo *mdx*-sal ( $p \le 0,05$ ; test t de *Student*).

#### 4.2 Avaliação da função cardíaca: eletrocardiograma (ECG)

A análise do ECG permitiu observar que os animais controles C57BL/10 apresentam amplitudes normais das ondas P, Q, R, S e T (Figuras 8 e 9).

Os animais distróficos (tratados com salina, *mdx-sal*) mostraram aprofundamento da onda Q, bem como diminuição da amplitude da onda S e aumento da amplitude de R e T. (Figura 8). Onda R polifásica foi evidente em cerca de 70% dos casos (Figura 8). O intervalo PR estava significativamente diminuído (Figura 10), bem como os intervalos QRS, QT, QTc. O índice de cardiomiopatia estava significativamente aumentado em comparação ao animal C57BL/10 (Figura 10) e a razão R/S diminuída (Figura 11).

O tratamento com suramina melhorou o ECG, afetando diversos parâmetros de forma significativa. A amplitude das ondas (Figura 7) e a razão R/S (Figura 10) foram alteradas. O intervalo PR voltou a valores próximos do normal e o índice de cardiomiopatia foi significativamente reduzido (Figura 9). Quanto aos intervalos QRS, QT, QTc e a frequência cardíaca, não foram observadas alterações (p>0,05).



**Figura 8:** Registro do ECG de camundongos C57BL/10, *mdx*-sal e *mdx*-sur usando a derivação DII.



Figura 9: Histograma representativo da análise quantitativa do ECG em relação às amplitudes das ondas P, Q, R, S e T dos animais C57BL/10, *mdx*-sal, *mdx*-sur. (\*) diferença

significativa quando comparado aos animais C57BL/10 ( $p\leq0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos animais *mdx*-sal ( $p\leq0,05$ ; ANOVA).



**Figura 10:** Histograma representativo da análise quantitativa do ECG em relação à frequência cardíaca (FC), intervalo PR, QRS, QT e QTc e ao índice de cardiomiopatia dos animais C57BL/10, *mdx*-sal, *mdx*-sur. (\*) diferença significativa quando comparado aos animais C57BL/10 ( $p\leq0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos animais *mdx*-sal ( $p\leq0,05$ ; ANOVA).



**Figura 11:** Razão R:S expressa como amplitude da onda S em relação a onda R. (\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 ( $p\leq0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos *mdx*-sal ( $p\leq0,05$ ; ANOVA).

#### 4.3 Determinação de creatina cinase (CK) total no plasma sanguíneo

A análise da CK revelou que os animais distróficos apresentam níveis elevados quando comparados aos animais controle. A suramina reduziu significativamente os níveis plasmáticos de CK, aproximando-se dos valores controles (Figura 12).



**Figura 12:** Níveis plasmáticos da enzima creatina cinase (U/L) dos camundongos C57BL/10, *mdx*-sal e *mdx*-sur. (\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 ( $p \le 0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos *mdx*-sal ( $p \le 0,05$ ; ANOVA).

#### 4.4 Análise Histológica

#### 4.4.1 Músculo cardíaco

A análise qualitativa do músculo cardíaco de animais distróficos idosos mostrou áreas de fibrose, inflamação e degeneração (Figura 13).

Na análise quantitativa, a suramina reduziu em 54% a área de fibrose no músculo cardíaco em relação à sua área total, 60% no ventrículo esquerdo (VE), 49% no septo interventricular (SI) e 33% no ventrículo direito (VD) quando analisados de maneira isolada (Figura 14). Verificamos uma redução de 40% na inflamação em relação à área total do coração, de 63% no VE, 44% no SI e 57% no VD (Figura 15). Observamos ainda uma redução de 95% das fibras marcadas com AE em relação à área total, 87,5% no VE, 34% no SI e 72% no VD (Figura 16).



**Figura 13:** Tricrômio de Masson mostrando áreas de fibrose (verde) no coração de camundongos C57BL/10 (A), *mdx*-sal (B) e *mdx*-sur (C). Hematoxilina & eosina mostrando áreas de inflamação (\*) respectivamente em *mdx*-sal (E) e *mdx*-sur (F). Fibras marcadas com Azul de Evans no septo interventricular (SI) de camundongos C57BL/10 (G), ventrículo direito (VD) de *mdx*-sal (H) e ventrículo esquerdo (VE) de *mdx*-sur (I). Escala: 100µm.



**Figura 14:** Porcentagem da área de fibrose em relação à área total (AT) do coração, a área do ventrículo esquerdo (VE), do septo interventricular (SI) e do ventrículo direito (VD). (\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 ( $p\leq0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos *mdx*-sal ( $p\leq0,05$ ; ANOVA).



**Figura 15:** Porcentagem da área de inflamação mensurada em relação à área total (AT) do coração, área do ventrículo esquerdo (VE), do septo interventricular (SI) e do ventrículo direito (VD). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos animais *mdx*-sal ( $p \le 0,05$ ; test t de *Student*).



**Figura 16:** Porcentagem das fibras marcadas com AE em relação à área total (AT) do músculo cardíaco, ventrículo esquerdo (VE), septo interventricular (SI) e ventrículo direito (VD). (\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 ( $p\leq0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos *mdx*-sal ( $p\leq0,05$ ; ANOVA).

#### 4.4.2 Diafragma

No músculo diafragma de camundongos distróficos (*mdx*-sal) foram observadas extensas áreas de fibrose, fibras completamente regeneradas com núcleo central e fibras em degeneração evidenciadas pelo Azul de Evans (Figura 17).

O tratamento com suramina diminuiu em 7,39% a área de fibrose (Figura 18) e 54% a de inflamação (Figura 19). Observamos aumento de 8,6% no número de fibras com núcleo periférico (Figura 20), redução de 6,2% no número de fibras com núcleo central (Figura 20) e 88% nas fibras marcadas com AE (Figura 21). As áreas de regeneração diminuiram em 62,3% (Figura 21).



**Figura 17:** Tricrômio de Masson mostrando áreas de fibrose (verde) no diafragma de camundongos C57BL/10 (A), *mdx*-sal (B) e *mdx*-sur (C). Hematoxilina & eosina mostrando fibras com núcleo central ( $\rightarrow$ ) e fibras com núcleo periférico ( $\triangleright$ ) respectivamente em *mdx*-sal (E) e *mdx*-sur (F). Fibras marcadas com Azul de Evans nos camundongos *mdx*-sal (H) e *mdx*-sur (I). Escala: 100µm.



**Figura 18:** Porcentagem da área de fibrose mensurada no músculo diafragma (\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 ( $p\leq0,05$ ; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos *mdx*-sal ( $p\leq0,05$ ; ANOVA).



**Figura 19:** Porcentagem da área de inflamação mensurada no músculo diafragma. (\*\*) diferença significativa quando comparado aos animais *mdx*-sal ( $p \le 0.05$ ; test t de *Student*).



**Figura 20:** Porcentagem de fibras com núcleo periférico (NP) e fibras com núcleo central (NC) no músculo diafragma dos animais mdx-sal e mdx-sur. (\*\*) diferença significativa quando comparado aos animais mdx-sal (p≤0,05; test t de *Student*).



**Figura 21:** Porcentagem da área de regeneração (Reg) e de fibras marcadas com Azul de Evans (AE) mensurada no músculo diafragma. (\*\*) diferença significativa quando comparado aos animais mdx-sal (p $\leq$ 0,05; test t de *Student*).

Os níveis de TGF-β1 estavam aumentados nos músculos diafragma e cardíaco do animal distrófico controle comparado aos valores do animal normal (C57BL/10; Figura 22). A suramina elevou o TGF- β1 no diafragma. No coração, a suramina não alterou os níveis de TGF-β1 (Figura 22).



**Figura 22:** Análise do TGF- $\beta$ 1 através de Western Blotting no músculo diafragma (Dia) e coração (Cor) nos animais C57BL/10, *mdx*-sal e *mdx*-sur. (\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 (p≤0,05; ANOVA). (\*\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos *mdx*-sal (p≤0,05; ANOVA).

#### 4.6 Determinação semiquantitativa dos níveis de corpos cetônicos e proteínas na urina

O exame de urina com fita fotométrica mostrou que o conteúdo total de proteínas foi igual em todos os grupos (C57BL/10, mdx-sal e mdx sur; 0.3g/L) no início e ao término do protocolo experimental e que a maioria dos animais, de todos os grupos, não apresentou níveis elevados de corpos cetônicos.

#### **5 DISCUSSÃO**

# 5.1 Efeito da suramina na função muscular esquelética e na função cardíaca de animais distróficos

O grau de envolvimento do coração e a extensão das alterações nos músculos esqueléticos têm sido considerados importantes fatores para o prognóstico clínico de pacientes com DMD (Gulati et al., 2005). A cardiomiopatia e a falência cardíaca resultante são fatores determinantes para a morbidade e para a mortalidade na Distrofia Muscular de Duchenne. A prevalência da disfunção cardíaca na DMD aumenta com a idade, sendo que a maioria dos pacientes por volta de 18 anos desenvolve cardiomiopatia, comumente apresentando cardiomiopatia dilatada (Au et al., 2010; Khouzami et al., 2010).

O modelo *mdx* desenvolve cardiomiopatia que se agrava com a idade, culminando com a fibrose extensa e falência cardíaca (Quinlan et al., 2004; Chamberlain et al., 2007; Bostick et al., 2008; Spurney et al., 2008). Durante os cinco primeiros meses de idade, pequenas áreas de fibrose são encontradas nos músculos esqueléticos dos membros posteriores do camundongo *mdx*. Em contraste, o aumento da formação de tecido conjuntivo pode ser detectado nos músculos esquelético e cardíaco de *mdx* idosos, tal como observado nos achados histopatológicos de pacientes com DMD (Quinlan et al., 2004).

A DMD é uma patologia degenerativa que afeta o músculo esquelético e cardíaco para a qual ainda não há nenhuma terapia eficaz (Bish et al., 2011). A terapia anti-fibrótica através da suramina foi proposta por ter um potencial terapêutico na distrofinopatia com base em recentes dados que mostraram a atenuação da doença no músculo estriado esquelético em camundongos mdx idosos (7 meses) (Tanigut et al., 2011). No entanto a função cardíaca em estágios mais tardios da patologia não foi avaliada nesse estudo.

Uma vez que a cardiomiopatia é a principal causa de morte nesses pacientes, é relevante avaliar o efeito de um tratamento direcionado aos músculos esquelético e cardíaco.

Considerando-se a função muscular esquelética, observamos que os animais distróficos apresentaram redução de 8,7% da força muscular ao término do protocolo experimental. O envelhecimento pode ter efeito direto na estrutura e função muscular predispondo a atrofia, diminuição do número de fibras, fadiga e fraqueza o que consequentemente torna o músculo susceptível à lesão (Lynch et al., 2000; Mouisel et al., 2009). No presente trabalho, verificamos que o animal C57BL/10 não apresentou perda da força ao longo do tempo, sugerindo que o envelhecimento não afetou a força muscular, pelo menos nesse período. Assim, a perda de força observada no *mdx*-sal pode ser decorrente da presença de fibrose, que está significativamente aumentada nesses animais, tal como observado anteriormente em nosso laboratório (Taniguti et al., 2011).

Com a suramina, a performance muscular dos camundongos foi quase que totalmente revertida a níveis controles, corroborando com os dados de Taniguti et al., 2011, que utilizou em seus estudos animais *mdx* idosos de 7 meses de idade. Esse resultado mostra que o tratamento a longo prazo com a suramina também foi capaz de atenuar a perda de força muscular em animais distróficos mais velhos (11 meses de idade). Tal como sugerido anteriormente, a suramina, ao reduzir a fibrose dos músculos esqueléticos, melhorou a função muscular.

Quanto à função muscular cardíaca, os achados eletrocardiográficos revelaram ondas R polifásicas, que podem ser indicativo de bloqueio atípico do ramo direito do sistema de condução, registro também encontrado em crianças distróficas (Slucka, 1968). A diminuição da razão R:S pode ser atribuída ao compromotimento da passagem do sinal elétrico causado por danos à parede ventricular esquerda (Perloff et al., 1967). Observamos ainda diminuição do intervalo PR nestes animais indicativo de aceleração na condução do sinal elétrico através do nó atrioventricular (Bostick et al., 2008), aprofundamento da onda Q e prolongamento do intervalo QRS, QT e QTc nos animais distróficos e aumento do índice de cardiomiopatia. Esses achados estão de acordo com os observados em pacientes distróficos (Slucka, 1968) e com estudos em modelos animais da DMD (Bia et al., 1999; Wehling-Henricks et al., 2005; Branco et al., 2007; Bostick et al., 2008; Bostick et al., 2009).

Tem-se sugerido que essas alterações eletrocardiográficas são indicativas de cardiomiopatia e que a presença de tecido fibrótico contribui para o surgimento dessas mudanças no registro (Perloff et al., 1967; Hainsey et al., 2002; Wehling-Henricks et al., 2005; Thrush et al., 2009).

O tratamento a longo prazo com a suramina foi eficaz em melhorar significativamente a amplitude das ondas P, Q, R, S e T, o intervalo PR, a razão R:S e o índice de cardiomiopatia. Atribuímos a melhora funcional desses parâmetros à diminuição da fibrose intersticial, visto que esta leva a anormalidades elétricas e funcionais no coração uma vez que cardiomiócitos remanescentes envoltos em tecido conjuntivo têm suas conexões intercelulares e a capacidade de conduzir sinais comprometida (Wehling-Henricks et al., 2005).

Os intervalos QRS, QT, QTc e a frequência cardíaca não apresentaram melhora significativa com o tratamento. Isso provavelmente é devido a suramina não impedir totalmente a formação de fibrose.

Dessa forma, sugerimos que o tratamento a longo prazo com suramina atenua os sinais clínicos da cardiomiopatia na DMD, mas não impede seu desenvolvimento.

# 5.2 Efeito da suramina nas características histopatológicas do músculo estriado esquelético e cardíaco e nos níveis de TGF-β1

Inibidores da enzima conversora da angiotensina, bem como os bloqueadores do receptor da angiotensina, têm sido utilizados na terapia da DMD para tratamento da cardiomiopatia (Jefferies et al., 2005; Rhodes, 2008; Bish et al., 2011). Entretanto, estas drogas, apesar de terem efeitos benéficos na função cardíaca, não melhoram a fibrose e podem não afetar a distrofia dos músculos estriados esqueléticos. Estudos prévios em camundongos distróficos com 2 anos de idade revelaram que drogas bloqueadoras do receptor de angiotensina, como o losartan, preservaram a função cardíaca, mas não a função esquelética (Bish et al., 2011). Entretanto, a fibrose cardíaca e esquelética não foi modificada pelo losartan, provavelmente devido a participação de outras vias, que não a da angiotensina (Bish et al., 2011).

O efeito protetor em ambos os músculos cardíaco e esquelético foi recentemente demonstrado após tratamento precoce com os agentes anti-fibróticos lisinopril e espironolactona em animais *mdx; utrn*<sup>+/-</sup>. A melhora da função cardíaca e do diafragma é atribuída ao fato de o tratamento ter sido iniciado precocemente, ou seja, antes da disfunção cardíaca tornar-se evidente (Rafael-Fortney et al., 2011).

Estudos prévios relatam áreas de fibrose em maior extensão no ventrículo esquerdo, preferencialmente na parede póstero-basal (Slucka, 1968; Wehling-Henricks et al., 2005; Spurney et al., 2008). Entretanto, nossos achados revelam maior acometimento do ventrículo direito. Outro estudo sugere um envolvimento aproximadamente igual de ambos os ventrículos (Quilan et al., 2004). Acreditamos que o ventrículo direito tenha sido mais acometido pela fibrose possivelmente por complicações de nível respiratório, comuns em camundongos distróficos a partir do sexto mês de vida, nos quais a disfunção ventricular direita precede a disfunção ventricular esquerda, respectivamente aos 8° e 11-12° meses de vida do animal (Crisp et al., 2011).

Verificamos que o coração de animais C57BL/10 mostra nenhuma ou mínima infiltração do corante Azul de Evans, enquanto o coração de animais distróficos apresenta fibras com marcação positiva, indicativo de danos à membrana celular. Estudo crononológico da cardiomiopatia em animais distróficos demonstra resultados semelhantes em animais de idade próxima ao do presente estudo (Van Erp et al., 2010).

Além disso, observamos níveis aumentados de CK nos animais distróficos em comparação com os animais controles, corroborando com estudos prévios (Bulfield et al., 1984, Ozawa, Hagiwara & Yoshida, 1999 e Taniguti et al., 2011). A suramina foi eficaz em reduzir as áreas em degeneração e melhorar os níveis de CK no grupo tratado. Isso se deve ao efeito protetor da droga na mionecrose. Embora os mecanismos pelos quais a suramina possa proteger contra a mionecrose sejam desconhecidos, uma possibilidade seria relacionada à sua ação antagonista nos receptores purinérgicos, que estão envolvidos na mionecrose (Iwata et al., 2007).

As análises de H&E revelaram a presença de infiltrados inflamatórios no coração de animais distróficos. A suramina foi eficaz em reduzir o processo inflamatório, demonstrando assim sua possível ação também na cascata inflamatória, possivelmente pela

inibição do TNF- $\alpha$  com seus receptores, levando a diminuição de sua atividade biológica (Mancini et al., 1999).

A suramina reduziu significativamente a fibrose cardíaca e no diafragma, comprovando a ação anti-fibrótica da droga também em estágios mais avançados da distrofinopatia. Esta ação da suramina pode ser devida ao bloqueio dos receptores para o TGF-β1 e consequentemente da sinalização intracelular para síntese de colágeno (Dijke & Hill, 2004).

Verificamos ainda redução das áreas em regeneração e aumento no número de fibras com núcleo periférico no músculo diafragma o que pode ser devido à capacidade da droga em inibir o efeito da miostatina na diferenciação miogênica (Nozaki et al., 2008).

Nos animais distróficos, os níveis de TGF-β1 estavam aumentados nos músculos cardíaco e diafragma, de acordo com estudos prévios (Bernasconi et al., 1995; Van erp et al., 2010; Taniguti et al., 2011). O tratamento com suramina, interessantemente elevou os níveis de TGF-β1 no músculo diafragma, embora a fibrose tenha sido reduzida.

No músculo cardíaco, a suramina não alterou os níveis de TGF- $\beta$ 1 provavelmente por não interferir na sua produção, apenas inibindo a ligação com seu receptor (La Rocca et al., 1990; Taniguti et al., 2011). Além disso, os músculos distróficos respondem diferentemente a sinalização do TGF- $\beta$ 1, talvez devido à ativação específica da citocina aos seus receptores ao longo do tempo (Chen et al., 2005).

#### 5.3 Dosagem e efeitos colaterais da suramina

Sabe-se que a suramina, quando utilizada em doses acima de  $275\mu$ M, por um período de várias semanas, pode levar a toxicidade (Lam et al., 2010). Seus principais efeitos tóxicos incluem proteinúria, insuficiência adrenal, danos à córnea, coagulopatia, polineuropatia e trombocitopenia, geralmente descritos em pacientes que estão em tratamento para algum tipo de câncer (Garcia-Schürmann et al., 199 e McGeary et al., 2008).

Mais recentemente, estudos clínicos com baixas doses (10-20µM) de suramina evidenciaram sua ação anti-tumoral, não havendo evidencia de toxicidade (Lam et al., 2010).

No presente estudo utilizamos a dose de 60mg/kg baseados em estudos prévios (Lossos et al., 2000; Taniguti et al., 2011). Esta dose é cerca de dez vezes menor que a descrita como não-tóxica por Lam et al., 2010. De fato, a suramina não aumentou a proteinúria, bem como a presença de corpos cetônicos.

Adicionalmente, verificamos que os animais tratados apresentaram redução de 10% da massa corporal em comparação aos animais que não receberam tratamento. Isso pode ser devido ao fato da droga diminuir a ingestão de ração, como observado em experimentos com animais modelos de lúpus eritematoso sistêmico tratados com suramina (Ballock & Sakic, 2008). Entretanto, não mensuramos o consumo de ração pelos animais e a diminuição do peso não foi significativamente diferente em relação aos animais C57BL/10.

Assim, aparentemente, a suramina, na dose e tempo aqui empregados, não provocou efeitos colaterais significativos no camundongo mdx. Entretanto, é importante ressaltar que a transposição de doses de modelos animais para pacientes humanos deve ser feita com cuidado, sendo necessário estudos clínicos para determinação de doses adequadas.

# 6 CONCLUSÃO

Concluímos que o agente anti-fibrótico suramina exerceu efeito positivo na distrofinopatia do camundongo mdx idoso, atenuando os sinais da cardiomiopatia e melhorando a histopatologia do músculo diafragma.

Sugerimos que a suramina possa ser uma droga potencialmente útil para a terapia farmacológica das distrofinopatias, bem como auxiliar nas terapias genéticas e celulares, ao diminuir a formação de fibrose e promover a manutenção de fibras musculares íntegras, alvo destas terapias. Embora não tenha impedido o desenvolvimento da cardiomiopatia, a droga pode promover melhor qualidade de vida em estágios tardios da doença, minimizando os sinais da insuficiência cardíaca e respiratória.

# 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEEN V, ROBSON LG. Experimental models of duchenne muscular dystrophy: relationship with cardiovascular disease. **Open Cardiovasc Med J.**, v.26, n.4, p.265-77, 2010.

ARAGÃO EA, FERREIRA TL, CHIOATO L, MEDEIROS AI, SECATTO A, FACCIOLI LH, WARD RJ. Suramin inhibits macrophage activation by human group IIA phospholipase A2, but does not affect bactericidal activity of the enzyme. **Inflamm Res.**, v.58, n.4, p. 210–17, 2009.

AU CG, BUTLER TL, SHERWOOD MC, EGAN JR, NORTH KN, WINLAW DS. Increased connective tissue growth factor associated with cardiac fibrosis in the mdx mouse model of dystrophic cardiomyopathy **Int J Exp Pathol.**, v.92, n.1, p.57-65, 2010.

BALLOK DA, SAKIC B. Purine receptor antagonist modulates serology and affective behaviors in lupus-prone mice: evidence of autoimmune-induced pain? **Brain, Behav Immun**, v.22, n.8, p.1208-16, 2008.

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., v.96, n.2, p.1137-44, 1995.

BHARGAVA S, HOTZ B, HINES OJ, REBER HA, BUHR HJ, HOTZ HG. Suramin inhibits not only tumor growth and metastasis but also angiogenesis in experimental pancreatic cancer. **J Gastrointest Surg.**, v.11, n.2, p.171-8, 2007.

BIA BL, CASSIDY PJ, YOUNG ME, RAFAEL JA, LEIGHTON B, DAVIES KE, RADDA GK, CLARKE K. Decreased myocardial nnos, increased inos and abnormal ecgs

in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. J Mol Cell Cardiol., v.31, n.10, p.1857–62, 1999.

BIERNACKA A, FRANGOGIANNIS NG. Aging and Cardiac Fibrosis. **Aging Dis.**, v.2, n.2, p.158-73, 2011.

BISAGGIO DR, CAMPANATI L, PINTO RCV, SOUTO-PADRÓN T. Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultraestructure of flagellum-cell body attachment region. **Acta Trop**, v.98, n.2, p.162-75, 2006.

BISH LT, YARCHOAN M, SLEEPER MM, GAZZARA JA, MORINE KJ, ACOSTA P, BARTON ER, SWEENEY HL. Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal muscle function in dystrophic mice. **Plos One**, v.6, n.6, p.e20856, 2011.

BOGDANOVICH S, PERKINS KJ, KRAG TO, KHURANA TS. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: currente approaches and future directions. **J Mol Med** (**Berl**)., v.82, n.2, p.102-15, 2003.

BOSTICK B, YUE Y, LAI Y, LONG C, LI D, DUAN D. Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. **Hum Gene Ther.**, v.19, n.8, p.851-6, 2008.

BOSTICK B, YUE Y, LONG C, MARSCHALK N, FINE DM, CHEN J, DUAN D. Cardiac expression of a mini-dystrophin that normalizes skeletal muscle force only partially restores heart function in aged Mdx mice. **Mol Ther.**, v.17, n.2, p.253-61, 2009.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, v.7, n.72, p.248-54, 1976.

BRANCO DM, WOLF CM, SHERWOOD M, HAMMER PE, KANG PB, BERUL CI. Cardiac electrophysiological characteristics of the mdx (5cv) mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **J Interv Card Electrophysiol.**, v.20, n.1-2, p.1-7, 2007.

BUDASZ-SWIDERSKA M, JANK M, MOTYL T. Transforming growth factor-β1 upregulates myostatin expression in mouse C2C12 myoblasts. **J Physiol Pharmacol.**, v.56, supp.3, p.195-214, 2005.

BULFIELD G, SILLER WG, WIGHT PA, MOORE KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.81, n.4, p.1189-92, 1984.

BURELLE Y, KHAIRALLAH M, ASCAH A, ALLEN BG, DESCHEPPER CF, PETROF BJ, DES ROSIERS C. Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: Lessons from the dystrophic heart. **J Mol Cell Cardiol.**, v.48, n.2, p.310-21, 2010.

CHAMBERLAIN JS, METZGER J, REYES M, TOWNSEND D, FAULKNER JA. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. **FASEB J**, v.21, n.9, p. 2195-204, 2007.

CHAN YS, LI Y, FOSTERW, FU FH, HUARD J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. **Am J Sports Med.**, v.33, n.1, p.43-51, 2005.

CHEN YW, NAGARAJU K, BAKAY M, McINTYRE O, RAWAT R, SHI R, HOFFMAN EP. Early onset of inflammation and later involvement of TGF beta in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v.65, n.6, p.826-34, 2005.

CHU V, OTERO JM, LOPEZ O, SULLIVAN MF, MORGAN JP, AMENDE I, HAMPTON TG. Electrocardiographic findings in mdx mice: a cardiac phenotype of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v.26, n.4, p.513-519, 2002.

COHN RD, DURBEEJ M, MOORE SA, CORAL-VAZQUEZ R, PROUTY S, CAMPBELL KP. Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. **J Clin Invest.**, v.107, n.2, p.R1-7, 2001.

CRISP A, YIN HF, GOYENVALLE A, BETTS C, MOULTON HM, SEOW Y, BABBS A, MERRITT T, SALEH AF, GAIT MJ, STUCKEY DJ, CLARKE K, DAVIES KE, WOOD MJA. Diaphragm rescue alone prevents heart dysfunction in dystrophic mice. **Hum Mol Gen.**, v.20, n.3, p.413-21, 2011.

CYRULNIK SE, HINTON VJ. Duchene muscular dystrofy: A cerebellar disorder? **Neurosci Biobehav Rev.**, v.32, n.3, p.486-96, 2008.

DECONINCK N, DAN B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatr Neurol.**, v.36, n.1, p.1-7, 2007.

DIJKE P, HILL CS. New insights into TGF-β-Smad signaling. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n.5, p. 265-73, 2004.

DUAN D. Challenges and opportunities in dystrophin-deficient cardiomyopathy gene terapy. **Hum Mol Genet.**, v.15, n. 2, p. R253-R261, 2006.

ENGEL AG, YAMAMOTO M, FISCHBECK KH. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Myology. New York: McGraw-Hill, 1937p., p.1133-87,1994.

ERGUVEN M, AKEV N, OZDEMIR A, KARABULUT E, BILIR A. The inhibitory effect of suramin on telomerase activity and spheroid growth of C6 glioma cells. **Med Sci Monit**, v.14, n.8, p.165-73, 2008.

ERVASTI JM. Dystrophin, its interations with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochim Biophys Acta.**, v.1772, n.2, p.108-17, 2007.

FRANKEL KA, ROSSER RJ. The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: epimyocardial fibrosis. **Hum Pathol.**, v.7, n.4, p.375-86, 1976.

GARCIA-SCHÜRMANN JM, SCHULZE H, HAUPT G, PASTOR J, ALLOLIO B, SENGE T. Suramin treatment in hormone- and chemotherapy-refractory prostate cancer. **Urology**, v.53, n.3, p.535-41, 1999.

GILLIS JM. Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse. J Muscle Res Cell Motil., v.20, n.7, p.605-25, 1999.

GOSSELIN LE, WILLIAMS JE, DEERING M, BRAZEAU D, KOURY S, MARTINEZ DA. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve**, v.30, n.5, p.645-53, 2004.

GULATI S, SAXENA A, KUMAR V, KALRA V. Duchenne Muscular Dystrophy: Prevalence and Patterns of Cardiac Involvement. **Indian J Pediatr.**, v.72, n.5, p. 389-93, 2005.

GRADY RM, TENG H, NICHOL MC, CUNNINGHAM JC, WILKINSON RS, SANES JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v.22, n.90, p.729-38, 1997.

HAINSEY TA, SENAPATI S, KUHN DE, RAFAEL JA. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovasculature. **Neuromuscul Disord.**, v.13, n.4, p.294-302, 2002.

HOFFMAN EP, MARTIN GR, NAGARAJU K. PISTILLI EE, KNOBLACH S, SPURNEY CF. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: Expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. **Neuromuscul Disord.**, v.18, n.5, p. 371–81, 2008.

ISHIZAKI M, SUGA T, KIMURA E, SHIOTA T, KAWANO R, UCHIDA Y, UCHINO K, YAMASHITA S, MAEDA Y, UCHINO M.. Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. **Neuromuscul Disord.**, v.18, n.4, p. 342-48, 2008.

IWATA Y, KATANOSAKA Y, HISAMITSU T, WAKABAYASHI S. Enhanced Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy via involvement of P2 receptors. **Americ J Pathol**, v.171, n.5, p.1576-87, 2007.

JEFFERIES JL, EIDEM BW, BELMONT JW, CRAIGEN WJ, WARE SM, FERNBACH SD, NEISH SR, SMITH EO, TOWBIN JA. Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy. **Circulation.**, v.112, n.18, p.2799-804, 2005.

JIAO K, LANGWORTHY M, BATTS L, BROWN CB, MOSES HL, BALDWI HS. Tgfbeta signaling is required for atrioventricular cushion mesenchyme remodeling during in vivo cardiac development. **Development.**, v.133, n.22, p.4585-93, 2006.

JØRGENSEN LH, BLAIN A, GREALLY E, LAVAL SH, BLAMIRE AM, DAVISON BJ, BRINKMEIER H, MACGOWAN GA, SCHRØDER HD, BUSHBY K, STRAUB V, LOCHMÜLLER H. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle. **Am J Pathol.**, v.178, n.1, p.273-83, 2010. KATHIR KM, KUMAR TKS, YU C. Understanding the mechanism of the antimitogenic activity of suramin. **Biochemistry**, v.24, n.45, p.899-906, 2006.

KASPAR RW, ALLEN HD, MONTANARO F. Current understanding and management of dilated cardiomyopathy in Duchenne and Becker muscular dystrophy. J Am Acad Nurse **Pract.**, v.21, n.5, p.241–49, 2009.

KHAN R, SHEPPARD R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. **Immunology**, v.118, n.1, p.10-24, 2006.

KHOUZAMI L, BOURIN MC, CHRISTOV C, DAMY T, ESCOUBET B, CARAMELLE P, PERIER M, WAHBI K, MEUNE C, PAVOINE C, PECKER F. Delayed cardiomyopathy in Distrophin Deficient mdx mice relies on intrinsic Glutathione resource. **Am J Pathol**, v.177, n.3, p.1356-64, 2010.

LA ROCCA RV, STEIN CA, Danesi R, Myers CE. Suramin, a novel antitumor compound. J **Steroid Biochem Mol Biol**., v.37, n.6, p.893-8, 1990.

LAM ET, AU JL, OTTERSON GA, GUILLAUME WIENTJES M, CHEN L, SHEN T, WEI Y, LI X, BEKAII-SAAB T, MURGO AJ, JENSEN RR, GREVER M, VILLALONA-CALERO MA. Phase I trial of non-cytotoxic suramin as a modulator of docetaxel and gemcitabine therapy in previously treated patients with non-small cell lung cancer. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v.66, n.6, p.1019-29, 2010.

LI HJ, WANG LY, QU HN, YU LH, BURNSTOCK G, NI X, XU M, MA B. P2Y2 receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells. **Mol Cell Endocrinol.**, v.338, n.1-2, p.28-37, 2011.

LOHAN J, CULLIGAN K, OHLENDIECK K. Deficiency in Cardiac Dystrophin Affects the Abundance of the  $\alpha$ - $\beta$ -Dystroglycan Complex. **J Biomed Biotechnol.**, v.28, n.36, p.28-36, 2005.

LOSSOS IL, IZBICKI G, OR R, GOLDSTEIN RH, BREUER R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. Life Sci, v.67, n.23, p.2873-81, 2000.

LYNCH GS, HINKLE RT, CHAMBERLAIN JS, BROOKS SV, FAULKNER JA. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. **J Physiol.**, v.535, n.2, p.591-600, 2001.

MANCINI F, TORO CM, MABILIA M, GIANNANGELI M, PINZA M, MILANESE C. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)/TNF-alpha receptor binding by structural analogues of suramin. Biochem Pharmacol., v.58, n.5, p.851-9, 1999.

MANNING GW, CROPP GJ. The electrocardiogram in progressive muscular dystrophy. **Br Heart J.**, v.20, n.3, p.416-20, 1958.

MARQUES MJ, MATSUMURA CY, SANTO NETO H. Alterations in the permeability of dystrophic fibers during neuromuscular junction development. **Acta Biol Hung**, v.58, n.1, p.1-9, 2007.

MARQUES MJ, MACHADO RV, MINATEL E, SANTO NETO H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. **Muscle Nerve**, v.37, n.1, p.61-7, 2008.

MATSUDA RA, NISHIKAWA A, TANAKA H. Vizualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophindeficient muscle. **J Biochem**, v.118, n.5, p.959-64, 1995. McGEARY RP, BENNETT AJ, TRAN QB, COSGROVE KL, ROSS BP. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. **Mini Rev Med Chem**, v.8, n.13, p.1384-94, 2008.

McNALLY WP, DeHART PD, LATHIA C, WHITFIELD LR. Distribution of [14C]suramin in tissues of male rats following a single intravenous dose. Life Sci, v.67, n.15, p.1847-57, 2000.

MEGENEY LA, KABLAR B, PERRY RL, YING C, MAY L, RUDNICKI MA. Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.96, n.1, p.220-5, 1999.

MELACINI P, VIANELLO A, VILLANOVA C, FANIN M, MIORIN M, ANGELINI C, DALLA VOLTA S. Cardiac and respiratory involvement in advanced stage Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord.**, v.6, n.5, p.367-76, 1996.

MORIUCHI T, KAGAWA N, MUKOYAMA M, HIZAWA K. Autopsy analysis of the muscular dystrophies. Tokushima J Exp Med., v.40, n.1-2, p. 83-93, 1993.

MOUISEL E, VIGNAUD A, HOURDÉ C, BUTLER-BROWNE G, FERRY A. Muscle weakness and atrophy are associated with decreased regenerative capacity and changes in mTOR signaling in skeletal muscles of venerable (18-24-month-old) dystrophic mdx mice. **Muscle Nerve**, v.41, n.6, p.809-18, 2010.

NOZAKI M, LI Y, ZHU J, AMBROSIO F, UEHARA K, FU FH, HUARD J. Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. **Am J Sports Med.**, v. 36, n. 12, p.2354-62, 2008.

OZAWA E, HAGIWARA Y, YOSHIDA M. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. **Mo Cell Biochem.**, v.190, n.1-2, p.143-51, 1999.

PARTRIDGE TA, MORGAN JE, COULTON GR, HOFFMAN EP, KUNKEL LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. **Nature**, v.12, n.337, p.176-9, 1989.

PAYNE ET, YASUDA N, BOURGEOIS JM, DEVRIES MC, RODRIGUEZ MC, YOUSUF J, TARNOPOLSKY MA. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in mdx mice. **Muscle Nerve**, v.33, n.1, p.66-77, 2006.

PERLOFF JK, ROBERTS WC, DELEON AC, ODOHERTY D. Distinctive electrocardiogram of Duchenne progressive muscular dystrophy–an electrocardiographic-pathologic correlative study. **Am J Med**, v.42, n.2, p.179-88, 1967.

QUINLAN J.G, HAHN HS, WONG BL, LORENZ JN, WENISCH AS, LEVIN LS. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. **Neuromuscul Disord.**, v.14, n.8-9, p.491-6, 2004.

RAFAEL-FORTNEY JA, CHIMANJI NS, SCHILL KE, MARTIN CD, MURRAY JD, GANGULY R, STANGLAND JE, TRAN T, XU Y, CANAN BD, MAYS TA, DELFÍN DA, JANSSEN PM, RAMAN SV. Early treatment with lisinopril and spironolactone preserves cardiac and skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy mice. **Circulation**, v.124, n.5, p.582-8, 2011.

RHODES J, MARGOSSIAN R, DARRAS BT, COLAN SD, JENKINS KJ, GEVA T, POWELL AJ. Safety and efficacy of carvedilol therapy for patients with dilated cardiomyopathy secondary to muscular dystrophy. **Pediatr Cardiol.**, v.29, n.2, p.343-51, 2008.

SAPP JL, BOBET J, HOWLETT SE. Contractile properties of myocardium are altered in dystrophin-deficient mdx mice. **J Neurol Sci.**, v.142, n.1-2, p.17-24, 1996.

SHIONO T, KODAMA M, HANAWA H, FUSE K, YAMAMOTO T, AIZAWA Y. Suppression of myocardial inflammation using suramin, a growth factor blocker. **Circ J**, v.66, n.4, p.385-9, 2002.

SLUCKA C. The electrocardiogram in Duchenne progressive muscular dystrophy. **Circulation**, v.38, n.5, p.933-40, 1968.

SPURNEY CF, KNOBLACH S, PISTILLI EE, NAGARAJU K, MARTIN GR, HOFFMAN EP. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. **Neuromuscul Disord**, v.18, n.5, p. 371-81, 2008.

SPURNEY CF. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. **Muscle Nerve**, v.44, n.1, p.8-19, 2011.

STEDMAN HH, SWEENEY HL, SHRAGER JB, MAGUIRE HC, PANETTIERI RA, PETROF B, NARUSAWA M, LEFEROVICH JM, SLADK JT, KELLY AM. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v.8, n.352, p.536-9, 1991.

STEIN CA. Suramin, a novel antineoplasic agent with multiple potencial mechanism of action. **Cancer Res**, v.53, supp.10, p.2239-48, 1993.

TANABE Y, ESAKI K, NOMURA T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathol.**, v.69, n.1-2, p.91-5, 1986.

TANIGUTI APT, PERTILLE A, MATSUMURA CY, SANTO NETO H, MARQUES MJ. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF-β1 blocker. **Muscle Nerve**, v.43, n.1, p.82-7, 2011. THRUSH PT, ALLEN HD, VIOLLET L, MENDELL JR. Re-examination of the electrocardiogram in boys with Duchenne muscular dystrophy and correlation with its dilated cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v.15, n.103, p.262-5, 2009.

TURGEMAN T, HAGAI Y, HUEBNER K., JASSAL DS, ANDERSON JE, GENIN O, NAGLER A, HALEVY O, PINES M. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. **Neuromuscul Disord.**, v.18, n.11, p.857-68, 2008.

VAN ERP C, LOCH D, LAWS N, TREBBIN A, HOEY AJ. Timeline of cardiac dystrophy in 3–18-month-old mdx mice. **Muscle Nerve**, v.42, n.4, p.504-13, 2010.

YAMAZAKI M, MINOTA S, SAKURAI H, MIYAZONO K., YAMADA A, KANAZAWA I, KAWAI M. Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. **Am J Pathol.**, v.114, n.2, p.221-6, 1994.

YONEDA T, WILLIAMS P, RHINE C, BOYCE BF, DUNSTAN C, MUNDY GR. Suramin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer. **Cancer Res**, v.55, n.9, p.1989-93, 1995.

ZHOU L, PORTER JD, CHENG G, GONG B, HATALA DA, MERRIAM AP, ZHOU X, RAFAEL JA, KAMINSKI HJ. Temporal and spatial mRNA expression patters of TGF-β1, 2, 3 and TβRI, II, III in skeletal muscles of *mdx* mice. **Neuromuscul Disord.**, v.16, n.1, p. 32-38, 2006.

ZHU X, WHEELER MT, HADHAZY M, LAM Man-yee J, MCNALLY EM. Cardiomyopathy is independent of skeletal muscle disease in muscular dystrophy. **FASEB** J, v.16, p.1096-1098, 2002.

WEHLING-HENRICKS M, JORDAN MC, ROOS KP, DENG B, TIDBALL JG. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. **Hum Mol Genet.,** v.14, n.14, 1921-33, 2005.

WHITEHEAD NP, YEUNG EW, ALLEN DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.33, n.7, p.657-62, 2006.

WHITEHEAD NP, STREAMER M, LUSAMBILI LI, SACHS F, ALLEN DG. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. **Neuromuscul Disord**, v.16, n.12, p.845-54, 2006.

# 8 ANEXO \_\_ COMISSÃO DE ÉTICA: CERTIFICADO

#### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "Fibrose cardíaca em camundongos *mdx* idosos: efeito da Suramina, um bloqueador do TGF-β1":

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição:

( X ) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2255-1, Instituição:

) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo n $^{\circ}$  \_

\* Caso a Comissão seja externa ao IB/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.

Alunoa: Drielen de Oliveira Moreira

1H Orientadora: Maria Julia Marques

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

mauld aund

\_, Instituição:

Carimbo e assinatura

(

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: ( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura