

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ISABEL CRISTINA CHAGAS BARBIN

**“ADMINISTRAÇÃO DE L-ARGININA: EFEITOS SOBRE A  
FIBROSE MIOCÁRDICA E AUMENTO DA CARCINOGENESE  
EM CAMUNDONGOS *mdx*”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Isabel Cristina Chagas Barbin*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação 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, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**B234a**

Barbin, Isabel Cristina Chagas  
Administração de L-arginina: efeitos sobre a fibrose  
miocárdica e aumento da carcinogênese em camundongos  
*mdx* / Isabel Cristina Chagas Barbin. – Campinas, SP: [s.n.],  
2009.

Orientador: Humberto Santo Neto.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Arginina. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3.  
Camundongo *mdx*. 4. Fibrose endomiocárdica. 5.  
Miocárdio - Doenças. I. Santo Neto, Humberto Santo,  
1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** L-arginine administration: the effect on myocardial fibrosis and increase of the carcinogenesis in mice *mdx*.

**Palavras-chave em inglês:** Arginine; Duchenne muscular dystrophy; Mdx mice; Endomyocardial fibrosis; Myocardium - Diseases.

**Área de concentração:** Anatomia.

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

**Banca examinadora:** Humberto Santo Neto, Laura Ferreira de Rezende Franco, Miguel Arcanjo Areas.

**Data da defesa:** 22/05/2009.

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

Campinas, 22 de maio de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

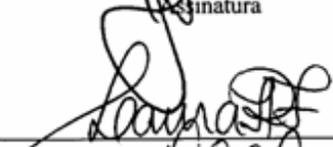
Prof. Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)



---

Assinatura

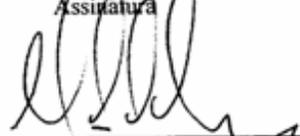
Profa. Dra. Laura Ferreira de Rezende Franco



---

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas



---

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

---

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

---

Assinatura

**Dedico...**

À minha amada e saudosa mãe **Benedita**, pelo amor, amizade e pelo exemplo de dignidade e honestidade que sempre foi em minha vida...

Ao meu esposo **Rafael** e aos meus filhos **Gabriel** e **Otávio**, pela paciência e compreensão durante o tempo em que me dediquei aos estudos, ausentando-me muitas vezes do convívio do lar. Pelo amor, apoio e incentivo que me ajudaram a cumprir esta jornada.

**Agradecimento especial...**

Ao Professor Dr. **Humberto Santo Neto**, pela orientação, paciência e confiança durante a realização deste trabalho. Pelo incentivo, aprendizado e aprimoramento didático e científico que me concedeu.

## **Agradecimentos**

À **Deus**, por ter me concedido a oportunidade de realizar mais uma importante etapa de minha vida.

Ao meu pai **João** e aos meus irmãos **Valdomiro, Hilton e Wilson**, que sempre me apoiaram em todos os sentidos da minha vida. Vocês são meus exemplos de perseverança e coragem.

Aos meus sogros, **Madalena e Antônio Barbin**, pelo apoio, incentivo em todos os momentos, os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pelo acolhimento e excelência em minha formação profissional.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, pela colaboração e pelas importantes considerações para a realização deste trabalho.

Aos professores Doutores **José Meciano Filho, Cristina Pontes Vicente e Adriana Pertille**, pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Aos professores Doutores **Miguel Arcanjo Áreas, Laura Ferreira de Rezende Franco, Marcelo Augusto Marretto Esquisatto, Marcelo Rodrigues da Cunha**, pelas sugestões e considerações feitas durante o exame da pré banca e banca.

À **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, pela colaboração e por ceder seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

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

À **Sra. Liliam Alves Senne Panagio**, pela atenção, auxílio e competência durante a realização do mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, **Sra. Ana Floriano Rodrigues Sr. Norivaldo Celestino, Sr. Marco Aurélio Ribeiro de Paula, Sr. Paulo Afonso Bernardes, Sr. Paulo Francisco dos Santos, Sr. Toni Donizeti dos Santos, Sr. Carlos Gonçalves e Sra. Marlene Lima Francisco**, pela disposição, auxílio e convívio durante a realização do mestrado.

Aos **amigos** do Departamento de Anatomia, que sempre me apoiaram e auxiliaram durante os estudos e experimentos, especialmente: **Daniela, Renato, Ana Paula, Cíntia, Flávia, Roberta e Vagner**.

**“Pode o homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pelas próprias experiências.”**

(Mansour Chalita)

**SUMÁRIO**

Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne.....	2
1.2 O camundongo <i>mdx</i> .....	5
1.3 O coração na Distrofia Muscular de Duchenne e no camundongo <i>mdx</i> .....	6
1.4 Patogênese da lesão em cardiomiócitos de corações deficientes em distrofina e administração de L-arginina.....	8
1.5 Rbdomiossarcoma nos camundongos <i>mdx</i> .....	9
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1 Referente ao estudo da fibrose miocárdica.....	15
3.1.1 Desenho Experimental.....	15
3.1.2 Preparação do tecido cardíaco.....	15
3.1.3 Análise morfométrica.....	16
3.1.4 Análise estatística.....	17
3.2 Referente ao estudo do Rbdomiossarcoma.....	17
4. Resultados.....	19
4.1 Sobre o tratamento com L-arginina.....	20
4.1.1 Análise Qualitativa.....	20
4.1.2 Análise quantitativa.....	21

4.2 Sobre a análise do Rabdomiossarcoma.....	23
5. Discussão.....	26
5.1 Do efeito da L-arginina sobre a fibrose miocárdica.....	27
5.2 Da carcinogenicidade da L-arginina.....	29
6. Conclusão.....	34
7. Referências Bibliográficas.....	36
5. Trabalho submetido.....	46
9. Anexos.....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Ca <sup>2+</sup>	- Íons Cálcio
CDG	- Complexo Distrofina-Glicoproteínas
DMD	- Distrofia Muscular de Duchenne
FM	- Fibrose Miocárdica
H&E	- Hematoxilina-eosina
<i>Mdx</i>	- Murine dystrophin X-linked
NO	- Óxido Nítrico
nNOS	- Óxido Nítrico Sintase neuronal
RMS	- Rabdomiossarcoma

## RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia caracterizada pela ausência de distrofina, uma proteína estrutural da membrana plasmática. A ausência da distrofina faz com que a fibra muscular esquelética e cardíaca sofram alterações funcionais seguida de necrose. Com o avançar da idade cerca de 40% dos pacientes desenvolvem cardiomiopatia devido à progressiva fibrose miocárdica (FM) e vão a óbito por esta razão. Portanto, tratamento que impeça a progressão da FM é de importância em pacientes com DMD. O camundongo *mdx*, modelo animal da distrofia, também apresenta progressiva FM e por isso tem servido de modelo experimental para a cardiomiopatia na DMD. Parte da FM em camundongos *mdx* tem sido atribuída à deficiência em óxido nítrico. Desta forma, terapias baseadas na administração exógena de óxido nítrico têm sido aventadas e a L-arginina, substrato para óxido nítrico sintase tem se revelado uma candidata para tal. Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da administração de longo tempo da L-arginina sobre a progressão da FM em camundongos *mdx*. Os animais foram tratados com L-arginina durante 60 semanas. Os corações foram retirados e preparados para avaliação histomorfométrica da FM através de coloração com tricrômico de Masson. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) serviram para observação histológica e quantificação da densidade de células inflamatórias. Corações de camundongos *mdx* de mesma idade que aqueles tratados com L-arginina serviram como controle. Nossos resultados mostram que a área média de FM nos camundongos que receberam L-Arginina não foi diferente ( $p > 0,05$ ) da dos camundongos do grupo controle ( $29.5 \pm 2.5$  % para controle vs  $31.4 \pm 2$  % para L-arginina). De outro lado, a densidade de células inflamatórias foi significativamente inferior nos camundongos que receberam L-arginina comparados ao controle ( $169.3 \pm 6.7$  células/mm<sup>2</sup> no controle vs  $102 \pm 6$  células/mm<sup>2</sup> em L-arginina). Baseado nisto, conclui-se que a administração por longo tempo de L-arginina não é capaz de prevenir a FM sugerindo que o uso da L-arginina pode não ser eficaz na prevenção da FM em DMD. Durante a realização do trabalho verificou-se que a administração de L-arginina aumenta a já conhecida susceptibilidade dos camundongos *mdx* desenvolverem tumores. Cerca de 40% dos camundongos *mdx* que receberam L-arginina por longo tempo apresentaram tumores cuja análise histopatológica, incluindo-se a expressão de MyoD revela serem rhabdomyosarcomas. Uma análise mais detalhada mostra que a maioria deles é do tipo embrionário e um do tipo alveolar. Esses resultados são importantes uma vez que esse protocolo poderá ser empregado para indução desse tipo de câncer e consequentemente servir como modelo experimental para o mesmo.

**ABSTRACT**

The Duchenne Muscle Dystrophy (DMD) is a myopathy characterized by dystrophin absence, which is a structural protein of the plasma membrane. The dystrophin absence leads to functional alterations followed by necrosis in the skeletal and cardiac muscle fiber. As the patients grow older, about 40% of them develop cardiomyopathy due to progressive myocardial fibrosis (MF), and eventually die because of this. Therefore, a treatment that avoids the MF progression is very important to DMD patients. The mouse *mdx*, animal model of dystrophy, also presents progressive FM and thus, has been used as an experimental model for cardiomyopathy in DMD. The MF in mice *mdx* has been partially attributed to the deficiency of nitric oxide. This way, therapies based on the exogenous administration of nitric oxide have been quoted and the L-arginine, which is a substrate of the synthase nitric, has been revealed to be a strong candidate to these therapies. The aim of this current project is evaluating the effect of long-term administration of L-arginine on the progression of MF in mice *mdx*. The animals were treated with L-arginine for 60 weeks. The hearts were taken out and prepared for histomorphometric evaluation of the myocardial fibrosis through the colouring with Masson's trichrome. Slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) were used for histological observation and quantification of the density of inflammatory cells. Hearts of mice *mdx* at the same age of those ones treated with L-arginine were used as control. Our results show that the average area of MF in mice which received L-arginine wasn't different ( $p > 0,05$ ) from the area of the control group ( $29,5 \pm 2,5\%$  for the control vs  $31,4 \pm 2\%$  for the L-arginine). On the other hand, the density of inflammatory cells was significantly smaller in mice which received L-arginine compared to the control ( $169.3 \pm 6.7$  cells/mm<sup>2</sup> in the control vs  $102 \pm 6$  cells/mm<sup>2</sup> in L-arginine). Based on this, we can conclude that the long-term administration of L-arginine is not enough to prevent the MF, suggesting that the use of L-arginine may not be effective to prevent the MF in DMD. During the research achievement, we could verify that the L-arginine administration increases the already known susceptibility of mice *mdx* of developing tumors. About 40% of the mice *mdx* which received L-arginine for a long time presented tumors whose histopathological analysis, including the MyoD expression, reveals them to be rhabdomyosarcomas. A further analysis reveals that most of them is the embrionic kind and one is the alveolar kind. These results are important since this protocol can be used to induce this kind of cancer and consequently serve as an experimental model for it.

## **1. INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

---

### **1.1 Distrofia Muscular de Duchenne**

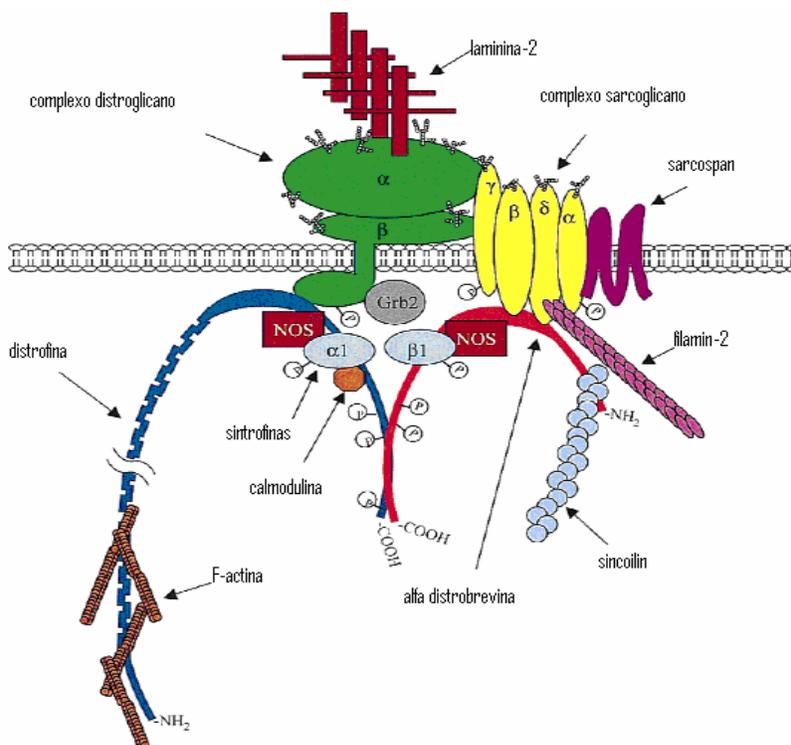
A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é o tipo mais comum entre as distrofias musculares humanas, afetando uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. Clinicamente manifesta-se entre dois e cinco anos de idade, quando se observa atraso no desenvolvimento motor, dificuldade em correr ou subir degraus e quedas frequentes. A fraqueza muscular é evidente nos membros inferiores e na musculatura proximal. Concomitantemente à fraqueza muscular, a criança apresenta pseudo-hipertrofia, principalmente nos membros inferiores. A fraqueza muscular é progressiva resultando em perda da deambulação aproximadamente aos doze anos de idade, com cifoescoliose. A utilização de órteses e de ventilação mecânica melhoram a qualidade de vida do paciente, porém o óbito é inevitável e frequentemente ocorre devido à falência respiratória e cardíaca por volta dos vinte anos de idade (BOGDANOVICH et al., 2004; ENGEL et al., 1994).

Biópsia de músculos de indivíduos acometidos pela DMD apresenta alterações morfológicas significativas. Fibras musculares necróticas ou em degeneração com presença de células inflamatórias são comumente observadas em músculos distróficos. As fibras musculares são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo e adiposo, evidenciados clinicamente pela pseudo-hipertrofia dos membros. Variações do diâmetro das fibras musculares são observadas a partir da idade de um a cinco anos (BLAKE et al., 2002; ENGEL et al., 1994).

A DMD é uma doença autossômica recessiva ligada ao cromossomo X, causada pela mutação no gene que codifica a proteína distrofina. Uma proteína estrutural com peso

molecular de 427 kDa, localizada principalmente na face citoplasmática do sarcolema (ENGEL et al., 1994).

O complexo distrofina-glicoproteínas (CDG, Figura 1) apresenta múltiplas subunidades que atravessam o sarcolema e formam uma ligação estrutural entre a matriz extracelular e a actina. Fazem parte deste complexo as sintrofinas, as sarcoglicanas, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a utrofina, a caveolina-3 e a distrobrevina (BONILLA et al., 1988; DURBEEJ & CAMPBELL, 2002; HOFFMAN et al., 1987).



**Figura 1:** Organização molecular do complexo distrofina glicoproteínas no sarcolema. Adaptado de Rando, *Muscle & Nerve*, 24, p.1575-1594, 2001.

A ausência da distrofina, principal característica da DMD, provoca redução dos níveis de todas as proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) inclusive nNOS que interessa diretamente para o presente trabalho.

Sugere-se que o CDG confere estabilidade ao sarcolema durante a contração e relaxamento da fibra muscular (ENGEL et al., 1994), além de servir como sinalizador de processos intracelulares que levam a mecanismos de defesa, a regulação de processos vitais ou a morte da fibra muscular (GAILLY, 2002; MARQUES, 2004; RANDO, 2001).

A falta da distrofina faz com que o sarcolema, membrana citoplasmática da fibra muscular se torne frágil, deixando as fibras musculares dos músculos susceptíveis a danos durante a contração e relaxamento muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005). Devido a esta fragilidade o sarcolema pode romper-se ocasionando a descontinuidade do mesmo, permitindo maior influxo de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) para o meio intracelular (PETROF, 1998).

Admite-se que o acúmulo excessivo de  $Ca^{2+}$  na fibra muscular causa hipercontração e ativação de proteases endógenas, que resulta em necrose da fibra muscular (BERCHTOLD et al., 2000; STEDMAN et al., 1991). Em fibras normais não distróficas este excesso é removido pelo retículo endoplasmático e pela mitocôndria (ENGEL et al., 1994).

No início da doença DMD, a necrose é compensada pela capacidade de regeneração das fibras musculares, o que se faz à custa da ativação das células satélites (ENGEL et al., 1994). As células satélites, localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema, são responsáveis pela regeneração muscular. Com o passar do tempo, a capacidade de regeneração por células satélites diminui e as fibras musculares são substituídas por tecido conjuntivo e adiposo (HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005), resultando na perda da função muscular observada nos pacientes com DMD.

## 1.2 O camundongo *mdx*

O conhecimento da fisiopatologia da lesão muscular e o estabelecimento de novas estratégias para o tratamento da DMD tiveram grande impulso, a partir da descoberta por Bulfield e colaboradores (1984), de uma linhagem de camundongos cujos músculos esqueléticos apresentavam semelhanças aos de portadores de DMD: fibras musculares em degeneração, fibras regeneradas de pequeno diâmetro e com núcleo em posição central.

Posteriormente, estudos genéticos demonstraram que estes camundongos apresentavam mutação do gene da distrofina, homóloga aquela ocorrida na DMD. Esta linhagem surgiu espontaneamente da linhagem C57BL/10 ScSn, denominada C57BL/10 *mdx* (“*murine dystrophic x chromosome-linked*”). Assim, a linhagem de camundongos conhecida como *mdx* tornou-se o modelo animal preferido para estudos da DMD (ANDERSON et al., 1988; COLLINS & MORGAN, 2003; HOFFMAN et al., 1987).

Apesar das semelhanças entre a DMD em humanos e nos camundongos *mdx*, a principal diferença entre o desenvolvimento desta doença nos dois casos é o fato de que nos camundongos as fibras têm capacidade de se regenerar sucessivamente após a degeneração, sem que ocorra a manifestação de sinais clínicos que demonstrem o comprometimento muscular (CULLEN & JAROS, 1988).

Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares nesses animais iniciam-se por volta dos 20 dias de vida pós-natal. O princípio dos ciclos de degeneração e regeneração relaciona-se ao momento em que se inicia a atividade muscular deste período, que levaria a suscetibilidade das fibras musculares à lesão (CULLEN & JAROS, 1988; DISATNIK et al, 1998; TANABE et al., 1986). Entre 35 a 90 dias de vida, a necrose atinge seu ápice, e entre 60 e 90 dias, mais de 50% das fibras musculares encontram-

se em processo de regeneração. Em torno de 120 dias de idade, encontram-se regeneradas (LEFAUCHEUR et al., 1995; TANABE et al., 1986).

Após os 20 meses de vida, a capacidade de regeneração muscular decresce devido à diminuição gradual da quantidade e da capacidade de proliferação das células satélites. Os animais começam a apresentar características patológicas semelhantes às observadas em humanos, com progressiva fraqueza motora e perda de fibras musculares, que são substituídas por tecido conjuntivo (LEFAUCHEUR et al., 1995).

Em função disso os camundongos *mdx* vêm sendo extensivamente utilizados nos estudos da patogênese da lesão da fibra muscular esquelética e na avaliação de novas terapias que retardem a evolução da doença nesses músculos.

### **1.3 O coração na Distrofia Muscular de Duchenne e no camundongo *mdx***

Assim como no músculo esquelético o músculo cardíaco também é comprometido, porém, numa fase mais tardia da DMD. Cerca de um terço dos pacientes de DMD apresenta sinais de disfunção cardíaca na adolescência e em idade mais avançada virtualmente todos desenvolvem cardiomiopatia (FINSTERER & STOLLBERGER, 2008; NIGRO et al., 1990).

Do ponto de vista histopatológico a alteração mais evidente no músculo cardíaco é o acúmulo progressivo de fibrose intersticial, que resulta em parte dos processos inflamatórios consequente à necrose dos cardiomiócitos (BAXTER, 2006; COX & KUNKEL 1997; FINSTERER & STOLLBERGER, 2008; FRANKEL & ROSSER, 1976; NIGRO et al., 1990; PERLOFF et al., 1967). As células inflamatórias induzem a fibrose através da secreção

de citocinas, as quais estimulam os fibroblastos cardíacos na produção de colágeno resultando na deposição excessiva de matriz extracelular (MORRISON et al., 2000).

A fibrose miocárdica (FM) desempenha importante papel na falência cardíaca na DMD, pois ao comprometer a arquitetura geral do coração e o sistema de condução do coração provoca arritmias, dilatação na parede do ventrículo esquerdo culminando com o óbito (FINSTERER & STOLLBERGER, 2008; FRANKEL & ROSSER, 1976; KERMADEC et al., 1994; MORIUCHI et al., 1993; MUNTONI, 2003; NIGRO et al., 1990; NOMURA & HIZAWA, 1982; PERLOFF et al., 1967; POLITANO et al., 1996).

Não obstante a importância da FM no desenvolvimento da cardiomiopatia e os óbitos decorrentes, não há tratamento específico objetivando a diminuição da progressão da FM nos pacientes com DMD. Uma das razões que colaboram para isto é a variabilidade com que se apresenta a evolução da FM nos pacientes com DMD (MANZUR et al., 2008).

Os camundongos *mdx* compartilham características observadas no coração dos pacientes portadores de DMD. Sabe-se que nesses animais o coração apresenta-se normal sob o ponto de vista histológico até ao redor de sete meses de idade. A partir desta idade é possível detectar-se fibrose intersticial miocárdica que avança progressivamente e ao redor de 17 meses de idade o coração desses animais apresenta hipertrofia dos cardiomiócitos, necrose celular, inflamação e extensas áreas de fibrose envolvendo endocárdio, pericárdio e epicárdio de ambos os ventrículos direito e esquerdo (QUINLAN et al., 2004). Geralmente, a fibrose cardíaca inicia-se com envolvimento da parede posterior do ventrículo esquerdo (CZINER & LEVIN, 1993). Posteriormente, tanto os átrios quanto os ventrículos exibem fibrose, focos de degeneração e infiltração de tecido adiposo (GILROY et al., 1963). Os miofilamentos sofrem desorganização e o retículo sarcoplasmático torna-se dilatado

(SANYAL, et al., 1978; WAKAI et al., 1988). Além disso, há aumento no número e mudanças estruturais das mitocôndrias em particular nas áreas cardíacas com lesão (SANYAL et al., 1978; WAKAI et al., 1988).

Em vista destas alterações patológicas o coração dos camundongos *mdx* também tem sido utilizado como modelo para estudo da cardiomiopatia na DMD.

#### **1.4 Patogênese da lesão em cardiomiócitos de corações deficientes em distrofina e administração de L-arginina**

Assim como no músculo esquelético a ausência da distrofina faz-se acompanhar pela diminuição da expressão de nNOS, a enzima responsável pela produção do óxido nítrico (NO), também está diminuída nos corações deficientes em distrofina. Estima-se que há diminuição de 80% da atividade da enzima nNOS e admite-se que a diminuição da expressão desta enzima colabore com a patogênese da lesão da fibra muscular cardíaca (BRITA, et al., 1999).

Em camundongos *mdx* transgênicos que expressam elevados níveis de NOS ocorre significativa melhora da função cardíaca, a cardiomiopatia torna-se menos evidente e em especial há diminuição significativa da FM. Em função disto postulou-se que a FM poderia ser minimizada através de terapia com fornecimento exógeno de NO (WEHLING-HENRICKS et al., 2005).

Há evidências de que a distrofinopatia em músculo esquelético de camundongos *mdx* seja minimizada pela administração de L-arginine (2-amino-5-ácido guanidinovalérico), um substrato para o óxido nítrico sintase (BARTON et al., 2005; VOISIN et al., 2005). Observou-se que, concomitante à diminuição da mionecrose havia acentuada diminuição da

fibrose intersticial do músculo esquelético (ARCHER et al., 2006; BARTON et al., 2005; VOISIN et al., 2005). Assim sendo é razoável que a L-arginina seja um candidato para as terapias de fornecimento de óxido nítrico.

É de interesse mencionar que qualquer terapia farmacológica para a DMD se faz por toda a vida, e o impacto do tratamento com L-arginina em longo prazo sobre a fibrose miocárdica progressiva não foi ainda investigado. Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se a administração de L-arginina durante 60 semanas poderia afetar a progressão da FM no camundongo *mdx*.

### **1.5 Rabdomiossarcoma nos camundongos *mdx***

Rabdomiossarcoma (RMS) é o mais comum dos sarcomas de tecido mole que ocorre na infância, responsável por aproximadamente 5 a 8% de todos os cânceres desta fase, com um pico de incidência nas idades de 1 a 5 anos. Geralmente, 50% das crianças que são diagnosticadas com RMS sobrevivem cinco anos (TORO et al., 2006).

Apesar do consenso de que os tumores do RMS podem derivar da transformação das células em desenvolvimento em qualquer ponto ao longo do eixo da célula muscular esquelética (MERLINO & HELMAN, 1999), desconhece-se a origem exata da célula carcinomatosa. Para alguns autores, a célula tumorogênica originar-se-ia das células satélites, que são células “dormentes” de natureza miogênica localizadas entre o sarcolema e a membrana basal muscular das fibras musculares esqueléticas (TRUPIN et al., 1979). As células satélites são responsáveis pela regeneração da fibra muscular esquelética, e entram em proliferação toda vez que a fibra muscular sofre lesão ou dano irreparável. Para outros

autores os RMSs podem surgir através da diferenciação de células maduras musculares em que os mionúcleos podem ser estimulados a reentrarem no ciclo celular após sinais específicos (KELLER & CAPECCHI, 2005).

Parte significativa do desconhecimento sobre a patogênese dos RMSs é devida à inexistência de modelos experimentais. Comumente, o RMS tem sido estudado através da manipulação de linhas de células humanas derivadas a partir do tumor RMS, adaptadas para o crescimento em cultura. Entretanto, as células do RMS humano representam os estágios finais do tumor e por isso elas não são apropriadas para os estudos dos eventos precoces do RMS (ANDERSON et al., 2001; MERLINO & HELMAN, 1999; NANNI, et al., 2003).

O RMS espontâneo é raro em roedores de laboratórios e por este motivo existem poucos modelos experimentais “in vivo”. De fato a incidência do RMS é baixa sendo estimada em 2,4 a 12,5% naqueles animais (DAVIS et al., 1997). Dessa forma há grande interesse em que novos modelos experimentais sejam criados.

Recentemente, observou-se que camundongos *mdx* são susceptíveis ao desenvolvimento espontâneo do RMS, embora sua incidência seja de apenas 6% (CHAMBERLAIN et al., 2007). Uma explicação para a predisposição ao desenvolvimento do rabdomiossarcoma nos camundongos *mdx* é que ao longo de sua vida eles sofrem seguidos ciclos de degeneração e regeneração das células musculares que estão associados com contínua ativação e proliferação das células satélites (CHAMBERLAIN et al., 2007). Foi sugerido que com o decorrer do tempo aumenta a probabilidade do desenvolvimento aleatório e espontâneo de mutações nas células satélites, levando ao desenvolvimento do RMS nesses animais (TIFFIN et al., 2003).

Por este motivo, o camundongo *mdx* poderia tornar-se um modelo animal experimental importante para estudos sobre o desenvolvimento do RMS (CHAMBERLAIN et al., 2007).

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

---

1 - Examinar os efeitos do tratamento de longo prazo com L-arginina sobre a evolução da fibrose miocárdica em camundongos *mdx*.

2 - Relatar o aumento da susceptibilidade da carcinogênese em camundongos *mdx* tratados com L-arginina.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.1. Referente ao estudo da fibrose miocárdica**

##### 3.1.1 Desenho Experimental

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes para experimentação de animal da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, sob o protocolo da Comissão de Ética na experimentação animal (CEEA-IB-UNICAMP) nº1263-1 (Anexo 1). Foram utilizados 20 camundongos das linhagens *mdx* machos, com idade inicial de 6 meses, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia em caixas plásticas sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro), com ração e água *ad libitum*.

Os camundongos foram distribuídos em dois grupos de 10 animais. Um dos grupos recebeu L-arginina (Sigma, St Louis) dissolvida em água de beber na dose 8mg/Kg/dia (de acordo com BARTON et al., 2005; VOISIN et al., 2005).durante 15 meses. Outro grupo de camundongos não foi tratado (grupo controle).

##### 3.1.2 Preparação do tecido cardíaco

Ao final da administração da droga os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com um composto de cloridrato de ketamina (Ketalar®, Parke Davies) e cloridrato de thiazine (Rompum®, Bayer), na proporção de 1:1 e dose de 0.02 mg/Kg.

Realizou-se toracotomia mediana para exposição do coração que depois de dissecado, foi retirado e imerso em isopentano por 30 segundos e congelado em nitrogênio líquido.

Em seguida, armazenados em biofreezer ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) e seccionados longitudinal e transversalmente com  $7\ \mu\text{m}$  de espessura em criostato (Microm-HS505E). Os cortes foram corados com tricrômico de Masson da seguinte forma: corados com hematoxilina de Harris por oito minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e imersas em solução de Masson por quinze minutos. Em seguida imersas em solução de ácido acético a 0,2 % e em solução de azofloxina (AFO) por cinco minutos e em solução de verde luz (light green) por trinta segundos. Após essa etapa, as lâminas foram imersas em ácido acético a 0,2% e a seguir os cortes foram desidratados em série crescente de etanol e diafanizados em xilol. Em seguida foram montadas em Tragacanth (Sigma-Aldrich, USA).

Outras lâminas foram coradas pela técnica rotineira de Hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação da densidade de células inflamatórias.

### 3.1.3 Análise morfométrica

Para avaliação da FM utilizaram-se as lâminas coradas com tricrômico de Masson. Cortes de tecido cardíaco foram examinados por um microscópio de luz Nikon® Eclipse E 400 conectado a um computador vinculado a uma vídeo câmara Nikon Express Series; Tokyo, Japan), que permite a captação das imagens no programa NIS-elements AR (Advances Reserches) e procedeu-se à contagem em  $\mu\text{m}^2$  das áreas de FM utilizando aumento de 20X, da área total do corte. Para isto foram selecionadas as 10 maiores áreas

de fibrose de cada lâmina (5 lâminas de animais controle e 5 de animais que receberam L-arginina) para relacionar com a área total. Após a coleta, os dados foram enviados para o programa Microsoft Excel para realização das porcentagens de FM correspondentes a cada animal.

Para avaliação da inflamação utilizaram-se as lâminas coradas com H&E. Com o auxílio de uma grade quadriculada, colocada em uma ocular Nikon e com objetiva de imersão em óleo (100X) procedeu-se à contagem do número de células inflamatórias existentes por  $\text{mm}^2$ . As células inflamatórias foram identificadas em função de seu tamanho e da morfologia do núcleo. As áreas avaliadas foram escolhidas aleatoriamente sendo que cerca de 10 áreas foram avaliadas em cada lâmina (5 lâminas de animais controles e 5 de animais que receberam L-arginina).

As quantificações de FM e de células inflamatórias foram realizadas tanto nos animais que receberam L-arginina quanto nos que não receberam para comparação.

#### 3.1.4 Análise estatística

A comparação entre os dados feita entre os dois grupos experimentais (*mdx* que receberam L-arginina e o grupo controle). Foram comparados usando o test *t-Student*, sendo considerado significativo  $p > 0,05$ .

### **3.2 Referente ao estudo do Rbdomiossarcoma**

Durante o período em que os animais receberam L-arginina, quatro foram a óbito sendo que dois apresentavam massa tumoral palpável na região massetéica, um na região dorsal do pescoço, e um na região femoral.

Os tumores foram retirados e fixados em Bouin por 24 horas, lavados em álcool 70% até clarear. Foram desidratados com álcool e diafanizados com xilol. Em seguida, inclusos na parafina. Secções de 5µm feitas em micrótomo (REICHERT-JUNG mod. 1130/ Biocut) foram posicionadas em lâminas silanizadas para coloração em H&E e imunohistoquímica para MyoD.

Após análise histopatológica através de lâminas coradas em H&E outros cortes foram empregados para a comprovação do tipo de tumor através de imunomarcção com MyoD a qual foi realizada da seguinte forma: Cortes transversais obtidos dos tumores foram desparafinados e re-hidratados para realização da técnica de imunohistoquímica para MyoD. Após recuperação dos sítios ativos dos antígenos com tampão citrato e bloqueio da marcação inespecífica com 3% BSA em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo primário para MyoD (SC 760; Santa Cruz) durante 12 horas a 4 C.

A seguir, os cortes foram lavados por 30 minutos com PBS e incubados com anticorpo secundário anti-coelho biotinilado IgG (Vector laboratories). Após o bloqueio da peroxidase endógena, as secções foram incubadas com complexo Avidina-biotina (ABC) peroxidase e reveladas com a diaminobenzidina (DAB; 3,3'- Diaminobenzidine Dihydrate Tetrahydrochloride; SIGMA).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E 400 conectado a um computador vinculado a uma vídeo câmara Nikon Express Series; Tokyo, Japan.

#### **4. RESULTADOS**

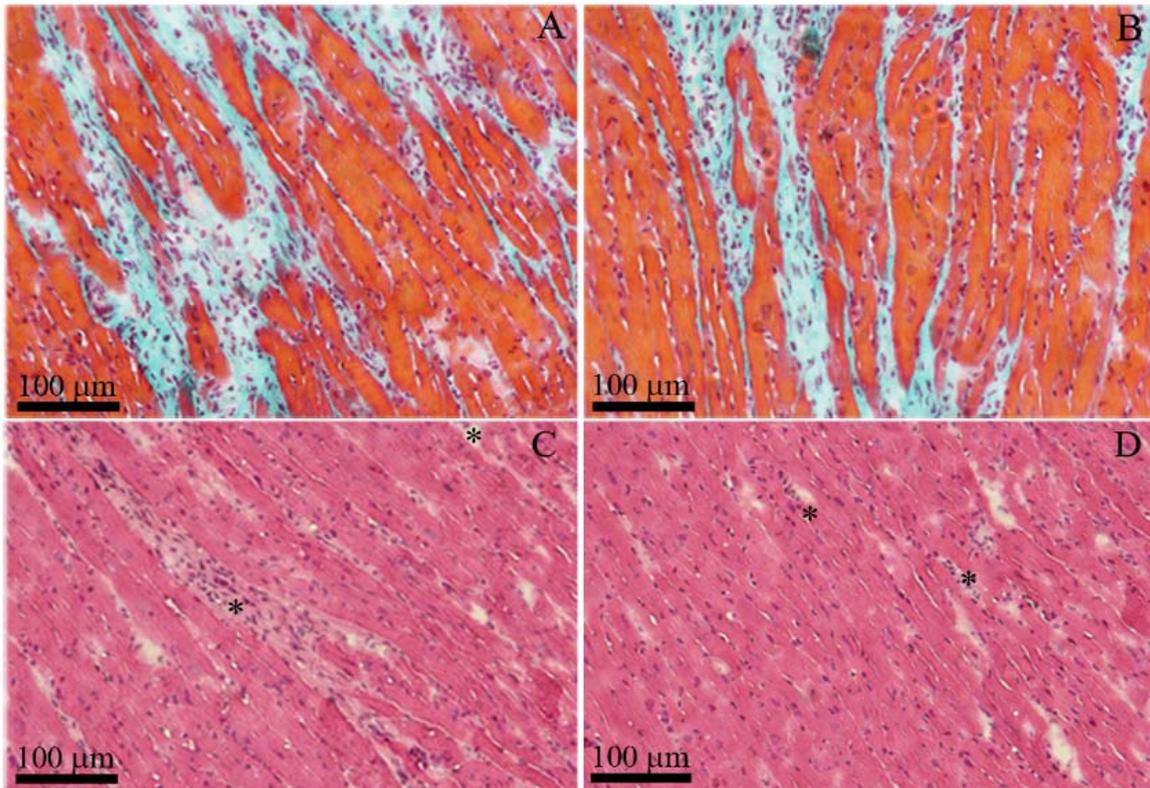
## **4. RESULTADOS**

---

### **4.1 Sobre o tratamento com L-arginina**

#### 4.1.1 Análise Qualitativa

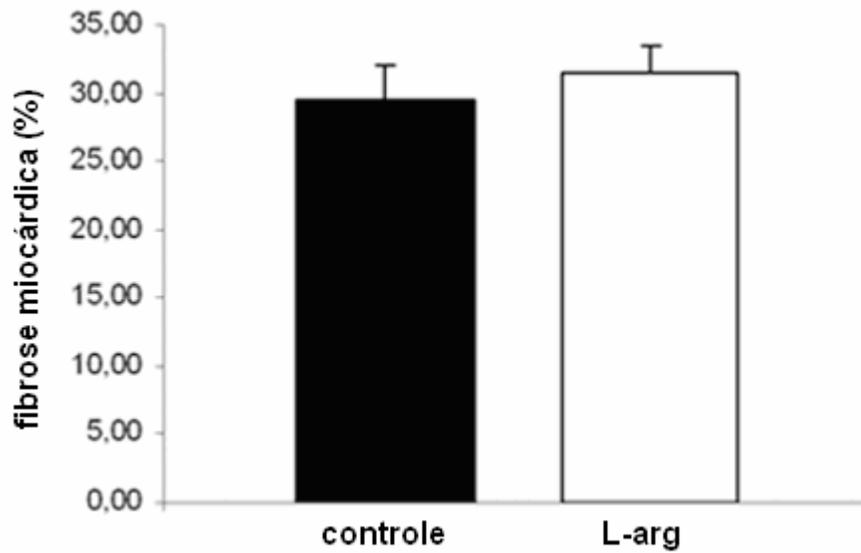
Não foi encontrada diferença histológica qualitativa entre os corações dos camundongos *mdx* que receberam L-arginina e os controles. Conforme identificados através dos cortes corados com tricrômico de Masson, os corações apresentaram focos de fibrose intersticial, distribuídas ao longo do endocárdio, miocárdio e do epicárdio do átrio, ventrículo e septo interventricular (Fig.2, A e B). Nas lâminas coradas com H&E observou-se infiltrado inflamatório formando distintos agregados multifocais entre os miócitos cardíacos, que por vezes, se apresentavam eosinófilos com desarranjos vacuolares, mudanças de estriações e núcleos picnóticos (Fig.2, C e D).



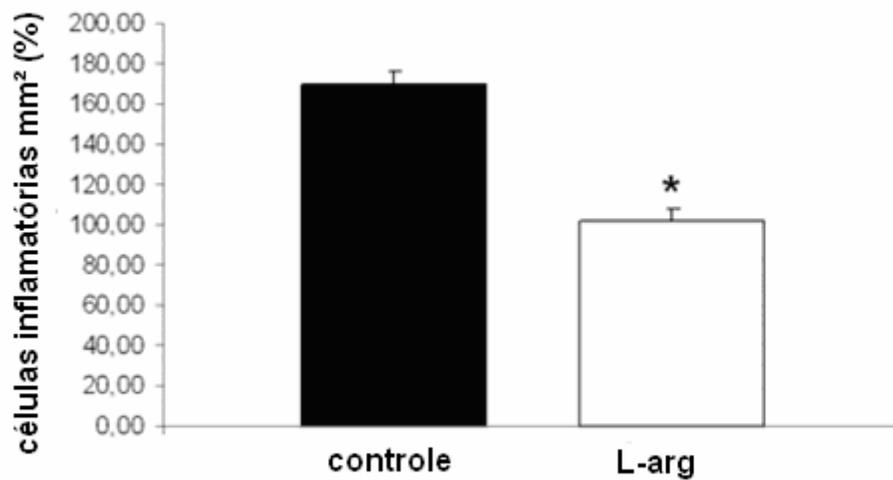
**Figura 2:** Secções do ventrículo esquerdo do coração de camundongos *mdx* que receberam L-arginina por 60 semanas (B e D) e animais controle (A e C). Em A e B, áreas de fibrose (coloração tricrômico de Masson). Em C e D, áreas de infiltrado inflamatório (\*) coloração H&E.

#### 4.1.2 Análise quantitativa

Na análise quantitativa, observou-se (Fig. 3) que a área média de FM nos camundongos que receberam L-Arginina não foi diferente ( $p > 0,05$ ) à dos camundongos do grupo controle, após 15 meses de administração de L-arginina ( $29.5 \pm 2.5$  % para controle vs  $31.4 \pm 2$  % para L-arginina). A densidade de células inflamatórias (Fig. 4) foi significativamente inferior nos camundongos que receberam L-arginina comparados ao controle ( $169.3 \pm 6.7$  células/mm<sup>2</sup> no controle vs  $102 \pm 6$  células/mm<sup>2</sup> em L-arginina).



**Figura 3:** Histograma representativo da área da fibrose cardíaca (%) nos animais *mdx* controle e nos que receberam L-arginina após 60 semanas.



**Figura 4:** Histograma representativo da densidade de células inflamatórias nos dois grupos controle e L-arginina. (\*) diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

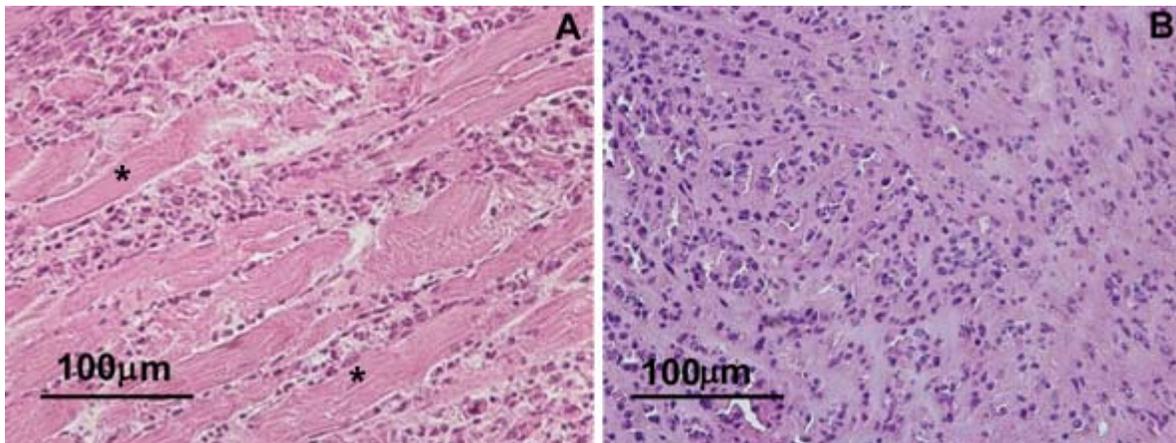
## 4.2 Sobre a análise do Rbdomiossarcoma

Os tumores foram encontrados em quatro animais, representando 40% de incidência. Foram inicialmente identificados por inspeção visual representado por uma proeminente massa subcutânea que se apresentaram nas regiões masseterica (2), dorsal do pescoço (1) e femoral (1).

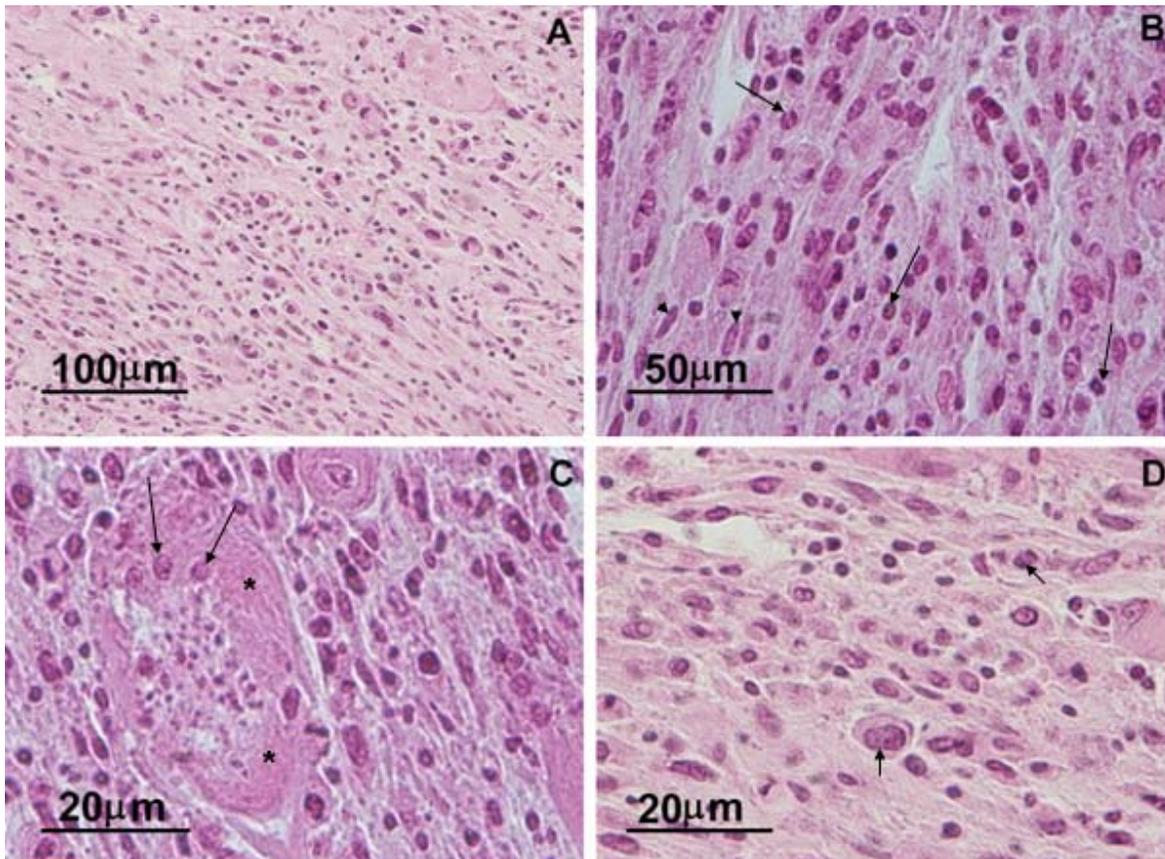
Não obstante apresentarem-se em diferentes estágios de progressão a análise histopatológica dos tumores em lâminas coradas com H&E sugere que a maioria deles é do tipo embrionário, quando comparados aos tumores humanos (Fig 5). No geral apresentam-se com células eosinófilas heterogênea em tamanho e forma incluindo células arredondadas e fusiformes com núcleo hipercromático (Fig 6).

Um dos tumores apresentou características histopatológica de RMS do tipo alveolar: agrupamento de células com escasso citoplasma e núcleos arredondados relativamente uniformes dispostas entre finos septos de tecido conjuntivo. Algumas vezes as células neoplásicas mostravam-se soltas e em aspecto de cachos de uva (Fig 7).

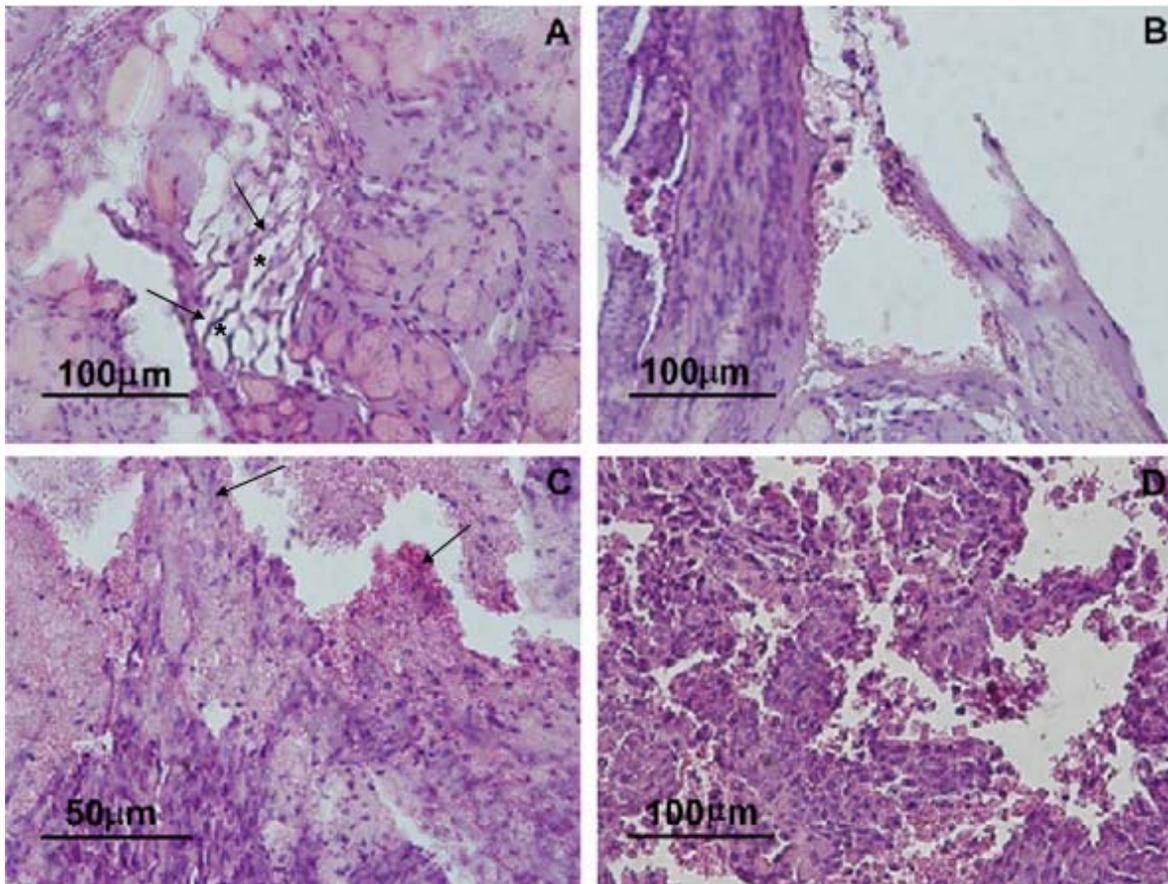
Em todos os tumores as células apresentaram-se positivas a reação dos anticorpos para MyoD embora no tumor do tipo alveolar as mesmas aparentavam ser em menor número e dispersamente distribuídas em relação aquelas dos tumores do tipo embrionário (Fig 8).



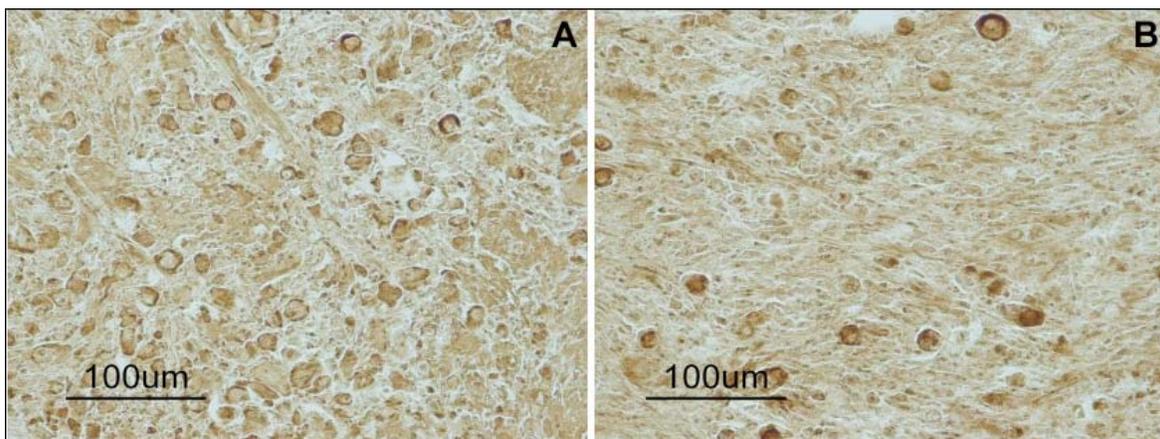
**Fig.5:** Aspectos histopatológicos do rhabdomyosarcoma do tipo embrionário. Em A, região em que ainda observam-se fibras musculares pré existentes (\*) entre células neoplásicas. Em B, células neoplásicas convencionais (arredondadas).



**Fig. 6:** Em A e B, centro do tumor mostrando células fusiformes (cabeças de setas) e arredondadas com núcleos hipercromáticos (setas) em rhabdomyosarcoma do tipo embrionário. Em C, fibra muscular pré existente (\*) com células neoplásicas em proliferação (setas) e em D, células tumorais com núcleos bilobulados (setas menores) e figuras de mitose. Notar o aspecto pleiomórfico dos núcleos.



**Fig. 7:** Notar aspecto geral das células neoplásicas formando alvéolos típicos de rabdomiossarcoma alveolar. A: septos de tecido conjuntivo (setas) delimitando alvéolos (\*). Em C agrupamentos de células com aspecto de cachos de uva (setas) e em D células pequenas com citoplasma escasso e núcleos arredondados dando a impressão de estarem “soltas”.



**Fig. 8:** Imunomarcção para MyoD mostrando marcação nuclear para o tumor do tipo embrionário (A) e alveolar (B).

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1 Do efeito da L-arginina sobre a fibrose miocárdica

A progressão da FM em humanos contribui em seu estágio final para a falência cardíaca, que ocorre por volta dos 30 anos na DMD. Isto significa que o tratamento farmacológico permanece por mais de duas décadas nos pacientes portadores de DMD. Por análise histopatológica a FM começa a ser detectada por volta de 36 semanas de idade e, ao redor de 40 a 42 semanas de idade, identifica-se a cardiomiopatia dilatada associada a anormalidades contráteis, em camundongos *mdx* (QUINLAN et al, 2004). Embora não seja possível traçar uma comparação exata entre a evolução da cardiomiopatia em camundongos *mdx* e em pacientes com DMD, admite-se, grosseiramente, que o camundongo com seis meses de idade corresponda a um paciente de 16 a 18 anos de idade (GROUNDS et al, 2008). No presente estudo, o camundongo *mdx* começou a receber L-arginina com 24 semanas de idade, permanecendo em tratamento durante 60 semanas.

Estes resultados mostraram que após 60 semanas de administração de L-arginina não houve alteração significativa na progressão da FM em camundongos *mdx*. Considerando que os mecanismos celulares e moleculares que resultam na FM sejam semelhantes no camundongo *mdx* e na doença humana, estes resultados sugerem que a progressão da FM não pode ser retardada em pacientes com DMD.

Sabe-se que o desenvolvimento da FM depende principalmente da presença de reação inflamatória, embora a regulação da proliferação de fibroblastos cardíacos seja de natureza multifatorial. Porém, os mecanismos celulares e moleculares que resultam em FM nos corações deficientes em distrofina ainda são desconhecidos. Sabe-se também que a FM

ocorre em vários tipos de cardiomiopatias idiopáticas as quais são de natureza não inflamatória (SPINALE, 2007; SWYNGHEDAUIW, 1999). Em camundongos *mdx* transgênicos com aumento da expressão de NOS há redução da reação inflamatória acompanhada da diminuição da FM, embora não esteja claro que a redução da FM seja consequência direta da diminuição da inflamação (WEHLING-HENRICKS et al., 2005). Em trabalhos recentes, sugere-se que o desenvolvimento da FM seja apenas parcialmente dependente da inflamação (MARQUES et al., 2009 in press). No presente estudo, a progressão da FM não foi alterada, embora a densidade das células inflamatórias tenha sido significativamente diminuída com o tratamento com L-arginina. De um modo geral, estes achados sugerem que o tratamento de longo tempo com L-arginina poderia ter um efeito pró-fibrótico nas nossas condições experimentais.

A remodelagem extracelular é regulada pelas metaloproteinases da matriz e a produção da FM pode refletir desequilíbrio entre a metaloproteinase-2 de matriz e inibidores de tecido da metaloproteinase-2 de matriz nos fibroblastos cardíacos. A expressão e a atividade da metaloproteinase-2 de matriz são estimuladas pelo acúmulo do NO, embora os mecanismos envolvidos sejam desconhecidos nos fibroblastos cardíacos (DAVIES et al., 2007).

No presente estudo, a administração de L-arginina em longo tempo pode resultar em aumento cumulativo de NO no tecido cardíaco, que em níveis elevados ou na presença de espécies de oxigênio reativo pode aumentar o estresse oxidativo através da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais, por sua vez, são ativadores da metaloproteinase-2 de matriz, resultando em um aumento da fibrose (BOGER 2008; DONINI et al., 2008; HNIA et al., 2008; PACHER et al., 2007; THOMAS et al., 2008). Estes

mecanismos explicariam porque a FM não decresceu, embora a reação inflamatória tenha diminuído significativamente com a administração de L-arginina.

No geral, estes resultados estão de acordo com a observação de que as fibras colágenas cardíacas não foram afetadas em camundongos *mdx* após seis meses de tratamento com L-arginina (VAN ERP et al., 2004) e que o desenvolvimento da FM não foi prevenido pela L-arginina, em coração não distrófico, apesar da restauração da atividade do NOS (SIMKO et al., 2005). Por outro lado, eles não estão de acordo com a observação de que a FM seja prevenida pela expressão de nNOS no miocárdio do camundongo *mdx* (WEHLING-HENRICKS et al., 2005). Esta diferença poderia ser atribuída a diferentes metodologias utilizadas.

O fato de que a L-arginina não ter sido eficaz em reduzir a progressão de FM não elimina a possibilidade de que as terapias baseadas na administração exógena de substratos para NO não possam diminuir a FM em camundongos *mdx*, tampouco serem empregadas na DMD. Estudos futuros, usando compostos que liberam NO diretamente, são necessários para examinar se outras formas de terapias baseadas em NO poderiam reduzir a FM, retardando a insuficiência cardíaca no coração com deficiência de distrofina.

Em conclusão, o presente estudo mostra que a administração de longo tempo com L-arginina não é capaz de prevenir a FM no camundongo *mdx*. Assim, os resultados não sustentam uso da L-arginina como terapia baseada em NO para a FM na DMD.

## **5.2 Da carcinogenicidade da L-arginina**

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a administração de L-arginina por longo tempo aumenta a susceptibilidade dos camundongos *mdx* a carcinogênese. A incidência de 40% no grupo tratado com L-arginina contrasta com ausência de tumores no grupo não tratado. Além disso, a prevalência do RMS resultante da administração da L-arginina é mais alta que o RMS espontâneo em camundongos *mdx* 6% e, em outros roedores de laboratórios, que registra na literatura porcentagens de 2.4 a 12.5% em estudos anteriores (CHAMBERLAIN, et al., 2007; DAVIS, et al., 1997).

Um fato interessante é que a maioria dos tumores (3 em 4) observados estava localizada na extremidade superior (cabeça e pescoço), particularmente na região massetérica. É bem estabelecido que a cabeça, o pescoço e a órbita são também os locais anatômicos mais comuns para o RMS primário em humanos (SHIELDS & SHIELDS, 2003).

A análise histológica revelou que a maioria dos tumores assemelha-se àquele classificado como sendo do tipo embrionário em humano e assim eles podem tornar-se um modelo experimental representativo para se estudarem alguns aspectos moleculares subjacentes da patogênese e do progresso deste câncer.

Há um consenso de que RMSs podem derivar a partir da transformação de células em qualquer ponto ao longo do eixo da célula muscular (MERLINO & HELMAN, 1999). Embora se acredite que essas células sejam originárias das células satélites, existe um debate sobre se elas podem incluir outras células tais como as precursoras embrionárias. Poderiam também se originar pela diferenciação de células adultas, pois seus núcleos podem ser estimulados a reentrarem no ciclo celular após alterações genéticas específicas (KELLER & CAPECCHI, 2005). Os ciclos contínuos de degeneração e regeneração, os quais estão associados com a ativação e proliferação das células satélites, têm sido

propostos como a causa do RMS espontâneo em camundongos *mdx* (CHAMBERLAIN, et al., 2007).

Os ciclos de regeneração e degeneração e conseqüentemente a ativação das células satélites dependem da lesão contínua da fibra muscular no camundongo *mdx* (HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005; TIDBALL, 2005). Sabe-se que as fibras dos músculos situados no crânio incluindo-se as dos músculos orbitais são menos acometidas que as fibras dos músculos dos membros nos camundongos *mdx* (PORTER et al., 2003; MARQUES et al., 2007). Neste contexto, as células satélites dos músculos craniais deveriam ser mais “dormentes” do que aquelas dos músculos dos membros. A regeneração muscular na terapia com L-arginina ocorre devido à ativação das células satélites, as quais são mediadas pelo NO derivado da L-arginina em camundongos *mdx* (BARTON, et al., 2005). Neste cenário, o recrutamento e a ativação das células satélites deveriam ocorrer com maior facilidade nos músculos dos membros e se de fato o RMS surge a partir da contínua ativação e proliferação daquelas células e esperar-se-ia que os músculos dos membros fossem mais susceptíveis em desenvolver RMS que aqueles do crânio nos animais que receberam L-arginina.

Em humanos, durante o desenvolvimento, o fenótipo da miosina embrionária é mais abundante nas fibras musculares em desenvolvimento que nas adultas, no entanto a miosina do tipo embrionário aumenta com a idade nos músculos craniais, tanto no homem quanto nos animais roedores (BUTLER-BROWNE, et al., 1988; KORFAGE et al., 2000; MONEMI, et al., 1996; MU et al., 2004). O NO derivado da L-arginina tem mostrado ser um importante regulador da expressão do gene que transforma um tipo de miosina em outro (CHIN et al., 1998; DRENNING, et al., 2008; MEISSNER, et al., 2007). Portanto, com o decorrer do tempo, a quantidade de fibras musculares com fenótipo fetal ou embrionário pode aumentar

no grupo tratado com L-arginina em comparação com os outros grupos experimentais deste estudo.

As fibras do músculo extraocular expressam as formas de miosina embrionária e fetal virtualmente por toda a vida (KJELLGREN et al., 2003; PEDROSA-DOMELLOF et al., 2000).

A cabeça e o pescoço são os locais mais comuns da origem do RMS durante a primeira década da vida, sendo que os músculos extraoculares são as fontes mais comuns do RMS (KJELLGREN, et al., 2003; PEDROSA-DOMELLOF et al., 2000; SHIELDS & SHIELDS, 2003; WEXLER & HELMAN, 1997). A ativação das células satélites dos músculos dos membros de camundongos *mdx* foi semanalmente estimulada a ciclos de degeneração e regeneração durante 50 semanas e nenhum tumor foi encontrado (LUZ et al., 2002). Coletivamente, estes achados sugerem que o fenótipo fetal e embrionário das fibras musculares dos músculos craniais pode exercer um papel na patogênese do RMS mais do que a ativação das células em camundongos *mdx* tratados com L-arginina.

O exato mecanismo através do qual a combinação desses três fatores: 1) perda da distrofina, 2) administração da L-arginina e 3) fibra muscular com fenótipo embrionário ou fetal torna os músculos craniais mais susceptíveis ao desenvolvimento de RMSs não é objeto de estudo deste trabalho. Entretanto, é razoável admitir que a caveolina, um componente essencial da membrana das cavéolas, relacionada a diversos tipos de tumores, poderia estar relacionada àqueles mecanismos (GOETZ et al., 2008; ROY et al., 2008 SCHWENCKE et al., 2006). A caveolina-1 é expressa em fibras de músculos neonatal e fetal, mas ausente em fibras musculares adultas. O NO regula a expressão da caveolina-1 (SHEN et al., 2008), e

nas condições de nosso experimento ela pode estar acumulada, uma vez que, o nível de NO pode também estar aumentado em função do longo tempo em que os animais receberam L-arginina.

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a incidência do RMS está aumentada em camundongos *mdx* que receberam L-arginina em longo tempo. A maioria dos tumores foi encontrada na cabeça e pescoço. Ambas, a alta incidência (40%) e as localizações anatômicas dos tumores sugerem que eles possam ser modelos experimentais úteis para estudar a patogênese e o crescimento do RMS.

## **6. CONCLUSÃO**

## **6. CONCLUSÃO**

---

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a administração crônica de L-arginina não previne a evolução da FM nos camundongos *mdx* sugerindo que essa terapia farmacológica pode não ser útil para o tratamento da FM na DMD.

Em camundongos *mdx* o uso prolongado de L-arginina aumenta a predisposição do desenvolvimento de tumores malignos, mais precisamente do tipo rabiomiossarcoma, com predominância nos músculos da cabeça e do pescoço.

Estudos futuros são necessários para compreensão dos mecanismos de ação desse fármaco no coração e na suposta carcinogênese.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023

ANDERSON, J.E., BRESSLER, B.H., OYALLE, W.K. Functional regeneration in the hindlimb skeletal muscle of the *mdx* mouse. **J Muscle Res Cell Motil.** v.9, (6), p.499-515, 1988.

ANDERSON, M.J., SHELTON, G. D., CAVENEE, W. K., ARDEN, K. C. Embryonic expression of the tumor-associated PAX3-FKHR fusion protein interferes with the developmental functions of Pax3. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 98, p.1589-1594, 2001.

ARCHER, J. D., VARGAS, C. C., ANDERSON, J. E. Persistent and improved functional gain in *mdx* dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. **FASEB J.** v.20, p.738-740, 2006.

BARTON, E.R., MORRIS, L., KAWANA, M., BISH, L.T., TOURSEL, T. Systemic Administration of L-arginine Benefits *mdx* Skeletal Muscle Function. **Muscle Nerve.** v.32, p. 751-760, 2005.

BAXTER, P. Treatment of the heart in Duchenne muscular dystrophy. **Dev Med Child Neurol.** v.48, p.163, 2006.

BERCHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity and disease. **Physiol Rev.** v.80 (3), p.1215-1265, 2000.

BLAKE, D.J., WEIR, A., NEWHEY, S.E., DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiol Rev.** v.82 (1), p.291-329, 2002.

BOGDANOVICH, S., PERKINS, K.J., KRAG, T.O.B., KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy: current approaches and future direction. **J Mol Med.** v.82 (2), p.102-115, 2004.

BOGER, R.H. L-arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous ? **Curr Opin Clin Nutri Metabol Care.** v.11, p. 55-61, 2008.

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.

BRITA, L.B., CASSIDY, P.J., MARTIN, E.Y., JILL, A.R., BRENDAN, L., KAY, E.D., GEORDE, K.R., KIERAN, C. Decreased Myocardial nNOS, Increased iNOS and abnormal ECGs in Mouse Models of Duchenne Muscular Dystrophy. **J Mol Cell Cardiol**. v.31, p.1857-1862, 1999.

BULFIELD, G., SILLER, W.G., 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.

BUTLER-BROWNE, G.S., ERIKSSON, P.O., LAURENT, C., THORNELL, L.E. Adult human masseter muscle fibers express myosin isozymes characteristic of development. **Muscle Nerve**. v.11 (6), p.610-620, 1988.

CHAKKALAKAL, J., THOMPSON, J., PARKS, J.R., JASMIN, J.B. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **FASEB J**. v. 19, p. 880-891, 2005.

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

CHIN, E.R., OLSON, E.N., RICHARDSON, J.A., YANG, Q., HUMPHRIES, C., SHELTON, J.M., WU, H., ZHU, W., BASSEL-DUBY, R., WILLIAMS, R.S. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. **Genes Dev**. v.12, p. 2499-2509, 1998.

COLLINS, C.A., MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **Int J Exper Pathol**. v.84, p.165-172, 2003.

COX, G.F., KUNKEL, L.M. Dystrophies and heart disease. **Curr Opin Cardiol**. v.12, p.329-343, 1997.

CULLEN, J., JAROS, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the x chromosome-linked dystrophic (*mdx*) mouse. comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathol.** v. 77 (1), p. 69-81, 1988.

CZINER, D.G., LEVIN, R.I. The cardiomyopathy of Duchenne's muscular dystrophy and the function of dystrophin. **Med Hypotheses.** v.40, p.169-173, 1993.

DAVIES, D.R., WILSON, K., SAM, M.J., KENNEDY, S.E., MACKMAN, N.B., CHARLESWORTH, J.A., ERLICH, J.H. The development of cardiac fibrosis in low tissue factor mice is gender-dependent and is associated with differential regulation of urokinase plasminogen activator. **J Mol Cell Cardiol.** v. 42 (3), p. 559-571, 2007.

DAVIS, J.A., MILLER, G.F., CLAIRE, M.F.S. Spontaneous rhabdomyosarcomas in (A/Jx<sup>CBA</sup>/J)F1 mice Carcinoid tumours. **Contemp Top Lab Anim Sci.** v.36 (1), p.87-89, 1997.

DISATNIK, M.H., DHAWAN, J., YU, Y., BEAL, M.F., WHIRL, M.M., FRANCO, A.A., RANDO, T.A. Evidence of oxidative stress in *mdx* mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **J Neurol Sci.** v. 161, p. 77-84, 1998.

DONNINI, S., MONTI, M., RONCONE, R., MORBIDELLI, L., ROCCHIGIANI, M., OLIVIERO, S., CASELLA, L., GIACHETTI, A., SCHULZ, R., ZICHE, M. Peroxynitrite inactivates human tissue inhibitor of metalloproteinase-4. **FEBS Lett.** v.582, p.1135-1140, 2008.

DRENNING, J.A., LIRA, V.A., SIMMONS, C.G., SOLTOW, Q.A., SELLMAN, J.E., CRISWELL, D.S. Nitric oxide facilitates NFAT-dependent transcription in mouse myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.294, p.C1088–C1095, 2008.

DURBEEJ, M., CAMPBELL, K. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. **Curr Opin Gen Develop.** v. 12, p. 349-361, 2002.

ENGEL, A.G., YAMAMOTO, M., FISCHBECK, K.H. Dystrophinopathies. In: ENGEL, A.G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology.** v.2 , p. 1130-1187, 1994.

FINSTERER, J., STOLLBERGER. Primary myopathies and the heart. **Scand Cardiovasc J.** v.42, p. 9-24, 2008.

FRANKEL, K.A., ROSSER, R.J. The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: Epimyocardial fibrosis. **Hum Pathol.** v.7 (4), p.375-386, 1976.

GAILLY, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. **Biochem Biophys Acta.** v.1600, p.38-44, 2002.

GILROY, J., CAHALAN, J.L., BERMAN, R., NEWMAN, M. Cardiac and pulmonary complications in Duchenne's progressive muscular dystrophy. **Circulation.** v.27, p.484-493, 1963.

GOETZ, G.J., LAJOIE, P., WISEMAN, I.R.N. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. **Câncer Metastasis Rev.** v.27, p. 484-493, 2008;

GROUND, M.D., RADLEY, H.G., LYNCH, G.S. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol Dis.** v.31, p.1-19, 2008.

HANIA, K., GAYRAUD, J., HUGON, G., RAMONATXO, M., PORTE, S.D.L., MATECKI, S., MORNET, D. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor-kappa B/matrix metalloproteinase cascade in *mdx* muscle fibers. **Am J Pathol.** v.172, p.1509-1519, 2008.

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.

HOLTERMAN, C.E., RUDNICK, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. **J Biophys Biochem Cytol.** v.9, p.575-584, 2005.

KELLER, C., CAPECCHI, M.R. New Genetic Tactics to Model Alveolar Rhabdomyosarcoma in the Mouse. **Cancer Res.** v.65, p.7530-7532, 2005.

KERMADEC, J.M., BECANE, H.M., CHENARD, A., TERTRAIN, F., WEISS, Y. Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: an echocardiographic study. **Am Heart J.** v.127 (3), p.618-23, 1994.

KJELLGREN, D., THORNELL, L., ANDERSEN, J., PEDROSA-DOMELLOF, F. Myosin Heavy Chain Isoforms in Human Extraocular Muscles. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.44, p.1419–1425, 2003.

KORFAGE, J.A.M., VAN EIJDEN. Myosin isoform composition of the human medial and lateral pterygoid muscles. **J Dent Res.** v.79 (8), p.1618-1625, 2000.

LEFAUCHEUR, J.P., PASTORET, C., SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec.** v. 242, p.70-76, 1995.

LUZ, M., MARQUES, M., NETO, H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. **Braz J Med Biol Res.** v. 35 (6), p. 691-695, 2002.

MANZUR, A.Y., KUNTZER, T., PIKE, M. SWAN, A. **Cochrane Database Syst Rev.** v.1: CD003725, 2008.

MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Braz J Morphol Sci.** v. 21 (3), p.145-152, 2004.

MARQUES, M.J., OGGIAM, D.S., BARBIN, I.C.C., FERRETTI, R., SANTO NETO, H. Long-term therapy with deflazacort decreases myocardial fibrosis in *mdx* mice. **Muscle Nerve**, 2009 in press.

MARQUES, M.J., PERTILLE, A., CARVALHO, C.L.T., SANTO NETO, H. Acetylcholine Receptor Organization at the Dystrophic Extraocular Muscle Neuromuscular Junction. **Anat Rec.** v.290, p.846–854, 2007.

MEISSNER, J.D., UMEDA, P.K., CHANG, K.C., GROS, G., SCHEIBE, R.J. Activation of the  $\beta$  myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300 and the calcineurin/NFATc1 pathway. **J Cell Physiol.** v.211, p.138–148, 2007.

MERLINO, G., HELMAN, L.J. Rhabdomyosarcoma - working out the pathways. **Oncogene.** v.18. p.5340-5348, 1999.

MONEMI, M., ERIKSSON, P., DUBAIL, I., BUTLER-BROWNE, S.G., THORNELL, L. Fetal myosin heavy chain increases in the human masseter muscle during aging. **FEBS Lett.** v.386, p.87-90, 1996.

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

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

MU, L., SU, H., WANG, J., HAN, Y., SANDERS, I. Adult Human Mylohyoid Muscle Fibers Express Slow-Tonic,  $\alpha$ -Cardiac, and Developmental Myosin Heavy-Chain Isoforms **Anat Rec.** part A, v.279, p.749-760, 2004.

MUNTONI, F. Cardiomyopathy in muscular dystrophies. **Curr Opin Neurol.** v.16 (5), p.577-83, 2003.

NANNI, P., NICOLETTI, G., GIOVANNI, C., CROCI, S., ASTOLFI, A., LANDUZZI, L. CARLO, E., IEZZI, M., MUSIANI, P., LOLLINI, P. Development of Rhabdomyosarcoma in HER-2/neu Transgenic p53 Mutant Mice. **Cancer Res.** v.63, p.2728-2732, 2003.

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

NOMURA, H., HIZAWA, K. Histopathological study of the conduction system of the heart in Duchenne progressive muscular dystrophy. **Acta Pathol Jpn.** v.32 (6), p.1027-1033, 1982.

PACHER, P., BECKMAN, J.S., LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev.** v.87, p.315-424, 2007.

PEDROSA-DOMELLOF, F., HOLMGREN, Y., LUCAS, C.A., HOH, J.F., THORNELL, L.E. Human extraocular muscles: unique pattern of myosin heavy chain expression during myotube formation. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.41, p.1608-1616, 2000.

PERLOFF, J.K., ROBERTS, W.C, DELEON, A.C, ODOHERTY D. Distinctive electrocardiogram of Duchenne progressive muscular dystrophy—an electrocardiographic-pathologic correlative study. **Am J Med.** v.42, p.179-188, 1967.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Mol Cell Biochem.** v. 179 (1-2), p. 111-123, 1998.

POLITANO, L., Nigro, V., Nigro, G. Development of cardiomyopathy in female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. **JAMA.** v.275, p. 1335–1338, 1996

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.** v. 12 (15), p. 1813-1821, 2003.

QUINLAN, J.G., HAHN, H.S., WONG, B.L., LORENZ, J.N., WENISCH, A.S., LEVIN, L.S. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. **Neuromuscul Disord.** v.14, p. 491-496, 2004.

RANDO, T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve.** v. 24, p.1575-1594, 2001.

ROY, B.K.U., RIAL, S.N., KACHEL, L.K., GERNER, W.E. Activated K-RAS Increases Polyamine Uptake in Human Colon Cancer Cells through Modulation of Caveolar Endocytosis. **Mol carcinog.** v.47, p.538-553, 2008.

SANYAL, S.K., JOHNSON, W.W., THAPAR, M.K., PITNER, S.E. An ultrastructural basis for electrocardiographic alterations associated with Duchenne's progressive muscular dystrophy. **Circulation.** v.57, p.1122-1129, 1978.

SCHWENCKE, C., Braun-Dullaes, R.C., Wunderlich, C., STRASSER, H.R. Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. **Cardiovascul Res.** v.70, p.42-49, 2006.

SHEN, J.A., LEE, W.S., LI, Y. Interaction of caveolin-1, nitric oxide, and nitric oxide synthases in hypoxic human SK-N-MC neuroblastoma cells. **J Neurochem.** v.107 (2), p.478-487, 2008.

SHIELDS, J.A., SHIELDS, C.L. Rhabdomyosarcoma: review for the Ophthalmologist. **Surv Ophthalmol.** v. 48 (1), p.39 – 57, 2003.

SIMKO, F., LUPTAK, I., MATUSKOVA, J., KRAJCIROVICOVA, K., SUMBALOVA, Z., KUCHARSKA, J., GVOZDJAKOVA, A., SIMKO, J., BABAL, P., PECHANOVA, O., BERNATOVA, I. L-arginine fails to protect against myocardial remodeling in L-NAME-induced hypertension. **Eur J Clin Invest.** v.35. p.362-368, 2005.

SPINALE, F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. **Physiol Rev.** v. 87, p. 1285-1342, 2007.

STEDMAN, H.H., SWEENEY, H.L., SHRAGER, J.B., MAGUIRRE, 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, p.536-539, 1991.

SWYNGHEDA UW, B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. **Physiol Rev.** v.79 (1), p. 215-262, 1999.

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

THOMAS, D.D., RIDNOUR, L.A., ISENBERG, J.S., FLORES-SANTANA, W., SWIZER, C.H., DONZELLI, S., HUSSAIN, P., VECOLI, C., PAOLOCCI, N., AMBS, S., COLTON, C.A., HARRIS, C.C., ROBERTS, D.D., WINK, D.A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radic Biol Med.** v.45, p.18-31, 2008.

TIDBALL J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.288, p.345–R353, 2005.

TIFFIN, N., WILLIAMS, R.D., SHIPLEY, J. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. **Br J Cancer.** v.89, p.327-332, 2003.

TORO, J.R., TRAVIS, L.B., WU, H.J., ZHU, K., FLETCHER, C.D.M., DEVESA, S.S. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the Surveillance, Epidemiology and End Results program, 1978–2001: an analysis of 26,758 cases. **Int J Cancer**. v.119, p.2922-2930, 2006.

TRUPIN, L.G., HSU, L., HSIEH, Y. Satellite Cell mimics in regenerating skeletal muscle. **Muscle Regen**. p.101-114, 1979.

VAN ERP, C., HOEY, A. Effect of L-arginine on cardiac function in *mdx* mice. **J Mol Cell Cardiol**. v.37, p.161-375, 2004.

VOISIN, V., SÉBRIÉ, C., MATECKI, S., YU, H., GILLET, B., RAMONATXO, M., ISRAEL, M., DE LA PORTE, S. L-arginine improves dystrophyc phenotype in *mdx* mice. **Neurobiol Dis**. v.20, p.123-130, 2005.

WAKAI, S., MINAMI, R., KAMEDA, K., OKABE, M., NAGAOKA, M., ANNAKA, S., HIGASHIDATE, Y., TOMITA, H., TACHI, N. Electron microscopic study of the biopsied cardiac muscle in Duchenne muscular dystrophy. **J Neurol Sci**. v.84, p.167-175, 1988.

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**. v.14 (14), p.1921-1933, 2005.

WEXLER, L.H., HELMAN, L.J. Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In: P.A. Pizzo and D.G. Poplack, Editors, **Principles and Practice of Pediatric Oncology**, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia. p.799–829, 1997.

**8. TRABALHO SUBMETIDO** (*Juornal of Cardiac Failure – Anexo 2*)

**8. TRABALHO SUBMETIDO NO “*JOURNAL OF CARDIAC FAILURE*”**

---

**Long-term administration of L-arginine does not attenuate myocardial fibrosis in dystrophin deficient *mdx* mice: an histomorphometric analyses.**

Maria Julia Marques, Isabel Cristina Chagas Barbin, Daniela Silva Oggian, Renato Ferretti, Humberto Santo Neto.

Correspondence should be addressed to:

Humberto Santo Neto,

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia,

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),

CP 6109, Campinas, 13084-971.

SP, Brazil.

Phone: (55)-(19)-3788-6395

Fax: (55)-(19)-3289-3124

email: [marques@unicamp.br](mailto:marques@unicamp.br)

## Abstract

Progressive myocardial fibrosis (MF) leading cardiac failure contributes significantly to death in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Nitric oxide-based therapy has been proposed to retard growing MF in DMD and a leading candidate is L-arginine (L-arg). Treatment for DMD is for all life but whether the long-term therapy with L-arginine affects MF is unknown. Here we examined the effects of a 15-month L-arg treatment on the progression of MF in *mdx* mice, an animal model for DMD. The MF was estimated by histomorphometric methods. MF was not affected ( $29.5 \pm 2.5\%$  of MF for control vs  $31.4 \pm 2\%$  of MF for L-arg-treated;  $P > 0.05$ ) although the density of inflammatory cells was reduced by 41% in L-arg treated mice. We conclude that long-term administration of L-arg failed to prevent MF in *mdx* mice and suggest that it may be no beneficial to treat MF in DMD.

**Keywords:** L-arginine, Duchenne, *mdx*, myocardial fibrosis, cardiomyopathy

## INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common X-linked disease, affecting 1 in 3,500 newborn males. It is a fatal form of muscular dystrophy caused by the absence of dystrophin, a protein that supports the plasma membrane in skeletal and cardiac muscle fibers<sup>1</sup>. One-third of DMD patients show signs of cardiac dysfunction by mid-teenage and virtually all DMD patients develop cardiac dysfunction by the end of their life.

Eventually, 10-40% of DMD patients die from cardiac failure and progressive accumulation of myocardial fibrosis (MF) play a role on that <sup>[2], [3], [4], and [5]</sup>.

The *mdx* mice, an animal model for DMD, exhibit MF similar to that observed in humans<sup>6</sup>. Loss of dystrophin is accompanied by decrease of dystrophin-associated glycoprotein complex, which includes nitric oxide synthase (NOS). Decreased levels of nitric oxide (NO), secondary to decrease of NOS has been associated to cardiac involvement and restoration of neural NOS activity was found to limit MF in *mdx* mice <sup>7</sup>. Hence, NO-based therapy has been proposed to cardiac involvement in DMD and L-arginine (2-amino-5-guanidinovaleric acid), the substrate for NOS, has emerged as a pharmacological candidate for that <sup>[7] and [8]</sup>

The effect of L-arginine therapy can be beneficial or harmful depending on the duration of administration <sup>[9] and [10]</sup>. Lifelong pharmacological therapy is required since there is no definitive cure for DMD. In this study we examined whether MF is affected by long-term (15 months) treatment with L-arginine, in the *mdx* mice.

## **METHODS**

### **Experimental Design**

Experimental procedures were conducted in strict accordance with guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by our Institutional Animal Care and Use Committee. Twenty male 6 month-old *mdx* mice were used (n=20). Animals were treated with L-arginine (Sigma, St Louis) in drinking water (8 mg/kg/day). Control *mdx* mice (n=10) received water only. After 15 months of treatment, the

animals (L-arginine-treated and 10 controls) were deeply anesthetized with a mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (Ketalar®, Parke Davies) and thiazine hydrochloride (Rompum®, Bayer) at a dose of 0.02 mg/kg (intraperitoneal route). The chest was opened just to the left of sternum and the hearts were dissected out.

#### Tissue preparation and morphometric analysis

Hearts were flash frozen in cooled isopentane and mounted in Tragacanth (Sigma–Aldrich, USA). Subsequently, 7 µm myocardial sections were obtained from the right and left ventricle, anterior and posterior wall, lateral wall and interventricular septum. Slides were stained with Masson’s trichrome or hematoxylin and eosin (H&E).

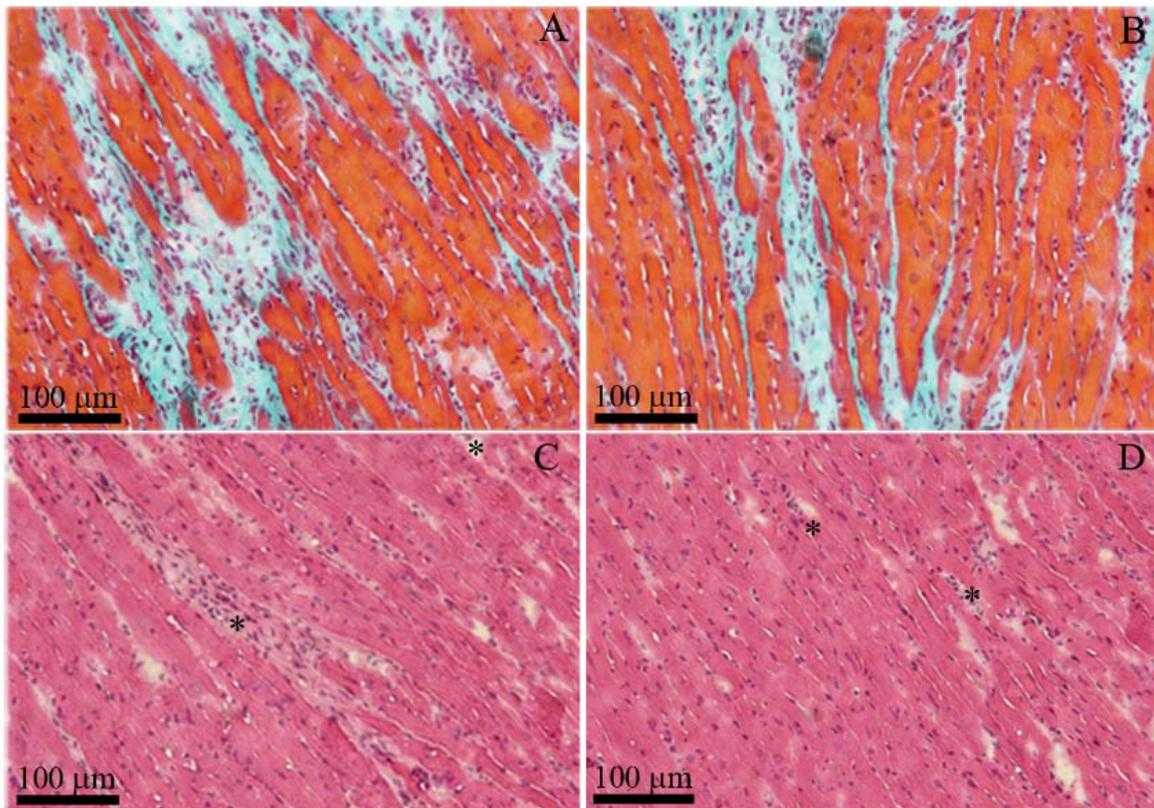
Myocardial sections (endocardial, mid-myocardial, and epicardial) were examined under 400x magnification (Nikon Eclipse E400, Nikon Inc. For quantification of myocardial fibrosis, areas of trichrome stained sections were calculated as a percentage of the total heart area using the NIS-Elements (Advanced Research (USA). Under × 400 magnifications, the density of inflammatory cells was manually counted from 10 randomly selected areas in a blinded fashion based on morphology of nuclei and cell size. The investigator responsible was unaware of the corresponding groups for slides examined.

#### Statistical analysis

All values are expressed as means ± SEM. To determine significance between two groups, comparisons were made using the unpaired *Student’s t*-tests with  $P < 0.05$  considered statistically significant.

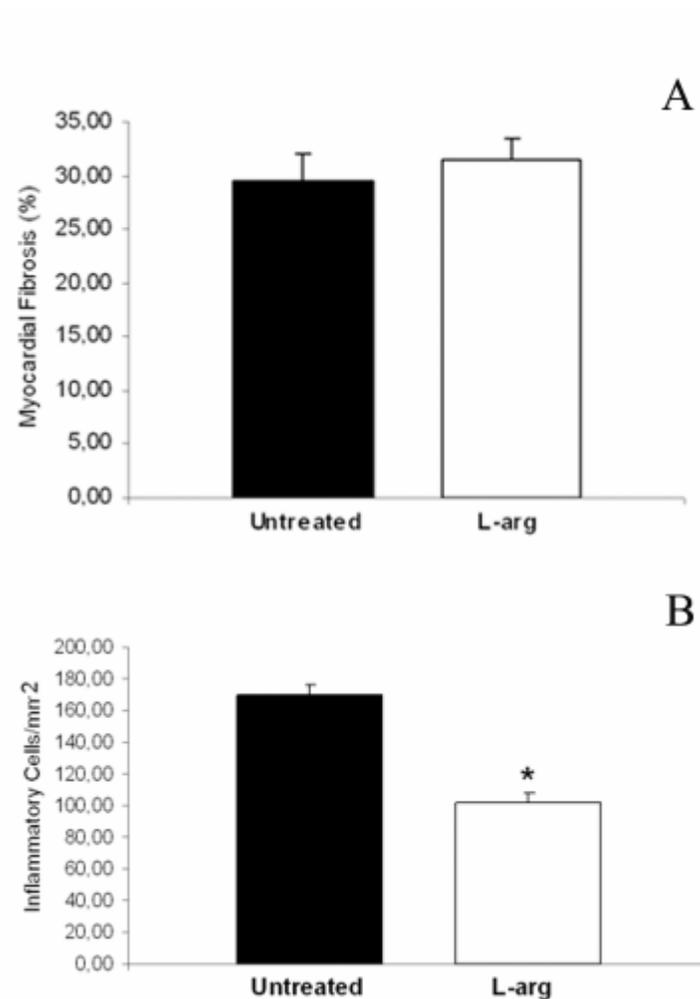
## RESULTS

No qualitative histological differences were found between hearts of control and L-Arg treated mice. As identified in by Masson's trichrome hearts showed unambiguous foci of interstitial fibrosis distributed along endocardium, myocardium and epicardium in atrium, ventricular and interventricular septum (Fig.1A, B). Slices stained with hematoxylin-eosin showed inflammatory infiltrate formed distinct multifocal aggregates between cardiac myocytes which sometimes were eosinophilic with vacuolar changes disarrangement of striations (Fig.1 C, D).



**Figure 1:** Heart sections of the mice *mdx* which received L-arginine for 60 weeks (B and D) and control animals (A and C). In A and B fibrosis areas (Masson's trichrome staining). In C and D, inflammatory infiltrate areas (\*) H&E staining.

Quantitative analysis show that (Fig. 2, chart A) the mean area of MF in L-arg-treated mice was not different ( $p>0.05$ ) from that of the control group, after 15 months of L-arginine treatment ( $29.5 \pm 2.5\%$  of MF for control vs  $31.4 \pm 2\%$  of MF for L-arg-treated). The density of inflammatory cells (Fig 2, chart B) was significantly lower in L-arginine-treated mice compared to control ( $169 \pm 12$  cells/ $\text{mm}^2$  in control vs  $102 \pm 9$  cells/ $\text{mm}^2$  in L-arginine-treated).



**Figure 2:** Chart A: graphic representation of the cardiac fibrosis area (%) in the control *mdx* animals and in the ones which received L-arginine after 60 weeks. Chart B: graphic representation of the inflammatory cells density in both groups, control and L-arginine.

## DISCUSSION

Previous studies had shown that MF was unchanged by 6 months treatment with L-arginine, but the age in which *mdx* mice started to be treated is not mentioned<sup>8</sup>. In *mdx* mice MF begins to be detectable by 8 months old by histopathological analysis<sup>6</sup> and in this study *mdx* mice began to receive L-arg before significant histopathological signs of fibrosis are seen (Fig 1 A) and received L-arg during 15 months. Considering that the average life span of the *mdx* is 22 months<sup>11</sup>, the 15-month therapy period represents about 68% of its lifetime. No morphometric differences in MF were seen between untreated and treated-*mdx* mice, providing evidence that long-term administration of L-arg may not be effective to reduce MF in dystrophin-deficient hearts. This finding may be of clinical relevance since any pharmacological therapy in DMD is for long-time periods.

It is interesting to note that the density of inflammatory cells was reduced by about 41% in hearts from L-arg treated *mdx* mice, which is consistent with the fact that nitric oxide (NO) and L-arg itself may have anti-inflammatory activities<sup>[12] and [13]</sup>. Although cardiac fibroblast proliferation is multifactorial in nature it is well established that inflammation plays a pivotal role in the development of MF<sup>14</sup>. In transgenic *mdx* mice over expressing NOS the reduction of the inflammatory reaction corresponds with a decrease in MF and decreasing inflammation with glucocorticoid reduces significantly MF in *mdx* mice<sup>[7] and [15]</sup>. However, we did not observed a reduction in MF with long-term L-arg treatment and one possibility to explain this finding is the fact that L-arg may have pro-fibrotic actions effects beyond its anti-inflammatory action in hearts from *mdx* mice. Support for this interpretation comes from findings showing that the treatment with NO donor including L-arg increased renal and hepatic fibrosis in absence of inflammation<sup>[16] and [17]</sup>.

Extracellular matrix remodeling is regulated by metalloproteinases and production of MF may reflect an imbalance between extracellular matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-2 in cardiac fibroblasts [13], [18] and [19]. When cardiac fibroblasts are exposed to a NO donor, expression and activity of metalloproteinases-2 is stimulated [20] and [21] and long-term L-Arg administration can result in higher levels of NO. High levels of NO in the presence of reactive oxygen species may increase the oxidative stress through superoxide and hydrogen peroxide production, which in turn are known to activate matrix metalloproteinase-2 [9] [10] [13] [34] and [24]. We speculate that this mechanism may explain why MF was not affected, despite the inflammatory reaction had been significantly reduced in L-arg treated group.

Plasma L-arginine levels or NO expression in cardiac tissue were not evaluated in the present study. Thus, it could be possible that the inability of L-arg to protect against progression of MF was caused by an inadequate dose of L-arg, rather than its inability to exert an anti-fibrotic effect. The fact that the density of inflammatory cells was reduced in this study and that the dosage we used here showed to be effective in others experimental situations in mice<sup>25</sup> do not support this view. In addition, others studies using higher doses of L-arg for a shorter period of time did not observe any effects on cardiac fibrosis in non dystrophic and *mdx* mice. [8] and [26].

In conclusion, the current study shows that long-term administration of L-arginine failed to prevent myocardial fibrosis *mdx* mice. Because treatment is for all life and assuming that the pathophysiological mechanism underlying cardiac fibrosis is similar between DMD and *mdx* mice the present results do not support the use of L-arginine as a NO-based therapy to MF in order to retard death by cardiac failure in DMD. This view is supported by the fact

that no benefit has been observed by L-arginine long-term administration in others human cardiovascular diseases<sup>27</sup>.

## REFERENCES

1. E.P. Hoffman, R.J. Brown and L.M. Kunkel, Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell* **51** (1987), pp. 919–9281
2. K.A. Frankel and R.J. Rosser, The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: Epimyocardial fibrosis, *Hum Pathol* **7** (1976), pp. 375–386
3. L.W. Markham, R.L. Spicer, P.R. Khoury, B.L. Wong, K.D. and L.H. Cripe, Steroid therapy and cardiac function in Duchenne muscular dystrophy, *Pediatr Cardiol* **26** (2007), pp. 768-771
4. G. Nigro, L.I. Comi, L. Politano and R.J.I. Bain, The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy, *Int J Cardiol* **26** (1990), pp.271-277
5. J. Finsterer and C. Stollberger, Primary myopathies and the heart, *Scand Cardiovasc J* **42** (2008), pp. 9-24
6. J. Quinlan, H. Hahn, B. Wong, J. Lorenz, A. Wenisch and L. Levin, Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings, *Neuromuscul Disord* **14** (2003), pp. 491-496

7. M. Wehling-Henricks, M.C. Jordan, K.P. Roos, B. Deng and J.G. Tidball, Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium, *Hum Mol Genet* **14** (2005), pp.1921-1933
8. C. Van Erp and A. Hoey, Effect of L-arginine on cardiac function in *mdx* mice, *Neuromusc Disord* **37** (2004), pp. 161-375
9. R.H. Boger, L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? , *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11** (2008) pp, 55-61
10. P. Pacher, J.S. Beckman and L. Liaudet, Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, *Physiol Rev* **87** (2007), pp. 315-424
11. S. J. Chamberlain, J. Metzger, M. Reyes, D. Townsend and A. J. Faulkner, Dystrophin-deficient *mdx* mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma, *FASEB J* **21** (2007), pp. 2195-2204
12. L. Morbidelli, S. Donini and M. Ziche, Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis, *Curr Pharm Des* **9** (2003), pp. 521-530
13. K. Hnia , J. Gayraud, G. Hugon , M. Ramonatxo, S.D.L. Porte, S. Matecki and D. Mornet, L-Arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor-kappa

B/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers, *Am J Pathol* **172** (2008), pp. 1509-1519

14. F.G. Spinale, Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function, *Physiol Rev* **87** (2007), pp. 1285-1342

15. M. J. Marques, D. S. Oggiam, I.C.C. Barbin, R. Ferretti and H. Santo Neto, Long-term therapy with deflazacort decreases myocardial fibrosis in *mdx* mice, *Muscle Nerve* (2009), in press

16. W. Eberhardt and J. Pfeilschifter, Nitric oxide and vascular remodeling: Spotlight on the kidney, *Kidney Int* **72** (2007), pp. S9-S16

17. K. Migita, Y. Maeda and S. Abiru, Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells, *FEBS Lett* **579** (2005), pp. 3119-3125

18. J. Benjamin, Matrix metalloproteinases: from biology to therapeutic strategies in cardiovascular disease, *J Investig Med* **49** (2001), pp. 381-397

19. F.G. Spinale, Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart, *Circ Res* **90** (2002), pp. 520–530
20. S.M. McCarthy, P.F. Bove and D.E. Matthews, Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of the cysteine switch, *Biochemistry* **47** (2008), pp.5832-5840
21. X.G. Guo, H.Y. Uzui and T.H. Mizuguchi, Imidaprilat inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in human cardiac fibroblasts induced by interleukin-1 beta via NO-dependent pathway, *Int J Cardiol* **126** (2008), pp.414-420
22. D. Chazalotte, K. Hnia, F. Rivier, G. Hugon and D. Mornet, Alpha 7B integrin changes in *mdx* mouse muscles after L-arginine administration, *FEBS Lett* **579** (2005), pp.1079-1084
23. S. Donnini, M. Monti, R. Roncone, L. Morbidelli, M. Rocchigiani, S. Oliviero, L. Casella, A. Giachetti, R. Schulz and M. Ziche, Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4, *FEBS Lett* **582** (2008), pp.1135-1140
24. D.D. Thomas, L.A. Ridnour, J.S. Isenberg, W. Flores-Santana, C.H. Switzer, S. Donzelli, P.Hussain, C.Vecoli, N. Paolocci, S. Ambs, C.A. Colton, C.C. Harris, D.D. Roberts and D.A. Wink, The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling, *Free Radic Biol Med* **45** (2008), pp. 18-31

25. H. Santo Neto, U.V. VOMERO and M.J. MARQUES, L-arginine enhances muscle regeneration after experimental envenomation by *B. jararacussu*: A future for nitric oxide-based therapy? *Toxicon* **48** (2006), pp.353–357
26. F. Simko, I. Luptak, J. Matuskova, K. Krajcirovicova, Z. Sumbalova, J. Kucharska, A. Gvozdjakova, J. Simko, P. Babal, O. Pechanova and I. Bernatova, L-arginine fails to protect against myocardial remodeling in L-NAME-induced hypertension, *Eur J Clin Invest* **35** (2005), pp.362-368
27. A. M. Wilson, R. Harada and N. Nair, L-arginine supplementation in peripheral arterial disease - No benefit and possible harm, *Circulation* **116** (2007), pp.188-195



## 9. ANEXOS

### ANEXO 1: Certificado da Comissão de Ética em experimentação animal, Instituto de Biologia-UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

#### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

#### CERTIFICADO

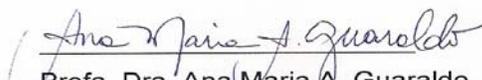
Certificamos que o Protocolo nº 1263-1, sobre "Efeito da L-arginina no tecido cardíaco de camundongos mdx: estudos histomorfológico e imunohistoquímico", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Humberto Santo Neto / Isabel Cristina Chagas Barbin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de maio de 2007.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1263-1, entitled "\_\_\_\_\_", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 28, 2007.

Campinas, 08 de março de 2007.

2<sup>A</sup>. VIA

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**ANEXO 2:** Confirmação da submissão para a revista *Journal of Cardiac failure* do trabalho intitulado “Long-term administration of L-arginine does not attenuate myocardial fibrosis in dystrophin deficient *mdx* mice: an histomorphometric analyses”.

**Maria Julia Marques**

---

**De:** "Journal of Cardiac Failure" <schristiansen@hfsa.org>  
**Para:** <marques@unicamp.br>  
**Enviada em:** quarta-feira, 18 de março de 2009 12:24  
**Assunto:** A manuscript number has been assigned

Dear Prof. Marques,

Your submission entitled "Myocardial fibrosis is unaltered by long-term administration of L-arginine in dystrophin deficient *mdx* mice: a histomorphometric analysis" has been assigned the following manuscript number: 092645.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/cardfail/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Cheryl Yano  
Managing Editor  
Journal of Cardiac Failure

## ANEXO 3: Declaração do Comitê de Ética.

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada “ADMINISTRAÇÃO DE L-ARGININA: EFEITOS SOBRE A FIBROSE MIOCÁRDICA E AUMENTO DA CARCINOGENÊSE EM CAMUNDONGOS *mdx*”:

( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

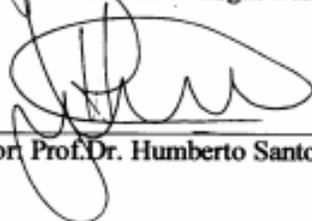
( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

( X ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1263-1).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).



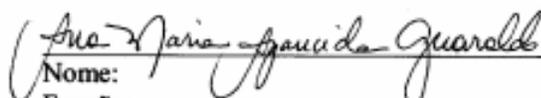
Aluna: Isabel Cristina Chagas Barbin



Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/IB - UNICAMP