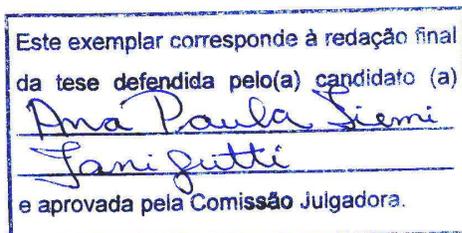




**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**ANA PAULA TIEMI TANIGUTI**

**FIBROSE MUSCULAR EM CAMUNDONGOS *MDX*: EFEITOS  
DO EXERCÍCIO FÍSICO E AGENTE ANTI-FIBRÓTICO**



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

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques**

**Campinas, 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

T156f

Taniguti, Ana Paula Tiemi  
Fibrose muscular em camundongos *mdx*: efeitos do  
exercício físico e agente anti-fibrótico / Ana Paula Tiemi  
Taniguti. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Maria Julia Marques.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Distrofia muscular animal. 2. Camundongo *mdx*. 3.  
Músculos - Fibrose. 4. Suramina. 5. Fator transformador  
de crescimento beta. I. Marques, Maria Julia, 1961-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in *mdx* mice by suramin, a TGF-  $\beta$ 1 blocker.

**Palavras-chave em inglês:** Animal muscular dystrophy; *Mdx* mice; Muscle - Fibrosis; Suramin; Transforming growth factor beta.

**Área de concentração:** Anatomia.

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

**Banca examinadora:** Maria Julia Marques, Katashi Okoshi, Luis Garcia Alonso, Maeli Dal Pai Silva, Maria Luisa Moraes Barreto Chaves.

**Data da defesa:** 18/02/2011.

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

Campinas, 18 de Fevereiro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

  
Assinatura

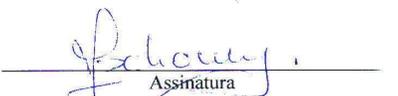
Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

  
Assinatura

Prof. Dr. Luis Garcia Alonso

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Luisa Morais Barreto Chaves

  
Assinatura

Prof. Dr. Katashi Okoshi

  
Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Aos meus pais e familiares  
pelo amor e apoio cúmplice e incondicional.**

*Para estar junto não é preciso estar perto, e sim do lado de dentro.*

*Leonardo da Vinci*

*Agradeço...*

**A Deus por me conceder a oportunidade de realizar o doutorado e por  
colocar sempre em meu caminho pessoas amigas e preciosas.**

*Sede para mim uma rocha de refúgio,*

*Uma fortaleza bem armada para me salvar.*

*Pois que só vós sois minha rocha e fortaleza,*

*Haveis de me guiar e dirigir, por amor de vosso nome.*

*Salmo 30*

*Agradecimento especial...*

**À Profa. Dra. Maria Julia Marques, minha orientadora e mestre, pela  
orientação recebida, amizade e confiança.**

*Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.*

*Isaac Newton*

## ***Agradecimento...***

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

À CNPq, CAPES/PROEX e FAPESP pelo auxílio financeiro deste projeto.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto, com grande estima, pela amizade, incentivo e conhecimentos adquiridos ao longo desses anos e pelas valiosas sugestões para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Pertille pela imensa amizade, apoio e dedicação. Muito obrigada pela disponibilidade de me ensinar pacientemente a técnica de western blot imprescindível para a realização deste trabalho e pelas considerações dadas no Exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Elaine Minatel que acompanhou toda minha pós-graduação, pela imensa amizade, respeito e considerações.

À Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, a quem admiro muito, pela amizade, respeito, apoio e conhecimentos transmitidos durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pela amizade, grande respeito, disponibilidade e conhecimentos adquiridos.

Ao Prof. Dr. José Ângelo Camilli pela amizade, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva pelo respeito, atenção, disponibilidade e pelas sugestões dadas durante a pré-banca e banca. Muito obrigada pela receptividade e oportunidade de aprender e realizar a técnica de PCR-RT real time fundamental para confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

Ao Prof. Edson Rosa Pimentel pela amizade, atenção, disponibilidade e pela valiosa oportunidade de aprender técnica de zimografia que complementou de modo crucial a elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni pela atenção, disponibilidade e pela oportunidade ímpar de realizar a técnica miográfica para verificar a força de contração do diafragma *in vitro*.

Ao Prof. Katashi Okoshi pela imensa atenção, disponibilidade e pelas importantes sugestões dadas na pré-banca e banca. Muito obrigada pela receptividade e dedicação na realização de ecocardiografia dos camundongos *mdx*.

Ao Prof. Luis Garcia Alonso pela atenção e pela disponibilidade em participar de minha pré-banca e banca.

À Profa. Dra. Maria Luisa Morais Barreto Chaves pela atenção e disponibilidade em participar de minha banca.

À Profa. Mary Anne Heide Dolder pela atenção, disponibilidade e pelas importantes sugestões dadas no Exame de Qualificação.

À Profa. Ana Maria Guaraldo pela atenção, disponibilidade e pelas importantes sugestões dadas no Exame de Qualificação.

Ao Gildo Bernardo Leite, biólogo do Departamento de Farmacologia/Unicamp, pela imensa atenção, receptividade e disponibilidade em realizar a preparação do músculo diafragma para a técnica de miografia *in vitro*.

À Fernanda Losi Alves de Almeida pela amizade, apoio e imensa atenção despendida para ensinar pacientemente a técnica de PCR-RT real time.

À Andrea Aparecida de Aro pela amizade e disponibilidade em ensinar a técnica de zimografia.

Ao Norivaldo Celestini e Marcos Aurélio Ribeiro pela inestimável amizade, apoio e auxílio nos procedimentos experimentais.

À Marlene Lima pela amizade e manutenção e cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

À Lilian Alves Senne Panagio pela amizade, atenção e auxílio durante toda a pós-graduação.

À Érika da Silva Campos, Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos, Stella Maris Fick de Ferraz, Toni Donizetti dos Santos e Carlos Gonçalves (*in memoriam*) pelo apoio e convívio ao longo desses anos.

À Cíntia Yuri Matsumura, minha amiga e companheira de laboratório, pela imensa amizade, dedicação, apoio e amadurecimento pessoal e profissional. Muito obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e pela ajuda imprescindível para realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Adriana Fogagnolo Maurício, Drielen de Oliveira Moreira, Érica Benjamim da Silva, Isabel Cristina Chagas Barbin, Juliano Alves Pereira, Letícia Montanholi Apolinário, Luis Henrique Rapucci, Matheus Bersan Rovere, Natália da Costa Pinheiro, Paula Spanopoulos Perez, Rafael Ventura Machado, Renato Ferretti, Samara Camaçari de Carvalho, Tereza Cristina Pessoa Albuquerque pela amizade, apoio e aprendizagem diária ao longo desses anos.

Aos meus amigos de pós-graduação Amanda Cia Hetzl, Camila Marques Freria, Eduardo Marcelo Cândido, Fábio Montico, Gustavo Ferreira Simões, Leslie Cristina Pinto, Renata Zanon, Sheila Cristina Victorio, Wagner José Fávaro e Wilson Romero Nakagaki pelo grande carinho e amizade construída.

*A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana*

*Louis Pasteur*

**Sumário****Lista de abreviaturas****Resumo****Abstract**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1.1. Apresentação.....</b>	<b>02</b>
<b>1.2. Distrofia muscular de Duchenne.....</b>	<b>03</b>
<b>1.3. Camundongo <i>mdx</i>.....</b>	<b>05</b>
<b>1.4. Fibrose muscular e fator de crescimento transformador beta-1 (TGF-<math>\beta</math>1).....</b>	<b>07</b>
<b>1.5. Suramina.....</b>	<b>09</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Grupos experimentais.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Protocolo experimental.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Exercício de corrida em esteira em alta intensidade.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Tratamento com suramina.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Marcação de fibras musculares com azul de Evans.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Análise histológica.....</b>	<b>18</b>
<b>3.7. Estudo <i>in vitro</i> da força de contração do diafragma.....</b>	<b>19</b>
<b>3.8. Determinação de creatina-quinase no plasma sanguíneo.....</b>	<b>20</b>
<b>3.9. Medida da força de tração dos membros anteriores.....</b>	<b>21</b>
<b>3.10. Western blot.....</b>	<b>22</b>
<b>3.11. Análise estatística.....</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Análise histológica.....</b>	<b>25</b>

<b>4.2. Quantificação da enzima creatina-quinase no plasma sanguíneo.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Massa corporal e medida da força de tração dos membros anteriores.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4. Estudo <i>in vitro</i> da força de contração do diafragma.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5. Western blot.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1. Efeito do exercício físico no músculo distrófico.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2. Efeito da suramina no músculo distrófico.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>8. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>9. DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>74</b>

**Lista de abreviaturas**

**AE** - azul de Evans

**BB** – músculo bíceps braquial

**CK** - creatina-quinase

**DABCO** – 1,4-diazabicyclo octano

**DIA** – músculo diafragma

**DMD** – distrofia muscular de Duchenne

**EGF** – fator de crescimento epidermal

**FGF** – fator de crescimento fibroblástico

**GAPDH** - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

*mdx* – distrofia muscular ligada ao cromossomo X

**PDGF** – fator de crescimento derivado de plaquetas

**TA** – músculo tibial anterior

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

**VEGF** – fator de crescimento endotelial vascular

## Resumo

O camundongo *mdx* é o animal mais utilizado como modelo da distrofia muscular de Duchenne (DMD), diferindo dos humanos doentes por apresentar ciclos de regeneração muscular e reduzida fibrose. Este trabalho tem como objetivos: **1.** desenvolver protocolo experimental para promover fibrose muscular através de exercício de corrida em esteira e **2.** verificar se a suramina inibe a fibrose induzida experimentalmente. A suramina tem efeito anti-fibrótico, sendo um potencial agente farmacológico para tratamento da DMD visando sucesso de terapias celulares.

Foram utilizados camundongos *mdx* (n=42) e C57BL/10 (n=11) com seis meses de idade. Os camundongos *mdx* foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo sedentário e tratado com salina (n=11), grupo sedentário e tratado com suramina (n=11), grupo exercitado e tratado com salina (n=10) e grupo exercitado e tratado com suramina (n=10). Os animais foram submetidos à corrida em esteira diariamente e o tratamento com suramina (60mg/kg) foi realizado em dias alternados, via intra-peritoneal. Após sete semanas, os animais foram sacrificados e o músculo tibial anterior, bíceps braquial, diafragma e coração coletados e congelados para análise histológica e protéica por western blot. O plasma sanguíneo foi submetido à análise de creatina-quinase. A força de tração dos membros anteriores foi medida no início e no final do protocolo experimental utilizando-se *Grip Strength Meter* e o músculo diafragma submetido ao estudo *in vitro* para verificar a força de contração.

Verificamos que o protocolo de corrida em esteira foi adequado para induzir a fibrose e inibir a regeneração nos músculos da pata dos camundongos *mdx*. O aumento da área de fibrose foi acompanhado pelo aumento dos níveis de TGF- $\beta$ 1, aumento de creatina-quinase e diminuição da força de tração. O tratamento com suramina diminuiu a fibrose nos músculos exercitados e acelerou o processo de regeneração. Adicionalmente, observamos que a suramina reduziu o número de fibras marcadas com azul de Evans, diminuiu os níveis da CK e impediu a perda da força de tração bem como a força de contração do músculo diafragma.

Concluimos que o protocolo de corrida em esteira foi eficaz na indução de fibrose nos músculos tibial anterior e bíceps braquial. O efeito anti-fibrótico da suramina torna-a droga potencialmente útil para a terapia farmacológica da DMD.

**Abstract**

The *mdx* mouse is commonly used as a model to study Duchenne muscular dystrophy (DMD) however shows cycles of muscle regeneration and reduced fibrosis. The purposes of this study were (1) to induce muscle fibrosis through eccentric running exercise in *mdx* mice and (2) to verify the effects of suramin on muscle fibrosis.

Six-month-old *mdx* (n=42) and control (C57BL/10, n=11) mice were used. *Mdx* mice were divided in four groups: sedentary and saline-treated (n=11); sedentary and suramin-treated (n=11); exercised and saline-treated (n=10) and exercised and suramin-treated (n=10). The *mdx* mice belonging to the exercised groups were placed on treadmill to run daily, for seven weeks. Suramin was injected at a dose of 60mg/kg i.p. on alternate days. At the end of the experimental protocol, the mice were sacrificed and the tibialis anterior, biceps brachii, diaphragm and heart muscles were dissected, frozen in liquid nitrogen and used to histological and western blot analysis. Blood was obtained to determine creatine-kinase (CK) levels. The forelimb force was measured by an adapted Grip Strength Meter. Force of contraction of diaphragm *in vitro* was verified.

Our results showed that the experimental protocol was adequate to induce muscle fibrosis in *mdx* mice. The occurrence of fibrosis was accompanied by elevated levels of TGF- $\beta$ 1 and serum CK and decreased forelimb force. Suramin reduced muscle fibrosis, decreased the number of muscle fibers stained with Evans blue, reduced serum CK levels and prevented the loss of muscle force in exercised *mdx* and diaphragm strips *in vitro*. We concluded that the downhill running protocol was effective for inducing fibrosis in tibialis anterior and biceps brachii muscles of *mdx* mice. Suramin seems to be a potential useful therapeutic alternative for DMD treatment.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Apresentação

As distrofinopatias são doenças causadas por mutação no gene da distrofina. As duas principais distrofinopatias são a distrofia muscular de Duchenne (DMD) e a distrofia muscular de Becker (Engel et al., 1994).

A DMD é uma miopatia fatal caracterizada por progressiva degeneração e fraqueza muscular (Engel et al., 1994). A doença é causada pela ausência da distrofina, proteína estrutural do sarcolema importante para a manutenção de sua estabilidade mecânica durante a contração muscular (Hoffman et al., 1987).

A regeneração muscular nos humanos com DMD é comprometida e ocorre apenas nos cinco primeiros anos de vida, quando gradativamente perde-se a capacidade replicativa das células satélites e o tecido muscular é substituído por tecidos adiposo e conjuntivo (Biggar et al., 2002).

A fibrose muscular, evidenciada por pseudo-hipertrofia dos membros inferiores dos indivíduos distróficos (Engel et al., 1994), torna-se característica importante quando consideramos terapias gênicas e celulares. Uma vez que a fibrose pode dificultar a regeneração muscular e migração de células miogênicas normais injetadas no músculo distrófico, tratamento com anti-fibrótico antes do transplante de células ou administração de oligonucleotídeos para restabelecimento da distrofina pode ser potencialmente útil para o sucesso dessas terapias (Zhou & Lu, 2010).

A suramina é um anti-fibrótico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA; Cheson et al., 1987; Reed et al., 1992; Mietz et al., 1998) inicialmente utilizada para o tratamento de indivíduos contaminados com *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense* e para o tratamento de tumores (Voogd et al., 1993; McGeary et al., 2008). A injeção da droga em músculos de camundongos normais após lesão mecânica reduziu

significativamente a fibrose e aumentou a regeneração muscular, evidenciada por maior quantidade de fibras com núcleo central e melhora funcional (Chan et al., 2003; Chan et al., 2005).

Neste trabalho, verificamos o efeito da suramina em músculos de camundongos *mdx* submetidos à corrida em esteira. O *mdx* é o animal mais utilizado como modelo da DMD (Engel et al., 1994), porém difere-se dos humanos afetados por apresentar ciclos de regeneração muscular e reduzida fibrose (Bulfield et al., 1984; Iannaccone et al., 1995; Pastoret & Sebille, 1995b). Utilizamos exercício físico para induzir fibrose muscular nos camundongos *mdx*, tornando-os modelos mais próximos da DMD.

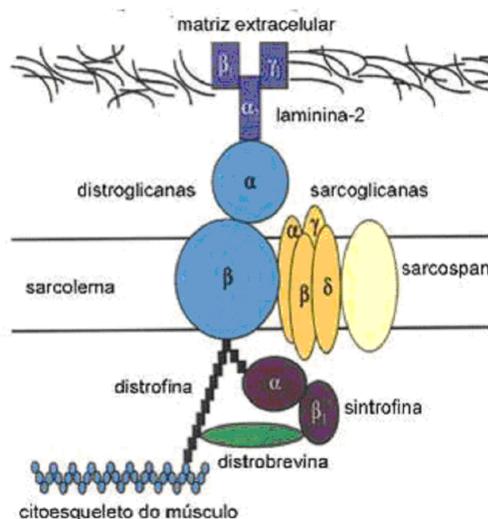
## **1.2. Distrofia muscular de Duchenne**

A DMD destaca-se, dentre as distrofias musculares, por ser a mais comum e devastadora. É uma doença recessiva letal ligada ao cromossomo X que afeta uma em cada 3500 crianças do sexo masculino (Engel et al., 1994). A doença é hereditária em 70% dos casos e em 30% é causada por mutação espontânea do cromossomo X (Bobo et al. 2009). Embora a maioria das mulheres portadoras da doença seja assintomática, estas podem apresentar a partir da terceira década de vida, fraqueza muscular, mialgia, aumento dos níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase e cardiomiopatia (Bobo et al., 2009; Seemann et al., 2010).

Clinicamente, a criança com DMD manifesta a doença entre dois e cinco anos de idade, quando são percebidos atraso no desenvolvimento motor, dificuldade em correr e em subir degraus e quedas freqüentes. A fraqueza muscular é progressiva e resulta em perda da deambulação com cerca de doze anos de idade (Engel et al., 1994). Embora a utilização de

ventilação mecânica melhora a qualidade de vida do doente, o óbito frequentemente ocorre por volta dos vinte anos de idade por insuficiência cardiorrespiratória (Bogdanovich et al., 2004).

A degeneração muscular na DMD é causada por mutação no gene da distrofina, o que leva à ausência desta proteína (Hoffman et al., 1987; Bonilla et al., 1988). A distrofina é uma proteína estrutural de 427 kDa encontrada na face citoplasmática do sarcolema ligada aos miofilamentos e a um complexo de glicoproteínas da membrana (Figura 1). O complexo distrofina-glicoproteínas desempenha papel importante na manutenção da estabilidade mecânica do sarcolema, uma vez que permite ligação do citoesqueleto à laminina da matriz extracelular (Hoffman et al., 1987). Foi sugerido que a falta da distrofina levaria à instabilidade do sarcolema durante a contração muscular e facilitaria a entrada de grandes quantidades de íons cálcio na fibra levando à sua degeneração (Rolland et al., 2006; Whitehead et al., 2006; Ervasti, 2007). Mais recentemente foi sugerido que proteínas reguladoras de cálcio tais como calsequestrina e calmodulina também podem estar envolvidas na patogênese da distrofia (Culligan et al., 2002; Ferretti et al., 2009; Pertille et al., 2010).



**Figura 1:** Esquema do complexo distrofina-glicoproteínas representando a  $\alpha$ - e  $\beta$ -distroglicanas;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - sarcoglicanas; sarcospan;  $\alpha$ -,  $\beta$ 1-sintrofina e  $\alpha$ - e  $\beta$ -distrobrevinas e a distrofina. A distrofina exerce papel importante na estabilização do sarcolema conectando a actina citoesquelética à cadeia  $\alpha$ 2 da laminina-2 localizada na lâmina basal via complexo de glicoproteínas (Adaptado de Rando, 2001).

O caráter progressivo da DMD e a ausência de tratamentos efetivos estimulam os estudos básicos e clínicos voltados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas como as farmacológicas, as nutricionais, as gênicas e as celulares (Bogdanovich et al., 2004; Payne et al., 2006).

### 1.3. Camundongo *mdx*

O camundongo da linhagem *mdx* (*X-chromosome linked muscular dystrophy*) é o animal mais utilizado como modelo da DMD (Willmann et al., 2009). Foi identificado em 1984 na colônia C57BL10/ScSn apresentando níveis elevados das enzimas creatina-quinase e piruvato-quinase e degeneração muscular característica de distrofia (Bulfield et al., 1984).

Os animais da linhagem *mdx* apresentam, tais como os humanos doentes, mutação espontânea no cromossomo X que leva à deficiência da distrofina. Nos *mdx*, o gene da

distrofina está localizado na região Hq Bpa do cromossomo X e são afetados pela doença machos e fêmeas homozigóticos, que se apresentam viáveis e férteis (Bulfield et al., 1984; Engel et al., 1994).

Visto que camundongos *mdx* apresentam ciclos de regeneração muscular e reduzida fibrose (Bulfield et al., 1984; Iannaccone et al., 1995; Pastoret & Sebille, 1995a; Pastoret & Sebille, 1995b), a distrofia nos animais desta linhagem é menos severa quando comparada à DMD (Grounds et al., 2008).

O exercício voluntário em roda de corrida ou a corrida em esteira aumentam a degeneração muscular no *mdx* (Brussee et al., 1997; Vilquin et al., 1998; De Luca et al., 2003; Nakamura et al., 2005; Okano et al., 2005; Hodgetts et al., 2006; Grounds et al., 2008) tornando-o modelo mais próximo à DMD. Diferentemente dos camundongos, humanos doentes apresentam regeneração muscular reduzida, degeneração muscular progressiva e substituição do tecido muscular por colágeno e tecido adiposo (Engel et al., 1994; Biggar et al., 2002).

A degeneração muscular observada em camundongos distróficos exercitados provavelmente é facilitada pela instabilidade mecânica do sarcolema causada pela falta da distrofina (Carter et al., 2002). Estudos utilizando camundongos distróficos verificaram que músculos submetidos ao exercício excêntrico ou concêntrico em esteira apresentam aumento dos níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase (Vilquin et al., 1998), aumento do número de fibras musculares positivas ao azul de Evans (Brussee et al., 1997) e significativa fraqueza muscular, quando comparados aos músculos distróficos não exercitados e músculos normais exercitados (De Luca et al., 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que camundongos normais submetidos à única sessão de treinamento por 90 minutos apresentaram ruptura do sarcolema e dos sarcômeros e conseqüente degeneração (McNeil & Khakee, 1992).

Tal como os músculos distróficos submetidos ao exercício físico, o músculo diafragma de camundongos *mdx* apresenta progressiva degeneração e fraqueza muscular (Stedman et al., 1991; Dupont-Versteegden & McCarter, 1992; Louboutin et al., 1993; Gosselin et al., 2007). Foi sugerido que a necrose e fibrose muscular progressiva observadas no diafragma do *mdx* a partir dos seis meses de idade, provavelmente são conseqüências da constante ativação e contração deste músculo durante a vida do animal (Carter et al., 2002).

A utilização de exercício físico para induzir fibrose em músculos de membros anteriores e posteriores de camundongos distróficos é pouco estudada. O desenvolvimento de protocolo experimental utilizando exercício de alta intensidade e longa duração é interessante para tornar o *mdx* mais próximo da DMD, uma vez que nos humanos afetados a necrose muscular é seguida pela deposição excessiva de tecido conjuntivo e adiposo entre as fibras musculares (Engel et al., 1994).

#### **1.4. Fibrose muscular e fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1)**

A fibrose muscular é o tecido cicatricial fibroso resultado do processo de reparo muscular que envolve três etapas: i) a necrose muscular e ativação da resposta inflamatória, ii) a regeneração e iii) a deposição de matriz extracelular pelos fibroblastos (Grounds, 1991).

Logo após a lesão, fibras musculares degeneram e ocorrem alterações no fluxo sangüíneo, na permeabilidade vascular e exsudação leucocitária. Primeiramente, ocorre a migração de células polimorfonucleares e, seis horas após a lesão, é observada a migração de macrófagos, os quais são responsáveis pela fagocitose do tecido muscular necrótico. Simultaneamente à reação inflamatória, ocorrem ativação e proliferação de células satélites que se fundem para formar miotubos. A diferenciação dos miotubos em miofibras e a

deposição de tecido conjuntivo endomisial ocorrem como etapa final da regeneração (Grounds, 1991; Tidball, 2005).

O processo de regeneração muscular é complexo e depende de vários fatores tais como extensão e duração da lesão. As grandes lesões musculares geralmente resultam em fibrose muscular (Grounds, 1991; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010).

A fibrose muscular é uma característica morfológica evidente encontrada em indivíduos afetados pela DMD, no diafragma de camundongos *mdx* idosos e em músculos normais e distróficos submetidos à irradiação ionizante com raio-X em altas doses (Wakeford et al., 1991; Engel et al., 1994; Pastoret & Sebillé, 1995a; Pastoret & Sebillé, 1995b; Pagel & Partridge, 1999; Wernig et al., 2000). Sugere-se que a fibrose em músculos distróficos é devida 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; Iannaccone et al., 1995; Gosselin et al., 2004; Andreetta et al., 2006; Zhou et al., 2006; Zhou & Lu, 2010).

O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina de 25 kDa envolvida na resposta inflamatória e formação de fibrose (Budasz-Swidarska et al., 2005). Estudos com humanos verificaram níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 na matriz extracelular de fígados cirróticos, pulmão fibrótico e nos rins com glomerulonefrite (Khalil et al., 1989; Border et al., 1990; Milani et al., 1991).

O TGF- $\beta$ 1 é sintetizado por diversos tipos celulares, tais como células endoteliais, plaquetas, células T e macrófagos e está envolvido na proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (Roberts & Sporn, 1987). Estudo utilizando camundongos *mdx* verificou a presença de células inflamatórias mononucleares e elevada expressão do RNA mensageiro do TGF- $\beta$ 1 no músculo diafragma (Gosselin et al., 2004), sugerindo o envolvimento destas células na produção desta citocina e na fibrose neste músculo (Morrison et al., 2000; Gosselin et al., 2004). Adicionalmente, camundongos distróficos tratados com o anti-

inflamatório prednisona apresentaram redução do TGF- $\beta$ 1 e da fibrose no diafragma (Hartel et al., 2001).

Por outro lado, estudos *in vitro* verificaram que o TGF- $\beta$ 1 inibe a proliferação e diferenciação de mioblastos (Massagué et al., 1986; Allen & Boxhorn, 1987). Foi sugerido que esta citocina diminui a expressão do gene da miogenina, fator miogênico importante para diferenciação de mioblastos (Heino & Massagué, 1990).

A diminuição da fibrose muscular é de grande interesse no tratamento da DMD, visto que a deposição progressiva de matriz extracelular entre as fibras musculares pode retardar a regeneração muscular (Ibraghimov-Berskrovnaya et al., 1992; Engel et al., 1994; Iannaccone et al., 1995). Adicionalmente, a fibrose muscular pode dificultar a migração de células miogênicas injetadas no músculo distrófico submetido à terapia celular. Músculos normais tratados com colagenase antes do transplante de mioblastos apresentaram maior migração e fusão das células miogênicas transplantadas (Torrente et al., 2000).

### **1.5. Suramina**

A suramina (sym-bis(m-aminobenzoil-m-amino-p-metilbenzoil-1-naftilamino-4,6,8-trissulfonado)carbamida) apresenta 1492,2 g/mol de peso molecular e é composta por oito anéis benzeno, quatro grupos amida, um grupo uréia e seis grupos sulfonados (Figura 2; Bosch et al., 1997).



## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivos**

O presente trabalho tem como objetivos: i) desenvolver protocolo experimental para promover a fibrose muscular em camundongos *mdx* através de exercício de corrida em esteira e ii) verificar se a suramina inibe a fibrose muscular induzida pelo exercício físico.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Grupos experimentais

Foram utilizados camundongos das linhagens *mdx* (C57BL/10-*Dmd*<sup>*mdx*</sup>/PasUnib; n=42) e C57BL/10 (C57BL/10ScCr/PasUnib; n=11) com seis meses de idade, de ambos os sexos, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/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*. O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP (protocolo 1758-1).

Camundongos machos e fêmeas de ambas as linhagens apresentaram massa corporal semelhante ( $32,19 \pm 4,24$ g nos animais machos vs  $30,22 \pm 2,72$ g nos animais fêmeas). Os camundongos da linhagem *mdx* foram divididos em quatro grupos experimentais: **1)** grupo sedentário tratado com solução salina (*mdx* sed-sal; n=11), **2)** grupo sedentário tratado com suramina (*mdx* sed-sur; n=11), **3)** grupo exercitado e tratado com solução salina (*mdx* exer-sal; n=10) e **4)** grupo exercitado e tratado com suramina (*mdx* exer-sur; n=10).

Os camundongos da linhagem C57BL/10 (n=11) não foram submetidos ao treinamento, mas receberam o tratamento com solução salina. Estes animais serviram de controle para a técnica de western blot, quantificação da enzima creatina-quinase e estudo *in vitro* da força de contração do diafragma.

### **3.2. Protocolo experimental**

Os camundongos *mdx* dos grupos exercitados (n=20) foram submetidos à corrida em esteira diariamente durante sete semanas. A idade de seis meses foi escolhida por ser uma fase em que são observados poucos ciclos de degeneração e regeneração muscular quando comparada aos animais com dois meses de idade (Pastoret & Sebillé, 1995b). O restante dos camundongos *mdx* (n=22) não foi submetido ao treinamento.

Após o último dia de exercício, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg, 2% Virbaxyl, Virbac, São Paulo, Brasil) e cloridrato de cetamina (130 mg/kg, Francotar, Virbac, São Paulo, Brasil). O músculo tibial anterior, bíceps braquial, diafragma e o coração foram coletados e congelados. Foram destinados cinco camundongos *mdx* de cada grupo experimental para a técnica de marcação de fibras com azul de Evans (AE), análise histológica e estudo *in vitro* da força de contração do diafragma e seis animais para a técnica de western blot e determinação da enzima creatina-quinase.

A força de tração dos membros anteriores de cada animal foi medida no início e no final do treinamento em esteira.

### **3.3. Exercício de corrida em esteira em alta intensidade**

Utilizamos o exercício de corrida em esteira em alta intensidade para induzir degeneração e fibrose muscular nos camundongos *mdx*. Os camundongos foram submetidos ao exercício de corrida em esteira diariamente durante sete semanas. Na primeira semana os animais foram submetidos ao pré-treinamento, para adaptação em esteira. Os camundongos correram na velocidade de 12 metros por minuto, sem inclinação, durante quinze minutos inicialmente. O tempo de exercício foi aumentado gradativamente até atingir uma (01) hora no

final da primeira semana. A partir da segunda semana até a sétima semana os animais correram na velocidade de 17 metros por minuto, em inclinação de 15° em descida, durante uma (01) hora ou até atingir a exaustão (Okano et al., 2005; Nakamura et al., 2005).

Escolhemos o protocolo de exercício de corrida em esteira com inclinação em descida por causar maior lesão muscular que o exercício de corrida em esteira sem inclinação ou em subida (Grounds et al. 2008). Adicionalmente, os parâmetros de velocidade, frequência e tempo de exercício de corrida em esteira foram similares àqueles utilizados em protocolos de exercício de alta intensidade em animais normais e distróficos (Okano et al., 2005; Nakamura et al., 2005; Lahaye et al. 2010).

#### **3.4. Tratamento com suramina**

Os camundongos *mdx* dos grupos tratados com suramina receberam a droga intraperitonealmente em dias alternados na dose de 60 mg/kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Lossos et al., 2000) diluída em solução salina 0,9%. Os camundongos dos grupos tratados com solução salina receberam injeção intra-peritoneal de solução salina a 0,9% em dias alternados e serviram de controle.

#### **3.5. Marcação de fibras musculares com azul de Evans**

Para a observação de fibras marcadas com azul de Evans (AE), foram utilizados quatro animais *mdx* de cada grupo experimental. O AE é um corante *in vivo* que evidencia fibras musculares com alteração da permeabilidade do sarcolema e fibras em degeneração (Matsuda et al., 1995; Marques et al., 2007).

Os animais foram injetados intraperitonealmente com solução de AE (Evans blue dye; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a 1% diluída em tampão fosfato salina (PBS), na

dose de 0,1ml de solução de AE 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 cetamina) e exsanguinados. Os músculos tibial anterior, bíceps braquial e coração foram coletados, embebidos em meio de inclusão para baixas e médias temperaturas (Tissue Freezing Medium, Triangle Biomedical Sciences, North Carolina, USA), pré-congelados em N-hexano a 90°C negativos por um minuto e em seguida imersos em nitrogênio líquido e mantidos a 70°C negativos em *Biofreezer*. O hemidiafragma esquerdo dos grupos *mdx* sed-sal e *mdx* sed-sur foram submetidos ao estudo *in vitro* da força de contração e posteriormente congelados em nitrogênio líquido.

Em seguida, foram realizados cortes transversais de 7 µm de espessura do terço médio do músculo em criostato a 24°C negativos. Foram obtidas duas lâminas para cada músculo, sendo uma para análise da integridade do sarcolema por meio do AE e uma para técnica histológica de rotina (tricroômico de Masson). As lâminas destinadas para análise da integridade do sarcolema foram incubadas por 15 minutos com acetona a 25°C negativos e montadas em meio de montagem para fluorescência DABCO [1,4-diazabicyclo (2.2.2)octano; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA]. A observação das lâminas foi 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. As fibras marcadas com AE foram quantificadas. No músculo cardíaco, foi realizada a morfometria das áreas com fibras positivas ao AE.

### **3.6. Análise histológica**

#### **3.6.1. Tricrômico de Masson**

Os cortes congelados foram inicialmente fixados com solução de Bouin 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 em água corrente e imersas em solução de Masson por quinze minutos. Em seguida, as lâminas foram banhadas em solução de ácido acético a 0,2%, mergulhadas em solução de azofloxina (AFO) e em solução de verde luz (Light Green, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). 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 em microscópio de luz para análise morfométrica. Foram quantificadas as áreas de secção transversal do músculo, de inflamação/regeneração, de regeneração e a área de fibrose.

A classificação das áreas musculares foi realizada seguindo-se critérios morfológicos descritos anteriormente (Pastoret & Seville, 1995a; Pastoret & Seville, 1995b; Jin et al., 2000). A área de inflamação/regeneração foi caracterizada por infiltrado inflamatório abundante contendo pequenas fibras musculares com citoplasma fortemente basófilo e com núcleo central vesicular e a área de regeneração muscular foi caracterizada por fibras musculares com citoplasma basófilo e núcleo central e com poucas células inflamatórias (Figura 4). Adicionalmente, foi quantificado o número total de fibras musculares, o número de fibras com núcleo periférico e o número de fibras com núcleo central.

### 3.6.2. Análise morfométrica

Para a quantificação das áreas foram utilizados dois cortes aleatórios. As lâminas coradas com Tricromo de Masson foram analisadas utilizando-se microscópio Nikon Eclipse E-400 com objetiva de 20X acoplado a um computador e vídeo-câmera (Nikon Express Series, Shinagawa, Tokyo, Japão). A análise morfométrica foi realizada com software Image Pro-Express Version 4. Foi quantificada a porcentagem de área de inflamação/regeneração, de regeneração e de fibrose (Figura 4).

A quantificação de número de fibras com núcleo central e periférico foi realizada utilizando-se objetiva de 40X e ocular de 10X contendo retículo quadrilátero com 100 pontos, acoplada ao microscópio de luz utilizando-se contador manual. Foi quantificado o número total de fibras musculares, o número de fibras com núcleo central (indicativo de regeneração muscular) e fibras com núcleo periférico (indicativo de fibras que não sofreram degeneração).

### 3.7. Estudo *in vitro* da força de contração do diafragma

Para verificar o efeito da suramina na força de contração do músculo diafragma utilizamos técnica miográfica *in vitro*. O hemi-diafragma e nervo frênico esquerdo dos animais dos grupos C57BL/10 (n=05), *mdx* sed-sal (n=05) e *mdx* sed-sur (n=05) foram retirados e colocados em cuba contendo solução nutritiva (Solução de Tyrode; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,49 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42 mM, glicose 11,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11,09 mM e água) aerada com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C segundo Bülbbring, 1946.

O hemi-diafragma foi preso pelas costelas na base da cuba e o centro tendíneo amarrado com fio de sutura ao transdutor isométrico sob tensão constante (5 g/cm). O músculo

foi colocado sobre eletrodos de platina ligados a um estimulador S48F (Grass Instruments). O acoplamento entre o transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM e o fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400 permitiu o registro da força de contração muscular em gramas. A preparação foi curarizada com d-tubocurarina e o músculo recebeu estímulo direto a 70 V, 2 ms de duração, 2,5 Hz por 120 minutos. Em seguida, os músculos foram retirados da cuba, pesados, pré-congelados em N-hexano e imersos em nitrogênio líquido.

A força de contração do diafragma foi medida a cada dez minutos e os valores normalizados com a massa do hemi-diafragma esquerdo em gramas (g/g do hemi-diafragma esquerdo) e expressos em porcentagem em relação ao valor inicial (Tempo 10 minutos=100%).

### **3.8. Determinação de creatina-quinase no plasma sanguíneo**

Para verificar o efeito do exercício físico em esteira e da suramina sobre a degeneração muscular realizamos a quantificação da enzima creatina-quinase (CK). Os animais utilizados para a análise da CK foram utilizados posteriormente para a técnica de western blot. O sangue foi coletado por punção cardíaca sob anestesia com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina e em seguida, centrifugado a 936 RCF (força centrífuga relativa a aceleração da gravidade) e 4°C por 10 minutos para obtenção do plasma sanguíneo. Utilizamos o kit para quantificação de CK (CK Cinético Crystal, Bioclin, Quibasa, Minas Gerais, 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 cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores da CK foram expressos em unidades internacionais (U/L).

### 3.9. Medida da força de tração dos membros anteriores

Para verificar o efeito do exercício físico em esteira e da suramina sobre a força de tração dos membros anteriores, foi medida a força dos animais utilizando-se *Grip Strength Meter* (New Primer, São Paulo, Brasil). Os camundongos foram posicionados sobre a base do equipamento, suspensos pela cauda e estimulados a tracionar o anel metálico acoplado ao dinamômetro (Figura 3) com os membros anteriores. A força de tração exercida pelo animal foi expressa como a média das cinco maiores medidas de força em gramas dividida pela massa corporal em gramas (g/g de massa corporal; Payne et al., 2006).

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



**Figura 3:** *Grip Strength Meter* para medir a força de tração exercida pelos membros anteriores do camundongo.

### 3.10. Western blot

Para a quantificação do TGF- $\beta$ 1 foram utilizados seis camundongos de cada grupo experimental. Os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina e perfundidos com PBS. Os músculos diafragma, bíceps braquial, tibial anterior e coração foram retirados e homogeneizados com tampão para homogeneização (Tris-HCl 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, PMSF 1 mM, e Na<sub>3</sub>VO 0,25 mM) a 4°C usando homogeneizador Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, Westbury, New York, USA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação de 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 e Tris-HCl 0,12 M, glicerol 20%, SDS 2% e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,28 M) e aquecidas por 5 minutos. Em seguida, 30  $\mu$ g de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida 8-15% em aparelho para eletroforese (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). 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, USA). As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas 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 3% 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 quimiluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 minutos, seguido de exposição a filme Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, New York, USA). As densidades das bandas e das amostras sobre filme foram digitalizadas e gravadas para posterior quantificação da densitometria ótica utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MA, USA).

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 peroxidase correspondente (H+L) (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA).

### **3.11. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média±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 grupos foi realizada por análise de variância (two-way ANOVA;  $p \leq 0,05$ ).

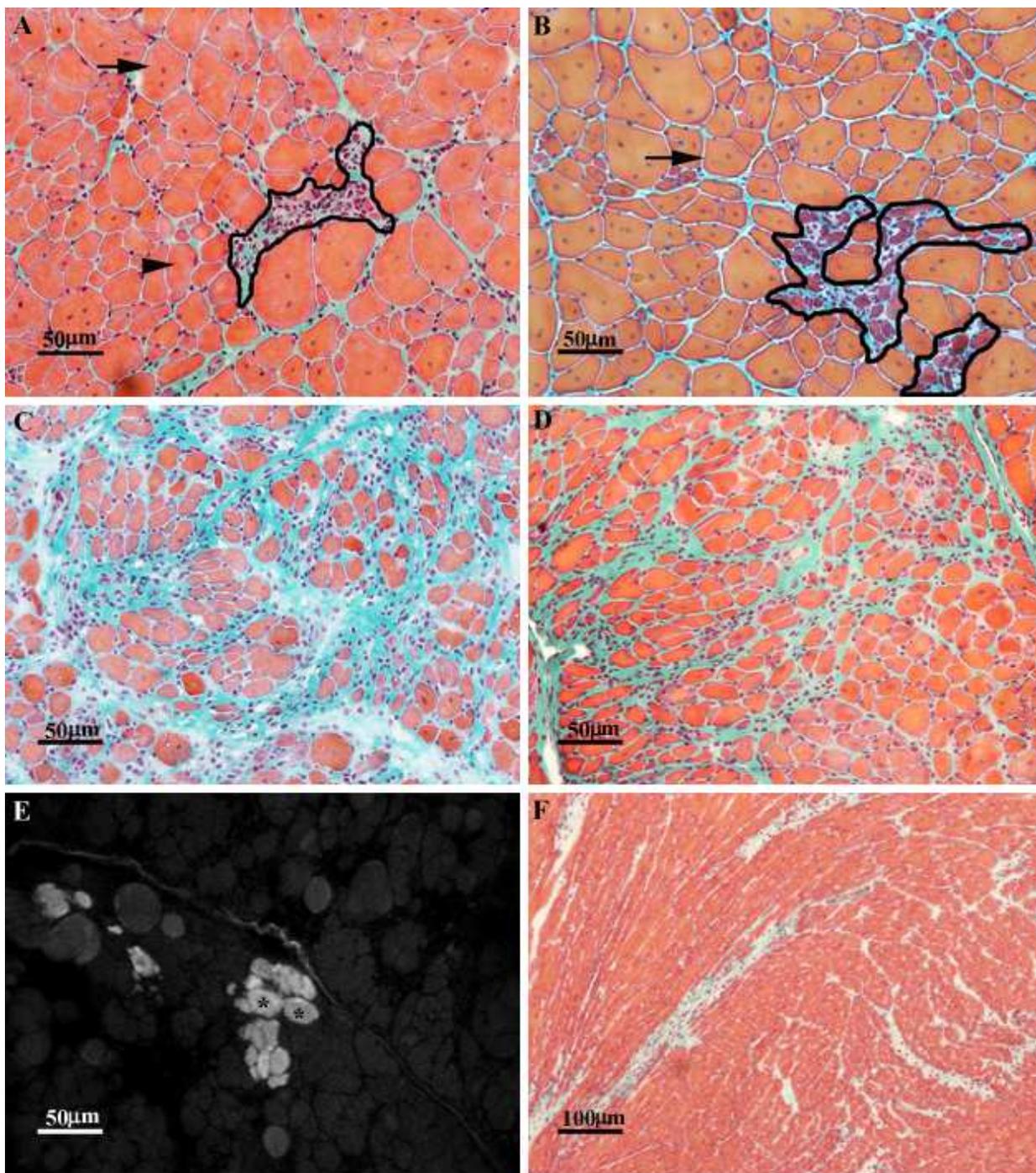
#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Análise histológica

O exercício de corrida em esteira aumentou significativamente a área de fibrose nos músculos tibial anterior ( $0,90 \pm 0,61\%$  nos *mdx* exer-sal vs.  $0,37 \pm 0,37\%$  nos *mdx* sed-sal) e bíceps braquial ( $3,80 \pm 2,47\%$  nos *mdx* exer-sal vs.  $1,41 \pm 0,74\%$  nos *mdx* sed-sal;  $p \leq 0,05$ , ANOVA; Tabela 1). O exercício não induziu fibrose nos músculos diafragma ( $13,00 \pm 2,50\%$  nos *mdx* exer-sal vs.  $11,60 \pm 3,20\%$  nos *mdx* sed-sal;  $p > 0,05$ , ANOVA; Tabela 1) e cardíaco ( $1,40 \pm 0,50\%$  nos *mdx* exer-sal vs.  $2,20 \pm 0,30\%$  nos *mdx* sed-sal;  $p > 0,05$ , ANOVA). O exercício reduziu significativamente as áreas de regeneração e porcentagem de fibras com núcleo central nos músculos tibial anterior e bíceps braquial (Tabela 1).

A suramina reduziu significativamente a área de fibrose no músculo tibial anterior ( $0,31 \pm 0,23\%$  nos *mdx* exer-sur), bíceps braquial ( $1,10 \pm 0,65\%$  nos *mdx* exer-sur) e diafragma ( $7,60 \pm 3,15\%$  nos *mdx* exer-sur) de *mdx* exercitados. Nos animais sedentários, a droga reduziu a fibrose somente no músculo diafragma ( $8,00 \pm 5,40\%$  nos *mdx* sed-sur). No músculo cardíaco, a suramina não diminuiu a fibrose ( $1,83 \pm 0,30\%$  nos *mdx* sed-sur e  $1,80 \pm 0,30\%$  nos *mdx* exer-sur). Os músculos tibial anterior e bíceps braquial apresentaram redução significativa na porcentagem de fibras marcadas com azul de Evans e áreas de inflamação/regeneração e de regeneração quando tratados com suramina (Tabela 1).

A suramina aumentou a porcentagem de fibras com núcleo central no músculo tibial anterior e área de regeneração no diafragma (Tabela 1).



**Figura 4:** Morfologia das diferentes áreas encontradas em músculos de camundongos *mdx* sedentários tratados com salina (**A-C**, **E**, **F**) e sedentário tratado com suramina (**D**). Em **A**, músculo bíceps braquial com área de inflamação/regeneração (circundada) caracterizada por infiltrado inflamatório e a presença de fibras com núcleo central (seta) e de fibras com núcleo periférico (cabeça de seta). Em **B**, músculo bíceps braquial com miócitos basófilos em processo de regeneração, o que caracteriza área de regeneração muscular (circundada). Em **C** e **D**, músculo diafragma com área de fibrose corada em verde pela técnica de tricomo de Masson. Em **E**, diafragma com fibras musculares positivas ao AE (\*) e em **F**, músculo cardíaco com reduzida fibrose. Aumento: 20X (A-E), 10X (F).

		%infl/reg	%reg	%fibrose	%NC	%NP	%AE
TA	<i>mdx sed-sal</i>	1,50±2,00	0,30±0,40	0,37±0,37	74,30±5,05	22,80±5,40	3,00±4,52
	<i>mdx sed-sur</i>	<b>0,08±0,12</b> *	<b>0</b> *	0,62±0,63	<b>89,55±4,50</b> *	<b>9,90±5,30</b> *	<b>0,46±1,00</b> *
	<i>mdx exer-sal</i>	<b>1,05±2,10</b> *	<b>0</b> *	<b>0,90±0,61</b> *	<b>64,60±7,90</b> *	<b>34,20±7,11</b> *	1,26±1,78
	<i>mdx exer-sur</i>	0,50±1,10	0,30±0,66	<b>0,31±0,23</b> **	<b>91,90±1,34</b> **	<b>8,12±1,34</b> **	<b>0</b> **
BB	<i>mdx sed-sal</i>	1,03±1,10	1,20±1,31	1,41±0,74	85,50±5,25	14,02±5,22	0,50±0,44
	<i>mdx sed-sur</i>	<b>0,25±0,24</b> *	<b>0,21±0,26</b> *	1,87±1,60	86,23±3,50	13,24±3,91	<b>0,10±0,12</b> *
	<i>mdx exer-sal</i>	1,31±1,67	<b>0,18±0,36</b> *	<b>3,80±2,47</b> *	<b>78,91±5,60</b> *	<b>19,83±4,60</b> *	1,25±1,81
	<i>mdx exer-sur</i>	<b>0,50±0,20</b> ** †	<b>0,04±0,10</b> †	<b>1,10±0,65</b> **	84,50±1,60	<b>16,42±2,13</b> **	<b>0,02±0,06</b> **
DIA	<i>mdx sed-sal</i>	3,37±1,00	0,60±0,57	11,60±3,20	78,53±3,15	21,30±3,10	0,19±0,06
	<i>mdx sed-sur</i>	5,61±1,77	1,02±0,30	<b>8,00±5,40</b> *	84,07±4,04	15,60±4,14	0,35±0,22
	<i>mdx exer-sal</i>	3,00±1,50	0,22±0,08	13,00±2,50	81,20±4,90	17,90±3,84	0,95±1,39
	<i>mdx exer-sur</i>	5,34±2,73	<b>0,85±0,13</b> **	<b>7,60±3,15</b> **	83,13±0,60	16,50±0,88	0,40±0,41

**Tabela 1:** Média e desvio padrão da porcentagem da área de inflamação/regeneração (%infl/reg), da área de regeneração (%reg), da área de fibrose (%fib), de fibras com núcleo central (%NC), de fibras com núcleo periférico (%NP) e de fibras marcadas com azul de Evans (%AE), do músculo tibial anterior (TA), bíceps braquial (BB) e diafragma (DIA).

(\*) diferença significativa quando comparado ao *mdx sed-sal* ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

(\*\*) diferença significativa quando comparado ao *mdx exer-sal* ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

(†) diferença significativa quando comparado ao *mdx sed-sur*; ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

#### 4.2. Quantificação da enzima creatina-quinase no plasma sanguíneo

Os camundongos distróficos apresentaram maiores níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase quando comparado aos camundongos normais. O exercício em esteira aumentou a CK nos *mdx* exercitados e a suramina reduziu significativamente esses níveis (Tabela 2).

<b>Linhagem</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Níveis plasmáticos da CK (U/L)</b>
<b>C57BL/10</b>	<b>sed-sal</b>	95±70
<b><i>mdx</i></b>	<b>sed-sal</b>	<b>805±374*</b>
	<b>sed-sur</b>	380±127
	<b>exer-sal</b>	<b>1540±556**</b>
	<b>exer-sur</b>	<b>474±300***</b>

**Tabela 2:** Níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase (U/L) dos camundongos *mdx* e C57BL/10.

(\*): diferença significativa quando comparado ao C57BL/10 ( $p \leq 0,05$ ; test-t de Student)

(\*\*): diferença significativa quando comparado ao *mdx* sed-sal ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

(\*\*\*): diferença significativa quando comparado ao *mdx* exer-sal ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

### 4.3. Massa corporal e medida da força de tração dos membros anteriores

Verificamos que o protocolo experimental de corrida em esteira não diminuiu a massa corporal final dos animais, porém reduziu a força de tração final dos animais. O tratamento com suramina apesar de reduzir a massa corporal dos animais, mostrou-se efetivo para impedir a diminuição de força nos animais tratados e exercitados (Tabela 3).

	Massa (g)		Força (g)		Força/Massa (g/g)	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final
<b>C57BL/10</b>	30,00±2,70	30,00±2,10	33,20 ±5,40	29,40±3,50	1,10±0,10	1,00±0,10
<i>mdx sed-sal</i>	35,10±4,50	35,20±4,10	30,40±1,60	29,40±2,50	0,90±0,10	0,80±0,10
<i>mdx sed-sur</i>	34,40±4,20	33,70±3,60	32,70±5,40	30,00±1,50	0,90±0,10	0,90±0,70
<i>mdx exer-sal</i>	30,20±3,00	30,00±5,00	30,80±1,30	<b>24,80±1,00*</b>	1,00±0,10	<b>0,90±0,10*</b>
<i>mdx exer-sur</i>	32,70±2,60	<b>26,70±3,00*</b>	30,60±0,50	<b>30,40±3,20**</b>	0,90±0,10	<b>1,10±0,20**</b>

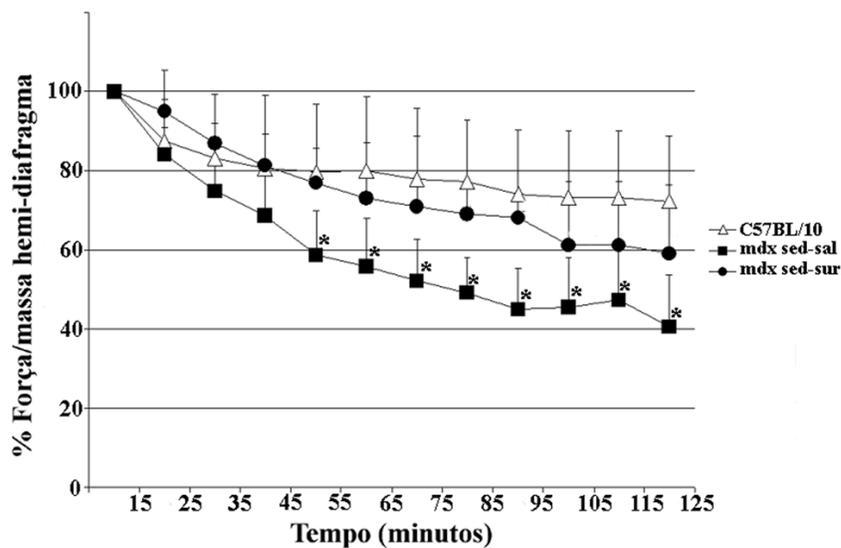
**Tabela 3:** Massa (g) e força (g/g massa corporal) de camundongos *mdx* e C57BL/10 no início e final do protocolo experimental

(\*) diferença significativa quando comparado aos valores iniciais ( $p \leq 0,05$ ; test-t de *Student*).

(\*\*) diferença significativa quando comparado ao *mdx exer-sal* ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

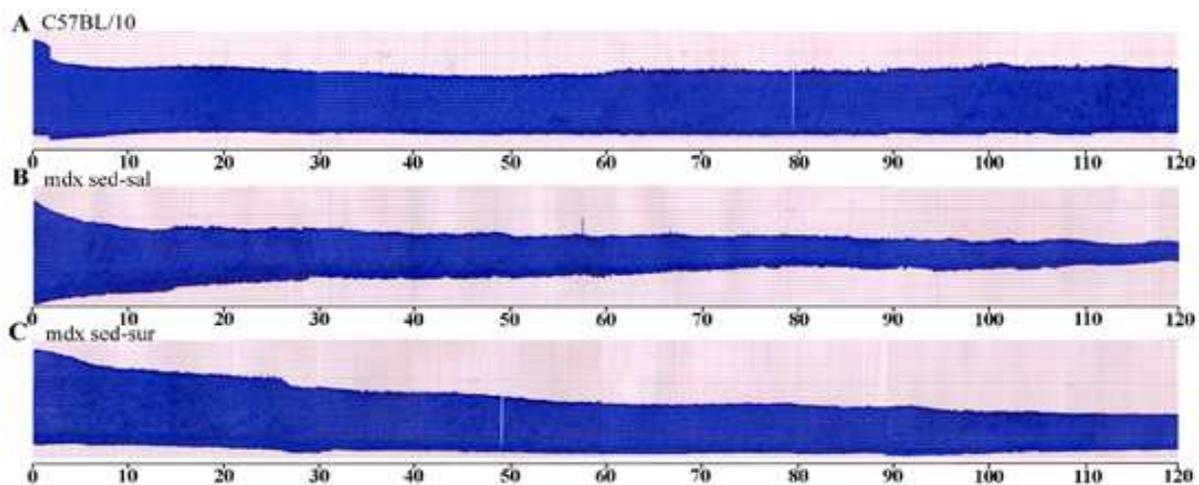
### 4.4. Estudo *in vitro* da força de contração do diafragma

Verificamos que a partir de 50 minutos de estimulação, a força contrátil do hemidiafragma de camundongos distróficos reduziu significativamente (40% no *mdx sed-sal* vs 20% no C57BL/10). Os animais tratados com suramina apresentaram perda de força contrátil, no entanto sem diferença significativa em relação aos animais normais (Gráfico 1; Figura 5).



**Gráfico 1:** Força contrátil do hemi-diafragma esquerdo de camundongos C57BL/10, *mdx* sedentário tratado com salina (*mdx* sed-sal) e *mdx* sedentário tratado com suramina (*mdx* sed-sur) durante 120 minutos de estimulação direta.

(\*) diferença significativa quando comparado aos camundongos C57BL/10 ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA)

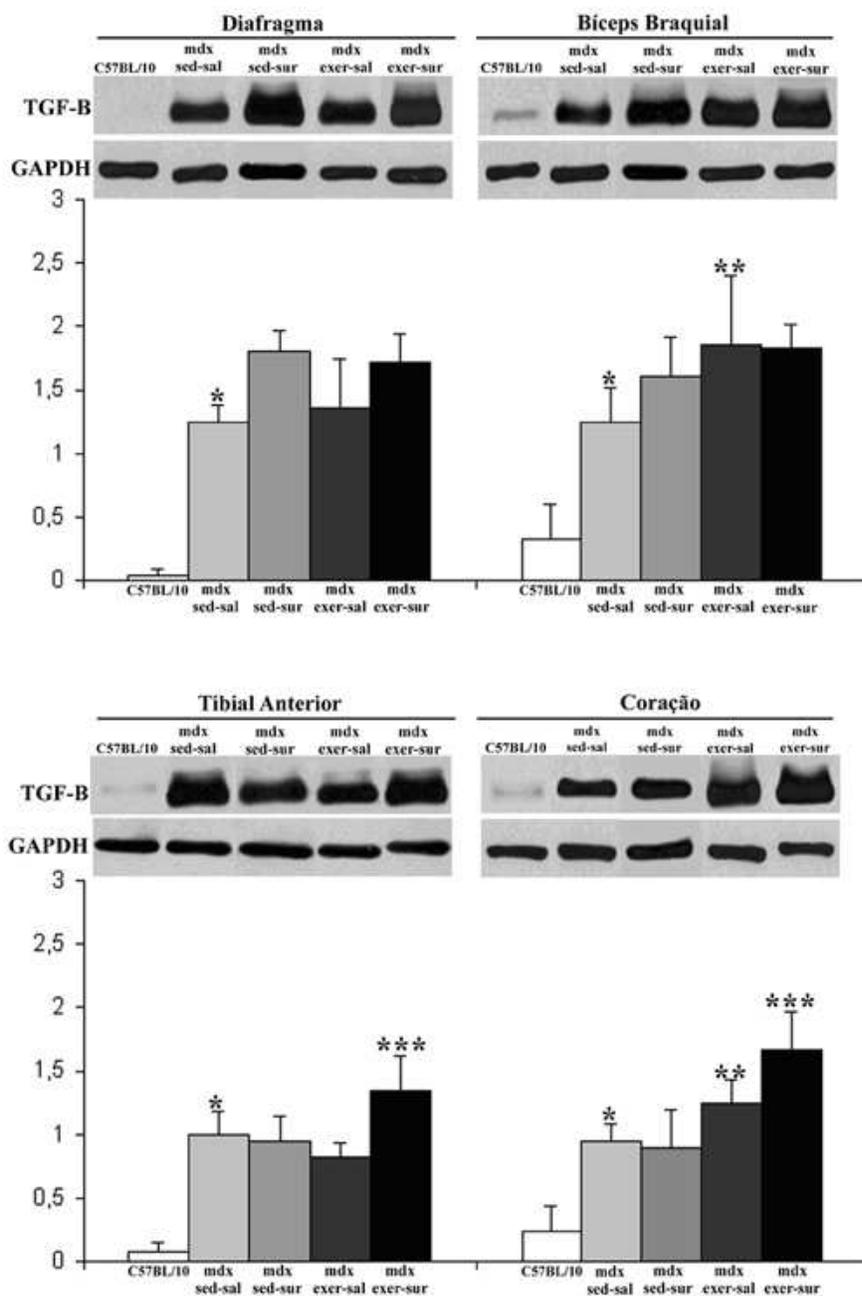


**Figura 5:** Registro miográfico do hemi-diafragma esquerdo de animais C57BL/10, *mdx* sedentário tratado com salina (*mdx* sed-sal) e *mdx* sedentário tratado com suramina (*mdx* sed-sur) durante 120 minutos de estimulação direta.

#### 4.5. Western blot

Todos os músculos distróficos do grupo sedentário tratado com salina (*mdx* sed-sal) apresentaram quantidade aumentada da citocina TGF- $\beta$ 1 quando comparados aos animais C57BL/10. O exercício físico aumentou significativamente os níveis dessa citocina no músculo bíceps braquial e coração de *mdx* (Figura 6).

O tratamento com suramina aumentou os níveis de TGF- $\beta$ 1 no músculo tibial anterior e coração de *mdx* exercitados.



**Figura 6:** Western blot dos músculos diafragma, bíceps braquial, tibial anterior e coração de animais C57BL/10, *mdx* sedentário e tratado com salina (*mdx* sed-sal), *mdx* sedentário e tratado com suramina (*mdx* sed-sur), *mdx* exercitados e tratados com salina (*mdx* exer-sal) e *mdx* exercitados e tratados com suramina (*mdx* exer-sur). Os gráficos representam os níveis de TGF-β1 expressos em unidade arbitrária e normalizados com GAPDH.

(\*) diferença significativa quando comparado ao C57BL/10 ( $p \leq 0,05$ ; test-t de *Student*)

(\*\*) diferença significativa quando comparado ao *mdx* sed-sal ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

(\*\*\*) diferença significativa quando comparado ao *mdx* exer-sal ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

## **5. DISCUSSÃO**

### 5.1. Efeito do exercício no músculo distrófico

O camundongo *mdx* é o animal mais utilizado como modelo da DMD (Willmann et al., 2009), porém difere-se de humanos afetados por apresentar ciclos de regeneração muscular e reduzida fibrose (Bulfield et al., 1984; Iannaccone et al., 1995; Pastoret & Sebille, 1995a; Pastoret & Sebille, 1995b).

O exercício voluntário em roda de corrida ou a corrida em esteira aumenta a degeneração muscular dos membros anteriores e posteriores do *mdx* (Brussee et al., 1997; Vilquin et al., 1998; De Luca et al., 2003; Nakamura et al., 2005; Okano et al., 2005; Hodgetts et al., 2006) e torna-o modelo mais próximo a DMD. Visto que a fibrose muscular é decorrente do reparo de lesões musculares significativas (Grounds, 1991), um dos objetivos do presente trabalho foi desenvolver protocolo experimental para promover fibrose nos camundongos *mdx* através de exercício de corrida em esteira. Escolhemos a idade de seis meses por ser uma fase em que são observados poucos ciclos de degeneração e regeneração muscular quando comparada aos animais com dois meses de idade (Pastoret & Sebille, 1995b) e progressiva deposição de colágeno no tecido muscular (Roig et al., 2004).

Neste trabalho utilizamos o exercício de corrida em esteira com inclinação em descida para induzir contrações excêntricas e conseqüentemente degeneração e fibrose muscular. Estudos verificaram que micro-lesões musculares crônicas induzidas por contrações excêntricas causam maior enfraquecimento e degeneração nos músculos normais (McNeil & Khakee, 1992) e distróficos (Vilquin et al., 1998; Grounds et al., 2008) quando comparadas às contrações concêntricas realizadas em exercício de corrida em esteira sem inclinação ou em subida (Grounds et al., 2008). Adicionalmente, foi sugerido que a fibrose observada no diafragma do *mdx* é conseqüência da constante ativação e contração deste músculo durante a

vida do animal (Carter et al., 2002), especialmente na primeira metade da expiração, quando ocorre a contração excêntrica (Gillis, 1996).

Verificamos que camundongos *mdx* submetidos à corrida em esteira durante sete semanas apresentaram aumento da área de fibrose nos músculos da pata, aumento dos níveis da enzima creatina-quinase no plasma sanguíneo e redução significativa da força de tração dos membros anteriores quando comparados aos *mdx* sedentários, o que está de acordo com estudos anteriores em que indivíduos e animais normais submetidos ao exercício diário e de alta intensidade, apresentaram comprometimento da força e lesão muscular (Carter et al., 2002; Lahaye et al. 2010).

A fibrose muscular é o tecido fibroso resultado da degeneração muscular e resposta inflamatória (Grounds, 1991; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010). Durante o processo de regeneração muscular ocorre a liberação de vários mediadores químicos da inflamação, dentre eles o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), responsável pela formação de fibrose (Budasz-Swidarska et al., 2005). Nos indivíduos com DMD e camundongos distróficos o TGF- $\beta$ 1 é a principal citocina envolvida na fibrose muscular (Bernasconi et al., 1995; Gosselin et al., 2004). Neste trabalho verificamos que camundongos *mdx* sedentários apresentam elevados níveis de TGF- $\beta$ 1 quando comparados aos camundongos normais.

O exercício de corrida em esteira aumentou a fibrose e os níveis do TGF- $\beta$ 1 apenas no músculo bíceps braquial. No músculo tibial anterior e no coração a fibrose não estava correlacionada com o aumento dos níveis de TGF- $\beta$ 1. Estes resultados sugerem que os músculos distróficos respondem diferentemente à sinalização do TGF- $\beta$ 1 e ao exercício físico. Provavelmente as diferenças intrínsecas no metabolismo de colágeno de cada músculo (Gosselin et al., 2007), bem como a ativação dos receptores de TGF- $\beta$ 1 (Chen et al., 2005) e o

recrutamento de cada um deles em um regime de exercício específico (Grounds et al., 2008) estejam envolvidos nestas diferentes respostas. Nos *mdx* sedentários, apesar de os níveis de TGF- $\beta$ 1 serem semelhantes entre os músculos estudados, verificamos que os músculos da pata apresentaram reduzida fibrose muscular quando comparados ao diafragma.

Outro efeito observado nos músculos tibial anterior e bíceps braquial de animais exercitados foi diminuição das áreas de regeneração e do número de fibras com núcleo central. Estudos verificaram que camundongos distróficos submetidos ao exercício excêntrico ou concêntrico em alta intensidade em esteira apresentam aumento dos níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase (Vilquin et al., 1998), diminuição da expressão do fator de crescimento homólogo à insulina tipo-1 (*insulin-like growth factor-1, IGF1*) e da *MyoD* (Okano et al., 2005) e significativa fraqueza muscular (De Luca et al., 2003), quando comparados aos camundongos distróficos sedentários. Adicionalmente, estudos *in vitro* verificaram que o TGF- $\beta$ 1 inibe a proliferação e diferenciação de mioblastos (Massagué et al., 1986; Allen & Boxhorn, 1987) e a expressão do gene da miogenina, fator miogênico importante para diferenciação de mioblastos (Heino & Massagué, 1990).

Assim, concluímos que o protocolo de exercício de corrida em esteira foi efetivo para induzir a fibrose muscular no camundongo *mdx* e torná-lo modelo mais próximo da DMD.

## **5.2. Efeito da suramina no músculo distrófico**

Utilizada desde 1920 para tratamento de indivíduos contaminados com *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, a suramina foi utilizada mais recentemente como agente anti-tumoral (Voogd et al., 1993; McGeary et al., 2008), uma vez que sua ligação com receptores de vários fatores de crescimento tais como fator de crescimento epidermal

(*epidermal growth factor*, EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), fator de crescimento fibroblástico (*fibroblast growth factor*, FGF), fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) e fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), impediu a metástase de câncer de pulmão, de mama, câncer prostático, colorretal e gliomas (McGeary et al., 2008).

Neste trabalho utilizamos a suramina como agente anti-fibrótico potencialmente útil para terapia farmacológica da DMD. Apesar da diminuição de massa corporal dos camundongos distróficos exercitados e tratados com suramina, verificamos que o tratamento com a droga durante sete semanas foi bem tolerado pelos animais e efetivo no bloqueio da fibrogênese.

Observamos que a suramina diminuiu significativamente a fibrose nos músculos tibial anterior, bíceps braquial e diafragma de animais *mdx* embora não houvesse diminuição dos níveis de TGF- $\beta$ 1 nos músculos estudados. No músculo tibial anterior e coração houve aumento dos níveis da citocina após tratamento. Estes resultados sugerem que possivelmente a ação anti-fibrótica da suramina é devida ao bloqueio dos receptores para o TGF- $\beta$ 1 e consequentemente da sinalização intracelular para a síntese de colágeno.

A ação do TGF- $\beta$ 1 na regulação da fibrose depende de sua ligação com os receptores serina/treonina quinase tipo I e tipo II localizados na membrana plasmática. Esta ligação permite a fosforilação do receptor tipo I pelo receptor tipo II. O receptor tipo I ativado propaga o sinal através da fosforilação de proteínas R-Smad (*receptor-regulated Smad*). As proteínas R-Smad ativadas formam complexos com Smad4 que interagem com fatores de transcrição no núcleo da célula (Dijke & Hill, 2004).

O aumento do número de fibras com núcleo central no músculo tibial anterior e da área de regeneração no músculo diafragma nos *mdx* tratados com suramina sugerem que a droga aumentou a regeneração muscular. A regeneração muscular pela suramina provavelmente foi estimulada pela inibição da miostatina, proteína com efeitos inibitórios no crescimento e diferenciação do tecido muscular (Lee & McPherron, 2001). Estudo *in vitro* verificou que a suramina neutralizou os efeitos da miostatina aumentando a diferenciação e o índice de fusão das células miogênicas normais C2C12 (Nozaki et al., 2008).

O aumento da regeneração muscular e a diminuição da fibrose podem ser observados na melhora funcional dos músculos estudados. Observamos que camundongos exercitados tratados com a suramina não apresentaram perda da força de tração das patas anteriores quando comparados aos animais exercitados e tratados com solução salina. Adicionalmente, o músculo diafragma de animais tratados com suramina apresentou menor redução da força contrátil, *in vitro*, durante estimulação submáxima direta e significativa diminuição da fibrose muscular. Estudos anteriores verificaram que a suramina aumentou a força contrátil *in vitro* do músculo gastrocnêmio normal submetidos à laceração (Chan et al., 2003; Chan et al., 2005).

A diminuição de fibras musculares marcadas com azul de Evans e redução dos níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase nos camundongos distróficos tratados com suramina sugerem possível efeito protetor da droga contra a degeneração muscular. Estudos utilizando miotubos de hamster BIO14.6 e de camundongos *mdx* verificaram efeitos positivos nos níveis da CK e força (Iwata et al., 2007) provavelmente devido à sua ação antagonista aos receptores purinérgicos (Leff et al., 1990), que estão envolvidos na mionecrose (Iwata et al., 2007).

Tendo em vista a ação anti-fibrótica da suramina juntamente com seus efeitos na regeneração e degeneração muscular, concluimos que a suramina pode ser potencialmente útil para o tratamento da DMD. A fibrose muscular é uma das principais características

morfológicas encontradas no músculo distrófico e impede o sucesso de terapias celulares, ao dificultar a migração de células indiferenciadas e, ao diminuir a quantidade de fibras musculares viáveis para expressão de distrofina comprometendo as terapias genéticas.

## **6. CONCLUSÃO**

Concluimos que a fibrose muscular, principal característica morfológica encontrada em indivíduos acometidos pela DMD, pode ser induzida nos músculos da pata de camundongo *mdx* através do exercício físico. O exercício de corrida em esteira em alta intensidade durante sete semanas foi efetivo para tornar o *mdx* modelo mais próximo da DMD.

Adicionalmente, sugerimos o envolvimento do TGF- $\beta$ 1 na progressão da distrofia nos camundongos *mdx*. Tratamento com suramina, droga bloqueadora de receptores de TGF- $\beta$ 1, reduziu fibrose muscular e promoveu melhora funcional em animais distróficos sedentários e exercitados. Os efeitos positivos da suramina nos músculos distróficos tornam-na droga potencialmente útil para as terapias farmacológicas da DMD.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLEN, R.E.; BOXHORN, L.K. Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. **J Cell Physiol**, v. 133, n. 3, p. 567-572, 1987.

ANDREETTA, F.; BERNASCONI, P.; BAGGI, F.; FERRO, P.; OLIVA, L.; ARNOLDI, E.; CORNELIO, F.; MANTEGAZZA, R.; CONFALONIERI, P. Immunomodulation of TGF-beta1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. **J Neuroimmunol**, v. 175, n. 1-2, p. 77-86, 2006.

BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERI, P.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MORANDI, L.; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 1137-1144, 1995.

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

BOBO, J.K.; KENNESON, A.; KOLOR, K.; BROWN, M.A. Adherence to American Academy of Pediatrics recommendations for cardiac care among female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Pediatrics**, v. 123, p. e471-e475, 2009.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J Mol Med**, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

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 at the muscle cell surface. **Cell**, v. 54, n. 4, p. 447-452, 1988.

BORDER, W.A.; OKUDA, S.; LANGUINO, L.R.; SPORN, M.B.; RUOSLAHTI, E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antisera against transforming growth factor  $\beta$ 1. **Nature**, v. 346, n. 6282, p. 371-374, 1990.

BOSCH, J.J.K.; HOP, E.; OVERBEEK, W.; UNDERBEG, W.J.M.; BEIJINEN, J.H.; BULT, A. Degradation of suramin in aqueous solutions. **Int J Pharm**, v. 155, n. 1, p. 27-34, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUSSEE, V.; TARDIF, F.; TREMBLAY, J.P. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. **Neuromuscul Disord**, v. 7, n. 8, p. 487-492, 1997.

BUDASZ-SWIDERSKA, M.; JANK, M.; MOTYL, T. Transforming growth factor- $\beta$ 1 upregulates myostatin expression in mouse C2C12 myoblasts. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, suppl. 3, p. 195-214, 2005.

BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of rat. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 1, n. 1, p. 38-61, 1946.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984.

CARTER, G.T.; ABRESCH, R.T.; FOWLER, W.M.Jr. Adaptations to exercise training and contraction-induced muscle injury in animal models of muscular dystrophy. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 81, suppl. 11, p. S151-S161, 2002.

CHAN, Y.S.; LI, Y.; FOSTER, W.; FU, F.H.; HUARD, J. The suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. **Am J Sports Med**, v. 33, n. 1, p. 43-51, 2005.

CHAN, Y.S.; LI, Y.; FOSTER, W.; HORAGUCHI, T.; SOMOGYI, G.; FU, F.H.; HUARD, J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. **J Appl Physiol**, v. 95, n. 2, p. 771-780, 2003.

CHEN, Y.W.; NAGARAJU, K.; BAKAY M.; McINTYRE, O.; RAWAT, R.; SHI, R.; HOFFMAN, E.P. Early onset of inflammation and later involvement of TGF beta in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, n. 6, p. 826-834, 2005.

CHESON, B.D.; LEVINE, A.M.; MILDVAN, D.; KAPLAN, L.D.; WOLF, P.; RIOS, A.; GROOPMAN, J.E.; GILL, P.; VOLBERDING, P.A.; POIESZ, B.J. Suramin therapy in AIDS and related disorders. Report of the US Suramin Working Group. **JAMA**, v. 258, n. 10, p. 1347-1351, 1987.

CULLIGAN, K.; BANVILLE, N.; DOWLING, P.; OHLENDIECK, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding of dystrophic *mdx* mouse. **J Appl Physiol**, v. 92, n. 2, p. 435-445, 2002.

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

DIJKE, P.; HILL, C.S. New insights into TGF- $\beta$ -Smad signaling. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 5, p. 265-273, 2004.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E.; McCARTER, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 15, n. 10, p. 1105-1110, 1992.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. New York: McGraw-Hill, 1994. 1937p. p.1133-1187. ISBN 0070195595.

ERVASTI, J.M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 2, p. 108-117, 2007.

GILLIS, J.M. The *mdx* mouse: why diaphragm? **Muscle Nerve**, v. 19, n. 9. p. 1230, 1996.

FERRETTI, R.; MARQUES, M.J.; PERTILLE, A.; SANTO NETO, H. Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 39, n. 5, p. 609-615, 2009.

GOSSELIN, L.E.; WILLIAMS, J.E.; DEERING, M.; BRAZEAU, D.; KOURY, S.; MARTINEZ, D.A. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve**, v. 30, n. 5, p. 645-653, 2004.

GOSSELIN, L.E.; WILLIAMS, J.E.; PERSONIUS, K.; FARKAS, G.A. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (*mdx*) mice: impact of pirfenidone. **Muscle Nerve**, v. 35, n. 2, p. 208-216, 2007.

GROUND, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathol Res Pract**, v. 187, n. 1, p. 1-22, 1991.

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

HARTEL, J.V.; GRANCHELLI, J.A.; HUDECKI, M.S.; POLLINA, C.M.; GOSSELIN, L.E. Impact of prednisone on TGF- $\beta$ 1 and collagen in diaphragm muscle from *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 24, n.3, p. 428-432, 2001.

HEINO, J.; MASSAGUÉ, J. Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor  $\beta$ . **J Biol Chem**, v. 265, n. 18, p. 10181-10184, 1990.

HODGETTS, S.; RADLEY, H.; DAVIES, M.; GROUNDS, M.D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF alpha function with Etanercept in *mdx* mice. **Neuromuscul Disord**, v. 16, n. 9-10, p. 591-602, 2006.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.Jr.; KUNKEL, L.M. Dystrophin: the protein of Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 919-928, 1987.

IANNACCONE, S.; QUATTRINI, A.; SMIRNE, S.; SESSA, M.; DE RINO, F.; FERINI-STRAMBI, L.; NEMNI, R. Connective tissue proliferation and growth factors in animal models of Duchenne muscular dystrophy. **J Neurol Sci**, v. 128, n. 1, p. 36-44, 1995.

IBRAGHIMOV-BERSKROVNAYA, O.; ERVASTI, J.M.; LEVEILLE, C.J.; SLAUGHTER, C.A.; SERNETT, S.W.; CAMPBELL, K.P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**, v. 355, n. 6362, p. 696-702, 1992.

IWATA, Y.; KATANOSAKA, Y.; HISAMITSU, T.; WAKABAYASHI, S. Enhanced  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange activity contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy via involvement of P2 receptors. **Am J Pathol**, v. 171, n. 5, p. 1576-1587, 2007.

JIN, Y.; MURAKAMI, N.; SAITO, Y.; GOTO, Y.; KOISHI, K.; NONAKA, I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. **Acta Neuropathol**, v. 99, n. 6, p. 619-627, 2000.

KATHIR, K.M.; KUMAR, T.K.; YU, C. Understanding the mechanism of the antimitogenic activity of suramin. **Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 899-906, 2006.

KHALIL, N.; BEREZNAVY, O.; SPORN, M.; GREENBERG, A.H. Macrophage production of transforming growth factor  $\beta$  and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. **J Exp Med**, v. 170, n.3, p. 727-737, 1989.

LAHAYE, S.D.; GRATAS-DELMARCHE, A.; MALARDÉ, L.; VICENT, S.; ZGUIRA, M.S.; MOREL S.L.; DELAMARCHE, P.; ZOUHAL, H.; CARRÉ, F.; BEKONO, F.R. Intense exercise training induces adaptations in expression and responsiveness of cardiac  $\beta$ -adrenoceptors in diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**, v. 9; p. 72-80, 2010.

LEE, S.J.; McPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.

LEFF, P.; WOOD, B.E.; O'CONNOR, S.E. Suramin is a slowly-equilibrating but competitive antagonist at  $P_{2x}$ -receptors in the rabbit isolated ear artery. **Br J Pharmacol**, v. 101, n. 3, p. 645-649, 1990.

LOSSOS, I.S.; IZBICKI, G.; OR, R.; GOLDSTEIN, R.H., BREUER, R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. **Life Sci**, v. 67, n. 23, p. 2873-2881, 2000.

LOUBOUTIN, J.P.; FICHTER-GAGNEPAIN, V.; THAON, E.; FARDEAU, M. Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles. **Neuromuscul Disord**, v. 3, n. 5-6, p. 463-469, 1993.

MASSAGUÉ, J.; CHEIFETZ, S.; ENDO, T.; NADAL-GINARD, B. Type  $\beta$  transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, n. 21, p. 8206-8210, 1986.

MARQUES, M.J.; MATSUMURA, C.Y.; 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.

MATSUDA, R.; NISHIKAWA, A.; TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **J Biochem**, v. 118, n. 5, p. 959-964, 1995.

McGEARY, R.P.; BENNETT, A.J.; TRAN, Q.B.; COSGROVE, K.L.; ROSS, B.P. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, n. 13, p. 1384-1394, 2008.

McNEIL, P.L.; KHAKEE, R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. **Am J Pathol**, v. 140, n. 5, p. 1097-1109, 1992.

MIETZ, H.; CHÉVEZ-BARRIOS, P.; FELDMAN, R.M.; LIEBERMAN, M.W. Suramin inhibits wound healing following filtering procedures for glaucoma. **Br J Ophthalmol**, v. 82, n. 7, p. 816-820, 1998.

MILANI, S.; HERBST, H.; SCHUPPAN, D.; STEIN, H.; SURRENTI, C. Transforming growth factor beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. **Am J Pathol**, v. 139, n. 6, p. 1221-1229, 1991.

MORRISON, J.; LU, Q.L.; PASTORET, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. T-cell-dependent fibrosis in the *mdx* dystrophic mouse. **Lab Invest**, v. 80, n. 6, p. 881-891, 2000.

NAKAMURA, A.; YOSHIDA, K.; UEDA, H.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, n. 3, p. 326-331, 2005.

NOZAKI, M.; LI, Y.; ZHU, J.; AMBROSIO, F.; UEHARA, K.; FU, F.; 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. 2354-2362, 2008.

OKANO, T.; YOSIDA, K.; NAKAMURA, A.; SASAZAWA, F.; OIDE, T.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 32, n. 2, p. 191-199, 2005.

PAGEL, C.N.; PARTRIDGE, T.A. Covert persistence of *mdx* myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. **J Neurol Sci**, v. 164, n. 2, p.103-116, 1999.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (*mdx*) and normal muscle in the mouse. **Muscle Nerve**, v. 18, n. 10, p.-1147-1154, 1995a.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J Neurol Sci**, v. 129, n 2, p. 97-105, 1995b.

PAYNE, E.T.; YASUDA, N.; BOURGEOIS, J.M.; DEVRIES, M.C.; RODRIGUEZ, M.C.; YOUSUF, J.; TARNOPOLSKY, M.A. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 33, n. 1, p. 66-77, 2006.

PERTILLE, A.; DE CARVALHO, C.L.T.; MATSUMURA, C.Y.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the *mdx* mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Int J Exp Pathol**, v. 91, n. 1, p. 63-71, 2010.

RANDO, T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 12, p. 1575-1594, 2001.

REED, E.; COOPER, M.R.; LAROCCA, R.V.; BOSTICK-BRUTON, F.; MYERS, C.E. Suramin in advanced platinum-resistant ovarian cancer. **Eur J Cancer**, v. 28A, n. 4-5, p. 864-866, 1992.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Transforming growth factor-beta: potential common mechanisms mediating its effects on embryogenesis, inflammation-repair, and carcinogenesis. **Int J Rad Appl Instrum B**, v. 14, n. 4, p. 435-439, 1987.

ROIG, M.; ROMA, J.; FARGAS, A.; MUNELL, F. Longitudinal pathologic study of the gastrocnemius muscle group in the mdx mice. **Acta Neuropathol**, v. 107, n. 1, p. 27-34, 2004.

ROLLAND, JF.; DE LUCA, A.; BURDI, R.; ANDREETTA, F.; CONFALONIERI, P.; CAMERINO, D.C. Overactivity of exercise-sensitive cation channels and their impaired modulation by IGF-1 in mdx native muscle fibers: beneficial effect of pentoxifylline. **Neurobiol Dis**, v. 24, n. 3, p. 466-474, 2006.

SEEMANN, N.; SELBY, K.; McADAM, L.; BIGGAR, D.; KOLSKI, H.; GOOBIE, S.; YOON, G.; CAMPBELL, C.; **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 3, p. 172-177, 2010.

SERRANO, A.L.; MUÑOZ-CÁVOVES, P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 18, p. 3050-3058, 2010.

STEDMAN, H.H.; SWEENEY, H.L.; SHRAGER, J.B.; MAGUIRE, H.C.; PANETTIERI, R.A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J.T.; KELLY, A.M. The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v. 352, n. 6335, p. 536-539, 1991.

TIDBALL, J.G. Inflammatory process in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol**, v. 288, n. 2, p. R345-R353, 2005.

TORRENTE, Y.; EL FAHIME, E.; CARON, N.J.; BRESOLIN, N.; TREMBLAY, J.P. Intramuscular migration of myoblasts transplanted alter muscle pretreatment with metalloproteinases. **Cell Transplant**, v. 9, n. 4, p. 539-549, 2000.

VILQUIN, J.T.; BRUSSEE, V.; ASSELIN, I.; KINOSHITA, I.; GINGRAS, M.; TREMBLAY, J.P. Evidence of mdx mouse skeletal fragility in vivo by eccentric running exercise. **Muscle Nerve**, v. 21, n. 5, p. 567-576, 1998.

VOOGD, T.E.; VANSTERKENBURG, E.L.; WILTING, J.; JANSSEN, L.H. Recent research on the biological activity of suramin. **Pharmacol Rev**, v. 45, n. 2, p. 177-203, 1993.

WAKEFORD, S.; WATT, D.; PARTRIDGE, T.A. X-irradiation improves *mdx* mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. **Muscle Nerve**, v. 14, n. 1, p. 42-50, 1991.

WERNIG, A.; ZWEYER, M.; IRINTCHEV, A. Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. **J Physiol**, v. 522, n. 2, p. 333-345, 2000.

WILLMANN, R.; POSSEKEL, S.; DUBACH-POWELL; MEIER, T.; RUEGG, M.A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 19, n. 4, p. 241-249, 2009.

WHITEHEAD, N.P.; YEUNG, E.W.; ALLEN, D.G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 7, p. 657-662, 2006.

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. 144, n. 2, p. 221-226, 1994.

ZHOU, L; LU, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 69, n. 8, p. 771-776, 2010.

ZHOU, L.; PORTER, J.D.; CHENG, G.; GONG, B.; HATALA, D.A.; MERRIAM, A.P.; ZHOU, X.; RAFAEL, J.A.; KAMINSKI, H.J. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF- $\beta$ 1, 2, 3 and T $\beta$ RI, II, III in skeletal muscles of *mdx* mice. **Neuromuscul Disord**, v. 16, n. 1, p. 32-38, 2006.

ZUMKELLER, W.; SCHOFIELD, P.N. Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecules in cancer patients. **Anticancer Res**, v. 15, n. 2, p. 343-348, 1995.

## **8. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO**

Suramin, a TGF- $\beta$  blocker, ameliorates dystrophinopathy in *mdx* mice by reducing MMP-9 activity

Ana Paula Tiemi Taniguti, MSc, Cíntia Yuri Matsumura, MSc, Humberto Santo Neto, PhD, and Maria Julia Marques, PhD

Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 04/15526-9 and 08/58491-1). H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grants 301386/07-2, 306689/06-5 and 474708/06-3). A.P.T.T. is the recipient of a CNPq fellowship (grant 140557/07-5).

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, 13083-970, Brazil. email: marques@unicamp.br

Phone: +55-19-3521-6395

Running title: Suramin and diaphragm force in *mdx* mice

## Abstract

In Duchenne muscular dystrophy (DMD) and in the mdx mice model of DMD, lack of dystrophin leads to extensive skeletal muscle necrosis and fibrosis. In the mdx, diaphragm is the most affected muscle, closely resembling human dystrophy. The aim of the present study was to verify whether suramin, an antagonist of TGF- $\beta$ 1 receptor, would affect the activity of metalloproteinase MMP-9 and MMP-2 in the diaphragm of mdx mice. In addition, we further analyzed whether suramin may improve diaphragm muscle force *in vitro* and protect against the loss of beta-dystroglycan, a component of the dystrophin-glycoprotein complex. We observed that suramin decreased MMP-9 activity, protected against diaphragm muscle force loss, increased b-dystroglycan levels and had no effect on MMP-2 activity. These findings suggest that suramin improves diaphragm dystrophinopathy possibly by down-regulating MMP-9 activity. It is also suggested that regulation of MMP-9, but not of MMP-2 activity, occurs, at least in part, through TGF- $\beta$ 1 receptor activation and this may be of relevance to the development of new therapeutic strategies for DMD.

## Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe muscle disease that leads to premature death, usually from respiratory and/or cardiac failure (Engel et al., 1994). It is caused by a lack of dystrophin, a cytoskeletal protein that links the cytoskeleton to the extracellular matrix through the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) (Ervasti et al., 1990; Ohlendieck et al., 1993). The *mdx* mouse model of DMD lacks dystrophin (Hoffman et al., 1987), showing intense myonecrosis and fibrosis of diaphragm muscle (Stedman et al., 1991), which displays a similar phenotype to that observed in DMD (Engel et al., 1994).

Fibrosis is an important aspect of the dystrophic muscle since it impairs muscle function and interferes with the success of cell and gene therapies for dystrophinopathies (Zhou and Lu, 2010). Progressive muscle fibrosis is a histological hallmark of DMD (Engel et al., 1994) and of the *mdx* diaphragm (Stedman et al., 1991), and results from deregulated balance of synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM) components (Zhou and Lu, 2010). A key mediator of fibrosis is transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Bernasconi et al., 1995), which plays a pivotal role in the balance of ECM components (Roberts et al., 1990).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are important regulators of ECM components in skeletal muscles (Carmeli et al., 2004). Inhibition of MMP-9 in *mdx* reduces myonecrosis and fibrosis and improves limb skeletal muscle contractile function (Li et al., 2009). Furthermore, genetic ablation of MMP-9 in *mdx* mice increases  $\beta$ -dystroglycan (Li et al., 2009), a component of the DGC and a substrate of MMP-9 (Michaluk et al., 2007; Page-McCaw et al., 2007).

Previously, we demonstrated that suramin, an anti-fibrotic agent, decreased fibrosis in limb and diaphragm muscles of the *mdx* mice (Taniguti et al., 2010 in press). In the present, we hypothesized that suramin, by its action as a TGF- $\beta$  blocker (Voogd et al., 1993; McGeary

et al., 2008), would affect the activity of MMP-9 and MMP-2 in the diaphragm of the dystrophin-deficient *mdx* mice. We found that suramin not only decreased MMP-9 activity and fibrosis, but also increased the levels of b-dys and improved diaphragm muscle force.

## Material and Methods

### Animals

Male and female *mdx* mice (C57BL/10-*Dmd*<sup>*mdx*</sup>/PasUnib; n=30; 6 months old) from a breeding colony maintained by our institutional animal care facility were used in all experiments. The mice were housed according to institutional guidelines and received food and water *ad libitum*. Some C57BL/10 mice (C57BL/10ScCr/PasUnib; n=15) were used for focused experiments. The animal experiments described here were conducted according to the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; process 2179-1) and the guidelines set forth by our Institution.

### Drug administration

*Mdx* mice (n=15) received intraperitoneal injections of suramin (60 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) on alternate days for 7 weeks (Lossos et al., 2000). Each animal was weighed daily so that the drug dose could be adjusted accurately. Control *mdx* mice (n=15) were injected with saline.

### Zymography analysis

To determine MMP-2 and MMP-9 activity in diaphragm muscle of control (n=4) and mdx mice (n=8), muscles were homogenized in a solution of 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2M NaCl, 0.1% Triton, 10mM CaCl<sub>2</sub> and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for protein extraction. The zymography assays were performed on 7.5% polyacrylamide electrophoresis gels containing 0.1% gelatin and using 30µg of protein per sample. After electrophoresis, the gels were washed with 2.5% Triton X-100 at room temperature and incubated overnight in a solution of 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1M NaCl and 0.03% sodium azide at 37°C. To visualize gelatinolytic bands, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue dye at room temperature (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) followed by extensive washing in destaining buffer (30% methanol and 10% acetic acid in distilled water). The gels were photographed and evaluated by band densitometry using ImageJ 1.38X software (National Institutes of Health, USA). Each sample was analyzed individually and the experiments were repeated three times. Four bands can easily be seen corresponding to 100-kDa (MMP-9), 66-kDa (pre-pro-MMP-2), 60-kDa (pro-MMP-2) and 55-kDa (active-MMP-2) (Kherif et al., 1999; Leite et al., 2010).

### Western blot analysis

β-dystroglycan was quantified by western blot in control C57BL/10 (n=6), mdx saline-treated (n=6) and suramin-treated (n=6) mice.

Muscles were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, and 0.25 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). The samples were centrifuged for 20 min at

12,581 g, and the soluble fraction was resuspended in 50  $\mu$ l Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M  $\beta$ -mercaptoethanol). An amount of 30  $\mu$ g of total protein homogenate from C57BL/10, treated, and untreated diaphragm muscle was loaded onto 8%-15% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane using a submersion electrotransfer apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skim milk/Tris-HCl buffered saline-Tween buffer (TBST; 10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). The membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C, washed in TBST, incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature, and developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA). To control for protein loading, Western blot transfer and nonspecific changes in protein levels, the blots were stripped and re-probed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Band intensities were quantified using the ImageJ 1.38X software (National Institutes of Health, USA).

The following primary antibodies were used for Western blotting: 1)  $\beta$ -dystroglycan (mouse monoclonal NCL-b-DG; Novocastra Laboratories; United Kingdom) and 2) GAPDH (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). The corresponding secondary antibody used for western blot was peroxidase-labeled affinity-purified mouse or rabbit IgG antibody (H+L) (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA).

### Diaphragm muscle force analysis: *In vitro* phrenic nerve-diaphragm preparation

Mice were anesthetized and whole diaphragms along with the phrenic nerves were removed. Left hemidiaphragm was mounted essentially as described for rats (Bülbring, 1946). The preparation was suspended under a constant tension of 5 g in a 5 mL organ bath containing aerated (95%O<sub>2</sub>–5%CO<sub>2</sub>) Tyrode solution (pH 7.4, 37 °C) of the following composition: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub> and 11.1mM glucose). Supramaximal pulses (0.1 Hz, 0.2 ms) delivered by a Grass S4 electronic stimulator (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) were applied through electrodes placed around the motor nerve. For indirect electrical stimulation, the preparations were incubated with d-tubocurarine (14.7 μM). Isometric muscle twitch-tension was recorded with a force–displacement transducer Load Cell BG 50 g (Kulite Semiconductor Products Inc., Leonia, NJ, USA) coupled to a physiograph (Gould RS 3400, Cleveland, OH, USA). The preparations were allowed to stabilize for at least 30 min.

### Histopathological analysis of diaphragm strips

We aimed to correlate muscle force with fibrosis in the same hemidiaphragm strip. Therefore, after the functional analysis of hemidiaphragm strip preparation, the strips were taken out of the bath, weight and freeze in liquid nitrogen for cryostat sectioning. Muscle fibrosis was identified by staining with Masson's trichrome in cryostat cross-sections of the diaphragm strip. Slides were examined under a Nikon Eclipse E 400 microscope connected to a personal computer and a video camera (Nikon Express Series, Shinagawa, Tokyo, Japan). Non-overlapping images of the entire muscle cross-section were taken and tiled together using the ImagePro-Express software. The total area of each cross-section and the fibrosis area

within each cross-section were measured with the ImagePro-Express software. All measurements were made by a blinded observer.

#### Statistical analysis

All data are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis for direct comparison between means of two groups was performed by the Student *t*-test. ANOVA was used for multiple statistical comparisons between groups.

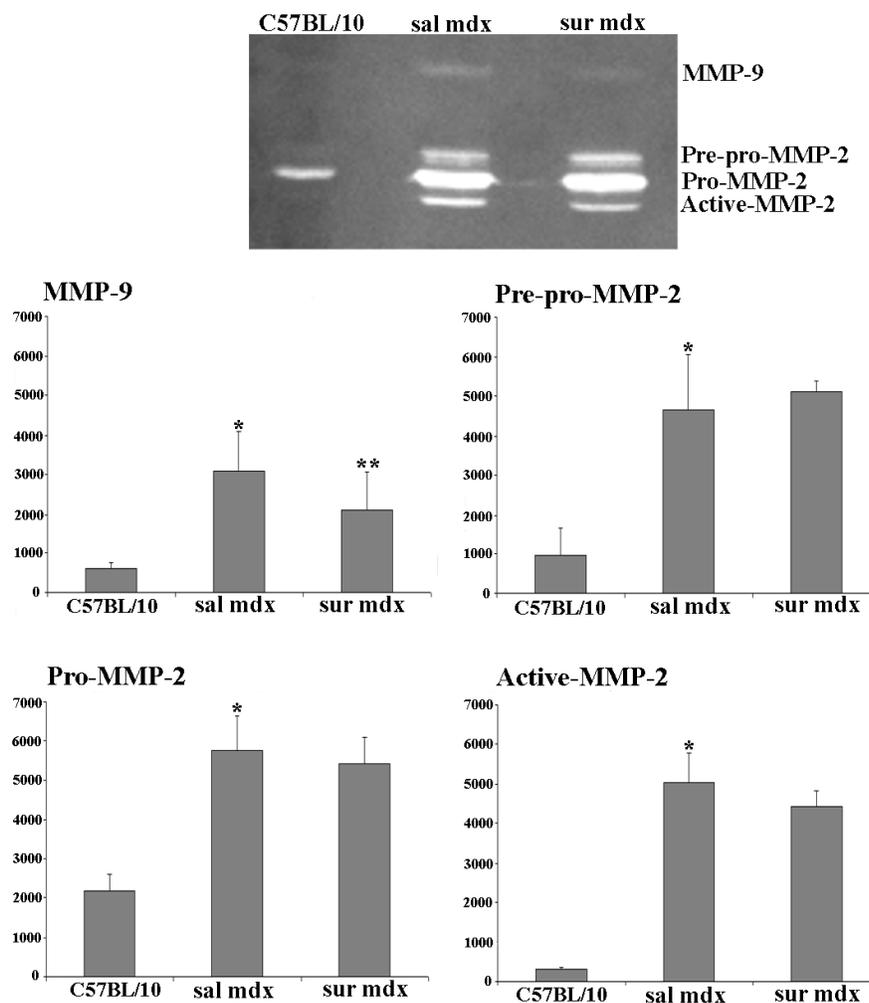
## Results

Zymography revealed that MMP-9, pro-pre-MMP-2, pre-MMP-2 and active-MMP-2 activity were significantly increased in mdx mice compared with C57BL/10 (Figure 1). Suramin decreased MMP-9 activity but did not affect MMP-2 activity in mdx mice (Figure 1).

The levels of b-DG were reduced in about 50% in mdx mice compared to C57BL/10. Suramin lead to a significant increase in  $\beta$ -dystroglycan (about 50% increase) in the mdx diaphragm compared to untreated mdx-mice, almost leading to normal control values (Figure 2).

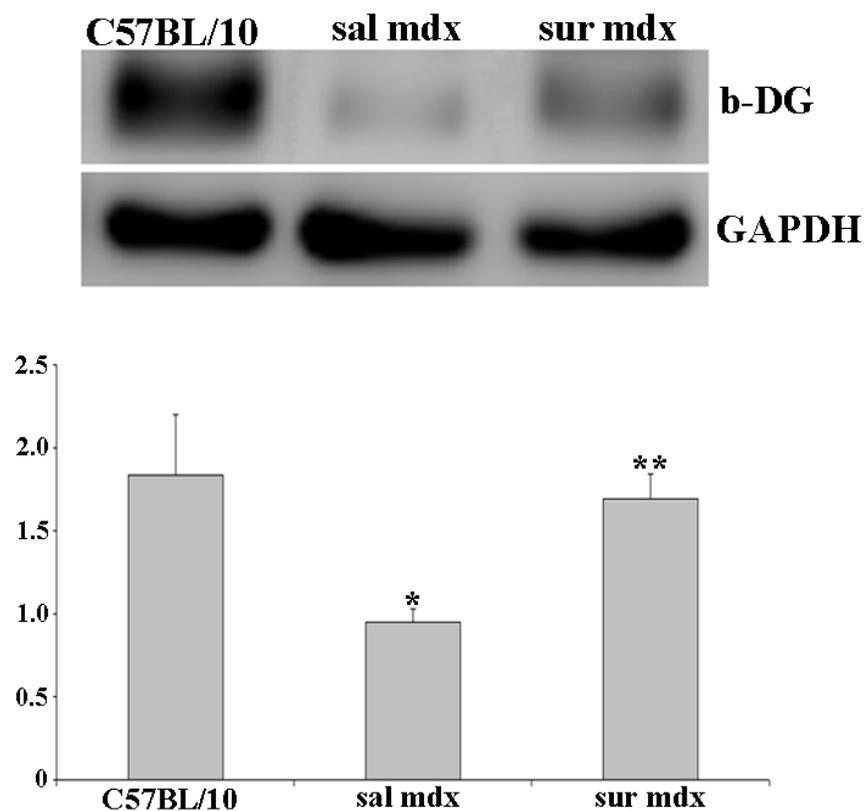
Suramin treatment protected diaphragm muscle against force loss overtime (Figure 3A). The protection against force loss was correlated with a significant decrease in the amount of fibrosis in the same strip (Figure 3B and 3C).

Figure 1



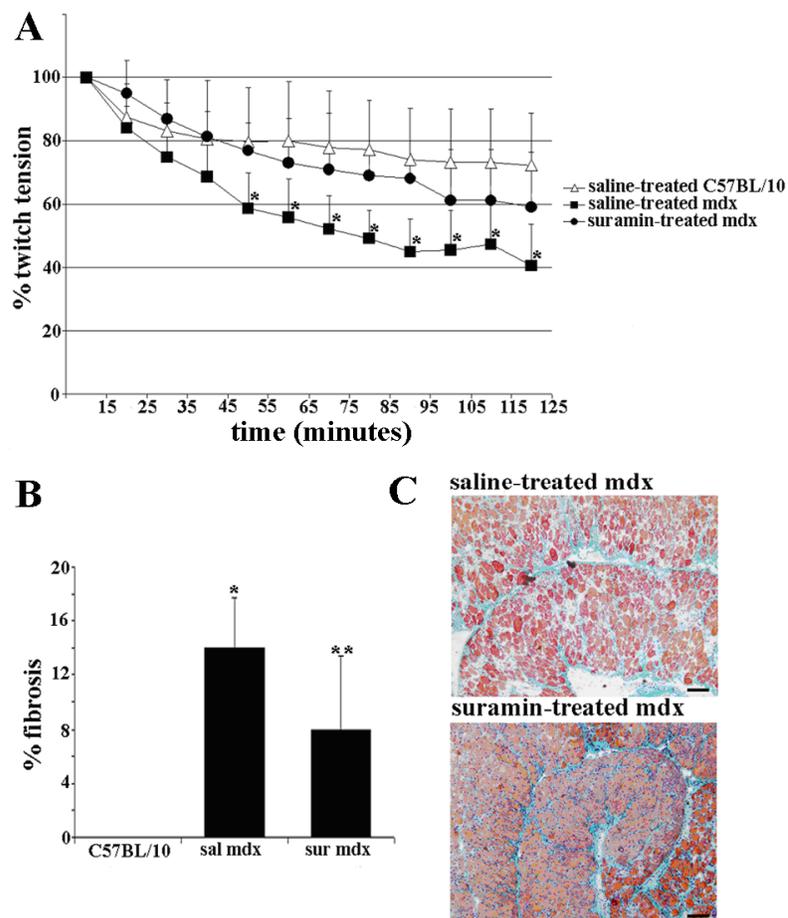
Zymograms of metalloproteinase activity from diaphragm muscle of C57BL/10, saline-treated mdx (mdx sal) and suramin-treated mdx (mdx sur) mice. Graphics show the activity level of MMP-9, pre-pro-MMP-2, pro-MMP2 and active-MMP-2. \*Significantly different from C57BL/10 ( $p < 0.05$ , ANOVA). \*\*Significantly different from saline-treated mdx mice ( $p < 0.05$ , ANOVA).

Figure 2



Western blot analysis of  $\beta$ -dystroglycan (b-DG) in crude extracts of diaphragm muscle from C57BL/10, saline-treated, suramin-treated mdx mice. Western blot of b-DG was reprobbed for GAPDH as a loading control. Graphs represent the level of b-DG expressed in arbitrary units and normalized to GAPDH levels. \*Significantly different from C57BL/10 ( $p < 0.05$ , ANOVA). \*\*Significantly different from saline-treated mdx mice ( $p < 0.05$ , ANOVA).

Figure 3



Effects of suramin on diaphragm force and fibrosis. (A) Diaphragm force of saline-treated C57BL/10, saline-treated mdx (sal mdx) and suramin-treated mdx (sur mdx) mice during direct electrical stimulation. The twitch tension variation during time was determined as ratio between the intensity of the muscle twitch in each time and mass of diaphragm strip. Each point represents the mean $\pm$ SD of 5 experiments. (B) Graphs represent values expressed as the percentage (mean  $\pm$  SD; n=5 mice/group) of the fibrosis area of diaphragm muscle (C) Histological appearance of diaphragm of saline-treated and suramin-treated mdx mice. \*p<0.05 compared to C57BL/10 mice; \*\*p<0.05 compared to saline-treated *mdx* mice (ANOVA).

## Discussion

In the present study we observed that MMPs activity is significantly increased in the diaphragm of mdx mice in comparison to control mice, at 7 months of age. This finding is in agreement with previous studies in which MMPs activity was also increased in limb muscles of younger (8 weeks of age) mdx mice (Li et al., 2009). The concomitant increase in fibrosis and MMPs observed here in the mdx DIA further support the roles of these proteases in the process of dystrophic muscle degeneration and fibrosis, as already reported in dystrophic dog and limb skeletal muscles of younger mdx mice (Fukushima et al., 2007; Li et al., 2009).

Previously, we showed that suramin is able to decrease fibrosis in DIA and in different skeletal muscles of the mdx mice (Taniguti et al., 2010). Here we demonstrated that suramin was effective to decrease only MMP-9 activity in the dystrophic DIA; MMP-2 activity was not influenced by suramin treatment. MMP-9 expression is associated to inflammatory response and to the activation of satellite cells and MMP-2 seems to participate mainly in the regenerative process (Kherif et al., 1999). MMP-9 and MMP-2 exhibit differential patterns of activity and are differently influenced by cytokines and growth factors (Le et al., 2007). The present observation that suramin decreased only MMP-9 activity suggests that TGF- $\beta$  signaling is not involved in MMP-2 activity, but this remains to be confirmed.

One possibility to explain the decreased activity of MMP-9 by suramin is that suramin, by blocking the binding of TGF- $\beta$ 1 to its receptor (Voogd et al., 1993; McGeary et al., 2008), would indirectly affect MMP9, given that MMP-9 expression seems to be induced by activation of TGF- $\beta$  receptors, at least in astrocyte and tumoral cells (Hsieh et al., 2010; Tobar et al., 2010). MMP-9 is produced by inflammatory cells in the muscle (Stahle-Backdahl et al., 1994). Considering that activation of purinergic receptors seems to be involved in MMP9

release from mononuclear cells (Gu et al., 2006), it would be possible that the blocking effects of suramin on purinergic receptors (Voogd et al., 1993) also affect MMP9 as observed here. Nevertheless, the present results suggest that the actions of TGF- $\beta$  on the control of ECM synthesis in skeletal muscle (Javelaud and Mauviel, 2004) are at least in part through regulation of MMP-9 activity but not MMP-2.

The presence of large amounts of MMP-9 has been associated with muscle degeneration in dystrophin-deficient mdx mice (Li et al 2009) due to its ability to cleave components of the DGP, such as  $\beta$ -dystroglycan (Yamada et al 2001; Li et al, 2009).  $\beta$ -dystroglycan is an important link of the sarcolemma to the ECM (Yamada et al., 2001; Fukushima et al., 2007), and this molecule is decreased in the mdx mice (Ervasti et al., 1990; Matsumura et al., 1993). In the present, we observed that suramin increased the levels of  $\beta$ -dystroglycan, possibly due to the lower levels of activity of MMP-9. This could contribute to attenuate myonecrosis and, as a consequence, fibrosis in diaphragm, which is in agreement with the in vitro functional findings indicating a marked increase in DIA contractile force when compared to saline-treated mdx mice.

In conclusion, the present study demonstrated that suramin decreased MMP-9 activity, but not MMP-2, concomitantly to fibrosis, in the most affected diaphragm muscle of mdx mice. In addition, suramin protected DIA against loss of muscle force and increased the levels of  $\beta$ -dystroglycan, further protecting dystrophic muscle against necrosis. Overall, the present findings suggests that, in mdx DIA, MMP-9 regulation, but not MMP-2, occurs, at least in part, via TGF- $\beta$ 1 receptor activation and this may be of relevance to development of new therapeutic strategies.

## References

Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Muscular dystrophies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1994. Vol 2, p 1133-1187.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; 345:315-319.

Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, Towbin JA, Bosch EP, Weisntein SL, Sernett SW, Campbell KP. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 1993; 43:795-800.

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

Stedman HH, Sweeny HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky, JT, Kelly AM. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1991; 352:536–538.

Zhou L, Lu H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69:771-776.

Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli 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. *J Clin Invest* 1995; 96:1137-1144.

Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor- $\beta$ . Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580:225-232.

Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29:191-197.

Li H, Mittal A, Makonchuk DY, Bhatnagar S, Kumar A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009; 18:2584-2598.

Michaluk P, Kolodziej L, Mioduszevska B, Wilczynski GM, Dzwonek J, Jaworski J, Gorecki DC, Ottersen OP, Kaczmarck L. Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem* 2007; 282:16036-16041.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:221-233.

Taniguti APT, Pertille A, Matsumura CY, Santo Neto H, Marques MJ. Prevention of muscle fibrosis by suramin, a TGF- $\beta$ 1 blocker. *Muscle Nerve* 2010; 43: 82-87.

Voogd TE, Vansterkenburg ELM, Wilting J, Janssen LHM. Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev* 1993; 45:177-203.

McGeary RP, Bennett AJ, Tran QB, Cosgrove KL, Ross BP. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8:1384-1394.

Lossos IS, Izbicki G, Or R, Goldstein RH, Breuer R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. *Life Sci* 2000; 67: 2873-2881.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdière-Sahuqué M, Fardeau M, Alameddine H. Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 1999; 205:158-170.

Leite PEC, Lagrota-Candido J, Moraes L, D'Elia L, Pinheiro DF, Silva RF, Yamasaki EN, Quirico-Santos T. Nicotine acetylcholine receptor activation reduces skeletal muscle inflammation of mdx mice. *J Neuroimmunol* 2010; 227:44-51.

Bülbring E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of rat. *Br J Pharmacol* 1946; 1:38-61.

Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMD<sub>1</sub>). *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:54-63.

Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci* 2007; 12: 1475-1487.

Hsieh HL, Wang HH, Wu WB, Chu PJ, Yang CM. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK- NF- $\kappa$ B pathways. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 88-104.

Tobar N, Villar V, Santibanez JF. ROS-NF $\kappa$ B mediates TGF $\beta$ 1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem* 2010; 340: 195-202.

Stahle-Backdahl M, Inoue M, GiudiceGJ, Parks WC. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93: 2022-20-30.

Gu BJ, Wiley JS. Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X<sub>7</sub> receptor. *Blood* 2006; 107:4946-4953.

Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor beta: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1161-1165.

Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Arai K, Okuyama A, Maekawa R, Shimizu T, Matsumura K. Processing of  $\beta$ -dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts

the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. Hum Mol Genet 2001; 10:1563-1569.

Matsumura K, Nonaka I, Campbell KP. Abnormal expression of dystrophin-associated proteins in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. Lancet 1993; 341:521-522.

## **9. DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Fibrose muscular em camundongos mdx: efeitos do exercício físico e agente anti-fibrótico":

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

( x ) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança\*:  
Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, sob Protocolo(s) nº 1758-1.

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

Ana Paula T Taniguti  
Aluna: Ana Paula Tiemi Taniguti

M. J. Marques  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo  
Nome:  
Função:

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