

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FMRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
E BIOAGENTES PATOGÊNICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“Avaliação do efeito de inibidores de mastócitos e do fator de necrose
tumoral na Distrofia Muscular de Duchenne”**

Daniela Dover de Araujo

RIBEIRÃO PRETO

2010

Daniela Dover de Araujo

**“Avaliação do efeito de inibidores de mastócitos e do fator de necrose
tumoral na Distrofia Muscular de Duchenne”**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da USP, para a obtenção do
título de Doutora em Ciências. Área: Biologia
Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Ramos Costa

RIBEIRÃO PRETO

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Araujo, Daniela Dover de

Avaliação do efeito de inibidores de mastócitos e do fator de necrose tumoral na Distrofia Muscular de Duchenne, 2010.

84p. : il.; 30 cm

Tese, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Dep. Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

Orientadora: Costa, Maria Cristina Ramos

1. Camundongo *mdx*. 2. Distrofia muscular. 3. Inflamação

DEDICATÓRIA

Dedico especialmente à minha mamãe Tóia (in memórian) que acompanhou este trabalho até a metade, mas me acompanhou de perto por 34 anos e continua me olhando... Obrigada pela minha educação, por sempre estar ao meu lado e por apoiar todas as minhas escolhas. Se hoje cheguei até aqui, com certeza foi por sua influência.

Dedico também a minha avó Aparecida (in memorian), por todas as suas orações. Com certeza continua rezando por mim, só que agora perto de Deus.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Cristina Ramos Costa, para mim “Cris Costa”, por ser muito mais que uma orientadora. Cris, obrigada por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, por todos os gestos de carinho com toda a minha família. Eu não consigo imaginar outra orientadora ao meu lado nestes últimos cinco anos. Foram cinco anos de muita dedicação, muito trabalho, muitas alegrias, muitas tristezas...sempre compartilhadas com você. Nosso “trabalho” não acaba aqui...tenho certeza.

Ao Dr. João Bizario, meu querido amigo e meu “padrinho” na vida acadêmica. Se a minha mãe não sabia como te agradecer por tudo que você fez com a minha vida profissional, eu também não sei. Só posso dizer: OBRIGADA! Se estou aqui hoje recebendo o título de doutora e assalariada é porque você me motivou e ajudou.

Ao meu marido, Carlinhos, por todo o amor, carinho e paciência (que foi muita). Agradeço a Deus todos os dias por colocá-lo em minha vida. O seu sorriso me contagia de emoção, me acalma e acalenta. EU TE AMO!

À família da AADM meus mais sinceros agradecimentos.

Dona Edna, a senhora é a “peça” fundamental e indispensável dessa família. Não conheço ninguém com tamanha força e determinação. Se estamos lá até hoje, com certeza é pelo seu trabalho. Nem preciso dizer que o Murilo, assim como todos os outros “meninos”, são nossas fontes de inspiração. Quando decidi que era na AADM que eu queria trabalhar, não foi por dinheiro e sim por uma causa.

Daniel Cerri, quantos anos de convivência...Às vezes a gente se atrita, mas a gente se ama. Dani, sua sabedoria foi fundamental para este trabalho, agradeço por toda ajuda que você deu e com certeza vai continuar dando. Afinal, você não vai se livrar de mim tão facilmente.

Angélica e Cláudia, vocês são ótimas...obrigada pela amizade e pela força em todos os momentos. Vocês ajudaram muito neste trabalho. Ah, obrigada por cuidarem dos meus camundongos.

Ian, o nosso mais novo ajudante ou “escraviario”. Muito obrigada por sua ajuda, com certeza ela foi essencial para que eu ganhasse tempo.

Ao pessoal do canil (Luciana e meninos) obrigada pelas horas de descontração.

À Dona Sonia, pelo carinho, beijos e abraços que recebo toda vez que entro na AADM.

Lilian, para mim você sempre fará parte da AADM, obrigada por estar sempre disposta a ajudar, e sempre da melhor maneira possível. Obrigada por tudo!

Esta família é muito unida e também muito ouriçada...
Esta é a minha Grande Família

É muito difícil agradecer a família, principalmente quando se tem várias...

Ao meu pai Ditinho, por estar sendo pai e agora mãe. Sem palavras para agradecer...você é maravilhoso e muito importante na minha vida. OBRIGADA!

À minha irmã Rosane por ser minha fonte de inspiração intelectual. Quando crescer quero ser assim...uma leitora assídua.

À minha irmã Patricia, que mesmo estando longe, está perto. Agradeço ao meu cunhado Luciano por fazer esta distância não atrapalhar a nossa união. Agradeço a vocês dois por se esforçarem em fazer com que o Matheus cresça presente em nossas vidas. Amo vocês!

À minha família de sangue e de coração: Tia Dilva, Tio Odilon, Stella, Cláudio, Flávinho, Claudinho... por serem presentes na minha vida e por estarem (se possível) mais presentes ainda. Não sei se este é o momento, mas impossível agradecer o que vocês tem feito pelo meu pai, e consequentemente por todas nós.

À família inteira do Tio Luizinho e Tia Elizene, sintam-se todos agradecidos por sempre torcerem pelo meu sucesso. Agradeço especialmente ao Marquinho, Simone e Sophia por me receberem em sua casa, e por sempre estarem presentes em momentos especiais.

À família da Tia Heleni: Arnaldo (bolacha), Marcos Paulo (Du) e Marco, vocês sabem que amo vocês. Du, foi muito importante pra mim quando você veio morar comigo, agradeço por isso. Minha casa estará sempre aberta para todos vocês.

A minha família adotiva: Tia Zenaide e Tio Cláudio, Fabiana e Alexandre, vocês são e sempre serão especiais.

A minha família de coração: Tio Arnaldo e Tia Neuza, Alessandra e Victor, são mais de 20 anos de uma amizade sempre presente. Vocês são incríveis!

A minha mais nova família: Seu Balthazar e Dona Deise, Du e Jana, Cris e Fabrício e meus queridos sobrinhos Guilherme e Bernardo. Tenho certeza que escolhi o marido certo, pois a família que veio no "pacote" não poderia ser melhor. Agradeço pelos incentivos, pelas descontrações, pelos almoços, por toda ajuda que vocês me deram quando eu estava em momentos de puro estresse, por exemplo, na qualificação.

*Minha família não acaba aqui... Agradeço a Deus por colocar em minha vida
AMIGOS que hoje fazem parte da minha grande família.*

Rafaela e Fausto, Lílian e Junior, o que seriam dos meus finais de semana sem vocês. Agradeço a Deus por ter amigos leais, companheiros e confidentes.

Ao meu irmão de coração Rodrigo pela amizade incondicional. Como agradecer os dois meses que morei em seu quarto em D.C. Só você para me apoiar nessa loucura.

Às "PEIAS", Sibere e Thailise, muito difícil agradecer... Vocês se tornaram minhas grandes amigas. Vocês sabem que eu seria capaz de ficar escrevendo...escrevendo...e não conseguiria terminar de agradecer tamanha gratidão. Vocês duas me ajudaram no momento mais difícil da minha vida. Obrigada não é suficiente para agradecer o que fizeram por mim. Saibam que vocês terão eternamente a minha amizade. Vocês são LINDAS.

Aos meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado: Val, Jo, Kamila, Tatiane e Cristiane Izidoro, Mariça e Luiz Henrique. Val e Jo não importam o rumo que nossas vidas tomem vocês sempre estarão no meu coração, afinal vocês fazem parte do meu crescimento profissional. Kamila, Tati e Cris, agradeço o carinho e a amizade. Mariçota, você é especial na vida de todas nós, o ensinamento que recebo de você é transcendental (coisa de outro mundo mesmo), não sei como explicar a paz e a luz que você me transmite. Luiz Henrique "fedido" você fez parte do início deste trabalho, e foi daí que nossa amizade surgiu. Adoro vocês!

Ao Caetano pela compreensão, pelo carinho, pelas milhares de ajuda...e também por cuidar do Pedro nesta reta final. Lógico que tenho que agradecer ao Pedro por roubar por várias horas a sua querida mamãe.

Às minhas amigas, Carla Petean e Viviane (vivi), vocês são queridas demais.

Aos meus companheiros do laboratório morfofuncional: Prof. Alfredo, Prof. Edson, Profa. Margarida e Profa Heid. Agradeço especialmente a Profa Heid pelo convívio toda segunda feira, e por tudo que venho aprendendo na área da embriologia e histologia.

Aos meus queridos alunos Francisco e Tatiana (olopatadina), Carol e Aline (LMP-420), Rafa e Pedro (cetotifeno), Mariana e Sibere (galectina) e Thailise (mioblastos). Acredito fortemente que aprendi a ser professora com vocês, vocês serão inesquecíveis, pois vocês fizeram parte do início da minha vida acadêmica. O que aprendi com vocês não tem preço.

Ao Dr. George Cianciolo principalmente pelo envio da droga LMP-420, mas agradeço também toda a atenção que ele me deu quando visitei seu laboratório na Duke University Medical Center.

Às professoras Maria Célia e Constance Oliver pelo grande ensinamento e por todas as sugestões (olopatadina) que deram início a este trabalho. Obrigada também pelo carinho que vocês sempre me receberam. Agradeço também a toda equipe de vocês, principalmente a

Maria Rita, por ter se disponibilizado a me ensinar o experimento de desgranulação de histamina.

Ao professor Marcelo Baruffi por sempre colaborar com a AADM, obrigada pelas galectinas, pelo nitrogênio, e principalmente pela nossa publicação.

Aos demais professores: Maria Paço Larson, Roy Larson, Enilza Espreafico por estarem sempre dispostos a ajudar.

Com muito carinho agradeço aos funcionários do departamento: Marinho, Rosângela, Pitta, Silmara, Cirlei, Vani e Izilda. Agradeço especialmente a Vani, Izilda e Silmara pelos ensinamentos na prática histológica, vocês foram a base deste trabalho.

À AADM, FAPESP, PETROBRAS, UNAERP, FINEP, FMRP e FAEPA pelo apoio financeiro e institucional.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ΔCt – média do Ct, ciclo em que a fluorescência ultrapassa o valor basal na reação de PCR em tempo real
- Omg – grupo de camundongos não tratados
- BSA – soro albumina bovina
- c/ex – com exercício físico
- ceto 1mg – grupo de camundongos tratados com cetotifeno na dose de 1 mg/kg/dia
- CK – creatina quinase
- DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol
- DGC – complexo proteico associado à distrofina
- DIA – músculo diafragma
- DMB – Distrofia Muscular de Becker
- DMD – Distrofia Muscular de Duchenne
- DMEM – meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Media
- dys* – gene da distrofina
- EBD – corante azul de Evans
- EDL – músculo extensor longo dos dedos
- FGF – fator de crescimento de fibroblastos
- GA – músculo gastrocnêmio
- Gal-1 – galectina-1
- Gal-3 – galectina-3
- GM-CSF – fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
- H&E – hematoxilina e eosina
- IFN- γ – interferon- γ
- Ig – imunoglobulina
- IL – interleucina
- LPS – lipopolissacarídeo
- min – minuto

NGF – fator de crescimento neural

nNOS – isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico

NO – óxido nítrico

olo 10mg – grupo de camundongos tratados com olopatadina na dose de 10 mg/kg/dia

PAF – fator ativador de plaquetas

s/ex – sem exercício físico (sedentário)

SCF – fator de crescimento de células precursoras

SEM – erro padrão da média

TA – músculo tibial anterior

TGF- β – fator de crescimento e transformação beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

URE – unidades relativas de expressão

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença fatal causada pela ausência da distrofina e caracterizada por degeneração progressiva da musculatura esquelética. O camundongo *mdx*, modelo da DMD, apresenta susceptibilidade à lesão das miofibras, elevação da creatina quinase (CK) sérica e ciclos de degeneração e regeneração muscular, fenótipo intensificado por atividade física. A lesão muscular é exacerbada por um processo inflamatório crônico, do qual participam citocinas e células do sistema imunológico. Dentre estas células, destacam-se os mastócitos que se acumulam nos sítios de lesão, liberando mediadores como o TNF- α , que também é liberado pelos macrófagos, neutrófilos e miofibras lesadas. Este trabalho teve por objetivos: i) estudar o efeito da atividade física compulsória na degeneração muscular de camundongos *mdx*, a fim de otimizar as condições experimentais para o teste de drogas; ii) identificar marcadores de lesão muscular; e iii) avaliar o potencial efeito anti-inflamatório das drogas cetotifeno e olopatadina (anti-histamínicos e inibidores da desgranulação de mastócitos), e LMP-420 (inibidor da transcrição do TNF- α) na progressão da DMD. Para tanto, camundongos *mdx* de 4 semanas de vida foram submetidos a atividade física e ao tratamento com as drogas por 5 semanas. Os resultados indicaram que a galectina-1 pode ser considerada um marcador de degeneração muscular. De acordo com os critérios analisados em conjunto (dosagem de CK e parâmetros quantitativos histológicos dos músculos gastrocnêmio, GA, diafragma, DIA), verificou-se que as três drogas resultaram em uma diminuição significativa da degeneração muscular. Camundongos *mdx* tratados com cetotifeno, olopatadina e LMP-420 apresentaram redução significativa tanto nos níveis séricos de CK (37%, 23% e 30% respectivamente), quanto na área relativa ocupada por miofibras apresentando lesão no sarcolema (ceto: 95% no GA e 98% no DIA; olo: 73% somente no GA; e LMP-420: 98,6% no GA e 83,6% no DIA). Estes dados indicaram que as três drogas contribuíram para manter a integridade da musculatura esquelética de camundongos *mdx*, com destaque para a LMP-420.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a fatal disease caused by the absence of dystrophin and characterized by progressive degeneration of skeletal muscle. The *mdx* mouse, model of DMD, presents susceptibility to myofiber injury, elevated serum creatine kinase (CK) levels and degeneration-regeneration cycles. This phenotype can be intensified by physical activity. Muscular damage is exacerbated by a chronic inflammatory process, with the participation of cytokines and immune cells. Among these, mast cells accumulate in injury sites and release mediators as TNF- α , which is also released by macrophages, neutrophils and damaged myofibers. This work aimed to: i) study the effect of compulsory physical activity in the muscular degeneration of *mdx* mice, in order to optimize experimental conditions for drug testing; ii) identify protein markers of muscle damage; and iii) evaluate the potential anti-inflammatory effect of ketotifen and olopatadine (mast cell inhibitors and anti-histamine agents) and LMP-420 (inhibitor of TNF- α transcription) in the progression of dystrophinopathy. In this way, four week-old *mdx* mice were submitted to physical activity and drug treatment during 5 weeks. The results indicated that galectin-1 can be considered a marker of muscular degeneration. According to the analyzed criteria (CK dosage and histopathological analyses of GA and DIA muscles), the three drugs resulted in a significant reduction of muscular degeneration. *Mdx* mice treated with ketotifen, olopatadine and LMP-420 presented significant reduction in the CK levels (37%, 23% and 30%, respectively). A reduction in the area occupied by injured myofibers was also detected (keto: 95% in GA and 98% in DIA; olo: 73% only in GA; and LMP-420: 98.6% in GA and 83.6% in DIA). These data indicated that the three drugs contributed to maintain the integrity of *mdx* mice skeletal muscle, especially LMP-420.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. Distrofinopatias	15
1.1. Distrofia Muscular de Duchenne	15
1.2. Bases moleculares	17
1.3. O músculo esquelético distrófico	19
2. O camundongo <i>mdx</i>	21
3. Mastócitos e distrofia muscular	23
4. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	27
OBJETIVOS	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
1. Animais	31
2. Drogas utilizadas	32
2.1. Hidrocloreto de olopatadina e fumarato de cetotifeno	32
2.2. LMP-420	32
3. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica	33
4. Análises histológicas de cortes musculares	34
4.1. Obtenção dos músculos gastrocnêmio (GA) e diafragma (DIA) e preparo de cortes histológicos em parafina	34
4.2. Obtenção de cortes congelados corados com azul de Evans	35
4.3. Aquisição das imagens e análise histológica quantitativa	36
4.4. Ensaios de imunofluorescência: imunohistoquímica	37
5. Análise dos níveis de mRNA por PCR em tempo real	38
5.1. Extração de RNA total dos músculos GA e DIA	38
5.2. Reação de transcrição reversa (RT)	39
5.3. Oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	40
5.4. PCR quantitativo em tempo real	40
6. Indução de lesão muscular por BaCl ₂	41
7. Ensaios de <i>western blot</i> e imunodeteção das galectinas 1	42
7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	42

7.2. Imunodeteção em membranas de nitrocelulose	42
8. Análise estatística	43
RESULTADOS.....	44
PARTE I – Caracterização das colônias de camundongos mdx e C57BL/6 do Centro de Pesquisas em Distrofia Muscular (CPDM)	44
1. Análise da expressão da distrofina por imunohistoquímica	44
2. Avaliação do efeito da atividade física compulsória nos camundongos	45
2.1. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica	45
2.2. Avaliação morfológica dos músculos GA e DIA antes e após a atividade física	47
2.3. Análise da expressão de galectina-1 (Gal-1) nos músculos GA e DIA de camundongos normais e mdx	50
PARTE II - Avaliação do efeito do tratamento com cetotifeno e olopatadina em camundongos mdx.....	54
1. Avaliação semanal da massa corporal	54
2. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica.....	54
3. Avaliação dos processos de degeneração e regeneração muscular através da análise histológica quantitativa dos músculos GA e DIA	55
3.1. Quantificação dos focos de lesão	55
3.2. Quantificação de infiltrados de células inflamatórias.....	56
3.3. Quantificação de áreas contendo miofibras em processo de degeneração-regeneração	58
3.4. Quantificação de miofibras com núcleos não periféricos.....	59
PARTE III – Avaliação do efeito do tratamento com a droga LMP-420 em camundongos mdx.....	62
1. Avaliação dos níveis transcricionais de mRNA do TNF- α nos músculos GA e DIA	62
2. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica.....	63
3. Avaliação dos processos de degeneração e regeneração muscular pela análise histológica quantitativa dos músculos GA e DIA	63
3.1. Avaliação da degeneração muscular.....	63
3.1.1. Quantificação da área relativa ocupada por miofibras apresentando lesão no sarcolema.....	64
3.1.2. Quantificação da área relativa contendo infiltrados inflamatórios.....	65
3.2. Avaliação da regeneração muscular.....	65
3.2.1. Avaliação da área relativa contendo miofibras com sinais característicos de regeneração recente.....	66
3.2.2. Avaliação da porcentagem de miofibras contendo núcleos não periféricos	67

DISCUSSÃO	68
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ANEXOS

ANEXO 1 – Artigos publicados

ANEXO II – Manuscrito submetido

INTRODUÇÃO

1. Distrofinopatias

1.1. Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e a Distrofia Muscular de Becker (DMB) são doenças neuromusculares causadas por mutações no gene da distrofina, sendo por isso denominadas distrofinopatias. Apresentam padrão de herança ligada ao X recessivo e são caracterizadas por degeneração progressiva da musculatura esquelética e gravidade variável. A DMD, forma mais grave e mais frequente na população, afeta 1 em cada 3600 a 6000 meninos vivos, é altamente incapacitante e culmina com óbito por deficiência cardíaca ou respiratória, usualmente no início da segunda década de vida (Emery, 2002; Blake et al., 2002; Bushby et al., 2010a).

Os meninos afetados pela DMD são aparentemente normais ao nascimento, embora já apresentem a concentração sérica da enzima creatina quinase (CK) aumentada, um indicativo de degeneração de miofibras. O início da deambulação é tardio e, em geral, ocorre aos 18 meses de vida. Os primeiros sinais da DMD começam a aparecer entre os três e cinco anos de idade. Devido à fraqueza muscular dos membros inferiores e da cintura pélvica, a criança apresenta dificuldade para se locomover, subir escadas, correr, levantar-se do chão, podendo ser observado o sinal clássico de Gowers (Figura 1) (Gowers, 1886). Notam-se também quedas frequentes, aumento do volume das panturrilhas (pseudo-hipertrofia por substituição das miofibras necrosadas por tecido adiposo e fibroso), andar basculante, acentuação da lordose lombar e, posteriormente, cifoescoliose devido à atrofia da musculatura paravertebral. Por volta dos 11 anos, a criança apresenta incapacidade de andar e contraturas nos joelhos, pulsos, cotovelos e quadril. Geralmente aos 20 anos, ocorre acometimento do diafragma e outros músculos respiratórios, propiciando insuficiência respiratória que pode culminar em infecção ou falência respiratória. Pode haver também comprometimento da

função cardíaca. O óbito ocorre comumente entre a segunda e a terceira década de vida. Já na DMB, os primeiros sinais aparecem dos cinco aos 15 anos, sendo semelhantes aos da DMD, porém consideravelmente mais leves. Sua incidência é 10 vezes menor e apresenta evolução mais lenta (Emery, 2002).

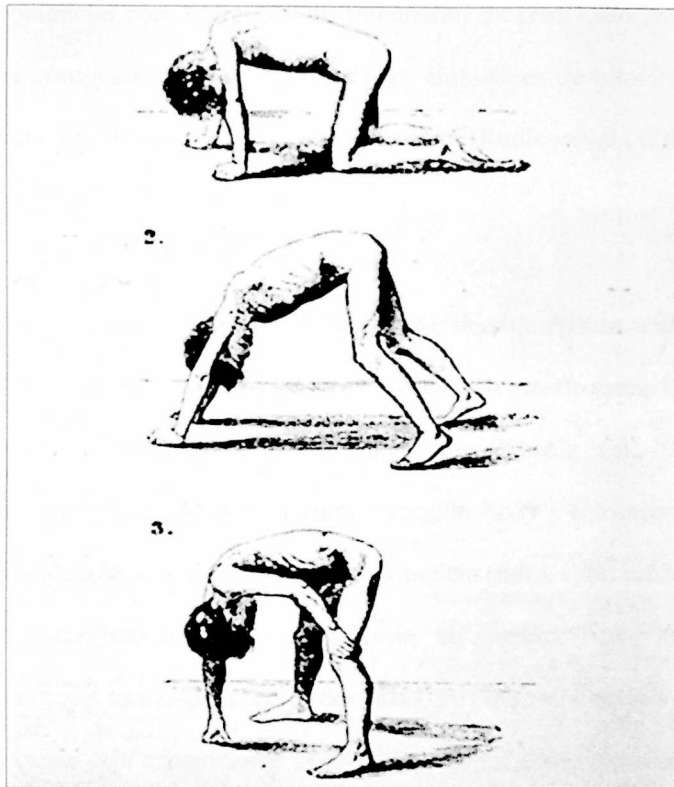


Figura 1: Sinal de Gowers. O clássico sinal de Gowers, em que a criança colocada de bruços é solicitada a se levantar e o faz "escalando sobre si mesma" devido à fraqueza da musculatura proximal.

Até o momento, não existe cura para as distrofinopatias. As estratégias terapêuticas disponíveis são paliativas e consistem em intervenções farmacológicas e nutricionais, que podem ser complementadas com cuidados de uma equipe multiprofissional com fisioterapia adequada e terapia psicológica, por exemplo (Bushby et al., 2010a e 2010b). As intervenções farmacológicas, em sua maioria, visam conter a degeneração muscular reduzindo a necrose

das miofibras e o processo inflamatório crônico associado. A terapia mais indicada é o uso de corticosteróides que pode ser associado a outros fármacos para minimizar a deficiência cardíaca e respiratória. A corticoterapia de uso prolongado, entretanto, deve ser bem monitorada, pois pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis como ganho de peso, menor crescimento e ocorrência de cataratas assintomáticas (Moxley et al., 2005; Wong et al., 2007). Outras drogas com potencial para aplicação no tratamento da DMD são antiinflamatórios de ação mais específica comparada aos corticosteróides, inibidores de citocinas, antioxidantes, bloqueadores de canais de cálcio e inibidores de proteólise (Radley et al., 2007).

1.2. Bases moleculares

Embora não tenha resultado na descoberta da cura das distrofinopatias, a identificação do gene da distrofina (*dys*) como causador dessas doenças representou um grande avanço, pois possibilitou o início da busca por abordagens moleculares visando o tratamento (Koenig et al., 1987). O gene *dys* é o maior gene conhecido (cerca de 2,5 Mb), localiza-se na região Xp21 e é composto por 79 exons. O transcrito, de 14 kb de extensão, é traduzido na forma completa (*full length*) predominantemente nos músculos esquelético e cardíaco e, em menores níveis, no cérebro. Até o momento, já foram identificados sete promotores tecido-específicos, dos quais três são responsáveis pela transcrição do gene completo e os demais pela expressão de isoformas menores, como representado na Figura 2A (Blake et al., 2002). Dois terços dos casos de DMD são decorrentes de mutações herdadas e um terço de mutações novas. Cerca de 58% dos afetados possuem grandes deleções ou inserções; 41% pequenas deleções ou inserções e mutações de ponto que causam códon de terminação prematura da tradução; o restante decorre de duplicações do gene *dys* (Kapsa et al., 2003).

A distrofina é uma proteína fibrosa da região subsarcolemal, composta por 3685 resíduos de aminoácidos, de massa molecular 427 kDa. É necessária para a formação do complexo proteico DGC (*dystrophin-glycoprotein complex*) que conecta o citoesqueleto

cortical de actina e a matriz extracelular, conferindo flexibilidade e estabilidade ao sarcolema (Figura 2B). Participam desse complexo outras proteínas como as α e β -distroglicanas, as sarcoglicanas, a sarcospan, a sintrofina, a distrobrevina e a isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS), entre outras. Na ausência da distrofina, os demais componentes proteicos têm sua expressão reduzida e o complexo DGC apresenta-se parcialmente desestruturado. Como consequência, o sarcolema apresenta fragilidade e susceptibilidade à lesão durante a contração das miofibrilas, o que desencadeia o processo de degeneração muscular característico dos músculos deficientes em distrofina. Entretanto, a fisiopatologia da doença ainda não foi totalmente esclarecida (Deconinck e Dan, 2007; Davies e Novak, 2006; Kapsa et al., 2003; Blake et al., 2002).

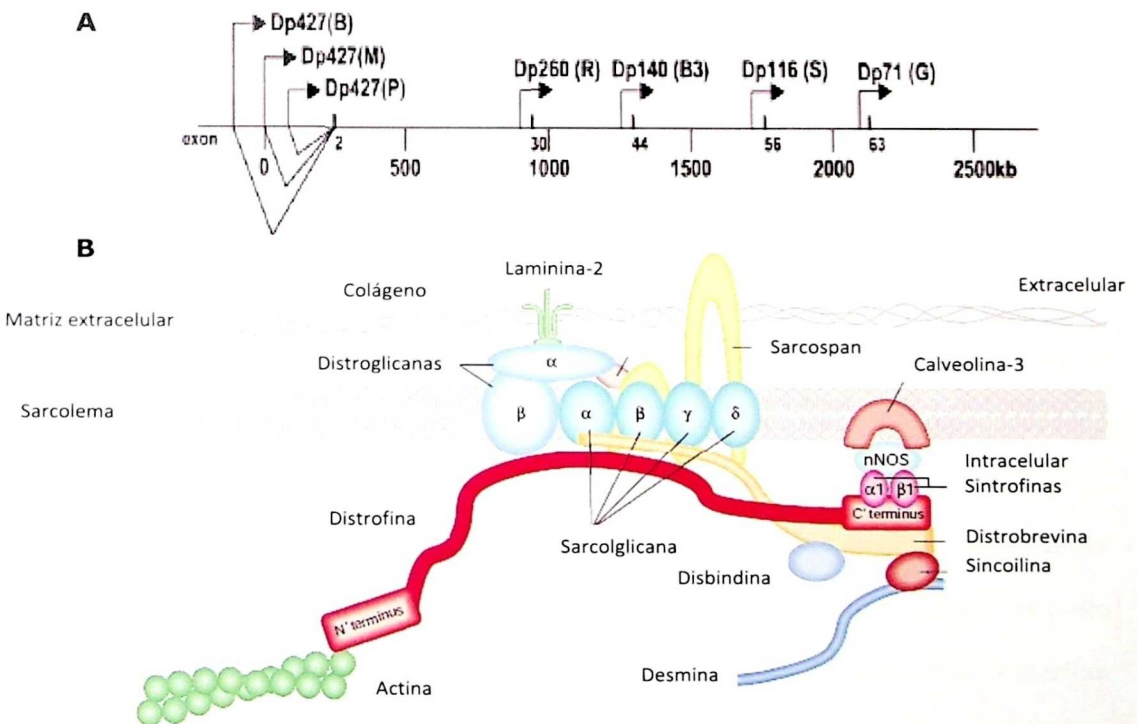


Figura 2: (A) Representação esquemática do gene da distrofina mostrando as diferentes isoformas proteicas, com as respectivas massas moleculares, resultantes da transcrição a partir de promotores tecido-específicos. B=cérebro, M=músculo, P=células de Purkinje, R=retina, S= células de Schwann, e G=glia e outros tecidos (expressão ubíqua) (Blake et al., 2002). (B) Representação esquemática do sarcolema mostrando a distrofina, o complexo proteico associado (DGC, *dystrophin-glycoprotein complex*), conectando o citoesqueleto de actina e a matriz extracelular. (Davies e Novak, 2004 modificado).

1.3. O músculo esquelético distrófico

O músculo esquelético é o tecido de maior massa de um indivíduo adulto hígido. Apresenta distribuição generalizada no organismo, sendo responsável pela postura, pelos movimentos, pelo funcionamento do sistema respiratório e por parte significativa do metabolismo. É um tecido compacto, altamente organizado, formado por células multinucleadas, de diâmetro aproximadamente homogêneo, denominadas fibras musculares ou miofibras devido à sua forma alongada. Cada miofibra é envolvida por uma membrana denominada sarcolema e contém em seu interior centenas a milhares de miofibrilas, estruturas formadas por unidades repetitivas denominadas sarcômeros. Os sarcômeros, formados por filamentos de actina e miosina, constituem as unidades contráteis do músculo e conferem o padrão estriado observado em cortes histológicos (Sloper et al., 1978).

As miofibras esqueléticas são muito susceptíveis à lesão após trauma direto (por exemplo, por intensa atividade física, lacerações) ou resultante de causas indiretas, como disfunção neurológica ou defeitos genéticos. Quando não reparadas, essas lesões podem levar à perda de massa muscular, deficiência locomotora e à letalidade nos piores casos. Entretanto, a manutenção da musculatura esquelética é conferida por sua notável capacidade para se regenerar, através de um processo eficiente e rápido, mediado por células satélites (Chargé e Rudnicki, 2004).

As células satélite são células precursoras mononucleadas quiescentes encontradas ao redor de cada miofibra, sendo delimitadas pela lâmina basal. Uma vez ativadas, essas células dividem-se produzindo mioblastos, que proliferam antes de iniciar a diferenciação e a fusão em miotubos, até finalmente amadurecer em miofibras (Figura 3). Algumas células satélites adjacentes a uma única miofibra são suficientes não só para regenerar o músculo formando mais de 100 miofibras, como também para manter o estoque de células satélite (Boldrin et al,

2007; Shi e Garry, 2006). Uma vez que tenha ocorrido a diferenciação, as miofibras não se dividem, e os núcleos não replicam seu DNA novamente.



Figura 3: Representação esquemática do papel das células satélites na regeneração muscular. Em resposta a uma lesão, a célula satélite quiescente é ativada por fatores como FGF, HGF, NOTCH/NICD e TNF- α . A expressão do fator de transcrição MyoD é aumentada no intervalo de 2 h após a lesão. Estudos recentes indicam que as células satélites fazem auto-renovação e proliferam produzindo mioblastos que se fundem para formar miofibrilas recém-regeneradas (caracterizadas pela localização central do núcleo) (Shi e Garry, 2006 modificado).

O músculo esquelético distrófico é caracterizado pela presença de regiões contendo miofibrilas necróticas geralmente agrupadas, que podem ser observadas em cortes de biópsias de pacientes com DMD mesmo antes de o sinal clínico de fraqueza muscular ser notado. Próximo às miofibrilas necróticas são encontrados infiltrados de células inflamatórias, predominantemente constituídos de macrófagos e linfócitos T CD4+ (McDouall et al., 1990).

Nos estágios iniciais da distrofinopatia, é possível notar, simultaneamente à degeneração das miofibrilas, sinais de regeneração muscular ativa, que ocorre com o objetivo de substituir ou reparar as fibras lesadas. As miofibrilas recentemente regeneradas apresentam pequeno diâmetro, citoplasma basofílico (devido à presença de RNA) e núcleos grandes e centralizados. O mecanismo de regeneração é similar ao descrito acima para o músculo esquelético normal. Essas regiões, contendo características de lesão e de regeneração, são frequentemente denominadas grupos de degeneração-regeneração (Deconinck e Dan, 2007). Nessa fase inicial, o número de células satélite no músculo de pacientes afetados pela DMD é maior do que o encontrado em

músculo normal. Entretanto, foi demonstrado em estudos *in vitro* que essas células apresentam menor capacidade de proliferação (Blake et al., 2002). Com a progressão da distrofinopatia, a capacidade regenerativa das miofibras esqueléticas vai sendo perdida à medida que o tecido muscular é substituído pelos tecidos adiposo e fibroso, o que resulta no quadro de pseudohipertrofia seguida de atrofia. Nos estágios mais avançados, as células satélite são exauridas devido ao constante estímulo para a proliferação (Blake et al., 2002).

A ausência da distrofina e a desestruturação do complexo DGC conferem fragilidade ao sarcolema, provocando micro-lesões em resposta ao dano mecânico induzido por contrações excêntricas e outros tipos de estresse mecânico. As lesões na membrana podem resultar em aumento da permeabilidade das miofibras (com perda de proteínas citoplasmáticas e infiltração por conteúdo extracelular), perda da homeostase do cálcio e morte celular. Além da regeneração alterada, como descrito anteriormente, outros eventos ocorrem *downstream* às lesões no sarcolema: defeitos vasculares (devido à deslocalização da enzima nNOS e perda da modulação por NO), processo inflamatório crônico e fibrose (Deconinck e Dan, 2007). Entretanto, o mecanismo completo da fisiopatologia dos músculos deficientes em distrofina ainda não é conhecido.

2. O camundongo *mdx*

Existem vários modelos animais para as distrofinopatias, sendo o mais utilizado o camundongo *mdx* devido à facilidade de manutenção e manuseio (Collins e Morgan, 2003) (Figura 4A). Essa linhagem, considerada modelo genético e bioquímico da DMD, surgiu espontaneamente em uma colônia C57BL/10, e foi identificada devido aos elevados níveis da enzima muscular creatina quinase (CK) no soro (Bulfield et al., 1984). A ausência de distrofina funcional nas miofibras resulta de uma mutação de ponto que cria um códon de terminação de tradução no exon 23 do gene (Collins e Morgan, 2003).

Como mencionado anteriormente, análises histopatológicas de biópsias musculares de pacientes com DMD sugerem fragilidade do sarcolema e maior susceptibilidade a lesões, desencadeando uma cascata de eventos: maior influxo de Ca^{2+} , apoptose e necrose, infiltração por tecido fibroso e adiposo, isquemia vascular e presença de infiltrados inflamatórios (processo inflamatório crônico) (Deconinck e Dan, 2007). O camundongo *mdx* apresenta um quadro distrófico semelhante, mas com a ocorrência de ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares, e maior capacidade regenerativa em comparação aos meninos afetados pela DMD (Tseng et al., 2002).

A primeira onda de degeneração intensa do camundongo *mdx* ocorre entre a terceira e a quarta semana de vida. Neste período, observa-se a presença de focos de necrose e de infiltrados inflamatórios, quantidades significativas de miofibras em regeneração com núcleos centralizados e altas concentrações séricas de CK. Após as primeiras semanas de vida, um quadro brando de miopatia associada à fibrose se segue e permanece durante o tempo de vida do animal, só tornando-se agudo com a senilidade (Collins e Morgan, 2003; Watchko et al., 2002).

Apesar de aparentemente menos grave do que na doença humana, a degeneração muscular é intensificada se os animais são submetidos a atividade física compulsória, principalmente exercícios excêntricos em que a musculatura é alongada enquanto suas fibras são ativadas (Brussee et al., 1997; De Luca et al., 2005). Depois de três sessões de corrida em declive (10 m/min por 10 min e 15° de inclinação), os músculos mais afetados são o diafragma (DIA), e o tríceps, com poucos danos considerados no tibial anterior (TA) e no extensor longo dos dedos (EDL) (Brussee et al., 1997) (Figura 4B). Contudo, se o exercício for forçado e crônico, aumenta a necrose no músculo gastrocnêmio (GA), podendo ser igual ou inferior ao dano no diafragma (DIA) e no TA (Burdí et al., 2006; Pierno et al., 2007). Grounds et al. (2008) discutem a importância do exercício forçado no aumento da gravidade

Página faltante no documento original

Página faltante no documento original

Os mediadores liberados pelos mastócitos aumentam a produção de colágeno, contribuindo para a fibrose, atraem outras células inflamatórias e intensificam a destruição tecidual (Marshall et al., 2004). Os três tipos principais de mediadores são: i) pré-formados: histamina e proteoglicanos (heparina, sulfato de condroitina), proteases neutras (triptase) e fatores de crescimento (TNF- α , fator de crescimento de fibroblastos - FGF, fator de crescimento de células precursoras - SCF, fator de crescimento endotelial vascular - VEGF, e fator de crescimento e transformação beta – TGF- β); ii) neo-formados: metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos) e fator ativador de plaquetas (PAF); iii) neo-sintetizados: interleucinas (IL3, IL4, IL5, IL6) e fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF), produzidos após ativação mediada por IgE (Mendonça et al., 1986; Metcalfe et al., 1997).

Como mencionado anteriormente, a desgranulação de mastócitos e consequente liberação de mediadores inflamatórios pode ser inibida por drogas sintéticas. O hidrocloreto de olopatadina (Figura 6A), uma nova droga antialérgica, é um potente antagonista do receptor H1 de histamina e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de várias doenças alérgicas. Tamura e colaboradores (2004), demonstraram que a olopatadina administrada por via oral na dose de 10 mg/kg/dia, tanto para uso preventivo quanto terapêutico, atenuou a inflamação cutânea e diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias (interferon- γ - IFN- γ , IL-4, IL-1b, GM-CSF e fator de crescimento neural - NGF) em ratos modelos de dermatite crônica. Em outros modelos animais de alergia, a olopatadina atuou como supressor das fases inicial e tardia, inibindo a liberação de histamina, triptase, TNF- α , leucotrienos e prostaglandinas de mastócitos em cultura primária (Matsubara et al., 2004; Ohmori et al., 2002). Além disso, é a primeira droga antialérgica que inibe tanto a infiltração quanto a ativação de eosinófilos (Ohmori et al, 2002).

A olopatadina é considerada uma droga de ação dupla, ou seja, combina o efeito anti-histamínico com o efeito anti-inflamatório resultante da inibição da liberação de mediadores através da estabilização da membrana dos mastócitos. Uma outra droga também de segunda geração considerada de ação dupla, apresentando propriedades semelhantes às da olopatadina, é o cetotifeno (fumarato de cetotifeno, Figura 6B) (Kaditis, 2007).

O cetotifeno é uma substância antialérgica potente, sendo um bloqueador não competitivo dos receptores H1 da histamina. Quando administrado por via oral na dose de 1 mg/kg/dia foi considerado um antiasmático não broncodilatador que inibe os efeitos de certas substâncias endógenas conhecidas por serem mediadoras inflamatórias, exercendo assim atividade antialérgica (Kaditis, 2007). Contudo, uma das diferenças entre o cetotifeno e a olopatadina, é que o cetotifeno parece atuar evitando o desencadeamento da resposta inflamatória, i.e., apresenta ação mais profilática do que terapêutica (Manzouri, 2006).

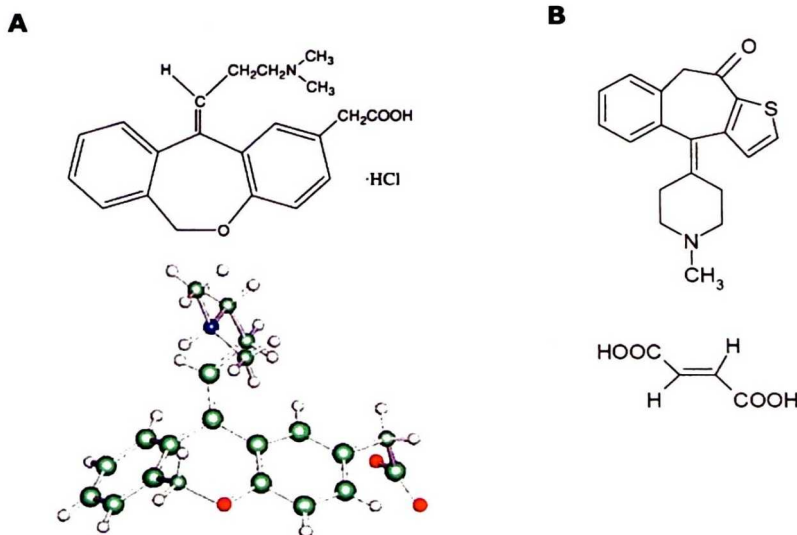


Figura 6: Estrutura química dos inibidores de mastócitos, olopatadina e cetotifeno. (A) Hidrocloreto de olopatadina (Allelock®, Kyowa Hakko Kogyo, Japão) e (B) Fumarato de cetotifeno (Zaditen®, Novartis do Brasil).

4. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma potente citocina pró-inflamatória, membro da superfamília de ligantes TNF que promovem a sinalização inflamatória. O TNF é sintetizado como uma proteína monomérica transmembrana (tmTNF) que é inserida na membrana como um homotrímero e clivada pela metaloprotease de matriz, denominada enzima de conversão do TNF alfa (TACE; ADAM17). A clivagem produz um trímero de 51 kDa que é solúvel circulante (solTNF), sendo ambos, tmTNF e solTNF, biologicamente ativos. O equilíbrio entre a sinalização por tmTNF e solTNF é influenciado pelo tipo de célula, seu estado de ativação, o estímulo para a síntese de TNF, atividade de TACE, e expressão de inibidores endógenos de TACE levando a efeitos divergentes do TNF sobre a viabilidade celular (MacCoy e Tansey, 2008; Wajant et al., 2003).

O receptor 1 do TNF, TNFR1, é expresso praticamente em todos os tipos de células e pode ser ativado pela ligação tanto do solTNF quanto do tmTNF, com preferência pelo solTNF. Já o receptor 2 do TNF, TNFR2, é expresso principalmente por células do sistema imunitário e pelas células endoteliais, e é preferencialmente ativado pelo tmTNF. A sinalização do TNF através de seus receptores (TNFR1 e TNFR2) pode provocar uma variedade de respostas celulares dependendo de vários fatores incluindo o estado metabólico da célula e as proteínas adaptadoras presentes. Dependendo dessas diferenças, ocorre a ativação de várias vias de sinalização intracelular, incluindo o fator nuclear kappa-B (NF- κ B), p38, c-jun N-terminal quinase (JNK) resultando em um número de respostas que incluem a inflamação, proliferação celular, migração, apoptose e necrose (McCoy e Tansey, 2008; Ware, 2005).

O TNF- α possui um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias e auto-imunes, incluindo artrite reumatóide, esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico (McCoy e Tansey, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que pacientes afetados pela

DMD apresentam altos níveis de TNF- α . Essa citocina, que é liberada no músculo por mastócitos, neutrófilos, macrófagos e miofibras lesadas (Figura 5) (Kuru et al., 2003), parece ter um papel chave no processo inflamatório da degeneração muscular (Grounds e Torrisi, 2004; Grounds et al., 2005; Hodgetts et al., 2006).

Uma significativa redução da necrose, característica das primeiras semanas de vida do camundongo *mdx*, foi observada pelo bloqueio do TNF- α utilizando anticorpos monoclonais neutralizantes (Grounds e Torrisi, 2004), ou uma proteína de fusão composta pelo domínio extracelular ligante do receptor de TNF- α ligado à porção Fc da imunoglobulina G humana (Hodgetts et al., 2006). Entretanto, apesar dos resultados promissores no camundongo *mdx*, a terapia baseada na inibição do TNF- α utilizando proteínas (anticorpos monoclonais ou o receptor solúvel) tem algumas desvantagens. Essa estratégia terapêutica apresenta custo muito elevado, além de envolver riscos de contaminação e perda de eficácia por proteólise ou desenvolvimento de resposta imune específica (anticorpos contra as proteínas administradas). Uma droga sintética que iniba a via do TNF- α sem apresentar essas desvantagens, pode representar um grande avanço para a terapia da DMD, doença cujas possibilidades terapêuticas são ainda bastante limitadas.

A droga sintética LMP-420 (Figura 7), um análogo de nucleosídeo de purina, é um inibidor não-citotóxico da transcrição do TNF- α . Foi desenvolvida pelo Prof. Dr. George J. Cianciolo do Duke University Medical Center (Durham, North Carolina, USA), em um estudo conjunto com a empresa LeukoMed Inc. (<http://www.leukomed.com>). Até o momento, já foi demonstrado que o LMP-420 inibe a replicação tanto do HIV quanto do *Mycobacterium tuberculosis* em células mononucleares de sangue periférico humano em cultura (Haraguchi et al., 2006). Em outro estudo, foi verificado, em um modelo *in vitro* para investigar a malária cerebral, que o LMP-420 inibiu a ativação de células endoteliais e a citoaderência, nessas células, de hemácias infectadas pelo *Plasmodium falciparum*, demonstrando um forte efeito

antiinflamatório da droga (Wassmer et al., 2005). Um estudo para doenças envolvendo processos inflamatórios intestinais, como a doença de Crohn, demonstrou inibição significativa do TNF- α em camundongos tratados com a LMP-420 comparados aos não tratados, mas não foi observado nenhum efeito sobre a inflamação tecidual (Hale e Cianciolo, 2008). Sabe-se que a inibição da transcrição do TNF- α pelo LMP-420 é mais efetiva em células humanas do que murinas, mas a porcentagem de inibição ainda não foi determinada (Dr. Cianciolo, comunicação pessoal).

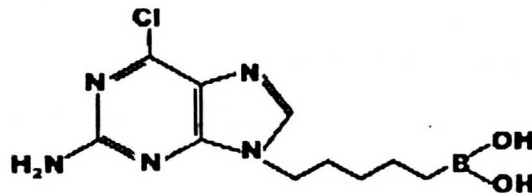


Figura 7. Estrutura molecular do LMP-420 (2-NH₂-6-Cl-9-[(5-dihydroxyboryl)-pentyl] purina).

Nesse estudo, foi avaliado o efeito das drogas olopatadina, cetotifeno e LMP-420 na progressão da distrofinopatia de camundongos *mdx* submetidos à atividade física compulsória. A hipótese inicial baseou-se na potencial ação antiinflamatória dessas drogas, como forma de conter o processo inflamatório crônico que acomete os músculos distróficos e, desta forma, melhorar a condição muscular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das drogas olopatadina, cetotifeno e LMP-420 nos processos de degeneração e regeneração de músculos afetados pela DMD utilizando camundongos *mdx* como modelo experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a caracterização fenotípica das colônias de camundongos *mdx* e C57BL/6 do Centro de Pesquisas em Distrofia Muscular (CPDM).
2. Estudar o efeito do exercício físico compulsório na musculatura esquelética de camundongos *mdx*, definindo parâmetros indicativos dos processos de degeneração e regeneração muscular.
3. Avaliar o efeito do tratamento de camundongos *mdx* submetidos a atividade física compulsória com cetotifeno e olopatadina utilizando parâmetros de degeneração e regeneração muscular.
4. Avaliar o efeito do tratamento de camundongos *mdx* submetidos a atividade física compulsória com a LMP-420 utilizando parâmetros de degeneração e regeneração muscular. Determinar nos camundongos tratados a porcentagem de inibição da transcrição do mRNA do TNF- α .

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Todos os animais utilizados foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisas em Distrofia Muscular (CPDM) da Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular (AADM) em caixas de polipropileno dispostas em uma estante isoladora (Alesco, São Paulo, Brasil), com termostato e temporizador. Alimento e água foram consumidos *ad libitum* com ciclos de luz de 12 horas. As colônias de camundongos do biotério do CPDM foram estabelecidas a partir de animais fornecidos pela Universidade Federal Fluminense (RJ). Este estudo tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Para avaliar a ação anti-inflamatória das drogas em estudo no camundongo *mdx*, foram selecionados camundongos machos de quatro semanas de vida, idade correspondente ao pico da primeira onda de degeneração muscular. Para acentuar a lesão muscular e o processo inflamatório os animais foram submetidos a cinco semanas de corrida em esteira elétrica a 20 cm/s, com declive de 16°, três vezes por semana, durante 20 minutos. Esta atividade iniciou-se na quarta semana de vida do camundongo, juntamente com o início do tratamento com as respectivas drogas. Para a caracterização fenotípica inicial (4 semanas de vida) e final (9 semanas de vida), os animais foram sacrificados com a utilização dos anestésicos xilaxina (Calier, Barcelona, Espanha) e quetamina (Vetbrands, Paulínea, Brasil) na dose de 1 µg/ml cada, para a retirada do sangue e dos músculos GA e DIA e realização dos seguintes procedimentos: i) dosagem de creatina quinase (CK) sérica; ii) análises histopatológicas através do preparo de cortes musculares corados com azul de Evans e com H&E; e iii) extração de RNA total para ensaios de PCR em tempo real; iv) extração de proteína total para ensaios de Western Blot. O número de camundongos utilizados em cada procedimento

experimental está indicado nas respectivas figuras do item Resultados. Os animais foram pesados semanalmente, a fim de ajustar a dose das drogas de acordo com sua massa corpórea.

Para a avaliação da olopatadina, do cetotifeno e da LMP-420 foram utilizados aproximadamente 100 camundongos *mdx* que foram divididos em tratados e não tratados com as respectivas drogas, conforme descrito no item 2 abaixo. Foram também utilizados 30 camundongos C57BL/6 normais.

2. Drogas utilizadas

2.1. Hidrocloreto de olopatadina e fumarato de cetotifeno

A droga hidrocloreto de olopatadina, aqui referida como olopatadina (Figura 6A), foi adquirida do Japão, onde é comercializada com o nome Allelock® (Kyowa Hakko Kogyo, Tóquio, Japão), em comprimidos de 5 mg cada. Foi utilizada na dose de 10 mg/kg/dia (Ohmori et al., 2002, Tamura et al., 2004). O fumarato de cetotifeno, aqui referido como cetotifeno, foi adquirido no Brasil na forma de xarope e é comercializado com o nome Zaditen® pela Novartis (Figura 6B), sendo utilizado na dose de 1 mg/kg/dia (Kaditis et al, 2007). Ambas as drogas foram diluídas a cada dois dias em água Milli-Q estéril e 100 µL, nas respectivas concentrações, foram aplicados nos camundongos por via oral (gavagem) diariamente.

Para avaliação da olopatadina e do cetotifeno os camundongos *mdx* foram divididos em: um grupo com 10 *mdx* tratados com olopatadina; um grupo com 10 *mdx* tratados com cetotifeno; e, um único grupo com 25 *mdx* controle não tratados.

2.2. LMP-420

A droga LMP-420 (2-NH₂-6-Cl-9-[(5-dihydroxyboryl)-pentyl] purine), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. George J. Cianciolo do Duke University Medical Center (Durham,

North Carolina, USA), é uma molécula pequena, análoga a um nucleosídeo de purina (Figura 7) e com ação inibitória da transcrição do mRNA do TNF- α (Wassmer et al., 2005). É solúvel em solução aquosa de sorbitol a 5% e pode ser administrada por via oral, subcutânea ou intraperitoneal.

Para avaliação do efeito da LMP-420, os camundongos *mdx* foram divididos em 2 grupos: i) um grupo com 20 *mdx* tratados diariamente com 100 μ L de uma solução aquosa de LMP-420 em sorbitol a 5%, injetados por via subcutânea (dose 25 mg/kg/dia); ii) um grupo controle com 20 *mdx* tratados com 100 μ L de sorbitol a 5% (veículo), injetados por via subcutânea. A LMP-420 foi diluída a cada dois dias e guardada na geladeira sob o abrigo da luz.

3. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica

Os camundongos C57BL/6 e *mdx* foram anestesiados com xilasina/quetamina, na dose de 1 μ g/mL cada, para coleta de aproximadamente 500 μ L de sangue de cada animal por punção cardíaca (cuidadosamente para evitar hemólise). As amostras foram mantidas a 4°C por 1 h para coagulação e posteriormente centrifugadas a 2000xg durante 5 minutos a 4°C. Aproximadamente 40 μ L de soro foram utilizados para a dosagem de CK utilizando o *kit* creatina fosfoquinase (CPK, Doles, Goiânia, Brasil), que se baseia em um método colorimétrico simples, seguindo as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em duplicata. Os valores dos níveis séricos de CK dos animais na nona semana de vida foram comparados entre si e com os valores obtidos de animais de quatro semanas através de análise estatística pelo *software* GraphPad Prism v.4.03, conforme descrito no item 8.

4. Análises histológicas de cortes musculares

4.1. Obtenção dos músculos gastrocnêmio (GA) e diafragma (DIA) e preparo de cortes histológicos em parafina

Imediatamente após o sacrifício dos camundongos por anestésicos (xiliasina/quetamina, na dose de 1 µg/mL cada) e deslocamento cervical, o GA e o DIA foram retirados, lavados em PBS (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de Na₂HPO₄; 7 mM de KH₂PO₄) e processados seguindo o protocolo padronizado no Laboratório de Histologia do Centro de Pesquisas em Distrofia Muscular (CPDM-AADM/UNAERP). Os músculos foram dispostos, individualmente, em cassetes de histologia e colocados para fixação em paraformaldeído 4 % (Sigma) por 18 a 20 horas. Após esta fase, foi realizada a desidratação dos tecidos colocando-os, consecutivamente, em concentrações crescentes de álcool etílico (Merck): 50 % por 8 minutos, 70 % por 30 minutos, 80% por 30 minutos, 90 % por 30 minutos, 95 % por 30 minutos e 100 % por 45 minutos com 3 trocas de 15 minutos cada; seguido de álcool etílico absoluto misturado com benzol (1:1) (Labsynth) por 15 minutos e posteriormente, benzol por 30 minutos também com três trocas. Em seguida, realizou-se a inclusão em parafina (Histosec pastilhas, Merck) por 30 minutos; o material foi retirado e incluído em uma nova solução de parafina por mais 30 minutos. Durante a microtomia, foram utilizados blocos de parafina para fazer cortes histológicos de 5 µm que foram fixados em lâminas de vidro (Bioglass) com albumina (Seracare, Life Sciences) e água. As lâminas permaneceram por 2 horas na estufa a 60°C e, após esse tempo, foi iniciado o processo de desparafinização, mergulhando-as em Xilol (Panreac Química) por duas vezes de 5 minutos cada, na mistura de Xilol e álcool etílico absoluto (1:1) por 4 minutos, e em concentrações decrescentes de álcool etílico: 100% por 4 minutos, 95% por 3 minutos, 90% por 3 minutos, 80% por 3 minutos, 70% por 3 minutos e, por fim, 50% por 3 minutos. Para a hidratação das

lâminas, foram realizadas lavagens em água corrente por 5 minutos e água destilada. As lâminas foram mergulhadas na solução corante hematoxilina por 45 segundos. Em seguida, foi retirado o excesso do corante com água corrente por 5 minutos e água destilada. As lâminas foram colocadas em solução de eosina por 45 segundos. A partir disso, foi iniciado um novo processo sequencial em que as lâminas foram colocadas em álcool etílico 95% por 1 minuto com três trocas, solução de Xilol e álcool etílico absoluto (1:1) por 45 segundos, e três lavagens com Xilol por no mínimo 5 minutos. Fez-se a montagem e finalização das lâminas usando Permount (Fisher) e lamínula de vidro 26x76mm (BIOGLASS).

4.2. Obtenção de cortes congelados corados com azul de Evans

O corante vital azul de Evans (*Evans Blue Dye*, EBD) é utilizado para a detecção de miofibras apresentando lesão no sarcolema (Hamer et al., 2002) Este corante infiltra as miofibras lesadas, que passam a apresentar fluorescência de cor vermelha quando excitadas com luz de comprimento de onda 495 nm. Cerca de 20 h antes do sacrifício, os animais foram injetados por via intraperitoneal com 100 µL de solução aquosa estéril de EBD a 1% por 10 g de massa corpórea. Para a obtenção de cortes congelados, logo após a retirada, os músculos foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Para a realização do corte, o material foi orientado em aparato para a inclusão em Tissue-Tek® (Sakura), congelado com acetona e gelo seco e assim transferido para a câmara do criostato (Leica) do Laboratório de Patologia do Hospital Beneficência Portuguesa ou do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Foram realizados cortes transversais de 30 µm de espessura com navalha de aço. Os cortes foram estendidos com *anti-roller* e colhidos em lamínulas 24x24 mm, por contato direto e consequente aderência por diferença de temperatura.

4.3. Aquisição das imagens e análise histológica quantitativa

Para a aquisição das imagens dos cortes histológicos, foi utilizado o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 800 contendo uma câmera digital DMX 1200 acoplada, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Mastócitos (FMRP-USP) coordenado pelas Profas. Dras. Maria Célia Jamur e Constance Oliver. Para a análise quantitativa, foi utilizado o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>). Os parâmetros de análise foram: i) porcentagem de células com núcleos não periféricos, característica de regeneração muscular (Figura 8A); ii) área relativa contendo infiltrados inflamatórios (Figura 8B); iii) área relativa contendo características de regeneração recente, isto é, fibras pequenas geralmente agrupadas, fortemente basofílicas, com citoplasma de coloração uniforme e núcleo central vesicular, em regiões onde não são observados infiltrados inflamatórios (Figura 8C); iv) área relativa ocupada por miofibras apresentando lesão no sarcolema indicada pela presença de EBD no sarcoplasma, um indicador de lesão celular (Figura 8D). Para todos os parâmetros analisados e expressos como porcentagem de área, foi considerada a área total analisada do corte como 100%. As análises foram realizadas em teste cego. Após esse processo, os dados foram analisados através do programa de estatística GraphPadPrism v.4.03, conforme descrito no item 8.

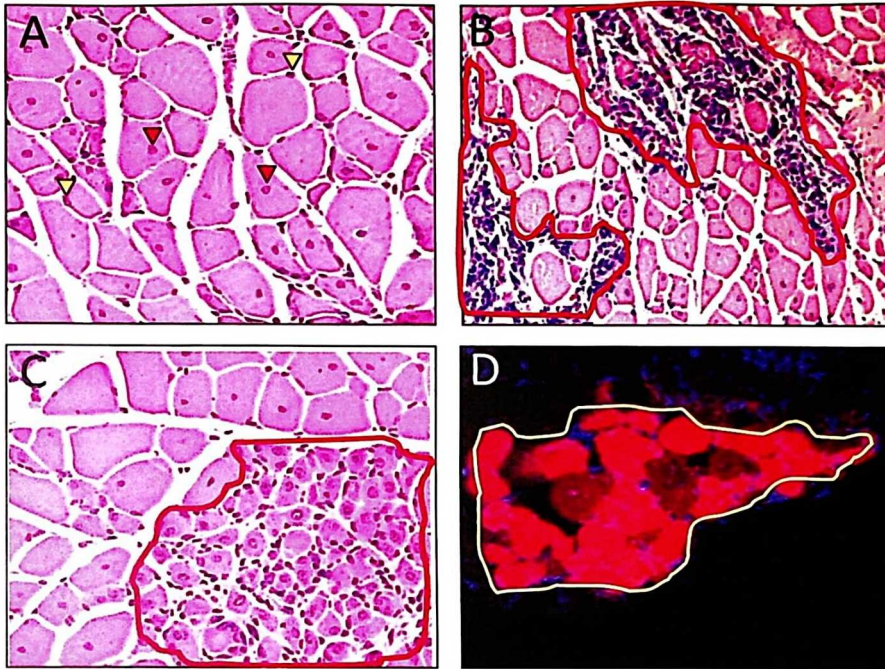


Figura 8: Imagens representativas de cortes musculares de camundongo *mdx* não tratado corados com H&E e azul de Evans. (A) As cabeças de setas amarelas (∇) indicam a presença de núcleos periféricos, e as cabeças de setas vermelhas (\blacktriangledown) indicam a presença de núcleos não periféricos; (B) A linha vermelha demonstra um exemplo de como a área foi selecionada para a quantificação de infiltrados inflamatórios; (C) A linha azul indica um exemplo de área selecionada para a quantificação de agrupamentos de miofibras em processo de degeneração-regeneração; (D) Observa-se em vermelho miofibras infiltradas com azul de Evans em imagem adquirida com microscopia de fluorescência. Os núcleos estão marcados em azul (DAPI).

4.4. Ensaios de imunofluorescência: imunohistoquímica

Foram realizados ensaios de imunohistoquímica para a confirmação fenotípica dos camundongos C57BL/6 e *mdx*, com base na presença ou ausência da distrofina no sarcolema das miofibras, e para a marcação de galectina-1 antes e após o programa de exercício físico compulsório. Após sacrifício dos animais com anestésico e deslocamento cervical, o músculo GA de um dos membros foi retirado, lavado em solução salina e envolvido em talco em pó para crioproteção, sendo em seguida imerso em nitrogênio líquido. Cortes transversais de 5

μm de espessura foram feitos em criostato Leica no Laboratório de Patologia do Hospital Beneficência Portuguesa de Ribeirão Preto. Os cortes foram colhidos em lamínulas de 24 x 24 mm, por contato direto, ocorrendo aderência por diferença de temperatura. As crio-seções foram bloqueadas com soroalbumina bovina (BSA) 1% e IgG de cabra a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS por 1 hora. Em seguida, foi feita a incubação com anticorpo policlonal anti-distrofina (Santa Cruz Biotechnology) ou anti-galectina-1 (Cerri et al., 2008) na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 1 hora à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados seis vezes por 5 minutos com PBS e incubados com o anticorpo secundário (5,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cabra anti-IgG de coelho mais FITC) durante 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados 6 vezes por 5 minutos com PBS e finalmente montados em Permount:PBS (2:1). As imagens foram obtidas em uma câmera digital Nikon DMX-1200 acoplada ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 800.

5. Análise dos níveis de mRNA por PCR em tempo real

5.1. Extração de RNA total dos músculos GA e DIA

Após o sacrifício dos camundongos, os músculos GA e DIA foram retirados, lavados em solução salina, congelados imediatamente em nitrogênio líquido, pesados e mantidos em freezer a -80°C até o momento da extração. As amostras congeladas foram colocadas em um cadinho de porcelana com pistilo e maceradas em nitrogênio líquido até completa pulverização. Foi então acrescentado o reagente Trizol na proporção de 1 mL do reagente para 50 a 100 mg de tecido macerado, de forma que a amostra não ultrapassasse 10% do volume do reagente utilizado para a homogeneização. Após completa homogeneização, as amostras foram submetidas à centrifugação, 12000xg por 10 minutos a 4°C , com o objetivo de remover o material insolúvel. Em seguida, foi realizada a incubação do homogeneizado por 5 minutos à temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos ácidos nucléicos -

proteínas. Foram adicionados 200 μL de clorofórmio (Merck) para cada 1 mL de Trizol. As amostras foram agitadas em *vortex* por 15 segundos, incubadas por 2 minutos a 4°C à temperatura ambiente e novamente centrifugadas a 12000xg por 15 minutos. A fase aquosa contendo o RNA total foi cuidadosamente coletada e à mesma foram adicionados 500 μL de isopropanol (Merck) para cada 1 mL de Trizol. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e a -20°C por 24 horas. O RNA precipitado, praticamente invisível, foi coletado após centrifugação a 12000xg por 30 minutos a 4°C e lavado com 1 mL de etanol 75% (Merck); agitando-se rapidamente em *vortex* para homogeneizar. Após centrifugação a 7500g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido. O *pellet*, seco ao ar em capela de fluxo, foi ressuscitado em 20 μL de água pré-tratada com DEPC e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (Beckman, Palo Alto, USA) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

5.2. Reação de transcrição reversa (RT)

A fim de obter moléculas de DNA complementar (cDNA) para serem utilizadas como molde na amplificação de genes de interesse por PCR, foram realizadas reações de transcrição reversa (RT) utilizando o kit SuperScript III (Invitrogen). As reações foram montadas em tubos de 0,2 mL adicionando-se: 2 μg de RNA total, 1 μL de oligo dT *primer* a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 μL de *annealing buffer* a 10 mM em um volume final de 6 μL . A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e 4°C por 1 minuto em termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram adicionados 2 μL de 2xFirst Strand e 10 μL da SuperScript III e a mistura foi incubada a 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

5.3. Oligonucleotídeos (*primers*)

A sequência dos oligonucleotídeos, os respectivos genes e o tamanho dos fragmentos amplificados são mostrados na Tabela I abaixo. O gene constitutivo ciclofilina de camundongo foi utilizado como controle endógeno (*housekeeping*) das reações de PCR quantitativo em tempo real.

Tabela I: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações PCR em tempo real.

<i>Genes</i>	<i>Primer sense (F)</i>	<i>Primer anti-sense (R)</i>	<i>Amplicon (pb)</i>
<i>TNF-α</i>	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	213
<i>Ciclofilina</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCGCAAGTCAAAAG	91

5.4. PCR quantitativo em tempo real

Amostras de cDNA dos músculos GA e DIA foram utilizadas para os ensaios de PCR em tempo real para quantificação dos níveis de mRNA dos genes TNF- α e ciclofilina que foi amplificado como controle (Tabela I). Foi utilizado o reagente SybrGreen (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as reações foram processadas em um termociclador (Eppendorf-realplex⁴, New York, NY, USA), no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Em cada reação, foram adicionados: 1 μ L de cDNA para cada 6,25 μ L do *mix* Sybrgreen, 1 μ L de cada *primer* a 2,5 μ M, 1 μ L a 3,25 μ L de água DEPC, para totalizar um volume final de 12,5 μ L. Para todas as amostras, as reações foram feitas em duplicata e incubadas em termociclador utilizando o seguinte programa de ciclagem: i) pré-incubação a 50°C por 2 min, 95°C por 5 min.; ii) 48 ciclos para amplificação do TNF- α a 95°C por 20 s, 60°C por 35 s, seguido da *curva melting* (95°C por 15 min, 60°C por 15 s, 20 min até chegar a 95°C por 15 s).

Os níveis de mRNA foram calculados pelo método de quantificação relativa sem calibrador pela fórmula: $10.000/2^{\Delta Ct}$, em que ΔCt = média do Ct do gene alvo – média do Ct do controle endógeno (Albesiano et al., 2003). O Ct (*cycle threshold*) é o ciclo em que a amostra excede a fluorescência basal, ou seja, o ciclo em que a fluorescência da amostra é inequivocamente detectada acima do ruído de fundo (*background*). O limiar de detecção é estabelecido pelo usuário ao final de uma corrida de PCR em tempo real e deve ser posicionado na região exponencial geométrica das curvas de amplificação, em qualquer ponto acima do ruído basal, porém, abaixo da fase linear de amplificação ou do platô final. Os valores de Ct obtidos para as amostras revelam indiretamente a quantidade de mRNA presente nas amostras em estudo, nesse caso, músculos de camundongos *mdx* tratados com LMP-420 ou com o veículo, permitindo uma análise comparativa. Os níveis de mRNA obtidos para cada músculo foram representados em unidades relativas de expressão (URE).

6. Indução de lesão muscular por BaCl₂

Camundongos C57BL/6 (7-10 semanas de idade) foram submetidos à lesão por BaCl₂. Foram injetados 50 µL de uma solução de cloreto de bário estéril a 1,2 % (BaCl₂, Carlo Erba, Milão, Itália) no músculo GA esquerdo de cada camundongo e 50 µL de NaCl 0,9 % no músculo GA direito (controle). Para analisar a expressão da galectina-3 durante o processo de regeneração muscular, foi realizada inicialmente uma análise do perfil de expressão com relação ao tempo de lesão. Após definir que o terceiro dia, conforme apresentado na PARTE III (item 3) de Resultados, foi o tempo de maior expressão da galectina-3, optou-se por realizar análises após 1, 3 e 7 dias da lesão induzida em camundongos previamente tratados com a droga LMP-420.

Os camundongos C57BL/6 (7-10 semanas de idade) foram tratados por 10 dias com a LMP-420. No décimo primeiro dia, o BaCl₂ foi injetado conforme descrito acima. O

tratamento com a LMP-420 continuou durante todo o período deste procedimento, ou seja, até no dia do sacrifício dos animais. Os músculos retirados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados no -80C até o momento do processamento das amostras conforme descrito no item 7.

7. Ensaio de *western blot* e imunodeteção das galectinas 1

7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

Após sacrifício dos animais com anestésico e deslocamento cervical, os músculos GA foram congelados por alguns segundos em nitrogênio líquido, pesados e pulverizados em cadinho de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Para o preparo das amostras a serem aplicadas em géis de SDS-PAGE, foi adicionado tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2 % (p/v) ; glicerol 5% (v/v), SERVA blue 0,10mM, 2-mercaptoetanol 0,9 %, EDTA 0,25 mM e vermelho de fenol 30 μ M). Após obtenção de uma suspensão, a mesma foi fervida durante 5 minutos. O material insolúvel foi retirado por centrifugação a 20.000xg a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes (extratos proteicos) foram então analisados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando o sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmli e Favre (1973). Para SDS-PAGE foram utilizados mini-géis contendo gradiente de 5 a 20%.

7.2. Imunodeteção em membranas de nitrocelulose

O procedimento de eletrotransferência e imunodeteção foi realizado como descrito previamente (Towbin et al., 1979; Cerri et al., 2008). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,5 % em ácido tricloroacético (TCA) a 0,3% por 15

minutos e lavada com água, para remover o excesso de corante e visualizar as bandas. Os sítios inespecíficos da membrana foram neutralizados com a solução de bloqueio [5% de leite desnatado em pó em TBS/T (Tris HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM, e Tween-20 0,05%)] sob agitação contínua por uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada cinco vezes em TBS/T e então foi adicionado o anticorpo primário (policlonal de cabra anti desmina a 1,0 µg/mL, SantaCruz Biotechnology) juntamente com policlonal de coelho anti-galectina-1 (Cerri et al., 2008). A incubação foi mantida por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida o anticorpo primário não ligado foi retirado por cinco lavagens de 5 minutos cada, quando então foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (concentração final 40 ng/mL), por uma hora à temperatura ambiente. sob agitação, seguido de cinco lavagens de 5 minutos cada. A seguir, em câmara escura, a membrana foi banhada com a solução de revelação que consiste na mistura na proporção de 1:1 dos reagentes do “kit ECL-Western Blotting analysis system” (Santa Cruz Biotechnology) e exposta a filmes de raio-x. Após a exposição, o filme foi revelado manualmente.

8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism v.4.03, com aplicação do teste t de *Student* não pareado, sendo a significância estatística baseada em $P < 0,05$. Os resultados quantitativos foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média).

RESULTADOS

PARTE I – Caracterização das colônias de camundongos *mdx* e C57BL/6 do Centro de Pesquisas em Distrofia Muscular (CPDM)

1. Análise da expressão da distrofina por imunohistoquímica

Com o intuito de confirmar o fenótipo das colônias de camundongos a serem utilizados neste estudo, primeiramente foram realizados ensaios de imunohistoquímica para verificação da expressão da distrofina em cortes musculares de GA de animais *mdx* e C57BL/6 adultos escolhidos aleatoriamente. Em paralelo, cortes do mesmo músculo foram corados com H&E para análise histológica qualitativa.

Observa-se na Figura 9, a diferença morfológica entre as fibras musculares dos camundongos C57BL/6 (9A e 9C) e *mdx* (9B e 9D). Conforme esperado, os camundongos C57BL/6 (controles normais) apresentaram marcação na periferia das fibras (Figura 9C, em verde), indicando a presença da distrofina associada ao sarcolema. Os animais *mdx* não apresentaram nenhuma marcação para distrofina, confirmando assim, a ausência desta proteína (Figura 9D). As características morfológicas observadas nos cortes corados com H&E são compatíveis com quadro de distrofinopatia nos camundongos *mdx* adultos, principalmente o grande número de miofibras com núcleo central, indicativo de células em regeneração (Figura 9B, cabeças de seta). Nos cortes histológicos dos animais controles nota-se uma coloração homogênea, com fibras de tamanhos regulares e núcleos achatados na periferia celular (Figura 9A).

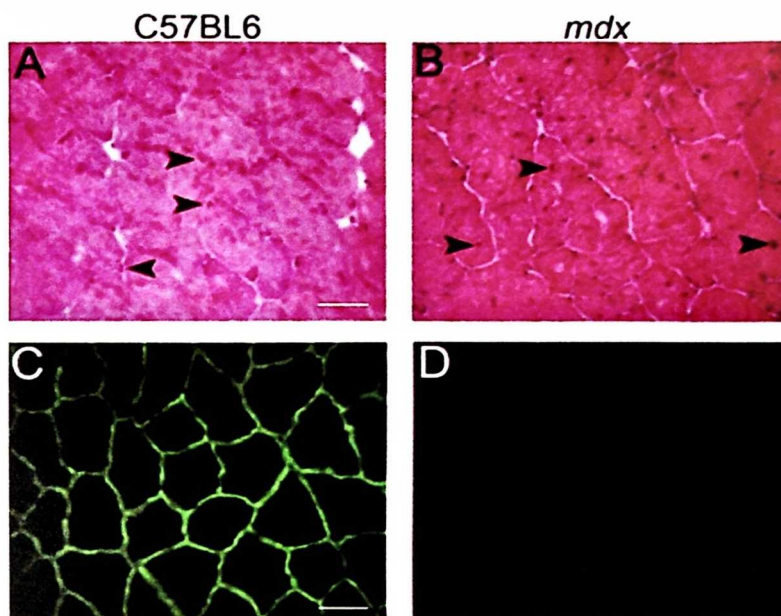


Figura 9: Confirmação fenotípica das colônias de camundongos C57BL/6 e *mdx* através de análise histológica. Cortes dos músculos GA de animais C57BL/6 (A e C) e *mdx* (B e D); corados com H&E (A e B) ou submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-distrofina e anticorpo secundário conjugado com FITC (C e D). As cabeças de setas indicam núcleos das miofibras. Barra, 10 μ m.

2. Avaliação do efeito da atividade física compulsória nos camundongos

2.1. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica

Para verificar o efeito do programa de atividade física compulsória utilizado, foi avaliada a atividade de CK sérica de camundongos normais e *mdx* não tratados, antes e após as cinco semanas de exercício. Conforme esperado, camundongos *mdx* de 4 semanas de idade apresentaram níveis de CK superiores aos dos C57BL/6 com diferença estatística significativa (níveis 265% maiores, $P=0,0002$); uma medida indireta da degeneração muscular característica dessa idade (Figura 10). Os camundongos *mdx* de 9 semanas de idade sedentários (9s s/ex) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparados com os *mdx* de 4 semanas (188% de aumento, $P=0,0005$), mostrando que a lesão

de miofibras persiste neste intervalo de tempo. Concordante com a literatura, os camundongos *mdx* de 9 semanas de idade exercitados (9s c/ex) (conforme descrito no item 1 de Material e Métodos) apresentaram um aumento significativo da atividade sérica de CK quando comparados com os de mesma idade sedentários (152%, $P=0,0346$), uma evidência indireta de que o programa de atividade física compulsória utilizado intensificou a lesão e a degeneração da musculatura esquelética dos camundongos *mdx*. Além disso, a comparação dos níveis de CK no início e no final do período experimental (camundongos *mdx* de 4 semanas de idade *versus* de 9 semanas submetidos a atividade física) mostrou uma diferença significativa (aumento de 286%, $P<0,0001$), evidenciando a adequação do procedimento utilizado para estudar o potencial efeito das drogas em manter a condição muscular.

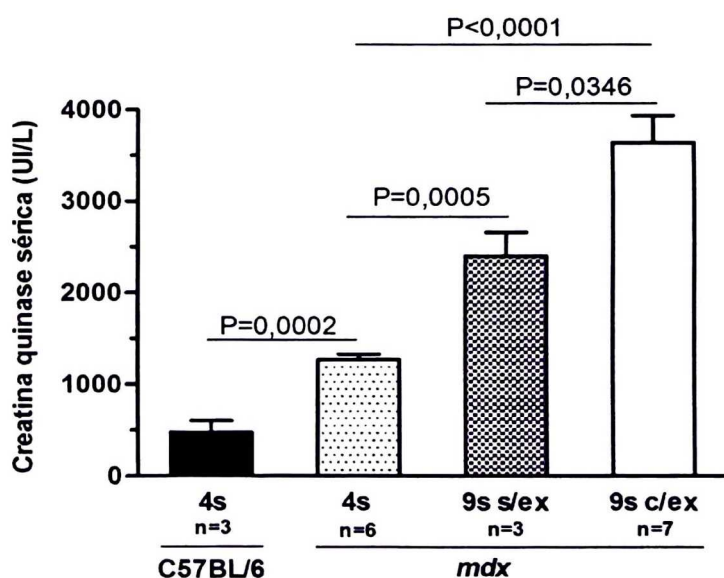


Figura 10: Efeito da atividade física compulsória sobre os níveis de CK sérica em camundongos sem tratamento. Foi utilizado soro de camundongos C57BL/6 e *mdx* não tratados, antes e após as cinco semanas de atividade física compulsória. Note a diferença significativa do grupo *mdx* 9s c/ex comparado com o grupo de *mdx* 4s ($P<0,0001$) e com o grupo de *mdx* 9s s/ex ($P=0,0346$), indicando maior degeneração muscular.

2.2. Avaliação morfológica dos músculos GA e DIA antes e após a atividade física

As condições gerais da musculatura esquelética de camundongos *mdx* foram avaliadas pela análise dos músculos GA e DIA (Figuras 11 e 12, respectivamente), antes e após o programa de atividade física. Pode-se observar, em ambos os músculos corados com H&E, no ponto inicial do experimento (4 semanas de idade, correspondente ao pico da primeira onda de degeneração muscular do camundongo *mdx*), a morfologia típica da distrofinopatia: miofibras com núcleos não periféricos, apresentando diâmetros irregulares e a presença de infiltrados de células inflamatórias (Figuras 11B e 12B). A presença de miofibras lesadas foi confirmada pela utilização do corante vital azul de Evans, que infiltra fibras com lesão no sarcolema. As miofibras infiltradas pelo corante apresentam fluorescência de cor vermelha, como mostram as Figuras 11D e 12D. Os cortes correspondentes de camundongos C57BL/6 mostraram músculos íntegros, com miofibras de diâmetro homogêneo e núcleos achatados localizados na periferia (Figuras 11A e 12A). Além disso, não foram detectadas miofibras com lesão no sarcolema (Figuras 11C e 12C).

No ponto final do experimento (camundongos de 9 semanas, após 5 semanas de atividade física compulsória), foi observada uma degeneração muscular aparentemente similar tanto no GA quanto no DIA dos camundongos *mdx* (Figuras 11H e 12H, respectivamente). A análise quantitativa deste parâmetro, ou seja, a área relativa ocupada por miofibras com lesão no sarcolema, será apresentada no item 1.3.1 da PARTE-II de Resultados (Figura 16). Da mesma forma como observado em 4 semanas, camundongos C57BL/6 não apresentaram alterações em ambos os músculos analisados (Figuras 11E e 12E). Nenhum foco de lesão foi detectado (Figuras 11G e 12G).

Gastrocnêmio

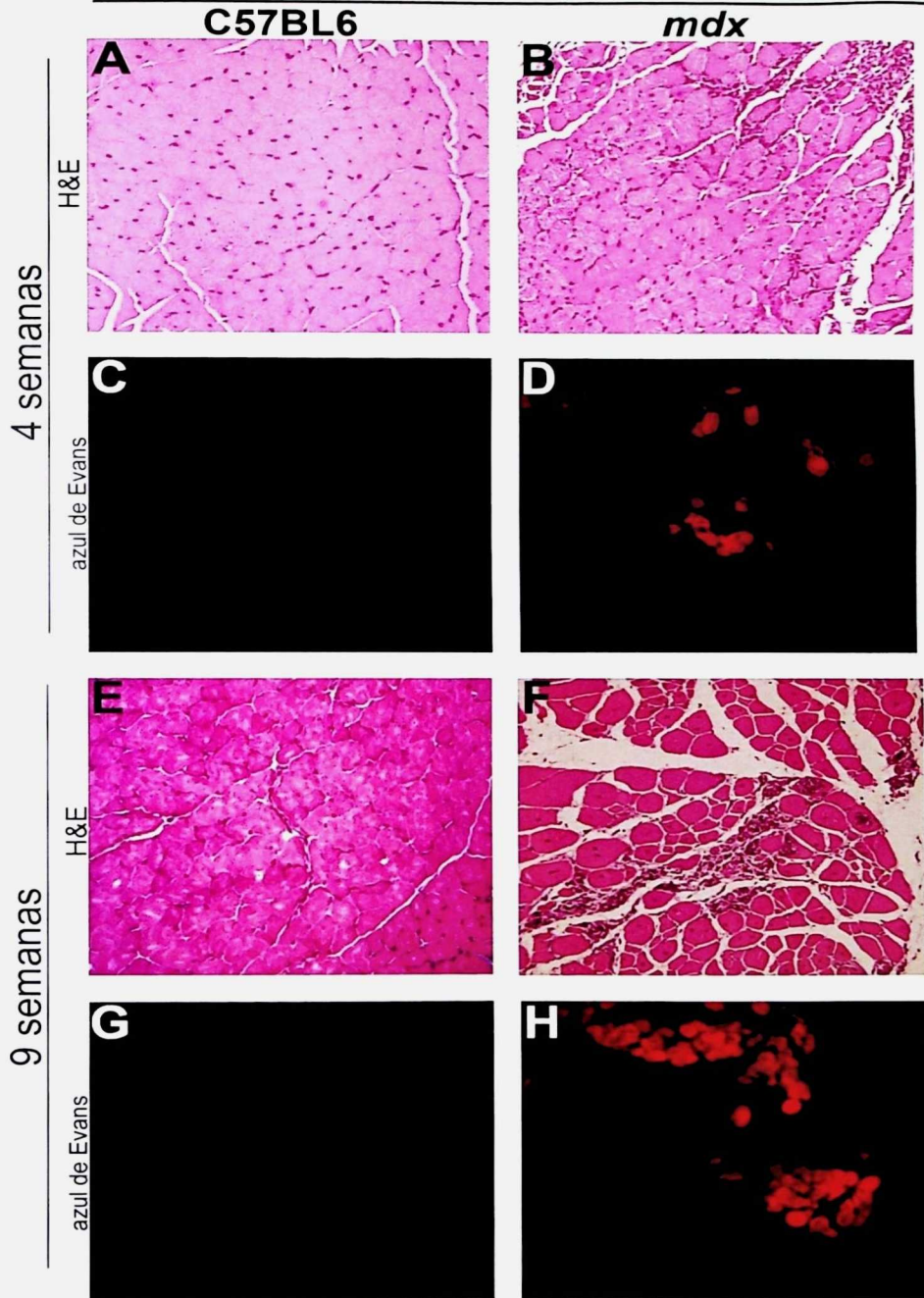


Figura 11. Análise histopatológica do músculo gastrocnêmio de camundongos *mdx* e C57BL/6 de 4 (A a D) e 9 semanas (E a F), após 5 semanas de atividade física compulsória. As colorações com H&E (B e F) evidenciam o fenótipo distrófico dos camundongos *mdx*, em comparação com a morfologia normal (A e E). A infiltração pelo corante azul de *Evans* mostra a presença de focos de miofibras com lesão no sarcolema nos camundongos *mdx* (D e H, em vermelho), mas não nos normais (C e G). Barra, 10 μ m.

Diafragma

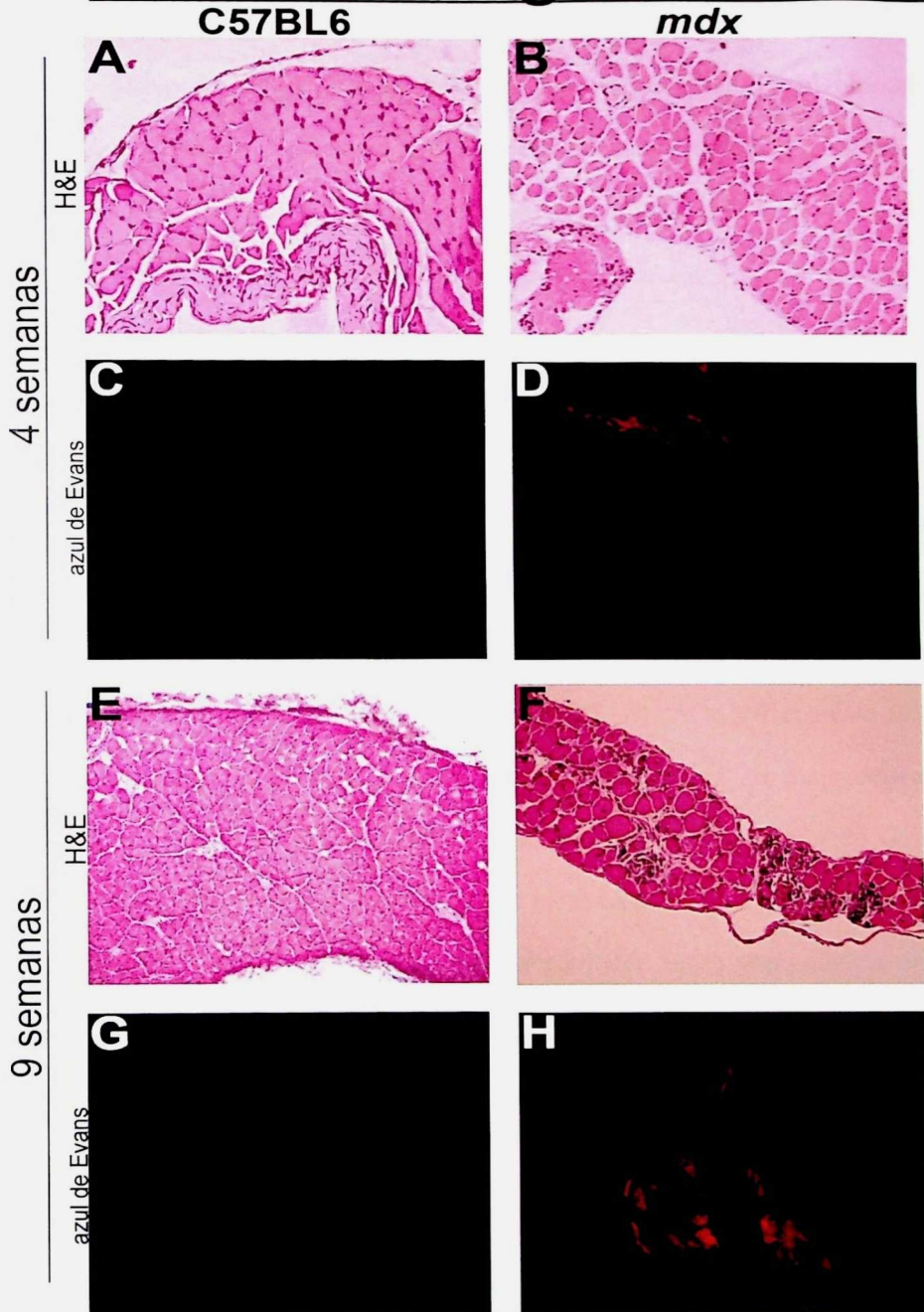


Figura 12: Análise histopatológica do diafragma de camundongos *mdx* e C57BL/6 de 4 (A a D) e 9 semanas (E a F), após 5 semanas de atividade física compulsória. As colorações com H&E (B e F) evidenciam o fenótipo distrófico dos camundongos *mdx*, em comparação com a morfologia normal (A e E). A infiltração pelo corante azul de *Evans* mostra a presença de focos de miofibras com lesão no sarcolema nos camundongos *mdx* (D e H, em vermelho), mas não nos normais (C e G). Barra, 10 μ m.

2.3. Análise da expressão de galectina-1 (Gal-1) nos músculos GA e DIA de camundongos normais e *mdx*

Com o objetivo de avaliar a expressão diferencial de proteínas relacionadas aos processos de degeneração e regeneração muscular foram realizados ensaios de imunohistoquímica e *western blot* utilizando anticorpos específicos para as proteínas TNF- α , TGF- β , colágenos I e III, e Gal-1. Não foram obtidas marcações em amostras de GA e DIA para as proteínas TNF- α e TGF- β provavelmente devido aos baixos níveis dessas citocinas nos músculos. Os colágenos I e III também não foram detectados, o que pode ser atribuído à qualidade dos anticorpos comerciais utilizados, uma vez que essas proteínas estão presentes em músculos esqueléticos.

Os resultados obtidos com o anticorpo anti-galectina-1 em cortes de GA mostraram que camundongos *mdx* de 4 semanas de vida apresentaram marcação mais intensa do que camundongos C57BL/6 de mesma idade (Figuras 13A e 13B). A localização de Gal-1 no músculo dos camundongos C57 apresentou-se de forma organizada e mais concentrada próximo ao sarcolema (Figuras 13A e 13C). Em contrapartida, a localização de Gal-1 nos camundongos *mdx* mostrou um padrão desorganizado tanto na periferia quanto no interior das miofibras (Figura 13B, 13D e 13F). O programa de atividade física compulsória utilizado resultou em aumento dos níveis de Gal-1 no GA (Figuras 13B, 13D e 13F).

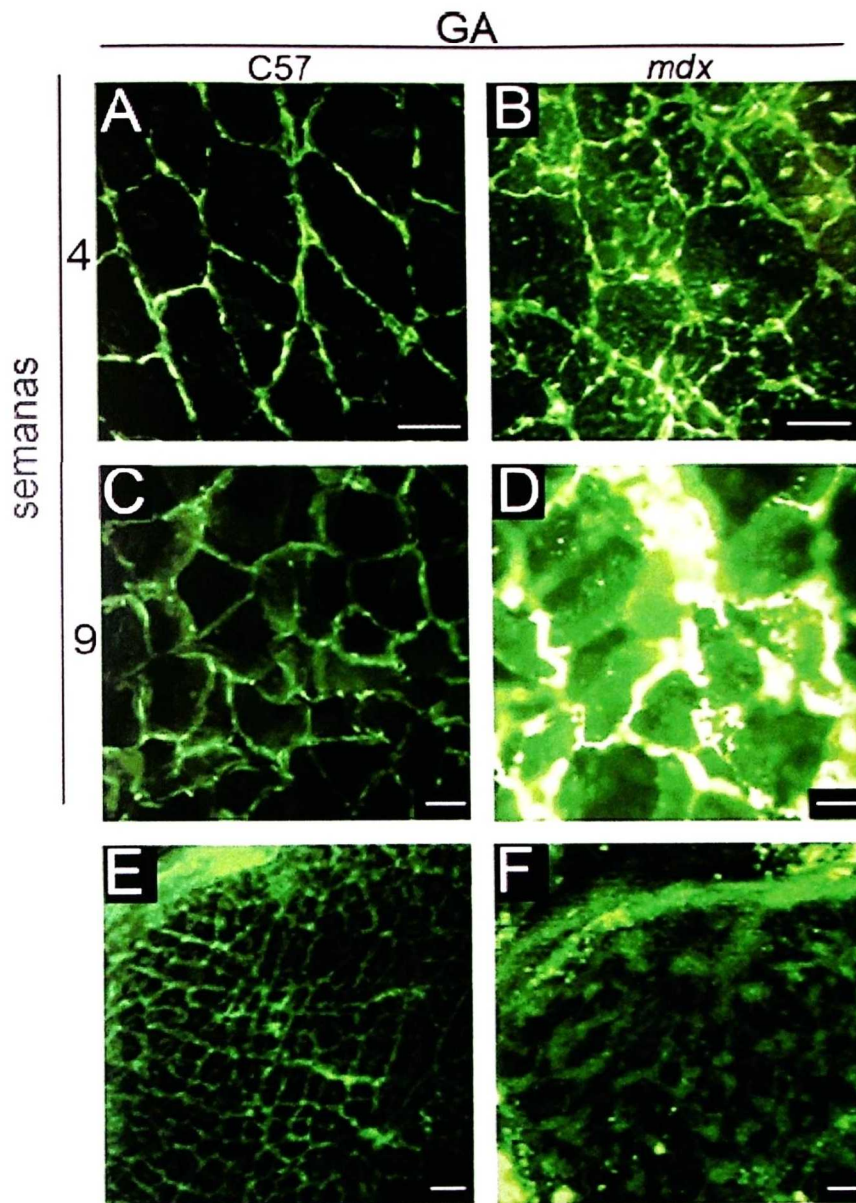


Figura 13: Imagens representativas dos ensaios de imunohistoquímica mostrando a expressão de Gal-1 no músculo GA de camundongos C57BL/6 (C57) (A, C, E) e *mdx* (B, D, F). Para a detecção de Gal-1 foi utilizado anti-Gal-1 (Cerri et al., 2008) e um anticorpo secundário conjugado (Alexa 488). Quando comparados camundongos de mesma idade, o *mdx* apresenta um maior nível de Gal-1 do que o C57 antes (B versus A, 4 semanas) e depois do período de atividade física (D versus C, 9 semanas). Analisando a marcação no interior de uma miofibrila, a marcação de Gal-1 no C57 (E) é aparentemente localizada nas miofibrilas em um padrão bem organizado; nas miofibrilas do *mdx* (F), esse padrão não é observado. Barra: 10 μ m para A-D e 2 μ m para E e F (Cerri, et al 2008).

Com o intuito de quantificar e confirmar os resultados obtidos na Figura 13 foram realizados ensaios de *western blot* (Figura 14). Amostras equivalentes dos músculos GA e DIA foram analisadas em géis corados com Coomassie blue (Figura 14A), eletrotransferidas e submetidas à imunodeteção com anti-Gal-1 e quantificadas utilizando o programa ImageJ. Como esperado, os resultados da Figura 14B confirmaram níveis aumentados de Gal-1 nos camundongos *mdx* comparados aos C57 de mesma idade, em ambos os músculos (* P = 0,0003 e # P <0,0001 para GA, 4 e 9 semanas de idade, respectivamente e * P = 0,0031 e # P = 0,0021 para DIA, 4 e 9 semanas de idade).

Estes resultados indicaram que a atividade física mantém altos níveis de Gal-1 nos músculos distróficos, ou seja, Gal-1 tem seus níveis aumentados durante a degeneração muscular (Figuras 14E e 14F), além de ter sua localização alterada.

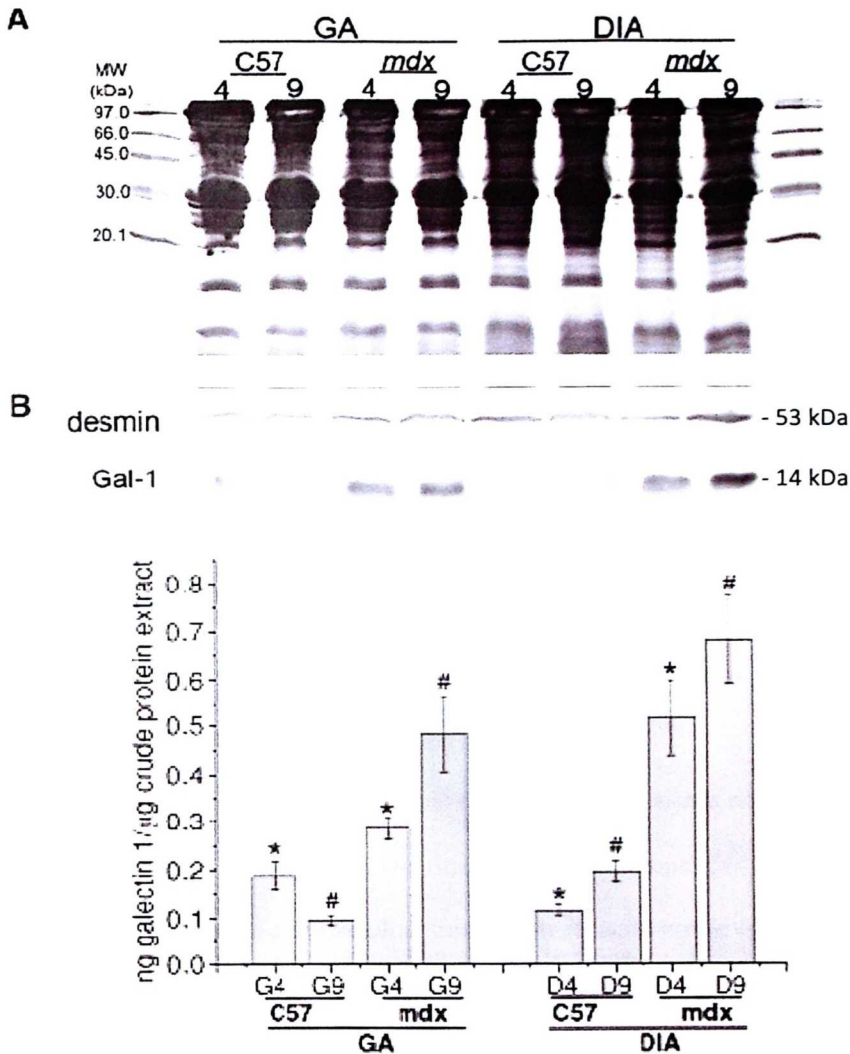


Figura 14: Análise quantitativa da expressão de Gal-1 no músculo esquelético de camundongos C57BL/6 e *mdx* antes e após atividade física. (A) Gel corado com Coomassie blue mostrando as quantidades iguais das amostras do extrato de músculos GA e DIA de camundongos C57BL/6 (C57) e *mdx* antes (4s) e após (9s) 5 semanas de física atividade. **(B)** *Immunoblots* equivalentes, marcados com anti-Gal-1 (e anti-desmina como controle constitutivo); as bandas foram quantificadas por densitometria. O gráfico mostra diferenças estatísticas nos níveis de Gal-1 dos camundongos *mdx* em comparação com C57 para ambos os músculos analisados (* $P = 0,0003$ e # $P < 0,0001$ para GA, 4 e 9 semanas de idade, respectivamente, e * $P = 0,0031$ e # $P = 0,0021$ para DIA, 4 e 9 semanas de idade). Note que a análise quantitativa confirmou o aumento da expressão de Gal-1 no músculo esquelético de camundongos *mdx* após a atividade física obrigatória (Cerri, et al 2008).

PARTE II - Avaliação do efeito do tratamento com cetotifeno e olopatadina em camundongos *mdx*

1. Avaliação semanal da massa corporal

Foi avaliada a massa corporal dos animais semanalmente durante todo o período experimental e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mesmo após 5 semanas de atividade física e tratamento. As massas dos camundongos variaram, em média, de 10g (4 semanas de vida) a 20g (9 semanas de vida). Este dado sugere que tanto o cetotifeno quanto a olopatadina, nas doses utilizadas no estudo (10 mg/kg/dia e 1 mg/kg/dia, respectivamente) não provocaram ganho ou perda de peso importante nos animais. Entretanto, a avaliação semanal da massa foi utilizada para ajustar a dose do medicamento quando necessário.

2. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica

A atividade de CK sérica dos camundongos em estudo foi avaliada no início e no final do período de atividade física e tratamento. No final do período, camundongos *mdx* tratados tanto com o cetotifeno quanto com a olopatadina mostraram redução nos níveis de CK (23% e 37%, respectivamente). Apresentaram diferença estatística ($P=0,0002$) para ambas as drogas, em relação ao grupo não tratado, o que sugere que essas drogas contribuíram para diminuir o grau de degeneração muscular desses camundongos (Figura 15).

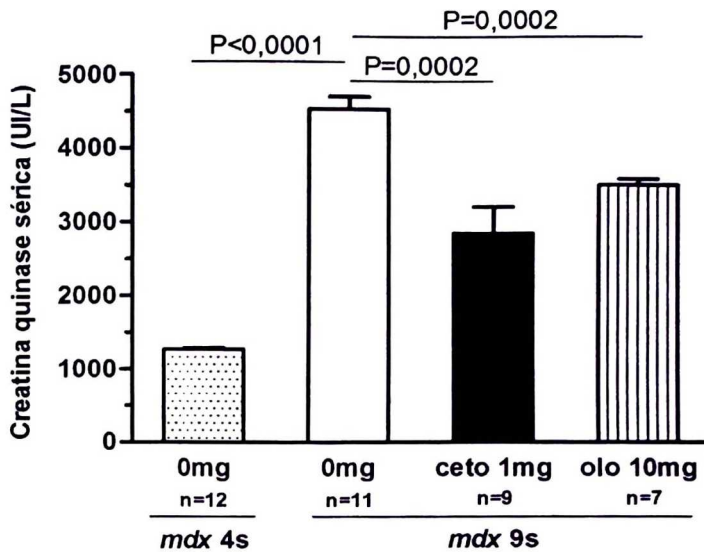


Figura 15: Dosagem da atividade da creatina quinase (CK) sérica em camundongos tratados ou não com cetotifeno e olopatadina. Foi utilizado soro de camundongos *mdx* tratados ou não com a olopatadina e o cetotifeno, antes e após cinco semanas de atividade física compulsória. Note as diferenças significativas dos grupos tratados com o cetotifeno e com a olopatadina ($P=0,0002$ para ambas as drogas) com relação ao grupo não tratado. A identificação dos grupos e o número de animais são indicados.

3. Avaliação dos processos de degeneração e regeneração muscular através da análise histológica quantitativa dos músculos GA e DIA

3.1. Quantificação dos focos de lesão

Um outro sinal de degeneração muscular pode ser observado quando miofibras com lesão no sarcolema sofrem infiltração pelo corante azul de Evans. Os resultados obtidos (Figura 16A) mostraram que, no final do experimento, o GA apresentou uma área de lesão ligeiramente maior do que o DIA, em consequência do exercício físico excêntrico que força esse músculo. O tratamento com cetotifeno resultou em uma diminuição estatisticamente significativa da área relativa ocupada por miofibras apresentando lesão no sarcolema tanto no GA (95%, $P=0,0008$) quanto no DIA (98%, $P=0,0293$) (Figuras 16A e 16B, respectivamente).

O tratamento com a olopatadina resultou em diminuição da lesão, apresentando resultado estatisticamente significativo apenas no músculo GA (73%, $P=0,0018$) (Figura 16A). É importante ressaltar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com as drogas estudadas (Figuras 16A e 16B, grupo cetotifeno 1mg *versus* olo 10mg).

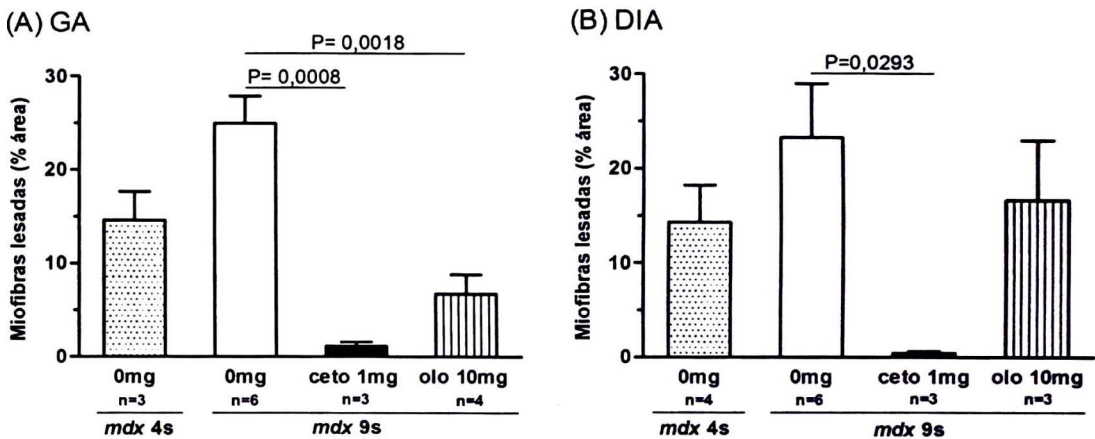


Figura 16: (A) Área relativa ocupada por miofibras com lesão no gastrocnêmio e no diafragma após o período de atividade física compulsória e tratamento. São mostrados resultados de grupos tratados com cetotifeno (ceto 1mg) e com olopatadina (olo 10mg), dois inibidores da desgranulação de mastócitos. A redução da porcentagem de área com lesão foi significativa no grupo tratado com cetotifeno em ambos os músculos analisados, o que é um indicativo de que o tratamento contribuiu para a redução da lesão. O tratamento com a olopatadina resultou em diminuição significativa da lesão apenas no músculo GA. A identificação dos grupos e o número de animais são indicados.

3.2. Quantificação de infiltrados de células inflamatórias

Para a quantificação de infiltrados de células inflamatórias, cada corte histológico do músculo em análise foi percorrido em toda a sua extensão e a área ocupada por infiltrados foi determinada em relação à área total do corte, como descrito no item 4.3 de Material e Métodos, (Figura 8B). A análise dos resultados mostrou que, no GA, houve um aumento significativo da área de infiltrados no grupo de camundongos *mdx* com 9 semanas sem tratamento em relação ao grupo de 4 semanas (314%, $P=0,0072$) (Figura 17A). Observou-se

também uma diminuição estatisticamente significativa do grupo tratado com a olopatadina no GA (74,3%, $P=0,0180$) em relação ao grupo sem tratamento. No GA o grupo tratado com cetotifeno não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo sem tratamento (Figura 17A).

No DIA dos camundongos *mdx* tratados com o cetotifeno foi observado um aumento não significativo na área de infiltrados inflamatórios no final do experimento (Figura 17B). No grupo tratado com a olopatadina, observou-se redução da área de infiltrados, mas não significativa quando comparada à média desse grupo com a do grupo não tratado. É importante notar que, em ambos os músculos analisados, o tratamento com a olopatadina mostrou resultados mais consistentes neste parâmetro, apresentando um padrão semelhante aos animais de 4 semanas de vida. Diferentemente dos animais tratados com o cetotifeno, que apresentaram resultados sugestivos de que não houve melhora no quadro inflamatório do animal.

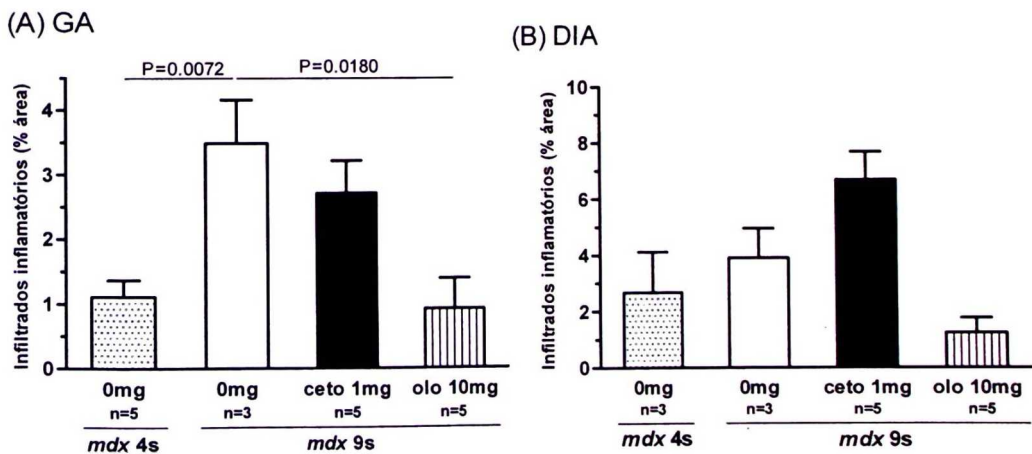


Figura 17: Quantificação da área de infiltrados inflamatórios nos músculos GA e DIA de camundongos *mdx* tratados ou não com cetotifeno e olopatadina, antes e após o período de atividade física. (A e B) Resultados gerais dos músculos GA e DIA não tratados e tratados com o cetotifeno e a olopatadina, expressos como média e SEM por grupo. Note a diminuição significativa ($P=0,0180$) no GA tratado com a olopatadina com relação ao grupo controle. A identificação dos grupos e o número de animais de cada grupo são indicados.

3.3. Quantificação de áreas contendo miofibras em processo de degeneração-regeneração

As áreas musculares em processo de degeneração-regeneração foram quantificadas considerando o seguinte critério morfológico: áreas contendo fibras pequenas geralmente agrupadas, fortemente basofílicas, com citoplasma de coloração uniforme e núcleo central vesicular (Pastoret e Sebille, 1995). Vale ressaltar que foram considerados grupos de fibras com essas características em regiões onde não se observava a presença de infiltrados inflamatórios; portanto, esse parâmetro é indicativo de regeneração muscular recente. Os resultados obtidos na Figura 18A mostram que, no GA, apenas o tratamento como cetotifeno resultou em diminuição significativa das áreas em regeneração (69%, $P < 0,0001$) quando comparado com o grupo não tratado. No DIA (Figura 18B), houve diminuição significativa no grupo tratado com o cetotifeno (83%, $P = 0,0001$) em relação ao grupo não tratado; e redução de 60% ($P = 0,0144$) em relação ao grupo tratado com a olopatadina.

Pela análise histológica qualitativa foi observada maior integridade muscular nos animais tratados com ambas as drogas: fibras de tamanho mais homogêneo e coloração uniforme nos cortes corados com H&E (Figura 20).

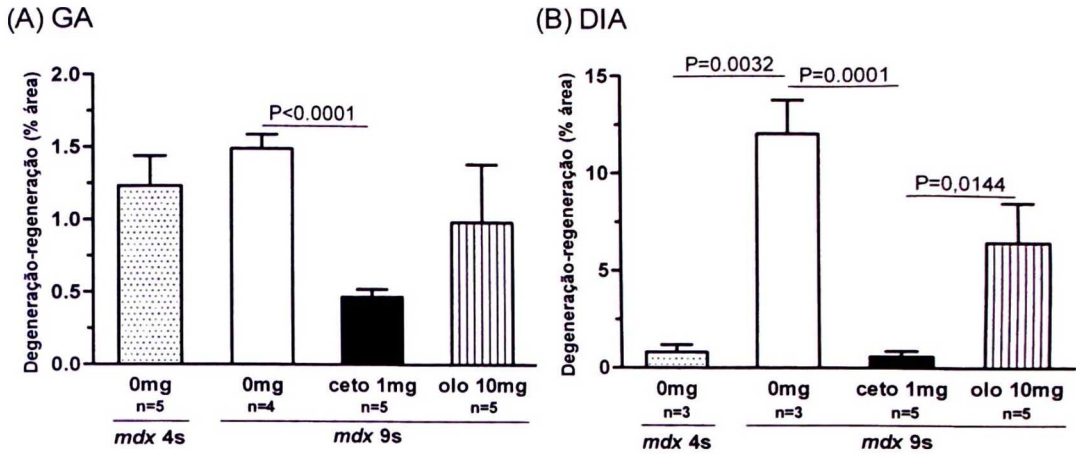


Figura 18: Quantificação da área de degeneração-regeneração dos músculos GA e DIA de camundongos *mdx* tratados ou não com cetotifeno e olopatadina, antes e após o período de atividade física. (A e B) Resultados gerais dos músculos GA e DIA não tratados e tratados com cetotifeno e olopatadina, expressos como média e SEM por grupo. Note que o grupo tratado com o cetotifeno apresentou diferença significativa tanto no GA ($P < 0,0001$) quanto no diafragma ($P = 0,0001$) com relação ao grupo sem tratamento. A identificação dos grupos e o número de animais de cada grupo são indicados.

3.4. Quantificação de miofibras com núcleos não periféricos

Para estimar a porcentagem de miofibras com núcleos não periféricos, outro sinal característico do processo de regeneração muscular, foram contadas no mínimo 1500 fibras do GA e do DIA de cada animal (como descrito no item 4.3 de Material e Métodos, Figura 8A). Os resultados obtidos (Figura 19) mostraram que, em camundongos *mdx* de 4 semanas foram encontrados em média 10% de fibras com núcleos não periféricos no GA e 7% no DIA. Em 9 semanas, esse número aumentou significativamente para cerca de 65% no GA e 59% no DIA ($P < 0,0001$ para ambos), indicando um processo regenerativo intenso decorrente da lesão intensificada pela atividade física compulsória. Não foi detectada diferença significativa entre os animais tratados com olopatadina e não tratados nos dois músculos analisados (Figuras

19A e 19B). No grupo tratado com o cetotifeno houve redução significativa apenas no DIA, quando comparado com o grupo não tratado (54%, $P=0,0084$), (Figura 19B).

Além disso, correlacionando os dados referentes à porcentagem de núcleos não periféricos com os de degeneração-regeneração (Figuras 19 e 18, respectivamente), não podemos afirmar que o tratamento com a olopatadina alterou a regeneração muscular nos *mdx*. Contudo, os dados com o cetotifeno poderiam sugerir que houve menos regeneração no grupo tratado, uma vez que para ambos os parâmetros e músculos analisados a redução foi estatisticamente significativa, com exceção do músculo GA em relação aos núcleos não periféricos. Entretanto, em conjunto, os dados parecem indicar que a redução das áreas de regeneração em resposta ao tratamento com o cetotifeno é indicador de menor lesão prévia. A análise qualitativa da musculatura de animais de ambos os grupo tratados mostrou que a maior parte das fibras apresentou aspecto morfológico íntegro (Figura 20).

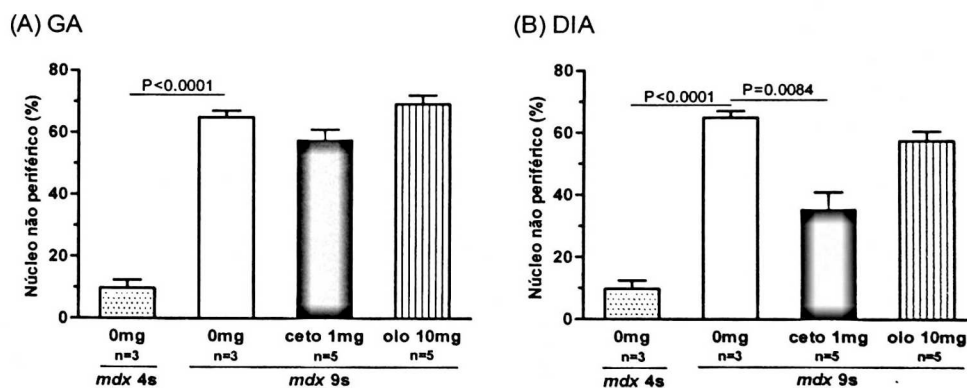


Figura 19: Quantificação de miofibras com núcleos não periféricos no GA e DIA camundongos de *mdx*, antes e após o período de atividade física. Nota-se que nos animais de 4 semanas os núcleos encontram-se principalmente em posição periférica; já com 9 semanas de idade a maioria encontra-se não periférica, sinal de regeneração muscular, com uma discreta diminuição da porcentagem de núcleos não periféricos nos animais tratados, exceto no DIA dos animais tratados com cetotifeno, onde observou-se redução de 42% ($P=0,0084$). Foram contadas, no mínimo, 1500 miofibras de cada camundongo. A identificação dos grupos e o número de animais utilizados são indicados.

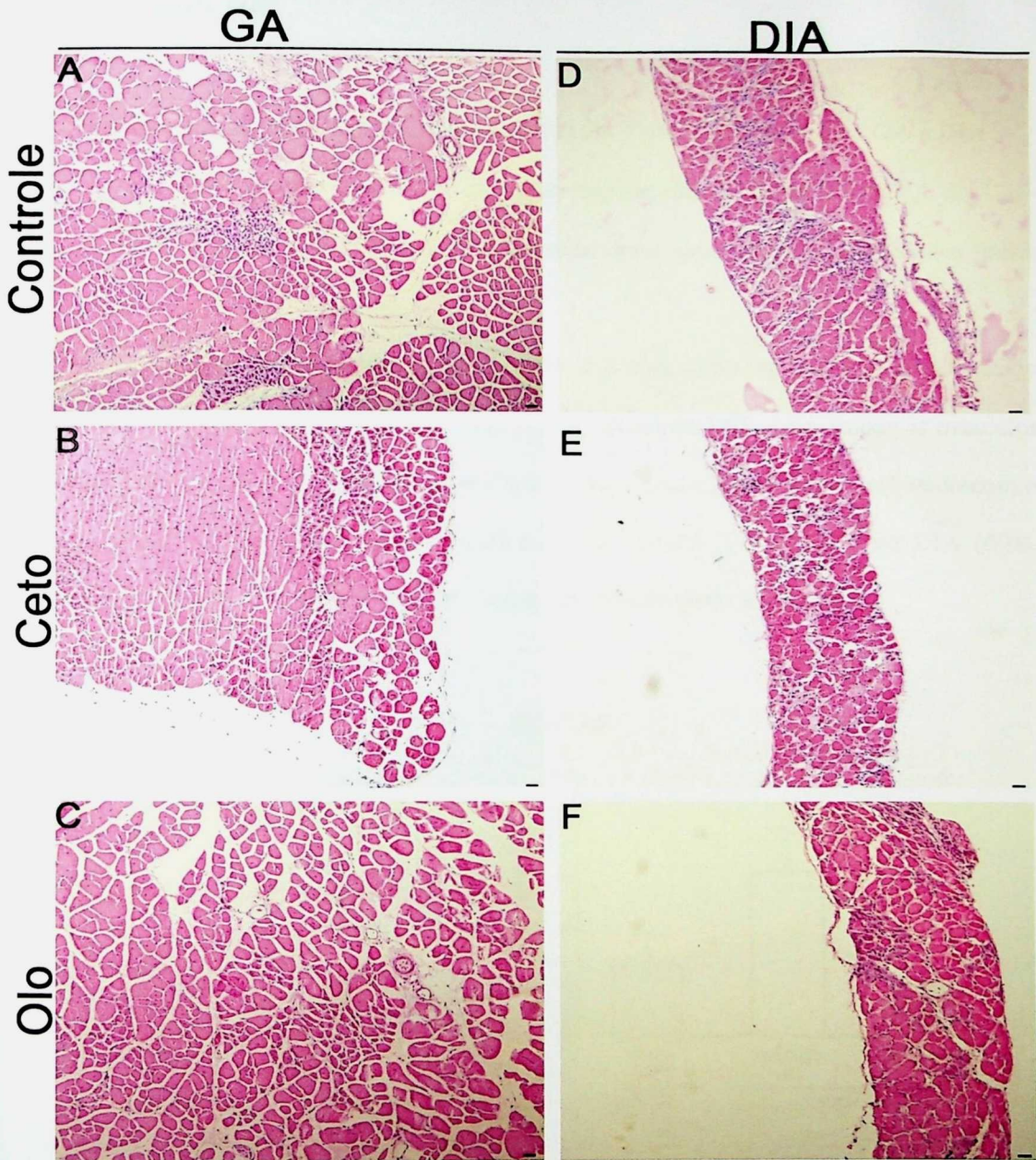


Figura 20: Imagens representativas da análise histopatológica representativa dos músculos GA (A, B e C) e DIA (D, E e F) de camundongos *mdx* tratados com cetotifeno e olopatadina, após 5 semanas de atividade física compulsória. Cortes musculares foram corados com H&E e usados para quantificar a área relativa ocupada por infiltrados inflamatórios, grupos em degeneração-regeneração e porcentagem de miofibras com núcleos não periféricos. Análises qualitativas mostraram que o tratamento com ambas as drogas contribuiu para melhorar a condição muscular dos camundongos *mdx* exercitados. Barra, 10 μ m.

PARTE III – Avaliação do efeito do tratamento com a droga LMP-420 em camundongos *mdx*

1. Avaliação dos níveis transcricionais de mRNA do TNF- α nos músculos GA e DIA

Para iniciar o estudo da LMP-420, foram investigados os níveis de mRNA do TNF- α para verificar a atividade inibitória da transcrição desse gene. Essas quantificações foram realizadas por PCR em tempo real.

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se que, como esperado, no grupo tratado com LMP-420 foram detectados menores níveis do mRNA do TNF- α em ambos os músculos analisados (Figura 21A e 21B). Comparando esse grupo com o grupo controle (tratado com o veículo), foi verificada redução significativa no GA (76,6%, $P=0,0413$) e no DIA (69%, $P=0,0304$), para níveis similares aos detectados nos animais de quatro semanas.

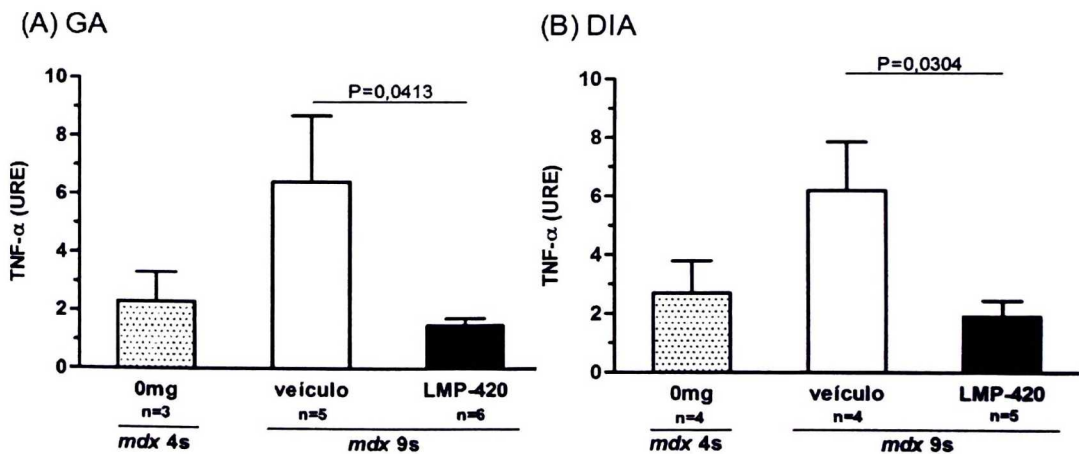


Figura 21: Análise comparativa dos níveis de mRNA do TNF- α , por PCR em tempo real, nos músculos GA e DIA tratados ou não com LMP-420. Note que em ambos os músculos analisados houve redução estatisticamente significativa no grupo tratado com a LMP-420. O número de animais utilizados em cada grupo está indicado. URE=unidade relativa de expressão.

2. Dosagem de creatina quinase (CK) sérica

Os resultados obtidos mostraram uma diminuição significativa de 45,1% na concentração de CK no soro dos camundongos *mdx* tratados com LMP-420 ($P=0,0083$), quando comparados aos *mdx* tratados como veículo, o que sugere redução da lesão muscular (Figura 22).

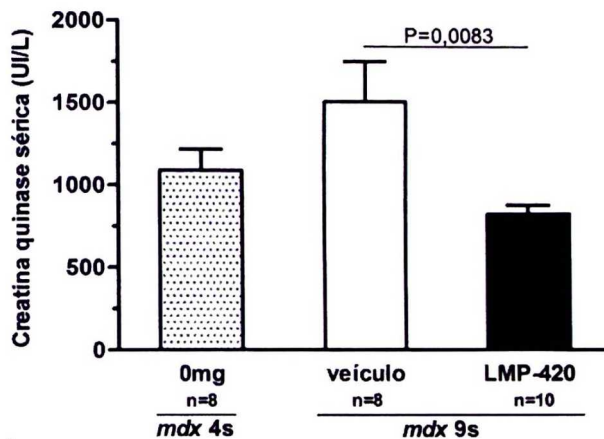


Figura 22: Níveis séricos de creatina quinase (CK) em camundongos *mdx* tratados com a droga LMP-420 antes e após atividade física compulsória. Foi detectada uma redução significativa nos níveis de CK no soro dos animais tratados com LMP-420 ($P=0,0083$) em relação ao grupo tratado com o veículo. O número de camundongos de cada grupo é indicado.

3 Avaliação dos processos de degeneração e regeneração muscular pela análise histológica quantitativa dos músculos GA e DIA

3.1 Avaliação da degeneração muscular

A degeneração muscular foi avaliada através da quantificação de dois parâmetros: i) área muscular relativa ocupada por miofibras infiltradas pelo corante azul de Evans, ou seja, apresentando lesões no sarcolema; e ii) área relativa contendo infiltrados de células inflamatórias.

3.1.1. Quantificação da área relativa ocupada por miofibras apresentando lesão no sarcolema

A quantificação da área muscular relativa ocupada por miofibras infiltradas pelo corante vital azul de Evans nos músculos GA e DIA foi realizada de acordo com Hamer e colaboradores (2002). Um resultado similar foi obtido para os dois músculos analisados, isto é, foram verificadas reduções significativas das áreas com miofibras lesadas, no grupo tratado com LMP-420 em comparação com o grupo controle; as reduções foram de 98,6% ($P=0,0026$) e 83,6% ($P=0,0010$), para o GA e o DIA, respectivamente (Figura 23). Estes resultados corroboram os dados obtidos na análise dos níveis séricos de CK, sugerindo uma diminuição da lesão do sarcolema em resposta ao tratamento com LMP-420.

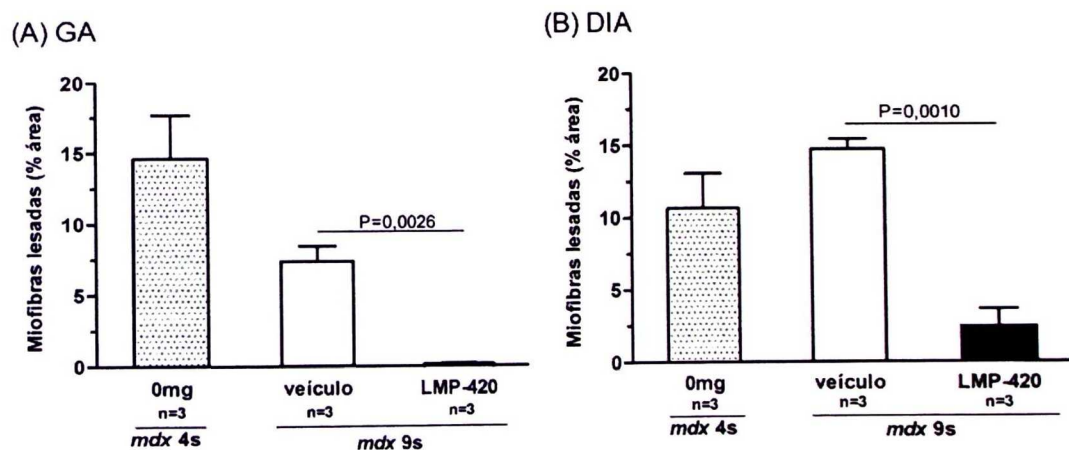


Figura 23: Quantificação da área muscular relativa apresentando miofibras com lesão no sarcolema (infiltradas por EBD) nos músculos GA e DIA. A análise mostrou uma redução significativa das áreas com miofibras lesadas em ambos os músculos tratados com a LMP-420, quando comparados ao grupo controle, de 98,6% ($P=0,0026$) e 83,6% ($P=0,0010$), para o GA e o DIA, respectivamente, sugerindo um efeito benéfico da droga em reduzir a lesão muscular. O número de camundongos de cada grupo é indicado.

3.1.2. Quantificação da área relativa contendo infiltrados inflamatórios

O processo inflamatório contribui substancialmente para aumentar a lesão nos músculos distróficos, como demonstrado em dados encontrados na literatura (Grounds e Torrisi, 2004; Hodgetts et al., 2006). Através da quantificação da área muscular relativa ocupada por infiltrados inflamatórios, verificou-se também uma diminuição significativa da porcentagem de área afetada, quando comparados animais tratados com a LMP-420 e animais controles em ambos os músculos (57,3% no GA, $P=0,0005$ e 66,3% no DIA, $P=0,0003$) (Figura 24). Esse resultado é coerente com os dados de CK e EBD que, em conjunto, sugerem que o tratamento com LMP-420 reduziu a lesão muscular e diminuiu a inflamação nos dois músculos analisados.

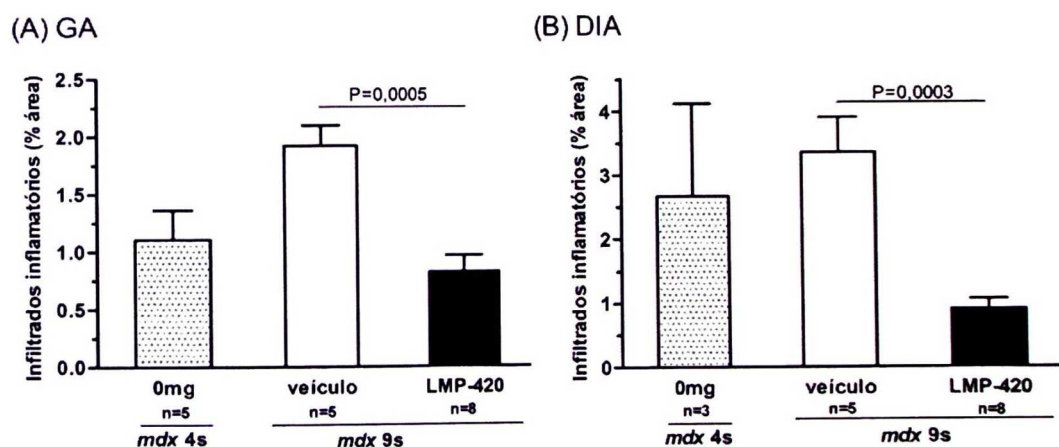


Figura 24: Quantificação da área muscular relativa ocupada por infiltrados de células inflamatórias nos músculos GA (A) e DIA (B). A análise mostrou uma redução significativa das áreas com infiltração de células inflamatórias em ambos os músculos no grupo tratado com LMP-420, em relação ao grupo controle, sugerindo redução do processo inflamatório crônico característico da distrofinopatia. O número de animais utilizados em cada grupo é indicado.

3.2. Avaliação da regeneração muscular

Os parâmetros utilizados para avaliar a regeneração muscular foram: i) a área relativa contendo miofibras com sinais característicos de regeneração recente, isto é, fibras agrupadas,

de pequeno diâmetro, núcleos centrais e coloração basofílica, sem a presença de infiltrados inflamatórios; e ii) a proporção de miofibras contendo núcleos não periféricos e periféricos. A ocorrência de núcleos centralizados é um sinal característico de regeneração muscular.

3.2.1. Avaliação da área relativa contendo miofibras com sinais característicos de regeneração recente

Os animais tratados com a LMP-420 apresentaram uma diminuição significativa na área relativa ocupada por fibras agrupadas e com características de regeneração apenas no músculo GA de 83,2% ($P=0,0385$), quando comparados com o grupo controle (Figura 25). Comparando o grupo tratado com a LMP-420 com o controle no músculo DIA, não foram detectadas diferenças significativas.

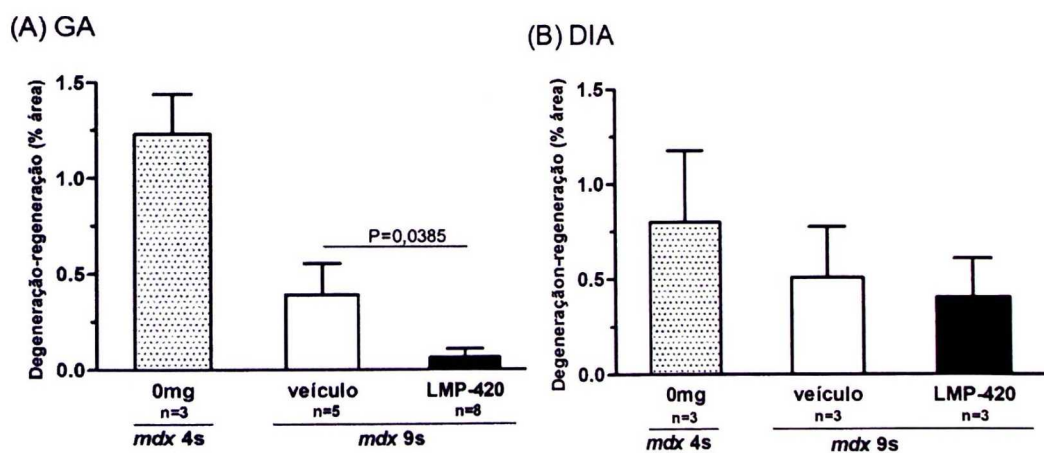


Figura 25: Quantificação da área muscular relativa correspondente a grupos de fibras em regeneração muscular nos músculos GA (A) e DIA (B). O grupo tratado com LMP-420 apresentou redução significativa da presença de fibras em regeneração apenas no GA ($P=0,0385$). O número de animais utilizados em cada grupo é indicado.

3.2.2. Avaliação da porcentagem de miofibras contendo núcleos não periféricos

Os resultados obtidos mostraram que o grupo tratado com a LMP-420 apresentou menor porcentagem de miofibras com núcleos centralizados em relação ao grupo tratado com o veículo apenas no GA (13,6% de redução, $P=0,0248$) (Figura 26).

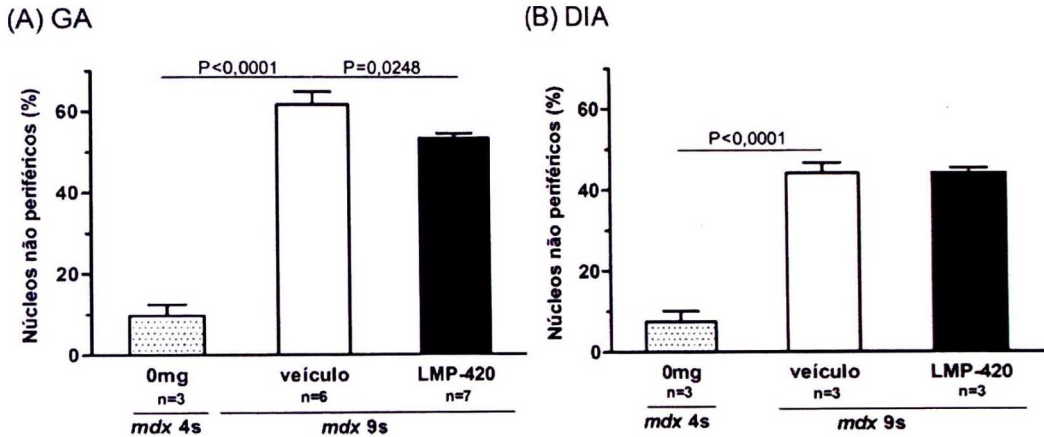


Figura 25: Quantificação da porcentagem de miofibras contendo núcleos não periféricos, um indicador de regeneração muscular. A análise mostrou uma redução significativa da presença de fibras em regeneração no GA quando comparado o grupo tratado com a LMP-420 com o controle ($P=0,0248$). No DIA não houve diferença significativa entre os grupos de 9 semanas. O número de animais de cada grupo é indicado.

DISCUSSÃO

O camundongo *mdx* e os testes de drogas para DMD

A DMD é uma doença grave, incapacitante e que resulta em óbito no início da segunda década de vida. Os tratamentos disponíveis até o momento são paliativos, o que justifica a necessidade de pesquisas para ampliar as opções terapêuticas, no intuito de aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes. As pesquisas terapêuticas de uma maneira geral utilizam duas estratégias: i) terapia celular e/ou gênica para substituição da distrofina; ii) terapia farmacológica visando a diminuição da lesão das miofibras, a redução da fibrose e o aumento da regeneração muscular para combater a degeneração.

Neste estudo, foi avaliado o efeito de drogas com ação anti-inflamatória na progressão da distrofinopatia, utilizando o camundongo *mdx* submetido a atividade física como modelo experimental. A relevância deste trabalho pode ser justificada considerando-se que a terapia farmacológica para a DMD é ainda bastante limitada e consiste, principalmente, no uso de corticosteróides (Radley et al., 2006). Essas drogas possibilitam retardar a evolução da doença reduzindo o risco de escoliose e estabilizando a função pulmonar (Bushby, et al 2010a). Entretanto, nas doses preconizadas, a corticoterapia sistêmica é acompanhada de variados e intensos efeitos adversos, como hipervolemia, obesidade, osteoporose e alterações visuais (Bushby, et al 2010a).

Desta forma, a pesquisa de novos compostos que possam prevenir ou retardar a progressão da doença é de fundamental importância. A ação anti-inflamatória mais específica das drogas testadas em relação aos corticosteróides pode representar um grande potencial para conter o processo inflamatório crônico característico da DMD. Este estudo pode contribuir para ampliar as opções de terapia farmacológica para a DMD, com possibilidade de propor drogas candidadas para futuros testes clínicos para essa doença.

No presente trabalho foi usado como modelo animal o camundongo *mdx* (Grounds et al., 2008), o qual apresenta um quadro distrófico brando se comparado aos pacientes com DMD, com a ocorrência de uma onda inicial de degeneração muscular, cujo pico ocorre entre a terceira e a quarta semana de vida. Esse período de lesão aguda fornece um excelente modelo para testar intervenções terapêuticas. Em contrapartida, em camundongos adultos é mais difícil detectar esse tipo de lesão, pois há ocorrência simultânea de regeneração (Radley et al., 2006). Uma solução para este problema é submeter os camundongos *mdx* no período de 4 a 10 semanas de idade à atividade física compulsória, principalmente exercícios excêntricos em que a musculatura é alongada enquanto suas fibras são ativadas (Brussee et al., 1997; De Luca et al., 2005). Foi observado que depois de três sessões de corrida em declive, os músculos mais afetados foram o diafragma (DIA), e o tríceps, com poucos danos considerados no tibial anterior (TA) e no extensor longo dos dedos (EDL) (Brussee et al., 1997). Contudo, se o exercício for forçado e crônico, aumenta a necrose do músculo gastrocnêmio (GA), podendo ser igual ou inferior ao dano do diafragma e do tibial anterior (Burdí et al., 2006; Pierno et al., 2007). Por isso, o melhor período para intervenções terapêuticas em camundongos *mdx* é de 4 a 10 semanas de idade, principalmente quando submetidos à atividade física, por ser neste intervalo que a doença se manifesta na sua forma mais grave (Granchelli et al., 2000 e Grounds et al., 2008).

Desta forma, nesse estudo, camundongos *mdx* foram submetidos a 5 semanas de atividade física compulsória em esteira elétrica com inclinação de 16°, três vezes por semana, por 20 minutos, iniciando na quarta semana de vida e terminando na nona semana, juntamente com o tratamento das drogas em estudo. Foram avaliados parâmetros de degeneração muscular (dosagem de CK sérica, infiltração pelo corante vital azul de Evans em miofibras lesadas, presença de infiltrados inflamatórios, níveis de mRNA do TNF- α) e de regeneração (detecção de fibras agrupadas em regeneração, porcentagem de núcleos não periféricos).

Devido à inclinação da esteira, para a análise histológica, os músculos escolhidos foram o GA e o DIA.

A dosagem dos níveis séricos da enzima creatina quinase (CK) é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o dano muscular, decorrente da maior susceptibilidade do sarcolema a lesão devido à ausência da distrofina em músculos distróficos (Grounds et al., 2008). A quantificação de CK é útil tanto no diagnóstico de pacientes afetados e de portadoras da DMD, quanto em estudos com modelos animais da doença, principalmente os que envolvem terapias (farmacológica, gênica ou celular). Em humanos, os valores de referência variam de 30 a 135 UI/L para mulheres e 55 a 170 UI/L para homens (Andriolo, 2005). Em pacientes afetados pela DMD, os níveis séricos são muito elevados (até 50 vezes o limite superior) (Beggs e Kunkel, 1990). A lesão muscular, intensificada pela atividade física compulsória em um período de 4 a 8 semanas, aumenta o extravasamento do conteúdo intracelular em camundongos *mdx*, resultando em níveis aumentados de CK no soro, o que indica indiretamente a ocorrência de lesão celular (Grounds et al., 2008; De Luca et al., 2005). Os resultados apresentados na Figura 10 mostraram que de fato a CK é um bom marcador de lesão, uma vez que comparando camundongos *mdx* de 9 semanas submetidos à atividade física com animais de mesma idade sedentários, detectou-se um aumento significativo de 152% nos níveis dessa enzima, indicando que a atividade física proposta intensificou a degeneração muscular.

Um outro sinal de degeneração muscular pode ser observado quando miofibras com lesão no sarcolema sofrem infiltração pelo corante azul de Evans. A Figura 16 mostra que não houve aumento significativo das áreas infiltradas com o corante nos camundongos *mdx* de 9 semanas submetidos a atividade física quando comparados com os de 4 semanas sedentários em ambos os músculos estudados. Isso pode ser atribuído à grande variação na gravidade da distrofinopatia observada dentro de uma mesma colônia de camundongos *mdx*, decorrente da

variabilidade biológica intra-espécie. Parâmetros histopatológicos são muitas vezes alterados, por exemplo, diferentes camundongos *mdx* de 23 dias infiltrados com o EBD podem apresentar níveis variados de lesões, de 10 a 80%. Devido a estas constantes variações dentro da mesma colônia, há necessidade de utilizar vários parâmetros, em conjunto e não isoladamente, para uma avaliação rigorosa da condição muscular do camundongo *mdx* Grounds et al. (2008).

Algumas proteínas e citocinas apresentam expressão diferencial em músculo distrófico podendo ser consideradas marcadores de degeneração (TNF- α), fibrose (TGF- β , colágenos 1 e 3) e regeneração (N-CAM) (Kuru, et al, 2003; Grounds e Torrisi, 2004; De Luca, et al, 2005; Bani, et al, 2008). Neste estudo, foi investigada a expressão da Gal-1, uma lectina envolvida no desenvolvimento do músculo esquelético (Watt et al. 2004; Kami e Senba 2005) e com evidências de participação na regeneração muscular (Goldring, et al 2002). Os resultados inéditos reportados aqui (Fig.13 e 14) demonstram o aumento de expressão e uma localização alterada da Gal-1 em músculos distróficos. Foi observado também que os níveis mantiveram-se elevados após o programa de atividade física demonstrando que a degeneração muscular induz a alta expressão de Gal-1, seguida por diminuição da expressão durante os estágios de regeneração, sugerindo um papel chave da Gal-1 no processo de regeneração celular (Cerri, et al, 2008).

Efeito do tratamento com cetotifeno e olopatadina em camundongos *mdx*

Para avaliar o efeito da inibição da desgranulação de mastócitos na progressão da distrofinopatia em camundongos *mdx*, foram utilizadas duas drogas, a olopatadina e o cetotifeno. Os parâmetros de degeneração muscular avaliados foram: dosagem de CK sérica, área de miofibras lesadas infiltradas por EBD e área contendo infiltrados inflamatórios. Os níveis de CK sérica foram reduzidos significativamente em resposta ao tratamento tanto com

o cetotifeno quanto com a olopatadina (23% e 37%, respectivamente) quando comparados com o grupo não tratado (Figura 15). Com relação à área ocupada por miofibras com lesão no sarcolema, o tratamento com cetotifeno resultou em uma diminuição estatisticamente significativa tanto no GA (95%) quanto no DIA (98%) (Figuras 16A e 16B, respectivamente), e o tratamento com a olopatadina resultou em diminuição significativa da lesão apenas no músculo GA (73%) (Figura 16A). Com relação à área contendo infiltrados inflamatórios, o grupo tratado com olopatadina apresentou redução significativa no GA (69%) em relação ao grupo sem tratamento (Figura 17A). Os animais tratados com o cetotifeno apresentaram resultados sugestivos de que não houve melhora no quadro inflamatório do animal (Figura 17).

Analisados em conjunto, esses dados podem sugerir que as duas drogas contribuíram para a redução da lesão. Entretanto, considerando os níveis de CK e a área de miofibras lesadas, o cetotifeno parece ser mais efetivo do que a olopatadina para prevenir a lesão e menos efetivo na contenção do processo inflamatório crônico. Dessa forma, o cetotifeno poderia ser utilizado como um agente profilático, como é proposto por Manzouri et al. (2006). Por outro lado, a tendência dessa droga em aumentar a inflamação, como observado na Figura 17, pode estar relacionada com uma ação dependente da dosagem. Existem relatos na literatura que indicam que em doses baixas o cetotifeno tem ação anti-inflamatória, mas que doses altas podem induzir à desgranulação de mastócitos e aumento da inflamação (Rosenwasser et al., 2005).

Com relação aos parâmetros de regeneração muscular, apenas o tratamento com cetotifeno resultou em diminuição significativa das áreas em regeneração tanto no GA (69%) quanto no DIA (83%) quando comparado com o grupo não tratado (Figura 18A e 18B). A porcentagem de núcleos não periféricos no grupo tratado com cetotifeno foi significativamente menor apenas no DIA (42%) (Figura 19B); não houve diferença

significativa no grupo tratado com olopatadina (Figura 19). Analisados em conjunto, os dados sugerem que o tratamento com olopatadina não alterou a regeneração muscular nos *mdx*. Contudo, os dados com o grupo tratado com cetotifeno poderiam sugerir que houve menos regeneração. Entretanto, a redução das áreas de regeneração pode ser consequência de menor lesão prévia, de forma concordante com os dados de degeneração muscular discutidos anteriormente.

O cetotifeno e a olopatadina são inibidores da desgranulação de mastócitos de segunda geração e apresentam ação dupla como estabilizadores de membrana e antagonistas do receptor H1 de histamina (Kaditis, 2007). Apesar da ação anti-inflamatória comprovada dessas drogas, não há relatos de outros estudos na literatura sobre seu efeito na progressão da distrofinopatia. Há relatos utilizando um inibidor de mastócitos de primeira geração, o cromoglicato de sódio (*Cromolyn*). Camundongos *mdx* tratados com cromoglicato de sódio apresentaram redução de necrose, aumento da força muscular, e estabilização do sarcolema, com redução de miofibras infiltradas pelo corante azul de Evans (Radley et al, 2006; Granchelli et al., 2000; Marques et al 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a administração oral do cetotifeno e da olopatadina reduziu a degeneração das miofibras de camundongos *mdx*. Desta forma, este estudo reforça as evidências de que a inibição de mastócitos é uma abordagem adequada para manter a integridade dos músculos distróficos.

Efeito do tratamento com a LMP-420 em camundongos *mdx*

O efeito da LMP-420, uma nova droga com ação inibitória da transcrição do TNF- α , foi investigado na progressão da distrofinopatia de camundongos *mdx* submetidos a atividade física, uma condição que exacerba o quadro de degeneração muscular (De Luca et al., 2005) e torna o fenótipo distrófico mais similar aos dos pacientes com Distrofia Muscular de

Duchenne (Grounds et al., 2008). A hipótese inicial do estudo baseou-se na potencial ação anti-inflamatória da droga, como forma de conter o processo inflamatório crônico que acomete os músculos distróficos e, desta forma, melhorar a condição muscular.

Para selecionar a dose de LMP-420 a ser utilizada, foi considerada um estudo prévio no qual o efeito anti-inflamatório dessa droga foi testado em modelo experimental murino de colite aguda e crônica (Hale e Cianciolo, 2008). Nesse estudo, os autores demonstraram *in vitro* e *in vivo* a redução dos níveis de TNF- α em resposta ao tratamento prévio com LMP-420. Os ensaios *in vivo* foram realizados em camundongos C57BL/6 (mesmo *background* dos camundongos *mdx* utilizados em nosso estudo) e as doses testadas variaram de 5 a 45 mg/kg/dia, correspondentes a 0,11 a 1 mg por camundongo, respectivamente. Nessa faixa de dosagem da LMP-420 foi verificada uma inibição de aproximadamente 80% nos níveis de TNF- α tanto no soro quanto no cólon, que não variou significativamente entre a menor e a maior dose administradas. Utilizando uma dose maior, correspondente a 2 mg por camundongo, foi observado um comportamento transitório de depressão, consistente com uma reação de hipotensão, que durou cerca de 20 minutos, inviabilizando, portanto, a utilização de doses maiores. Dessa forma, no presente estudo, foi utilizada a dose de 25 mg/kg/dia (intermediária na faixa de 5 a 45 mg/kg).

Inicialmente, foi verificada a porcentagem de inibição da transcrição do mRNA do TNF- α nos músculos GA e DIA de camundongos *mdx* tratados com LMP-420 e submetidos a atividade física. Comparando com o grupo controle, foi detectada redução estatisticamente significativa no GA (76,6%) e no DIA (69%), confirmando a ação esperada da droga (Figura 21). Não há relatos na literatura sobre a porcentagem de inibição considerando os níveis de mRNA do TNF- α , apenas os níveis de proteína.

Os parâmetros de degeneração muscular avaliados foram: dosagem de CK sérica, área de miofibras lesadas infiltradas por EBD e área contendo infiltrados inflamatórios. Os

resultados obtidos mostraram uma redução significativa de 45,1% na concentração da CK no soro dos camundongos *mdx* tratados com LMP-420, quando comparados aos *mdx* controle, o que sugere redução da lesão muscular (Figura 22). Dados similares foram relatados por Hodgetts et al. (2006), que obtiveram redução estatisticamente significativa de cerca de 37% nos níveis de CK em camundongos *mdx* submetidos a exercício físico e tratados com um inibidor de TNF- α (receptor solúvel).

Em relação à quantificação da área muscular ocupada por miofibras infiltradas pelo corante azul de Evans, um resultado similar foi obtido para os dois músculos analisados, isto é, foram verificadas reduções significativas no grupo tratado com LMP-420 em comparação com o grupo controle. Como mostra a Figura 23, as reduções foram de 98,6% e 83,6%, para o GA e o DIA, respectivamente. Estes resultados corroboram os dados obtidos na análise dos níveis séricos de CK e sugerem diminuição da lesão do sarcolema em resposta ao tratamento com LMP-420. Grounds e Torrisi (2004), utilizando inibição do TNF- α com anticorpo específico (Remicade®), mostraram redução em miofibras infiltradas por EBD no músculo tibial anterior. Hodgetts e colaboradores (2006) obtiveram redução significativa de 42% nos níveis de necrose do músculo quadríceps em resposta ao bloqueio do TNF com um receptor solúvel (Enbrel®).

O processo inflamatório foi avaliado pela quantificação da área ocupada por infiltrados inflamatórios. Foi verificada uma diminuição significativa da área afetada, quando comparados animais tratados com a LMP-420 e animais controles em ambos os músculos (57,3% no GA e 66,3% no DIA) (Figura 24). Esse resultado é coerente com os dados de CK e EBD que, em conjunto, sugerem que o tratamento com LMP-420 reduziu a lesão muscular e diminuiu a inflamação nos dois músculos analisados. Esse é o primeiro estudo que demonstra ação anti-inflamatória tecidual da LMP-420. Embora tenham demonstrado redução dos níveis de TNF em resposta à LMP-420 em modelo de colite em camundongos, Hale e Cianciolo

(2008) não verificaram diminuição da inflamação no cólon. As outras estratégias de inibição do TNF- α , uso de anticorpos inibitórios ou do receptor solúvel, resultaram em diminuição da inflamação, mas não tão significativa quanto a LMP-420.

Em relação à regeneração muscular, os animais tratados com a LMP-420 também apresentaram uma diminuição significativa na área com características de regeneração recente no músculo GA, quando comparados com o grupo controle (83%) (Figura 25). Uma menor porcentagem de miofibras com núcleos não periféricos em relação ao grupo controle foi observada em ambos os músculos analisados, mas significativa apenas no GA (13,6% de redução). Analisando em conjunto os dados referentes aos parâmetros indicativos de regeneração muscular, observa-se que o tratamento com a LMP-420 resultou em diminuição dos sinais de regeneração dos músculos em estudo. A partir desses dados seria possível propor duas hipóteses para a ação da LMP-420: i) a droga interfere no processo de regeneração muscular, dificultando-o; ou ii) a menor extensão de regeneração detectada é consequência de menor degeneração prévia. A segunda hipótese é a mais provável, se forem considerados os parâmetros de degeneração muscular que sugerem que a LMP-420 contribuiu para reduzir a lesão da musculatura dos camundongos *mdx*.

CONCLUSÕES

Em suma os resultados obtidos no presente estudo permitiram:

Validar o programa de atividade física compulsória para teste de drogas

Conforme esperado, os camundongos C57BL/6 (controles) apresentaram marcação na periferia das fibras indicando a presença da distrofina associada ao sarcolema e os camundongos *mdx* não apresentaram nenhuma marcação. O programa de atividade física compulsória resultou em aumento da degeneração muscular como evidenciado pelos níveis de CK e lesão no sarcolema, mostrando que a abordagem experimental foi adequada para investigar a intervenção de drogas na distrofinopatia.

Identificar a Gal-1 como marcador de degeneração muscular

Quando os camundongos são submetidos à atividade física os níveis de GAL-1 nos músculos distróficos são aumentados de forma significativa, e sua localização é alterada (Cerri et al, 2008).

Demonstrar que os estabilizadores de mastócitos e agentes anti-histamínico, cetotifeno e olopatadina, contribuem para manter a integridade do músculo de camundongos distróficos.

A administração oral tanto do cetotifeno quanto da olopatadina em camundongos *mdx* submetidos à atividade física contribuiu para a manutenção da integridade da musculatura dos camundongos, ou seja, houve significativa redução do quadro degenerativo das fibras musculares (Manuscrito submetido ao Neuromuscular disorders).

Demonstrar que a LMP-420 diminui o processo inflamatório e a degeneração muscular de camundongos distróficos

A administração oral de LMP-420 (25 mg/kg/dia) reduziu os níveis de mRNA do TNF- α (aproximadamente 70%), contribuindo de forma significativa para diminuir a inflamação e a degeneração muscular de camundongos distróficos submetidos à atividade física. Neste estudo, encontramos evidências de que a LMP-420, através da inibição do TNF- α é capaz de retardar a progressão do quadro distrófico nos camundongos *mdx*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albesiano, E., Messmer, B.T., Damle, R.N., Allen, S.L., Rai, K.R., Chiorazzi, N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood* 102, 3333-3339, 2003.
- Andriolo RB, El Dib RP, Ramos LR. Aerobic exercise training programmes for improving physical and psychosocial health in adults with Down syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3: CD005176, 2005.
- Bani C.; Lagrota-Candido, J.; Pinheiro, D.F.; Leite, P.E.C.; Salimena, M.C.; Henriques-Pons, A.; Quirico-Santos, T. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 37: 583-592, 2008.
- Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *The Journal of clinical investigation*, 85(3):613-9, 1990.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*, 82:291-329, 2002.
- Boldrin L, Morgan JE. Activating muscle stem cells: therapeutic potential in muscle diseases. *Curr Opin Neurol.*, 20(5):577-582, 2007.
- Brussee V, Tardif F, Tremblay JP. Muscles fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscular disorders: Neuromuscular Disorders*, 7(8):487-492, 1997.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X cromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 81(4):1189-1192, 1984.
- Burdi R, Didonna MP, Pignol B, Nico B, Mangieri D, Rolland JF, Camerino C, Zallone A, Ferro P, Andreetta F, Confalonieri P, De Luca A. First evaluation of the potencial effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscular disorders*, 16(4):237-248, 2006.
- Bushby K, Finkel R, Bimkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C, for the DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne

- muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.*, 9(1):77-93, 2010a.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C, for the DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.*, 9(2):177-189, 2010b.
- Cerri DG, Rodrigues LC, Stowell SR, Araujo DD, Coelho MC, Oliveira SR, Bizario JCS, Cummings RD, Dias-Baruffi M, Costa MCR. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of galectin-1. *Glycobiology*, 18(11):842-850, 2008.
- Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.*, 84:209-238, 2004.
- Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *International journal of experimental pathology*, 84(4):165-172, 2003.
- Davies KE, Nowak K. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature Review in Molecular Cell Biology* 7, 762-773, 2006.
- De Luca A, Nico B, Liantonio A, Didonna MP, Fraysse B, Pierno S, Burdi R, Mangieri D, Rolland JF, Camerino C, Zallone A, Confalonieri P, Andreetta F, Arnodì, Pisoni M, Svelto M, Camerino DC. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine in dystrophic *mdx* mice. *Am. J. Pathol.*, 166(2):477-489, 2005.
- Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric Neurology*, 36(1):1-7, 2007.
- Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307):687-695, 2002.
- Frost RA, Nystrom GJ, Langes CH. Lypopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283:R698-R709, 2002.
- Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *Journal of Neurological Sciences*, 135(1):10-17, 1996.

- Gorospe JR, Tharp MD, Hinckley J, Kornegay JN, Hoffman EP. A role of mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs and mice. *Journal of Neurological Sciences*, 122:44-56, 1994.
- Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez, D. Localization and early time course of TGF- β 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30: 645-653, 2004.
- Gowers WR. A manual of disease of the nervous system. London: Churcill, 1:391-394, 1886.
- Goldring, K., Jones, G.E., Thiagarajah, R., Watt, D.J. (2002) The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J Cell Sci*, **115**, 355-366.
- Granchelli JA, Avosso DL, Hudecki MS, Pollina C. Cromolyn increases strength in exercised mdx mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 91(3):287-296, 1996.
- Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS. Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders*, 10:235-239, 2000.
- Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease*, 31:1-19, 2008.
- Grounds MD, Davies M, Torrissi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res*. 320, 509-515, 1995.
- Grounds MD, Torrissi J. Anti-TNF α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*. 18, 676-682, 2004.
- Hale LP, Cianciolo G. Treatment of experimental colitis in mice with LMP-420, an inhibitor of TNF transcription. *J Inflamm (Lond)*. 10;5:4, 2008.
- Hamer PW, McGeachie JM, Davies MJ, Grounds MD. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre fragility and damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre permeability. *J. Anal.*, 200:69-79, 2002.
- Haraguchi S, Day NK, Kamchaisatian W, Beigier-Pompadre M, Stenger S, Tangsinmankong N, Sleasman JW, Pizzo SV, Cianciolo GJ. LMP-420, a small-molecule inhibitor of TNF- α , reduces replication of HIV-I and *Mycobacterium tuberculosis* in human cells. *AIDS Res. Ther.*, 3(8), 2006.

- Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in *mdx* mice. *Neuromuscular Disorders*, 16, 591-602, 2006.
- Kaditis AG, Winnie G, Syrogiannopoulos GA. Anti-inflammatory pharmacotherapy for wheezing in preschool children. *Pediatr. Pulmonol.*, 42(5):407-420, 2007.
- Kapsa R, Komberg AJ, Byrne E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol.*, 2:299-310, 2003.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3):509-517, 1987.
- Kuru S, Inukai A, Kato T, Liang Y, Kimura S, Sobue G. Expression of tumor necrosis factor- α in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathologica*, 105(3):217-224, 2003.
- Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biology*, 80:575-599, 1973.
- Manzouri B, Thomas HF, Larkin F, Ono SJ, Richard W. Pharmacotherapy of allergic eye disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 7(9):1191-1200, 2006.
- Marques MJ, Ventura Machado R, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle & Nerve*, 37(1):61-67, 2008.
- Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Immunology Reviews*, 4:787-799, 2004.
- Matsubara M, Masaki S, Ohmori K, Karasawa A, Hasegawa K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadina in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochemical Pharmacology*, 67:1315-1326, 2004.
- MacCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, 5:45, 2008.
- McDouall RM, Dunn MJ, Dubowitz V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 99:199-217, 1990.

- Mendonça VO, Vaugman I, Jamur MC. Maturation of adult rat peritoneal and mesenteric mast cells. A morphological and histofluorescence study. *Cell and tissue research*, 243(3):635-639, 1986.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol. Rev.*, 77:1033-1078, 1997.
- Metzger H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol. Rev.*, 125:37-48, 1992.
- Moxley RT III, Ashwal S, Pandya S, Connolly A, Florence J, Mathews K, Baumbach L, McDonald C, Sussman M, Wade C. Practice Parameter: Corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 64:13-20, 2005.
- Ohmori K, Ken-ichi H, Toshihiko K, Etsuo O, Satoshi K, Takashi Y, Akimichi M. Pharmacological, Pharmacokinetic of Olopatadine Hydrochloride, a New Antiallergic Drug. *Japanese Journal of Pharmacology*, 88:379-397, 2002.
- Pastoret C, Sebillé A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle & Nerve*, 18(10):1147-1154, 1995.
- Pierno S, Nicot B, Burdi R, Liantonio A, Didonna MP, Cippone V, Fraysse B, Rolland J-F, Mangierit D, Andretta F, Ferro P, Carmerinot C, Zallonet A, Confalonieri P, De Lucca A. Role of tumour necrosis factor α , but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33:344-359, 2007.
- Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, Leahy P, Li J, Guo W, Andrade FH. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Molecular Genetics*, 11(3):263-272, 2002.
- Radley HG, MD Grounds. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiology of Disease*, 23:387-397, 2006.
- Radley HG, De Luca A, Lynch GS, Grounds MD. Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39:469-477, 2007.
- Rosenwasser L J. a, O'Brien b T and Weyne J. Mast cell stabilization and antihistamine effects of olopatadine ophthalmic solution: a review of pre-clinical and clinical research. *Current Medical Research and Opinion*, 21(9):1377-1387, 2005.

- Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration and disease. *Genes Dev.*, 20(13):1692-16708, 2006.
- Sloper JC, Barrett MC, Partridge TA. The muscle cell. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 12:25-43, 1978.
- Tamura T, Matsubara M, Takada C, Hasegawa, Suzuki K, Ohmori K, Karasawa A. Effects of olopatadine hydrochloride, and antihistamine drug, on skin inflammation induced by repared topical application of oxazolone in mice. *British Journal of Dermatology*, 151:1133-1142, 2004.
- Tseng BS, Zhao P, Pattison JS, Gordon SE, Granchelli JA, Madsen RW, Folk LC, Hoffman P Booth FW. Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. *J. Appl. Physiol.*, 93:537-545, 2002.
- Towbin H; Stahelin T, Gordon J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354, 1979.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.*, 10:45-65, 2003.
- Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.*, 23:787-819, 2005.
- Wassmer SC, Cianciolo GJ, Combes V, Grau GE. Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria? *PLoS Medicine*, 2(9):e245, 2005.
- Watchko JF, O'Day TL, Hoffman TL. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J. Appl. Physiol.*, 93:407-417, 2002.
- Wong BL, Christopher C. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J Child Neurol.*, 17(3):183-190, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1 – Artigos publicados

Elsevier Editorial System(tm) for Neuromuscular Disorders
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Mast cell stabilizing and antihistamine agents, ketotifen and olopatadine, contribute to maintain muscle integrity in exercised mdx mice

Article Type: Original Article (O)

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; exercised mdx mice; mast cells; ketotifen; olopatadine; skeletal muscle degeneration

Corresponding Author: Mrs Maria Cristina Ramos Costa, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP), School of Medicine, University of Ribeirao Preto

First Author: Daniela D Araujo, MSc.

Order of Authors: Daniela D Araujo, MSc.; Daniel G Cerri, Ph.D; Tatiana T Fuzisaki, medical student; Francisco S M Pires, medical student; Lílian C Rodrigues, MSc.; Lucélio B Couto, Ph.D; João C S Bizario, Ph.D; Maria Cristina Ramos Costa, Ph.D

Abstract: Sarcolemma instability due to the lack of dystrophin is responsible for the initial events of muscle pathology in Duchenne patients and mdx mice. Muscular degeneration is exacerbated by a chronic inflammatory process in which immune cells and cytokines play key roles. Previous reports showed that degranulation inhibitors of mast cells, a primary source of inflammatory mediators in dystrophic muscle, reduce lesion and necrosis in mdx. Here we evaluated the effect of ketotifen and olopatadine, mast cell inhibitors with dual activity: membrane stabilizing and antihistamine properties. Male mdx mice were submitted to compulsory exercise during five weeks while were treated with 1 mg/kg/day-ketotifen or 10 mg/kg/day-olopatadine. Skeletal muscle conditions were evaluated by histopathological and biochemical analyses. Both drugs resulted in significantly decreased CK levels (37% and 23% for ketotifen and olopatadine-treated groups respectively) and an improvement of gastrocnemius and diaphragm conditions, with decreased relative area with injured myofibers and inflammatory infiltrates.

J. Miller
Editorial Assistant – Neuromuscular Disorders Journal
Dubowitz Neuromuscular Centre
UCL Institute of Child Health

Dear Dr. Miller,

We are submitting the manuscript entitled “**Mast cell stabilizing and antihistamine agents, ketotifen and olopatadine, contribute to maintain muscle integrity in exercised *mdx* mice**” which we would like to be considered for publication in Neuromuscular Disorders Journal.

In this work we studied the effectiveness of ketotifen and olopatadine, two second generation inhibitors of mast cells, as anti-inflammatory agents to retard muscle degeneration in dystrophin-deficient skeletal muscles. We used exercised *mdx* mice as model and considered parameters to evaluate muscular degeneration (serum creatine kinase level, infiltration by Evans blue dye, presence of inflammatory cells) and regeneration (percentage of non-peripheral nucleated myofibers and presence of grouped fibers with characteristics of recent regeneration). We focused on gastrocnemius and diaphragm muscles. Our results indicate that the oral administration of both drugs, especially ketotifen, contributed to maintain muscle integrity of the treated mice: creatine kinase levels were significantly reduced as well as the relative area occupied by injured myofibers and inflammatory infiltrates. Our findings suggest that ketotifen and olopatadine can be considered promising therapeutic options to future clinical trials for DMD.

"None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript."

We look forward to learning the decision of the Journal.

Sincerely,

Dr. Maria Cristina Ramos Costa
Muscular Dystrophy Research Center
University of Ribeirão Preto
Av Bandeirantes, 2419, Vila Virgínia
Ribeirão Preto, SP, Zip code 14340-670, Brazil

Mast cell stabilizing and antihistamine agents, ketotifen and olopatadine, contribute to maintain muscle integrity in exercised *mdx* mice

ABSTRACT

Sarcolemma instability due to the lack of dystrophin is responsible for the initial events of muscle pathology in Duchenne patients and *mdx* mice. Muscular degeneration is exacerbated by a chronic inflammatory process in which immune cells and cytokines play key roles. Previous reports showed that degranulation inhibitors of mast cells, a primary source of inflammatory mediators in dystrophic muscle, reduce lesion and necrosis in *mdx*. Here we evaluated the effect of ketotifen and olopatadine, mast cell inhibitors with dual activity: membrane stabilizing and antihistamine properties. Male *mdx* mice were submitted to compulsory exercise during five weeks while were treated with 1 mg/kg/day-ketotifen or 10 mg/kg/day-olopatadine. Skeletal muscle conditions were evaluated by histopathological and biochemical analyses. Both drugs resulted in significantly decreased CK levels (37% and 23% for ketotifen and olopatadine-treated groups respectively) and an improvement of gastrocnemius and diaphragm conditions, with decreased relative area with injured myofibers and inflammatory infiltrates.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, exercised *mdx* mice, mast cells, ketotifen, olopatadine, skeletal muscle degeneration

Abbreviations: CK, creatine kinase; DIA, diaphragm muscle; DMD, Duchenne muscular dystrophy; EBD, Evans blue dye; keto, ketotifen; olo, olopatadine; GA, gastrocnemius muscle.

Mast cell stabilizing and antihistamine agents, ketotifen and olopatadine, contribute to maintain muscle integrity in exercised *mdx* mice

Daniela Dover de Araujo ^{a,b}, Daniel Giuliano Cerri ^a, Tatiana Taba Fuzisaki ^a, Francisco Souza Meirelles Pires ^a, Lílian Cataldi Rodrigues ^a, Lucélio Bernardes Couto ^a, João Carlos da Silva Bizario ^a, Maria Cristina Ramos Costa ^{a,b,*}

^a Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP), School of Medicine, University of Ribeirão Preto, 14096-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil

^b Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil

* Corresponding author: Av Costábile Romano 2201, Zip code 14096-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Tel./Fax: 55-16-3919-3028. Email address: mrcosta@usp.br

Mast cell stabilizing and antihistamine agents, ketotifen and olopatadine, contribute to maintain muscle integrity in exercised *mdx* mice

ABSTRACT

Sarcolemma instability due to the lack of dystrophin is responsible for the initial events of muscle pathology in Duchenne patients and *mdx* mice. Muscular degeneration is exacerbated by a chronic inflammatory process in which immune cells and cytokines play key roles. Previous reports showed that degranulation inhibitors of mast cells, a primary source of inflammatory mediators in dystrophic muscle, reduce lesion and necrosis in *mdx*. Here we evaluated the effect of ketotifen and olopatadine, mast cell inhibitors with dual activity: membrane stabilizing and antihistamine properties. Male *mdx* mice were submitted to compulsory exercise during five weeks while were treated with 1 mg/kg/day-ketotifen or 10 mg/kg/day-olopatadine. Skeletal muscle conditions were evaluated by histopathological and biochemical analyses. Both drugs resulted in significantly decreased CK levels (37% and 23% for ketotifen and olopatadine-treated groups respectively) and an improvement of gastrocnemius and diaphragm conditions, with decreased relative area with injured myofibers and inflammatory infiltrates.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, exercised *mdx* mice, mast cells, ketotifen, olopatadine, skeletal muscle degeneration

Abbreviations: CK, creatine kinase; DIA, diaphragm muscle; DMD, Duchenne muscular dystrophy; EBD, Evans blue dye; keto, ketotifen; olo, olopatadine; GA, gastrocnemius muscle.

1. Introduction

In the X-linked lethal disorder Duchenne muscular dystrophy (DMD), the lack of dystrophin leads to sarcolemma damage and skeletal muscle wasting^[1-3]. The dystrophin gene was identified as the responsible for the disease by Hoffman and colleagues^[4]. Since then, several processes and molecular mechanisms have been elucidated in the DMD pathophysiology; but despite two decades of intensive studies, a definitive cure is not yet available. Until now, the recommended pharmacological treatment for most DMD patients is the use of corticosteroids in order to decrease inflammation and alleviate illness symptoms^[5,6]. However, the prolonged use of these drugs can cause several adverse effects^[31]. Effective pharmacological therapies which can retard or stop the progression of muscle degeneration are highly necessary^[5]. Some promising results have been recently described in *mdx* mice treated with drugs that can inhibit or modulate immune response^[7-11].

The absence of dystrophin in skeletal muscles triggers a cascade of events summarized as follows: (i) sarcolemmal instability leading to myofiber breakdown and release of intracellular content (the extent of this can be estimated by the quantification of creatine kinase (CK) levels in serum); (ii) infiltration of immune cells that contribute to a chronic inflammatory process; (iii) Ca²⁺ influx into myofibers and proteases activation; (iv) myofiber apoptosis and necrosis. These biochemical and morphological dysfunctions can also be observed in the *mdx* mouse, the most commonly used model for DMD^[12-15]. The protein dystrophin is predicted to have the same function in murine and humans; however, *mdx* mice present a milder pathology than DMD patients. Compulsory physical activity intensifies the dystrophic phenotype as it deviates the degeneration/regeneration cycles toward degeneration^[10,16].

Degeneration of dystrophic skeletal muscles is exacerbated by a chronic inflammatory process in which immune cells and cytokines play key roles. Previous studies using a microarray approach reported the overexpression of inflammatory mediators and other genes related to immune response in dystrophic muscles ^[17].

Mast cells are a source of inflammatory mediators in injured muscles, as well as macrophages, basophils, T-cells, natural killer cells, and others. Mast cells play an important role in wound healing and in the defense against pathogens^[18]. Besides many studies showing their pivotal role in allergy and anaphylaxis, these cells have been described to be involved in proliferation of connective tissue and fibrosis in several pathological conditions ^[18-20], such as myofiber remodeling/fibrosis in *mdx* mice ^[21]. Mast cells activation occurs in response to antigens (such as some chemical reagents or anaphylactic toxins), mechanical trauma, and temperature or UV rays, among others ^[22]. The mechanical myofiber damage can activate mast cell degranulation, contributing to tissue remodeling in DMD muscles. When exposed to intramuscular injections of purified mast cell granules ^[23] or compound 48/80, a mast cell secretagogue ^[24], adult *mdx* muscles showed increased necrosis in comparison with their normal counterpart. This observation indicated that dystrophic myofibers are vulnerable to mast cell mediators.

Mast cell stabilizing agents are drugs that retard calcium mobilization in the intracellular machinery, which in turn inactivates the degranulation process and impairs the release of inflammatory mediators ^[25]. Mast cells inhibitors (as disodium cromoglycate or Cromolyn®) have been characterized as suitable candidate for DMD amelioration, as they showed a protective effect on myofiber breakdown in limb and axial *mdx* muscles ^[9,25,26].

Novel drugs have been developed to more effectively inhibit mast cells and reduce inflammation. These drugs, such as ketotifen and olopatadine, have dual activity: stabilizing mast cell membrane and acting as multiple-action histamine H1-receptor

antagonists ^[27]. In addition to their action in mast cells, ketotifen and olopatadine prevent activation of neutrophils, eosinophils and macrophages. They can also inhibit the release of leukotrienes, platelet-activating factor and other inflammatory mediators ^[27]. Based on these previous data, we hypothesized that ketotifen and olopatadine could present even more effective anti-inflammatory action in dystrophic muscle than first-generation mast cells inhibitors, contributing to maintain muscle integrity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and drug administration

Mdx mice were housed and used in the Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP) in accordance with the institutional guidelines of the University of Ribeirão Preto Ethics Committee. Mice were kept at 20°C under 12 h light/dark cycles. Food and water were provided *ad libitum*. Approximately 50 male four week old *mdx* mice were used in this study, distributed in three groups: (i) untreated; (ii) treated with 1 mg/kg ketotifen (ketotifen fumarate, Zaditen[®], Novartis, Campinas, Brazil), and (iii) treated with 10 mg/kg olopatadine (Allelock[®] Kyowa Kakko Kogyo Tokyo, Japan). Drugs were administered daily, during five weeks, by gavage. To aggravate muscular degeneration, all mice were submitted to a 20 min program of downhill running on a 16° inclined treadmill (Columbus, OH) at 20 cm/s, 3 days/week for 5 weeks^[16]. Mice were sacrificed 24 h after the last run by CO₂ inhalation and the diaphragm (DIA) and gastrocnemius (GA) muscles were excised for analysis.

2.2. Creatine kinase dosage

Serum CK levels were quantified to estimate myofiber breakdown as an indirect evidence of muscular degeneration. At the end of the treatment regimen, animals were anesthetized with ketamine and xylazine (both at 10 mg/kg) and blood samples were collected by cardiac puncture. Serum CK levels were determined by a colorimetric kit (Doles Ltda, Goiânia, Brazil) in a DU650 spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Injured myofiber analysis

Mice were submitted to intraperitoneal injections with 1% Evans blue dye (EBD) in phosphate buffered solution (PBS, EBD Fluka, France) at 100 $\mu\text{L}/10\text{g}$ of body mass. EBD is an autofluorescence dye that fails to overpass normal sarcolemma, but is internalized during membrane breakdown and myofiber necrosis [28]. Animals were sacrificed 24 h after the injection. GA and DIA muscles were excised and snap frozen in the Tissue-TEK OCT compound (Sakura, Japan). The frozen samples were cryo-sectioned (Leica, Germany) in 30 μm -thick sections. Images were obtained with a Nikon DMX-1200 camera coupled to a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, USA). Three different observers performed blind quantitative analyses using ImageJ software. The bright red area (corresponding to EBD infiltrated myofibers) was quantified and the result was expressed as percentage of the total section area.

2.4. Quantitative histopathological analyses

At the end of treatment, 10 μm paraffin cross-sections of GA and DIA muscles were stained with hematoxylin and eosin (HE). Images were obtained with a Nikon DMX-1200 camera coupled to a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, USA) using the software ACT-1 program (Nikon). Three different observers performed blind quantitative analyses. Cross-sectional areas of the entire GA and DIA were measured using the Image-J software. The parameters used in this study were the presence of infiltrating inflammatory cells (basophilic staining) and areas containing mainly myotubes and myofibers with a small diameter and central nuclei, with poor inflammatory cell infiltration (considered areas that have undergone recent regeneration). The percentage of centronucleated fibers referred to the total number was obtained considering 1000 fibers per muscle section.

2.5. Statistical analyses

Comparisons between groups were made using Student's *t*-test (95% CI). Results were expressed as mean±SEM and statistical significance was set at $P<0.05$. All analyses were performed using the software GraphPad Prism v. 4.0 for Windows.

3. Results

3.1. *The physical activity program exacerbated muscular injury in mdx mice*

Our goal was to verify the effectiveness of ketotifen and olopatadine to retard the progression of dystrophinopathy in *mdx* mice, i.e. to maintain muscle integrity of dystrophic skeletal muscles. The sedentary *mdx* mouse presents the first wave of muscular degeneration/regeneration at three to four weeks of age. After this period the animal recovers and presents a mild muscular degeneration which takes more than eighteen months to become severe^[14,15]. To intensify and prolong the inflammation in order to verify the potential anti-inflammatory action of the drugs, we submitted *mdx* mice to a strenuous exercise program. We first evaluated the effect of this program using CK levels as an indirect parameter of muscular lesion. As expected, Supplemental Figure 1 shows that four week old male *mdx* mice presented significant higher CK levels when compared to C57BL/6 normal mice. Elevated CK levels were detected in sedentary nine week old mice in relation to four week old mice, but the exercised group presented the highest CK levels showing that the exercise regimen was effective to exacerbate muscular degeneration in *mdx* mice. Histological analyses of Evans blue dye and H&E stained sections of GA and DIA muscles confirmed these results (data not shown).

3.2. *Mice body mass did not show significant statistical difference between ketotifen or olopatadine-treated groups in comparison with untreated groups*

In order to verify possible variations in body mass due to the treatment with ketotifen and olopatadine, treated and untreated mice were weighted weekly and whole mass compared. No statistical difference was detected between treated and untreated

groups during the whole experimental period (data not shown). In the beginning of the study, the body mass mean of *mdx* mice was $9 \text{ g} \pm 1,2$ and in the end $19 \text{ g} \pm 2,6$.

3.3. Ketotifen and olopatadine treatment resulted in decreased CK levels

Myofiber breakdown and consequent leakiness were assessed by evaluating serum CK levels in both treated and untreated groups. Figure 1 shows that, when compared with untreated *mdx* (0 mg), treated mice had decreased CK levels by 23 and 37% in ketotifen and olopatadine treated *mdx*, respectively ($P=0.0002$ in both cases).

3.4. Relative area occupied with injured myofibers was decreased in GA by both drugs and in DIA by ketotifen treatment

After ketotifen and olopatadine treatment, histopathological analyses were performed using Evans blue dye (EBD) as a parameter of muscle degeneration. The relative areas occupied by EBD positive myofibers were quantified in GA and DIA muscles (Figure 2). Ketotifen treatment showed significant diminution of the injured myofiber relative area in both GA (95%; $P=0.0008$) and DIA (98%, $P=0.0293$) as seen in Figure 2A and 2B, respectively. On the other hand, olopatadine treated *mdx* presented significant decreased area only in GA (73%, $P=0.0018$). No difference was detected when ketotifen and olopatadine treated groups were compared (Figures 2A and 2B, 1 mg keto *versus* 10 mg olo).

3.5. Inflammatory infiltrates were decreased by the treatment with olopatadine

A potential anti-inflammatory effect of the drugs was evaluated by the relative muscular area infiltrated by immune cells. At the end point of the experimental period, the untreated group presented in the GA muscle an increase in the relative area occupied by

inflammatory infiltrates corresponding to 314% ($P=0.0072$) when confronted with 4 week old mice (Figure 3A). In this muscle, only olopatadine treatment resulted in reduction of the area with inflammatory infiltrates (74.3%, $P=0.0180$, Figure 3A). Unexpectedly, the DIA muscle showed the relative area occupied by inflammatory cells increased by 210% ($P=0.0271$) in relation to the untreated *mdx* mice and 455% ($P=0.0002$) in relation to the olopatadine treated group (Figure 3B), what could suggest that ketotifen contributed to increase inflammation in this muscle.

3.6. The degeneration/regeneration relative area was decreased in ketotifen and olopatadine treated mice

In order to evaluate the muscular regeneration, we quantified the relative area occupied by groups of myofibers in degeneration/regeneration process in GA and DIA muscles. We used the following morphological criterion: areas containing small grouped fibers, strongly basophilic, containing central nuclei and with cytoplasm showing a uniform staining pattern ^[29,30]. Areas with the presence of inflammatory infiltrates were not included, so this parameter indicates recent muscle regeneration. Figure 4 shows that in the GA muscle of ketotifen-treated *mdx* there was a significant reduction of the regeneration area (~66%, $P=0.0007$) when compared to the untreated group. For the DIA muscle, a similar result was obtained, i.e. decrease of approximately 83% ($P=0.0001$) in the ketotifen-treated group. Moreover, qualitative histological analyses suggested that the olopatadine treated mice exhibited greater integrity of the studied muscles when compared to other groups; i.e. myofibers with more homogeneous diameters and uniform H&E staining (Supplemental Figure 2).

3.7. The percentage of centronucleated myofibers was affected only in DIA muscle of ketotifen-treated mice

Another parameter to determine the extent of regeneration is the quantification of centronucleated myofibers. One thousand and five hundred fibers were counted for each muscle (n=3 to 5). As shown in Figure 5, statistically significant differences were detected between the untreated 4w and 9w groups, peaking at 69% in GA and 58% in DIA (P<0.0001 for both), which may be the reflex of the intense physical activity. After drug treatment, only ketotifen-treated DIA showed a decrease in centronucleated fibers by 54% (P=0.0084).

4. Discussion

In this study, we investigated the hypothesis that both mast cells stabilizing/anti-histamine drugs ketotifen and olopatadine could be effective to reduce inflammation and thus contribute to preserve the integrity of dystrophic skeletal muscles. The relevance of drug testing for dystrophinopathies can be justified considering that the pharmacological therapy for the DMD is still limited and consists, mainly, in the use of corticosteroids [5]. In some cases, this therapy delays the progression of the disease and until now seems to be the best intervention while a definitive cure is not available. However, even if used at indicated therapeutic dose, undesirable side effects can occur such as hypervolemia, loss in muscle mass, osteoporosis and visual alterations [31]. Thus, the search for new compounds that may prevent or slow the progression of muscular wasting is necessary. It has been recently reported that the inhibition of mast cells, which play a key role in several inflammatory processes, ameliorates dystrophic muscles [9,26]. The systemic and more specific anti-inflammatory action of new second generation inhibitors as ketotifen and olopatadine may be beneficial for DMD therapeutics.

The most commonly used animal model for drug testing in dystrophinopathy is the *mdx* mouse [15,26]. This animal presents a milder dystrophic phenotype when compared to DMD patients. It is well known the occurrence of an initial wave of muscular degeneration which peaks between the third and fourth weeks of life [14,15]. This window of acute injury provides a very good model for studying therapeutic interventions. On the other hand, adult *mdx* mice present simultaneous regeneration, making it difficult to investigate the potential protective effect of candidate drugs [5]. To overcome this problem, *mdx* mice can be submitted to compulsory physical activity which prolongs inflammation and exacerbates muscular degeneration [7,10,16,32]. Here, we started with four week old mice which were then submitted to a treadmill program during five weeks. This compulsory

eccentric activity, lengthen the muscle while activate their fibers^[9,16,32]. It was observed that after three sessions of downhill running (10 m/ min for 10 min and 15° inclination) the most affected muscles were diaphragm (DIA) and triceps, with little damage observed in *tibialis anterior* (TA) and *extensor digitorum longus* (EDL)^[32]. However, if we input a stressing and chronic exercise, the necrosis in the gastrocnemius muscle (GA) may be similar to the damaged DIA and TA^[33,34]. Therefore, the best gap for analyzing therapeutic interventions in the *mdx* mice is 4 to 10 weeks of age, especially when submitted to physical activity, because in this way the *mdx* phenotype become more similar to the human^[7,10,16]. Thus, in this study, *mdx* mice were subjected to 5 weeks of mandatory physical activity in the treadmill with an inclination of 16°, three times a week for 20 minutes each, simultaneously with the treatment of ketotifen and olopatadine.

The serum CK levels were significantly reduced in response to the treatment with both ketotifen and olopatadine drugs (decreasing 37% and 23%, respectively) compared with the untreated group (Figure 1). Damaged myofiber relative area showed a statistically significant reduction in ketotifen-treated mice, both in the GA (95%) as in the DIA (98%) (Figures 2A and 2B, respectively). The treatment with olopatadine resulted in significant decrease in muscle injury only in GA (73%) (Figure 2A). In regard to the area containing inflammatory infiltrates, the olopatadine treated group showed significant reduction in GA (69%) compared to the untreated group (Figure 3A). The results obtained with the group treated with ketotifen suggest that there was no effect in reducing inflammation in the studied muscles. Taken together, these data may suggest that the two drugs contributed to reduce muscular injury. Moreover, considering CK levels and the area of injured myofibers, ketotifen seems to be more effective than olopatadine to prevent injury and less effective in stopping the chronic inflammatory process. One possible explanation for this result is that ketotifen could be acting as a prophylactic agent, as previously proposed^[35].

Unexpectedly, as shown in Figure 3B, ketotifen seemed to contribute to increase inflammation in exercised *mdx* mice. This effect can be consequence of a dose-dependent action as it has been reported that ketotifen in low doses acts as anti-inflammatory agent, but high doses of this drug can induce degranulation of mast cells and increase of inflammation ^[36].

The muscle regeneration parameters (Figure 4) indicated that the treatment with ketotifen resulted in significant reduction in regeneration areas in both the GA (68%) and the DIA (94%) compared with the untreated group (Figure 4A and B), while olopatadine showed statistical reduction only in DIA (76%). The percentage of non-peripheral nuclei in the group treated with ketotifen was significantly lower in DIA (42%), but no significant differences were observed in the olopatadine treated group compared to the control group. Taken together, the data suggest that the treatment with olopatadine did not affect muscle regeneration in *mdx*. Furthermore, the treatment with ketotifen seems to impair regeneration in muscle fibers. However, the reduction in regeneration areas can be due to minor injury sites, i.e. less previous degeneration, as discussed for the ketotifen-treated group.

As aforementioned, ketotifen and olopatadine are second generation mast cell degranulation inhibitors and have dual action as membrane stabilizers and antagonists for histamine H1 receptor ^[27,37]. Despite the well documented anti-inflammatory action of these drugs, there were no previous reports on literature about their effect in the progression of dystrofinopathies. Recent studies reported good results with the utilization of the first generation mast cell inhibitor, sodium cromoglycate ^[9,25,26]. Our results suggest that ketotifen and olopatadine, especially ketotifen, have beneficial effect on dystrophic muscles and can be considered promising therapeutic options to DMD trials.

References

1. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 291-329.
2. Davies KE, Nowak K. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7: 762-773.
3. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: current hypotheses. *Pediatr. Neurol.* 2007; 36: 1-7.
4. Hoffman EP, Brown RH Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.
5. Radley HG, De Luca A, Lynch GS, Grounds MD. Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 469-477.
6. Moxley RT III, Ashwal S, Pandya S *et al.* Practice Parameter: Corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2005; 64: 13-20.
7. Bizario JCS, Cerri DG, Rodrigues LC *et al.* Imatinib mesylate ameliorates the dystrophic phenotype in exercised mdx mice. *J. Neuroimmunol.* 2009; 212(1-2): 93-101.
8. Huang P, Zhao XS, Fields M, Ransohoff RM, Zhou L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J.* 2009; 23(8): 2539-2548.
9. Radley HG, Grounds MD. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiology of disease* 2006; 23: 387-397.

10. De Luca A, Nico B, Liantonio A *et al.* A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine in dystrophic mdx mice. *Am. J. Pathol.* 2005; 166(2): 477-489.
11. Marques MJ, Machado RV, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle & Nerve* 2008; 61-67.
12. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 1189-1192.
13. Watchko JF, O'Day TL, Hoffman TL. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J. Appl. Physiol.* 2002; 93: 407-417.
14. Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int. J. Exp. Pathol.* 2003; 84: 165-172.
15. Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, 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.* 2008; 31: 1-19.
16. Cerri DG, Rodrigues LC, Stowell SR *et al.* Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of galectin-1. *Glycobiology* 2008; 18(11): 842-850.
17. Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ *et al.* A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Mol Genetic* 2002; 11(3): 263-272
18. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today.* 1990; 11(12): 458-464.

19. Miyazawa S, Hotta O, Doi N, Natori Y, Nishikawa K, Natori Y. Role of mast cells in the development of renal fibrosis: use of mast cell-deficient rats. *Kidney Int.* 2004; 65(6): 2228-2237.
20. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF - pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J.* 2005; 19: 1-11.
21. Nahirney PC, Dow PR, Ovalle WK. Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice. *Anat Rec.* 1997; 247(3): 341-349.
22. Maurer M, Theoharides T, Granstein RD *et al.*. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol.* 2003; 12(6): 886-910.
23. Gorospe JR, Tharp MD, Hinckley J, Kornegay JN, Hoffman EP. A role of mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs and mice. *Journal of Neurological Sciences* 1994; 122: 44-56.
24. Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS. Duchenne-like myopathy in double-mutant mdx mice expressing exaggerated mast cell activity. *Journal of Neurological Sciences* 1995; 131(1): 1-7.
25. Marques MJ, Ventura Machafo R, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle & Nerve* 2008; 37(1): 61-67.
26. Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS. Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders* 2000; 10: 235-239.
27. Bielory L, Lien KW, Bigelsen S. Efficacy and Tolerability of Newer Antihistamines in the Treatment of Allergic Conjunctivitis. *Drugs* 2005; 65(2): 215-228.
28. Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol.* 1997;139(2): 375-385.

29. Messina S, Altavilla D, Aguenouz M, Seminara P, Minutoli L, Monici MC, Bitto A, Mazzeo A, Marini H, Squadrito F, Vita G. Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice. *Am J Pathol.* 2006; 168(3): 918-926.
30. Pastoret C, Sebillé A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle & Nerve* 1995; 18(10): 1147-1154.
31. Wong BL, Christopher C. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J Child Neurol.* 2002; 17(3): 183-190.
32. Brussee V, Tardif F, Tremblay JP. Muscles fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscular disorders: Neuromuscular Disorders* 1987; 7(8): 487-492.
33. Burdi R, Didonna MP, Pignol B *et al.* First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscular disorders: Neuromuscular Disorders* 2006; 16(4): 237-248.
34. Pierno S, Nicot B, Burdi R *et al.* Role of tumour necrosis factor α , but not of cyclooxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2007; 33: 344-359.
35. Manzouri B, Thomas HF, Larkin F, Ono SJ, Richard W. Pharmacotherapy of allergic eye disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2006; 7(9): 1191-1200.
36. Rosenwasser LJ, O'Brien T, Weyne J. Mast cell stabilization and antihistamine effects of olopatadine ophthalmic solution: a review of pre-clinical and clinical research. *Current Medical Research and Opinion* 2005; 21(9): 1377-1387.

37. Kaditis AG, Winnie G, Syrogiannopoulos GA. Anti-inflammatory pharmacotherapy for wheezing in preschool children. *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42(5): 407-420.

Acknowledgments: We especially thank Mrs. Edna Maria Soatto Pupin, President of the Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular (AADM) for support; Dr. Maria Célia Jamur and Dr. Constance Oliver for the fluorescence microscope use; Angélica de Souza and Fabiana Matioli for the support in the animal facility and technical assistance. This work was supported by grants from PETROBRAS, FAPESP, AADM and University of Ribeirão Preto-UNAERP.

Legends

Figure 1. Ketotifen and olopatadine treatment reduced serum CK levels in exercised *mdx* mice. Serum CK significantly decreased after 5 weeks of treadmill exercise program and treatment with both mast cells inhibitors. Untreated (U; n=11); ketotifen-treated (keto; n=9) and olopatadine-treated groups (olo; n=7) this parameter indicated less muscle injury in the treated animals when compared to untreated (P=0.0002 for both).

Figure 2. Quantitative analyses performed using ImageJ software showed a reduction of the myofiber damage in GA muscle from both ketotifen and olopatadine treated groups (n=3–6; P=0.0008 and P=0.0018, respectively). The DIA muscle had a diminishment in injured myofibers only in the ketotifen treated group (n=3, P= 0.0293).

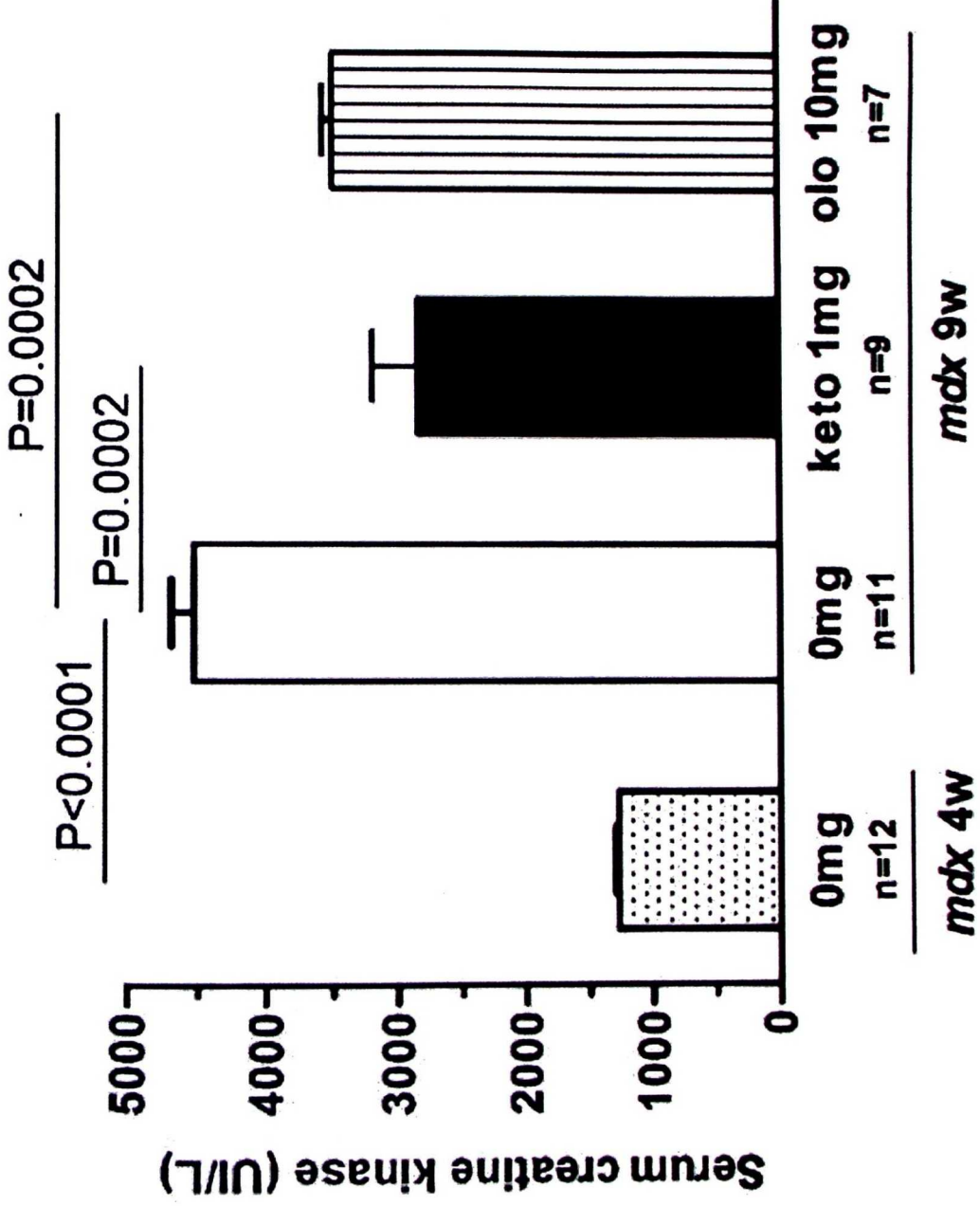
Figure 3. Inflammatory cell infiltration was reduced by 74.3% (P=0.0180) only in the GA from olopatadine treated *mdx* (A). An unexpected result was obtained in the DIA muscle (B). The ketotifen treated mice, which presented an increase of 210% (P=0.0271) when compared to the untreated group and to the olopatadine treated group (P=0.0002).

Figure 4. Ketotifen treatment resulted in decreasing of recent regenerated areas. Significant reductions were observed in both muscles (66% in GA, P<0.0001, and 83% in DIA, P=0.0001). The treatment with olopatadine also resulted in diminution of this parameter, but the differences were not significant.

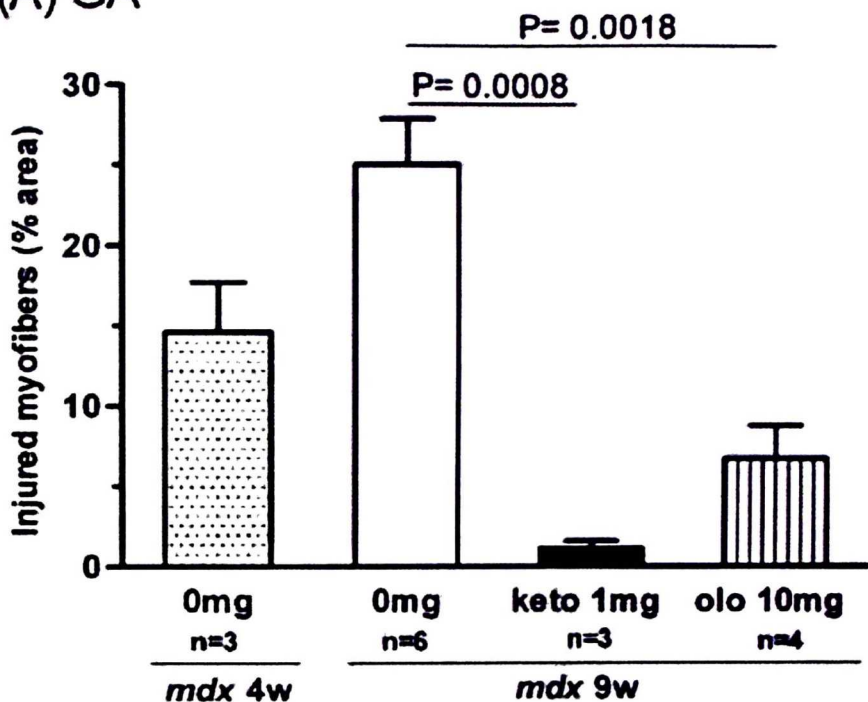
Figure 5. Quantification of centronucleated myofibers in GA and DIA muscles revealed significant differences between the *mdx* mice of 4 and 9 weeks old ($P < 0.0001$). Only the ketotifen-treated group showed a reduction of 54% of the percentage of myofibers with non peripheral nuclei. A total of 1500 fibers per animal ($n = 3$ to 5) was analyzed.

Supplemental Figure 1. Effect of compulsory physical activity in untreated *mdx* mice based on creatine kinase (CK) levels. Serum CK was quantified in normal C57BL/6 and in sedentary and exercised *mdx* mice. Note the significant difference between the exercised group in relation to the sedentary group ($P = 0.0346$) and to the four week old group ($P < 0.0001$), showing the effectiveness of the exercise to intensify muscular degeneration.

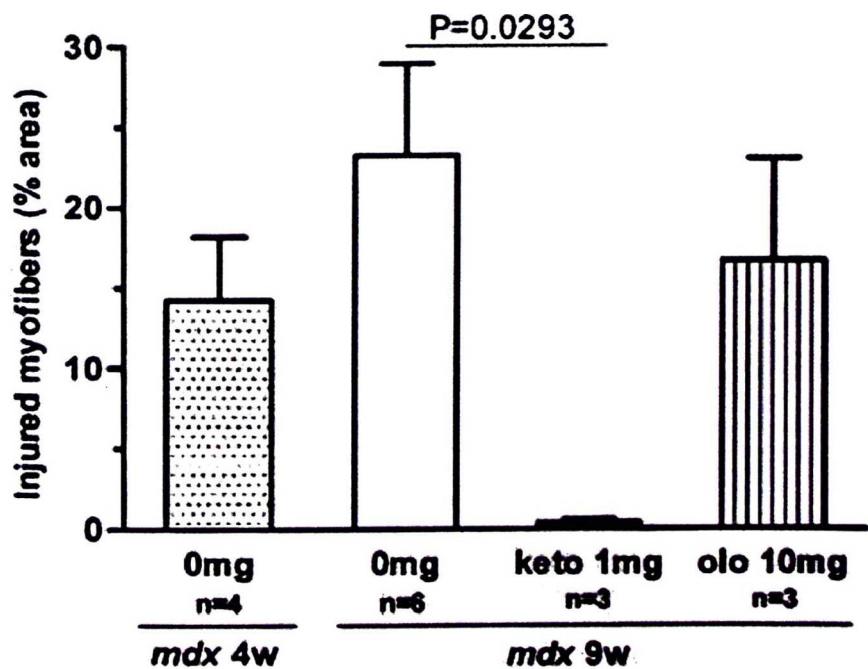
Supplemental Figure 2. Histological representative images of gastrocnemius (GA) and diaphragm (DIA) of untreated (Control), ketotifen-treated (Keto) and olopatadine-treated mice (Olo). Muscle sections were stained with H&E and used to quantify the relative area occupied by inflammatory infiltrates, grouped myofibers under recent regeneration and percentage of centronucleated myofibers. Qualitative analyses showed that both drugs improved muscle condition of exercised *mdx* mice. Bar, 10 μm .



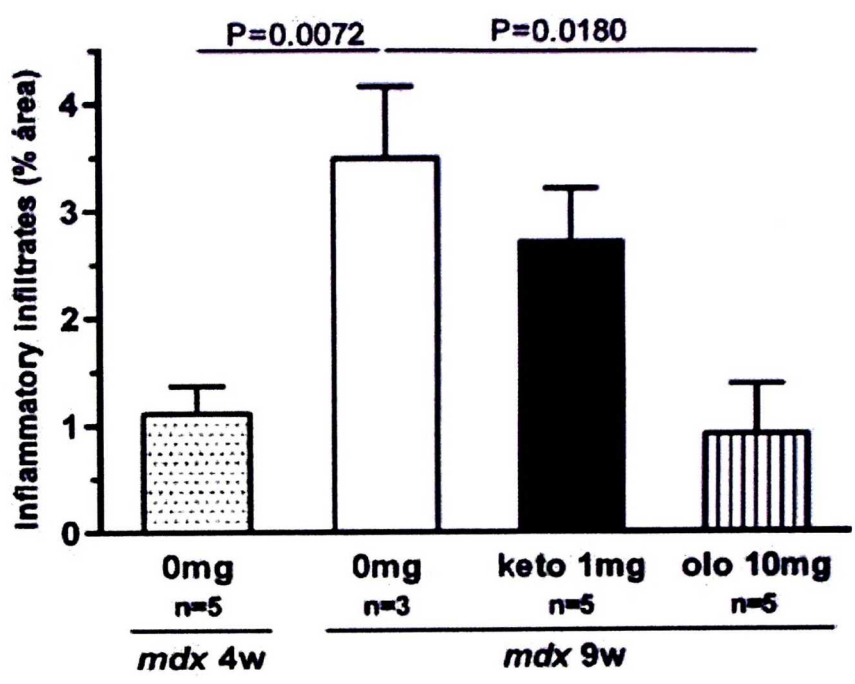
(A) GA



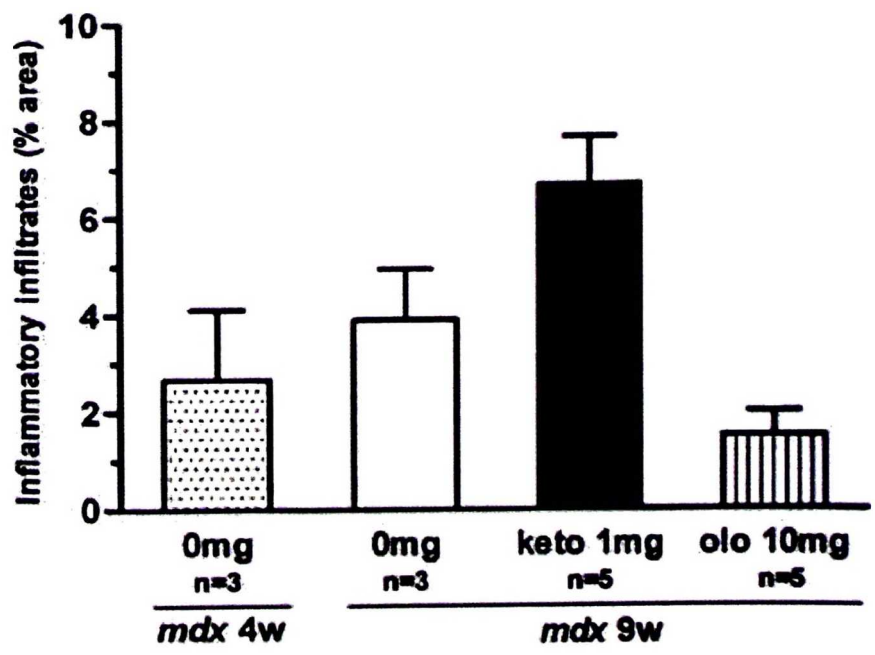
(B) DIA



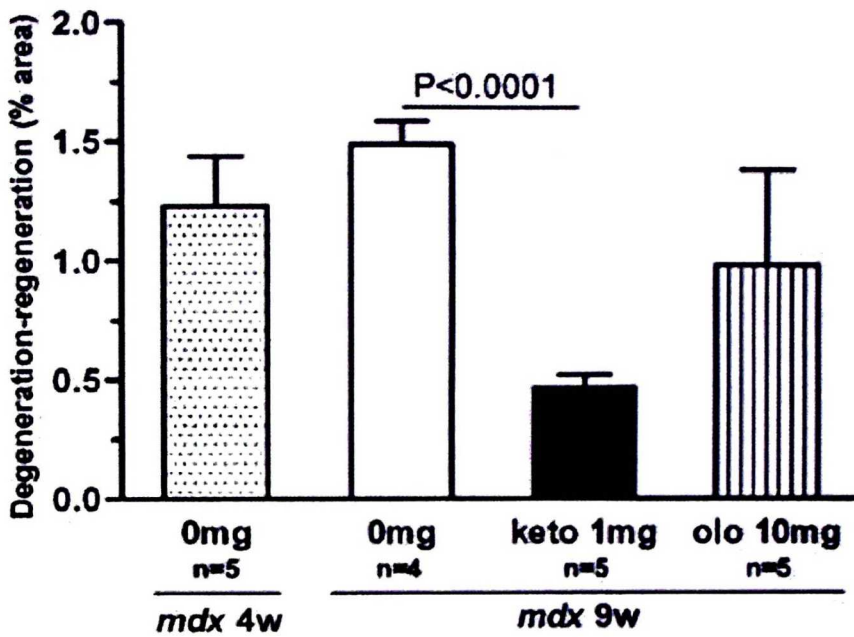
(A) GA



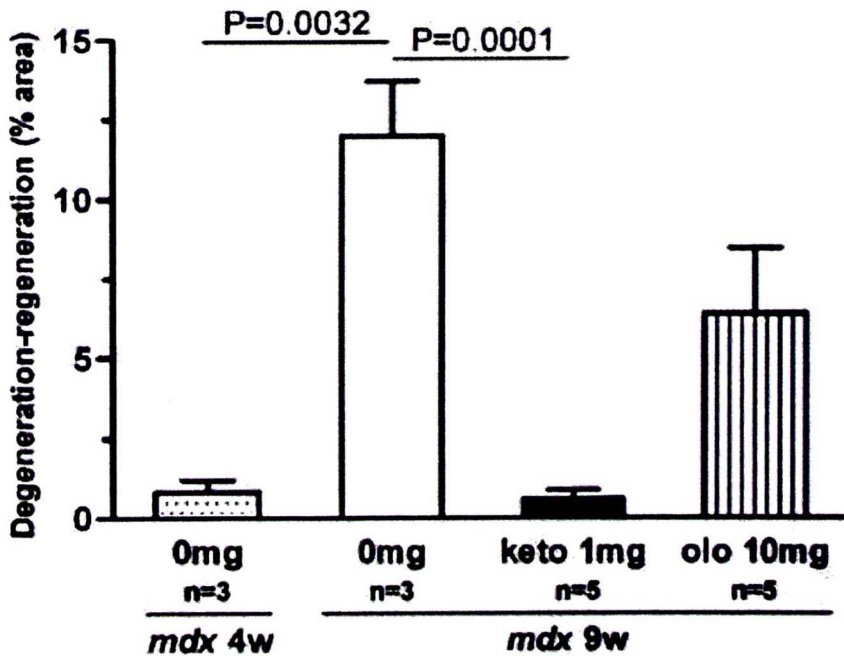
(B) DIA



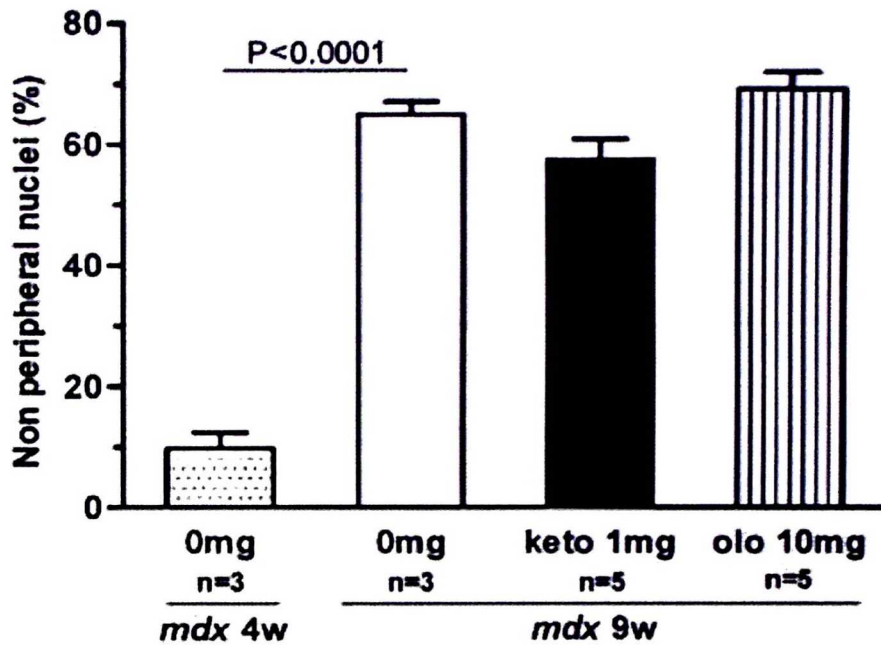
(A) GA



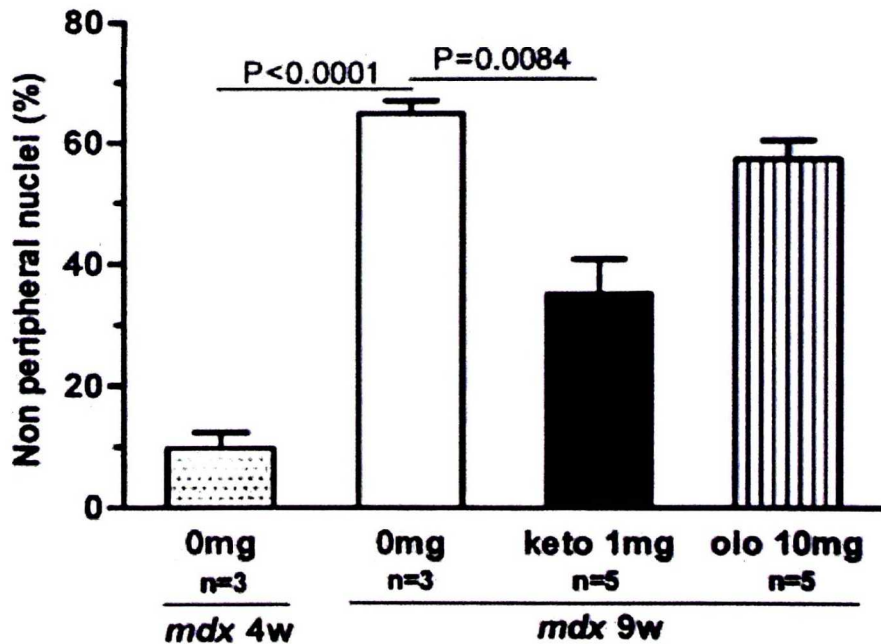
(B) DIA

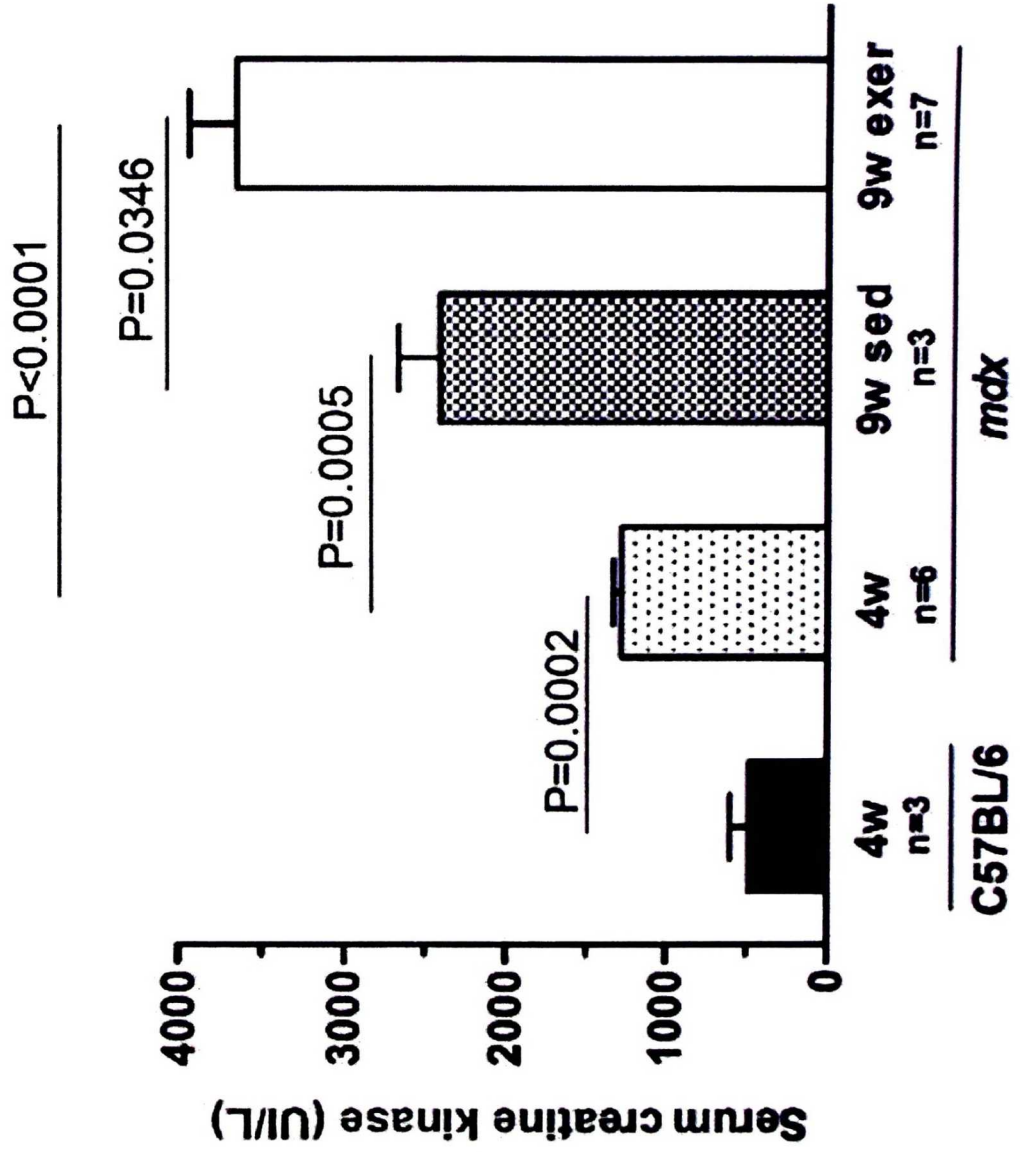


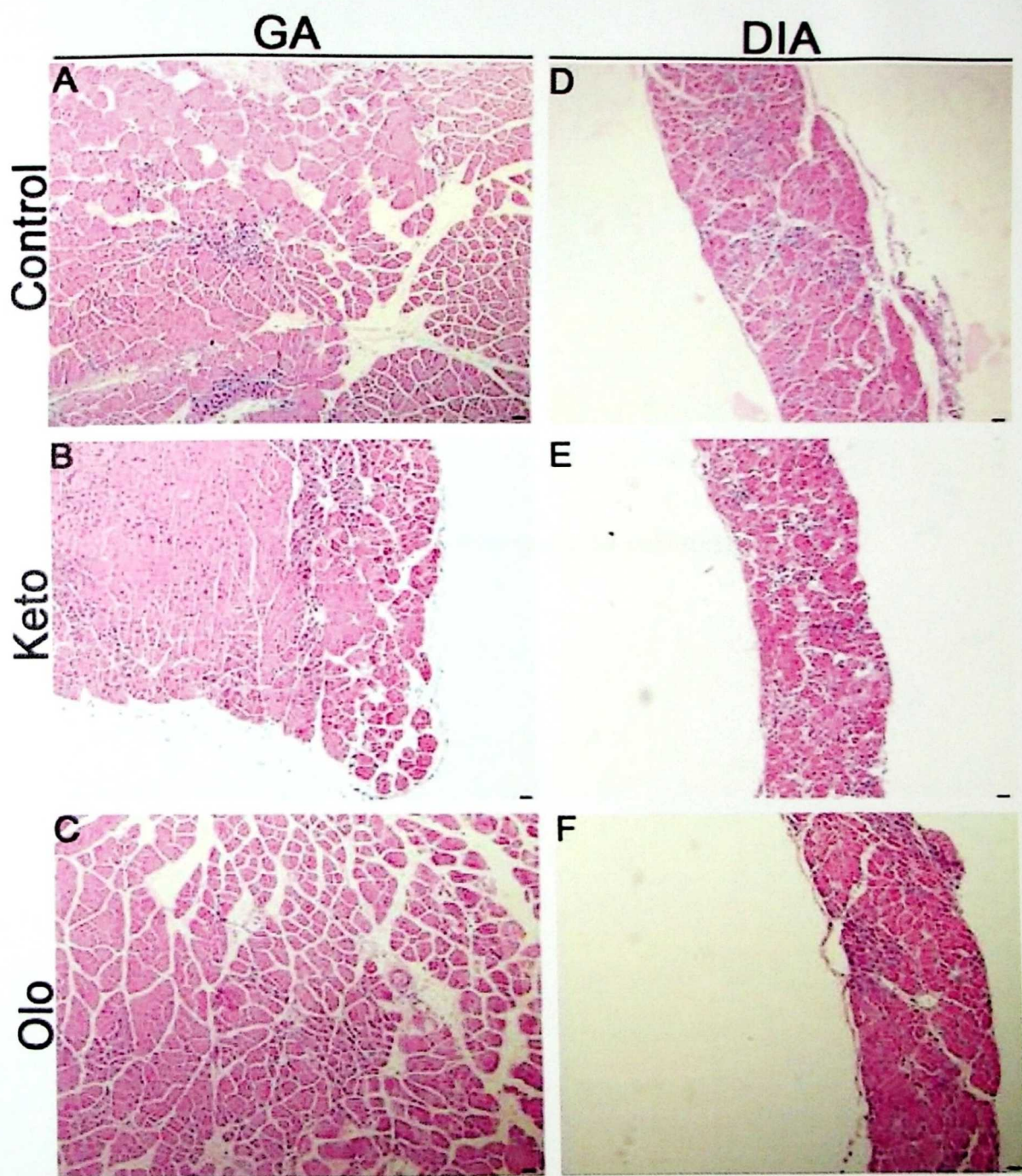
(A) GA



(B) DIA







ANEXO II – Manuscrito submetido

Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1

Daniel G. Cerri^{2,3}, Lílían C. Rodrigues^{2,4}, Sean R. Stowell^{5,6}, Daniela D. Araujo^{3,7}, Mariana C. Coelho³, Sibere R. Oliveira³, João C. S. Bizario³, Richard D. Cummings^{5,6}, Marcelo Dias-Baruffi^{1,4}, and Maria Cristina R. Costa^{1,3,7}

³Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP), School of Medicine, University of Ribeirão Preto, 14096-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil;

⁴Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto-SP, Brazil; ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma Center for Medical Glycobiology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK 73104, USA; ⁶Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine Atlanta, Atlanta, GA 30322, USA; and ⁷Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil

Acesso ao artigo:

<https://doi.org/10.1093/glycob/cwn079>

Received on November 28, 2007; revised on August 11, 2008; accepted on August 13, 2008

Muscle degenerative diseases such as Duchenne Muscular Dystrophy are incurable and treatment options are still restrained. Understanding the mechanisms and factors responsible for muscle degeneration and regeneration will facilitate the development of novel therapeutics. Several recent studies have demonstrated that Galectin-1 (Gal-1), a carbohydrate-binding protein, induces myoblast differentiation and fusion *in vitro*, suggesting a potential role for this mammalian lectin in muscle regenerative processes *in vivo*. However, the expression and localization of Gal-1 *in vivo* during muscle injury and repair are unclear. We report the expression and localization of Gal-1 during degenerative–regenerative processes *in vivo* using two models of muscular dystrophy and muscle injury. Gal-1 expression increased significantly during muscle degeneration in the murine *mdx* and in the canine Golden Retriever Muscular Dystrophy animal models. Compulsory exercise of *mdx* mouse, which intensifies degeneration, also resulted in sustained Gal-1 levels. Furthermore, muscle injury of wild-type C57BL/6 mice, induced by BaCl₂ treatment, also resulted in a marked increase in Gal-1 levels. Increased Gal-1 levels appeared to localize both inside and outside the muscle fibers with significant extracellular Gal-1 colocalized with infiltrating CD45⁺ leukocytes. By contrast, regenerating muscle tissue showed a marked decrease in Gal-1 to baseline levels. These results demonstrate significant regulation of Gal-1 expression *in vivo* and suggest a potential role for Gal-1 in muscle homeostasis and repair.