



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**ISABELLA CANELLA MESQUITA**

**LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR BUPIVACAÍNA EM  
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS PREDISPOSTOS A  
PERFIL DISTINTO DE CITOCINAS**

**Niterói  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ISABELLA CANELLA MESQUITA**

**LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR BUPIVACAÍNA EM  
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS PREDISPOSTOS A  
PERFIL DISTINTO DE CITOCINAS**

Orientadoras

Professora Jussara Lagrota Cândido

Professora Thereza Quirico dos Santos

**Dissertação submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Neuroimunologia – área de concentração: Imunobiologia.**

**Banca examinadora:**

---

**Joseli Lannes Vieira (IOC-Fiocruz)**

---

**Mauricio Verícimo (UFF)**

---

**Elizabeth Giestal Araújo (UFF)**

---

**Verônica Figueiredo Amaral (Suplente e Revisora- UFF)**

**A parte experimental deste trabalho foi executada nos laboratórios de Immunopatologia e Patologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense (UFF) e no Laboratório de Pesquisa em Auto-imunidade e Imuno-regulação (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz).**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

**MESQUITA, Isabella Canella**

**Lesão muscular induzida por bupivacaína em linhagens de camundongos predispostos a perfil distinto de citocinas – Niterói: UFF, 2007.**

102 f.

Dissertação – Mestrado em Neuroimunologia  
Universidade Federal Fluminense

1. lesão muscular
2. inflamação
3. Músculo Esquelético
4. citocinas

**Dedico esta tese**

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadoras pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.
- Às minhas orientadoras e amigas Prof<sup>as</sup> Jussara Lagrota-Cândido e Thereza Quírico dos Santos, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de mulheres as quais sempre farão parte da minha vida.
- À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.
- A Dr<sup>a</sup>. Joseli Lannes Vieira por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.
- Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.
- Aos meus colegas de trabalho Douglas, Rafael, Pedro e as técnicas do laboratório Nina e Bartira que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos.

- Aos meus amigos de laboratório Paulo Emílio, Gabriele, Cristiane, Guilherme, Fernanda e Jardel que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.
- As colegas do Laboratório de Autoimunidade da Fiocruz, Jaline, Valeska, Karina, Andréa, Luzia, Márcia, Diego, por me receberem tão bem, me ajudarem e participarem deste trabalho.
- Aos técnicos do Biotério Central da Fiocruz e do NAL pelo apoio técnico excepcional.
- A Dr<sup>a</sup> Andréa Fontes do DUBC da Fiocruz pelo apoio e colaboração na utilização do citômetro de fluxo.
- A todos os amigos do Instituto de Biologia pelo carinho e apoio.
- A todos os colegas e professores da pós-graduação em Neuroimunologia pelo convívio e aprendizado.

## EPÍGRAFE

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

## SUMÁRIO

	Página
FICHA CATALOGRÁFICA.....	v
DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
EPÍGRAFE.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1.0 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Tecido Muscular Esquelético.....	1
1.2 - Formação do Tecido Muscular.....	5
1.3 - Reparo do Tecido Muscular.....	6
1.4 - Progenitores Miogênicos.....	9
1.4.1 - Células Satélites.....	9
1.4.2 - Contribuição de Outras Células Miogênicas no Reparo do Tecido Muscular.....	13
1.5 - Participação da Inflamação no Reparo Tecidual .....	16
1.6 - Metaloproteinasas na Regeneração e Reparo de Tecido Muscular .....	23
1.7 - Modelos Animais de Injúria Muscular.....	25
2.0 - OBJETIVOS.....	28
2.1 - Objetivo Geral.....	28
2.2 - Objetivos Específicos.....	28
3.0 - MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 - Animais.....	29
3.2 - Indução da Lesão.....	29
3.3 - Processamento Histológico.....	30
3.4 - Imuno-histoquímica.....	30
3.5 - Histomorfometria.....	32
3.6 - Citometria de Fluxo.....	32
3.7 - RT-PCR.....	33

3.7.1 - Extração de RNA Total .....	33
3.7.2 - Eletroforese de RNA .....	34
3.7.3 - Transcrição Reversa de RNA e PCR.....	35
3.8 - Zimografia.....	36
3.8.1 - Preparo do Extrato Tecidual.....	36
3.8.2 - Gel para Zimografia.....	36
3.9 - Análise Estatística.....	37
4.0 - RESULTADOS.....	38
4.1 - Análise Histológica da Lesão Muscular .....	38
4.2 - Alterações no Microambiente da Lesão Muscular .....	42
4.2.1- Coloração de Picrocírius .....	42
4.2.2 - Atividade das Metaloproteases no Músculo Lesionado.....	47
4.3 - Fenotipagem do Infiltrado Inflamatório.....	51
4.4 - Fenotipagem do Linfonodo de Drenagem.....	53
4.5 - Expressão de RNAm para TGF- $\beta$ no músculo esquelético.....	62
5. - DISCUSSÃO.....	64
6. - CONCLUSÕES.....	72
7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP	Adenosina tri-fosfato
ATPASE	Adenosina tri-fosfatase
B10	C57BL/10
B6	C57BL/6
BHLH	<i>Basic-helix-loop-helix</i>
Ca <sup>+</sup>	Cálcio
CTX	Cardiotoxina
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DPI	Dias após inoculação
ECM	Matriz extracelular
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfatase dehidrogenase
HGF	fator de crescimento de hepatócito
HMGB1	Proteína do tipo <i>high mobility group box 1</i>
IGF	Fator de crescimento do tipo insulina
IL	Interleucina
LAP	Proteína associada à latência
LPS	Lipopolissacarídeo
MDSC	Células tronco derivadas de músculo
MHC	Miosina de cadeia pesada
MMP	Metaloprotease de matriz
MRF	Fator de crescimento muscular
mRNA	RNA mensageiro
NK	Célula natural killer
NO	Óxido Nítrico
NTX	Notexina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PGE2	Prostaglandina E
PPAR $\gamma$	Receptor de ativação proliferador de peroxossoma gama

RNAse	Ribonuclease
Runx2	Fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2
SCA-1	Antígeno de célula tronco do tipo 1
SDF	Fator derivado de célula do estroma
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	<i>Side Population</i>
TGF	Fator de transformação do crescimento
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do crescimento do tipo $\beta$
TIMP	Inibidor tecidual de metaloprotease
TLR	Receptor do tipo toll
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Zn <sup>2+</sup>	Zinco

**LISTA DE TABELAS**

	Página
1. Relação de anticorpos utilizados na imuno-histoquímica.....	31
2. Relação de anticorpos utilizados na citometria de fluxo.....	33
3. Lista de oligonucleotídeos.....	35

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Estrutura do músculo esquelético.....	2
2. Estrutura da fibra muscular.....	3
3. Distribuição heterogênea das fibras musculares esqueléticas.....	4
4. Estágios de regeneração do tecido muscular.....	9
5. Regulação molecular da regeneração do tecido muscular.....	11
6. Influência do microambiente na ativação das células satélites .....	13
7. Possíveis repositores de mionúcleos durante a regeneração muscular.....	15
8. Cinética da migração celular nas fases da lesão tecidual.....	17
9. Regulação do desenvolvimento de fibrose na lesão tecidual.....	23
10. Cinética da lesão muscular induzida por bupivacaína nas linhagens de camundongo.....	40
11. Painel com fotomicrografias da lesão muscular coradas pelo Giemsa.....	41
12. Coloração de picrossírius da lesão muscular.....	44
13. Histomorfometria da area da lesão ocupada por colágeno.....	46
14. Atividade de metaloproteinases no músculo esquelético.....	49
15. Atividade das MMP-9 e MMP-2 pró no músculo esquelético.....	50
16. Fenotipagem das células do infiltrado inflamatorio da lesão muscular induzida por bupivacaína.....	52
17. Celularidade dos linfonodos de axilar e braquial.....	54
18. Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos presentes nos linfonodos de drenagem em 4 dpi.....	49 55
19. Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos t presentes nos linfonodos de drenagem em 4dpi.....	57
20. Perfis representativos de expressão de CD44, CD25 e CD62L nas células TCD4+ de camundondos BALB/c.....	58

21. Análise por citometria de fluxo de expressão dos antígenos CD62L, CD44, CD25 nas células CD4+.....	59
22. Perfís representativos de expressão de CD44, CD25 e CD62L nas células CD8+ de camundongos C57BL6.....	60
23. Análise pr citometria de fluxo da expressão dos antígenos CD62L, CD44, CD25 nas células CD8+.....	61
24. Expressão de RNA mensageiro para TGF- $\beta$ no músculo esquelético	63

## RESUMO

Lesões musculares são problemas freqüentes na medicina esportiva e doenças miodegenerativas. A fase inicial do processo de reparo é caracterizada pela necrose do tecido danificado e ativação da resposta inflamatória. O objetivo deste trabalho foi analisar o reparo do tecido muscular após a indução de lesão muscular em linhagens de camundongos com distintos padrões de secreção de citocinas. Foram incluídos pelo menos 3 animais em cada grupo de estudo com padrão de citocinas Th1 (C57BL/10, C57BL/6) e Th2 (BALB/c). A injúria muscular foi induzida pela inoculação de bupivacaína no músculo *Triceps bachii*. Os camundongos foram sacrificados após 1, 4, 8 e 12 dias (dpi). As linhagens com predomínio de citocinas Th1 apresentaram maior área com miofibras regenerando e macrófagos em 4 dpi em comparação com o camundongo BALB/c. Os linfonodos regionais apresentaram aumento significativo da celularidade com aumento percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> somente nos camundongos BALB/c inoculados com bupivacaína. Os camundongos BALB/c mostraram um aumento da deposição de colágeno e menores níveis de MMP-9 associados com maior quantidade de mRNA para TGF-β1. Este estudo sugere que o perfil imunológico do camundongo pode influenciar o processo de remodelagem no músculo esquelético após inoculação de bupivacaína promovendo regeneração muscular (citocinas Th1) ou mionecrose e deposição de colágeno (citocinas Th2).

## ABSTRACT

Muscular lesion is a frequent matter in sportive medicine and myodegenerative diseases. Necrosis of the damaged tissue and activation of inflammatory response characterize the initial phase of muscle repair. This work aimed to analyze the tissue repair after induction of lesion in skeletal muscle from mouse lineages with distinct cytokine secretion patterns. It was included at least 3 mice per group with distinct cytokine pattern: Th1 (C57BL/10, C57BL/6) and Th2 (BALB/c). Muscular injury was performed by injection of bupivacaine (Bp) in the (*T. brachii*) skeletal muscle. Mice were sacrificed at 1, 4, 8 and 12 days post-injection (dpi). Both Th1-dominant strains presented more areas with regenerating myofibers and macrophages at 4 dpi. Regional lymph nodes showed significant increase of cellularity and relative numbers of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> in bupivacaine-inoculated BALB/c mice compared to non-inoculated matched mice at 4 dpi. BALB/c mice showed increased collagen expression and decrease of MMP-9 activity associated with more mRNA for TGF- $\beta$ 1. This study shows that the immune background of the mouse may affect the remodelling processes in skeletal muscles that occur in response to bupivacaine injection promoting muscle regeneration (Th1 cytokines) or myonecrosis and collagen deposition (Th2 cytokines).

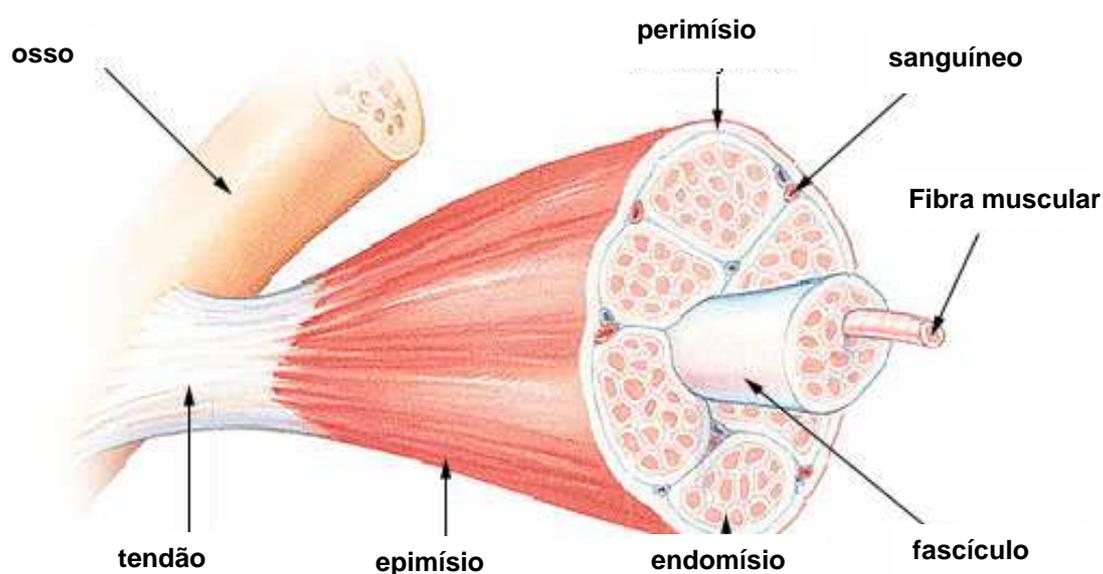
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

O músculo estriado esquelético é responsável pela sustentação e movimentação corporal devido a sua capacidade de contração e de gerar uma força que é aplicada sobre ossos e articulações. Na maioria das vezes essa contração é voluntária via estímulo nervoso. O músculo esquelético é formado por células cilíndricas alongadas e que possuem estriações transversais. As células musculares apresentam características específicas e por isto seus componentes receberam nomes especiais. O citoplasma é chamado de sarcoplasma, o retículo endoplasmático de retículo sarcoplasmático e a membrana citoplasmática de sarcolema. Os núcleos de uma fibra muscular estão todos localizados na periferia da fibra em contato com o sarcolema (Kerr, 2000).

Os músculos são formados por um conjunto de células que se originam da fusão de mioblastos e se organizam em feixes cilíndricos e multinucleados com até 30 cm. Cada fibra muscular é revestida por uma camada de tecido conjuntivo chamada endomísio. Tais fibras são então agrupadas em feixes mantidos juntos por outra camada de tecido conjuntivo, denominada perimísio. Esse grupo revestido ou feixe de fibras é denominado fascículo. Os grupos de fascículos com feixes de fibras, cada qual com vasos sanguíneos e tecido nervoso associados, são mantidos bem unidos por outra camada de tecido conjuntivo denominada epimísio. Os fascículos circundados por epimísio, que percorrem todo o comprimento do músculo esquelético, são então

completamente circundados por um tecido conjuntivo denominado fáscia (figura 1). A fáscia é um tecido conjuntivo denso e resistente que recobre todo o músculo e, estende-se além do músculo formando o tendão fibroso, cuja função é fixar o músculo ao osso. Esta disposição do tecido conjuntivo mantém a organização das fibras musculares, permitindo que a força de contração seja transmitida a outras estruturas como tendões e ligamentos e também influencia na distribuição dos vasos sanguíneos, linfáticos e inervação (Junqueira & Carneiro, 2004).

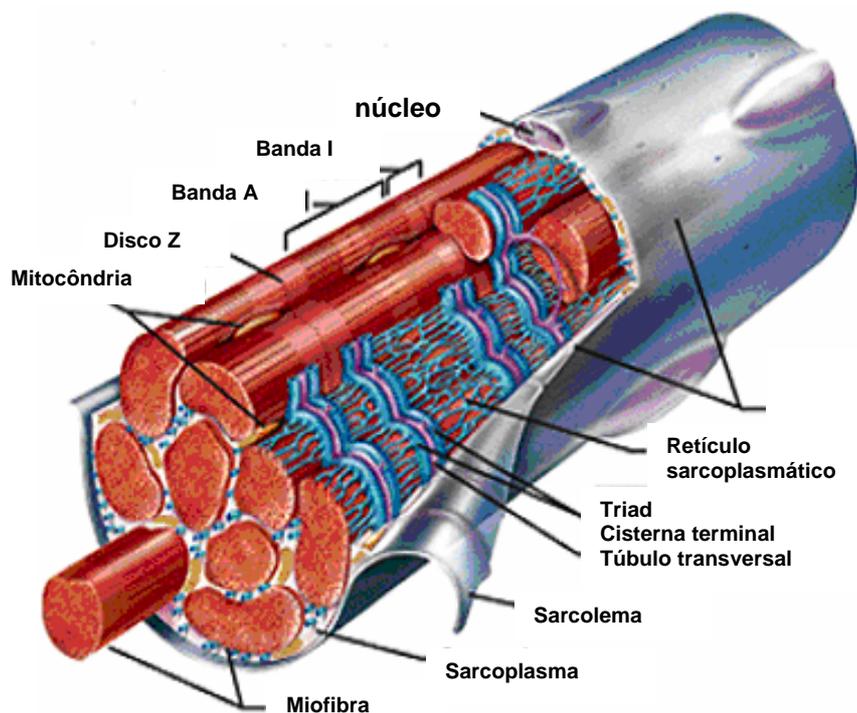


**Figura 1: Estrutura do músculo esquelético.**

[http://training.seer.cancer.gov/module\\_anatomy/unit4\\_2\\_muscle\\_structure.htm](http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit4_2_muscle_structure.htm) (acessado em 20/12/2006)

No interior de uma fibra muscular existe um número razoável de unidades estruturais orientadas longitudinalmente chamadas de miofibrilas formadas por filamentos de actina e miosina, as duas principais proteínas contráteis do músculo. As miofibrilas são cilíndricas, com diâmetro entre 1 e 2  $\mu\text{m}$ , podendo ser vistas ao microscópio óptico como estriações transversais

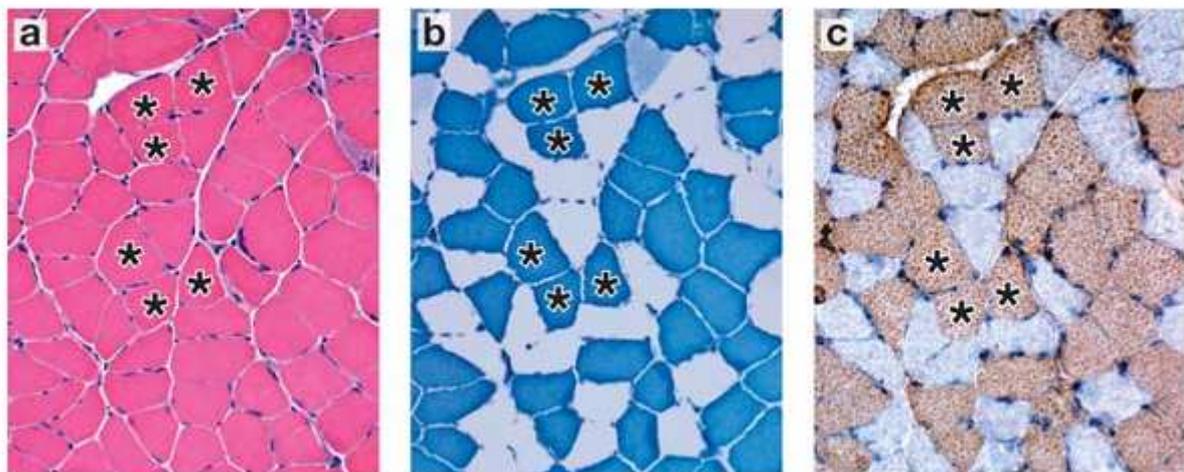
com faixas claras e escuras (Kerr, 2000). A banda I (isotrópica), apresenta-se mais clara porque a luz polarizada atravessa facilmente os finos filamentos de actina que a constituem. A banda A (anisotrópica), apresenta-se mais escura por ser composta por actina e filamentos espessos de miosina, o que dificulta a passagem da luz. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura, a linha Z. O sarcômero, unidade estrutural do músculo, é definido como a região da miofibrila compreendida entre as duas linhas Z. No centro de cada banda A existe uma área mais clara chamada de banda H, exclusivamente constituída de miosina (figura 2). Ao microscópio eletrônico podemos ver filamentos finos de actina que partem da linha Z até o bordo externo da banda H (Junqueira & Carneiro, 2004).



**Figura 2 – Estrutura da fibra muscular**

[www.adesnivel.pt/treino/musculo.htm](http://www.adesnivel.pt/treino/musculo.htm) (acessado em 16/02/2007)

As miofibras são heterogêneas no tamanho, metabolismo e função contrátil, o que permite uma grande variedade de funções de acordo com a composição das fibras. Inicialmente as fibras foram classificadas como sendo rápidas e lentas baseadas na velocidade de contração. Esta divisão também corresponde a diferenças morfológicas, com os músculos rápidos sendo brancos em algumas espécies como aves, e os músculos lentos de cor vermelha. O maior conteúdo de mioglobina e capilares nos músculos vermelhos contribui para a maior capacidade oxidativa dos músculos vermelhos comparados com os brancos. Atualmente, as fibras musculares são classificadas por três diferentes métodos: análise histoquímica para ATPase, identificação da isoforma de miosina e identificação bioquímica de enzimas metabólicas (Scott *et al.*, 2001) – ver figura 3.



**Figura 3: Distribuição heterogênea das fibras musculares esqueléticas.**

Análise do tipo de fibra de seções transversais do músculo soleus de camundongos coradas por hematoxilina-eosina (a), coloração metacromática da ATPase mostrando fibras tipo I (coradas em azul) e tipo IIA (azul claro), e em (c) imuno-histoquímica usando anticorpo monoclonal que reconhece miosina do tipo I (Bassel-Duby & Olson, 2006).

## 1.2 FORMAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR

O músculo esquelético de vertebrados é formado a partir do mesoderma paraxial, o qual se segmenta em somitos em cada lado da notocorda e do tubo neural (Christ & Ordahl, 1995). A porção dorsal do somito originará os músculos dos membros e do corpo, enquanto alguns músculos da cabeça são originados da porção anterior não segmentada, mesoderma paraxial e mesoderma pré-cordal (Buckingham *et al.*, 2003).

A miogênese é um processo que envolve uma cascata complexa de eventos incluindo especificação e a diferenciação das células precursoras ou mioblastos, que se fusionam para formar os miotubos primários e secundários e a subsequente maturação. Todos esses eventos se dão sob um controle genético restrito e envolve a migração de células precursoras (Muntoni *et al.*, 2002). Genes da família Pax, caracterizados pela presença de um *homeobox* e um *paired box*, estão implicados na proliferação de várias linhagens de precursores (Pownall *et al.*, 2002; Chen & Goldhamer, 2003; Charge & Rudnicki, 2004). Pax-3 e Pax-7 possuem um papel importante durante o desenvolvimento do músculo esquelético (Hawke & Garry, 2001; Chen & Goldhamer, 2003; Charge & Rudnicki, 2004). Famílias de fatores de transcrição, como MRF (fatores regulatórios miogênicos) que pertencem à superfamília de fatores de transcrição bHLH (basic helix-loop-helix), estão implicados na formação do músculo esquelético (Charge & Rudnicki, 2004). A família MRF consiste de MyoD (Myf-3), Myf-5, miogenina (Myf-1) e MRF4 (Myf-6/Herculin) (Sabourin & Rudnicki, 2000). MyoD e o Myf-5 são os fatores primários e agem na determinação miogênica, enquanto a miogenina e o MRF4 são fatores de diferenciação (Sabourin & Rudnicki, 2000). Camundongos duplo

nocaute para Myf-5 e MyoD não conseguem formar músculo esquelético devido a ausência de precursores de mioblastos (Rudnicki *et al.*, 1993). Células miogênicas com proliferação positiva para MyoD e /ou Myf5 formam mioblastos que proliferam e saem do ciclo celular para se tornarem miócitos diferenciados. Estes expressam as MRFs, miogenina e MRF4, e subseqüentemente genes musculares específicos como a cadeia pesada de miosina (MHC) e creatina quinase muscular (MCK) (Charge & Rudnicki, 2004). Durante o desenvolvimento muscular, uma população de mioblastos não se diferencia, permanecendo associada à superfície da fibra em desenvolvimento como células satélites musculares quiescentes (Charge & Rudnicki, 2004).

### **1.3 REPARO DO TECIDO MUSCULAR**

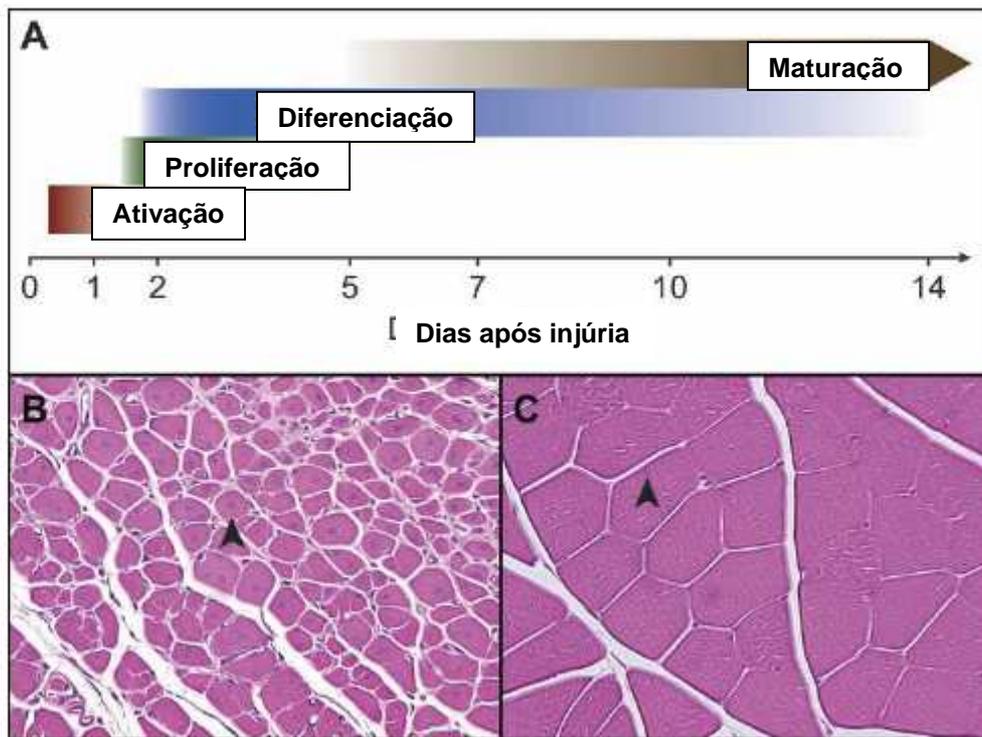
O músculo esquelético de mamíferos tem a capacidade de realizar regeneração rápida e extensa em resposta a injúria grave devido a defeitos genéticos e atividade física intensa. A regeneração muscular é caracterizada por três fases: degeneração, reparo e remodelagem (Jarvinen *et al.*, 2005). O evento inicial da degeneração muscular é a necrose das fibras musculares. Esse evento é iniciado geralmente pela ruptura do sarcolema resultando em aumento da permeabilidade da miofibra. A ruptura da miofibra se reflete pelo aumento dos níveis séricos da proteína muscular creatina kinase. A permeabilidade aumentada da fibra muscular a corantes de baixo peso molecular como azul de Evans é uma indicação da lesão do sarcolema associada a exercícios extensos e doenças degenerativas. Na lesão muscular além de necrose, degeneração e infiltrado de células inflamatórias também é evidente o extravasamento sangüíneo com formação de hematoma (Charge &

Rudnicki, 2004). Esse processo é seguido por uma fase de reparo onde ocorre a fagocitose do tecido lesionado, regeneração das miofibras, formação do tecido cicatricial e revascularização. Durante a fase seguinte, a fase de remodelagem, ocorre contração e reorganização do tecido cicatricial e a recuperação da capacidade funcional do músculo (Peng & Huard, 2004).

Na fase inicial da lesão muscular geralmente ocorre ativação de células mononucleares, principalmente células inflamatórias e células miogênicas. No período pós-lesão as principais alterações histológicas no sítio de lesão são: necrose da miofibrila e aumento do número de células mononucleares de origem não muscular (Charge & Rudnicki, 2004). Estudos recentes sugerem que fatores liberados por músculos lesionados ativam as células inflamatórias residentes que em troca produzem sinais quimiotáticos para as células inflamatórias circulantes (Warren *et al.*, 2004). Após lesão muscular induzida por exercícios ou por miotoxinas, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a invadir o músculo lesionado, com aumento numérico nas primeiras 6 horas. Os macrófagos se tornam o tipo celular predominante após 48h. Macrófagos fagocitam restos celulares e podem afetar outros aspectos da regeneração muscular ativando células miogênicas (Tidball, 2005).

Experimentos de marcação nuclear mostraram a contribuição das células satélites como uma fonte importante de novos mionúcleos na regeneração de miofibras (revisado em Zammit *et al.*, 2006)). Após a fase de proliferação miogênica, as novas fibras musculares formadas, como na miogênese embrionária, sofrem diferenciação e se fusionam a fibras lesionadas já existentes ou formam novas miofibras (figura 4A). As miofibras recém-

formadas são basofílicas, apresentam calibre pequeno, nucleação central (figura 4B) e expressam formas de MHC embrionário. Em seções longitudinais e em fibras isoladas a nucleação central é observada em porções discretas na área de regeneração ou ao longo de toda a fibra sugerindo que durante a regeneração a fusão celular não é difusa, mas focal ao local da lesão. Após a completa fusão das células miogênicas, as fibras aumentam de tamanho e o mionúcleo se move para a periferia da fibra. Sob condições normais o músculo regenerado não pode ser diferenciado morfológica e funcionalmente (Figura 4C) (Charge & Rudnicki, 2004).



**Figura 4: Estágios de regeneração do tecido muscular.**

A – Representação gráfica dos estágios de uma cinética de regeneração incluindo ativação de células satélites (2 horas após a injúria), proliferação de células satélites, diferenciação (caracterizado pelas miofibras centronucleadas) e maturação. B - Corte histológico de músculo corado por HE 5 dias após inoculação de cardiopalina (cabeça de seta - fibras centronucleadas). Após 2 semanas (C) as fibras já restauraram a citoarquitetura e apresentam nucleação periférica (cabeça de seta) (Shi & Garry, 2006)

## 1.4 PROGENITORES MIOGÊNICOS

### 1.4.1 Células Satélites:

As células satélites foram primeiramente descritas em 1961 por Alexander Mauro como mioblastos adormecidos, localizados entre a lâmina basal muscular e o sarcolema da fibra muscular, que não sofreram total desenvolvimento embrionário e que são capazes de retomar esse programa de miogênese em resposta a uma lesão muscular (Mauro, 1961). As células

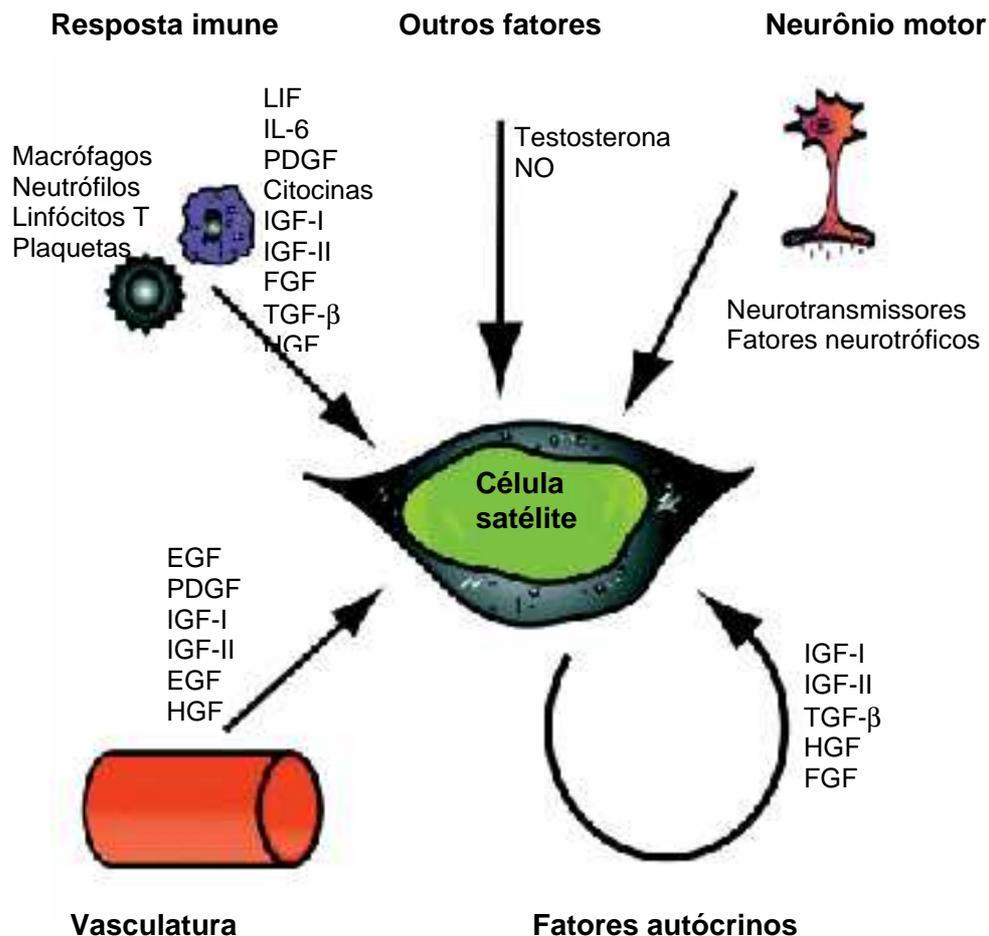
satélites ainda são encontradas em abundância logo após o nascimento, correspondendo em camundongos a 30% dos núcleos musculares sublaminares (Cardasis & Cooper, 1975; Chen & Goldhamer, 2003). Contudo, após o nascimento, essa proporção diminui para menos de 5% no camundongo adulto e continua a cair lentamente após a puberdade (Chen & Goldhamer, 2003; Charge & Rudnicki, 2004).

No músculo normal células satélites são normalmente quiescentes e expressam marcadores como Pax-7+, CD34 e M-caderina (revisado em Zammit *et al.*, 2006). Inicialmente, achava-se que Pax-7 era essencial para especificação de células satélites, porque camundongos mutantes nocaute para Pax-7 pareciam não possuir células satélites porém possuíam comprometimento da regeneração muscular. Contudo células satélites podem ser detectadas na ausência de Pax-7, porém sua manutenção e proliferação parece ser defeituosa, sugerindo que Pax-7 possua um importante papel anti-apoptótico (Relaix *et al.*, 2006).

Células satélites quiescentes não expressam níveis detectáveis de nenhum dos MRFs. Após a injúria e/ou ativação, a expressão de MyoD é induzida em 12 horas, antes mesmo da expressão de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), um marcador para proliferação celular. A expressão de miogenina ocorre tardiamente durante a fusão e diferenciação (Figura 5). Análise da expressão gênica de células satélites individuais ativadas, mostrou inicialmente a expressão de Myf-5 ou MyoD, seguida da coexpressão desses marcadores durante a fase proliferativa e de miogenina e MRF-4 na fase de diferenciação terminal (Cornelison & Wold, 1997; Charge & Rudnicki, 2004). Células satélites que mantêm a expressão de Pax e diminuem expressão de



A ativação e regeneração do tecido muscular são influenciadas por interações intercelulares, com a matriz extracelular e fatores secretados. A própria injúria muscular induz a liberação no espaço extracelular (Figura 6) de mediadores da resposta inflamatória e outras moléculas biologicamente ativas. Estudos *in vitro* tem evidenciado vários fatores tróficos: membros da família FGF (fator de crescimento de fibroblastos), IGFs (fator de crescimento do tipo insulina), HGF (fator de crescimento de hepatócitos, neurotrofinas e citocinas como por exemplo TGF (fator de transformação de crescimento) e Interleucina-6 (Hawke & Garry, 2001; Charge & Rudnicki, 2004).



**Figura 6- Influência do microambiente na ativação das células satélites (Hawke & Garry, 2001)**

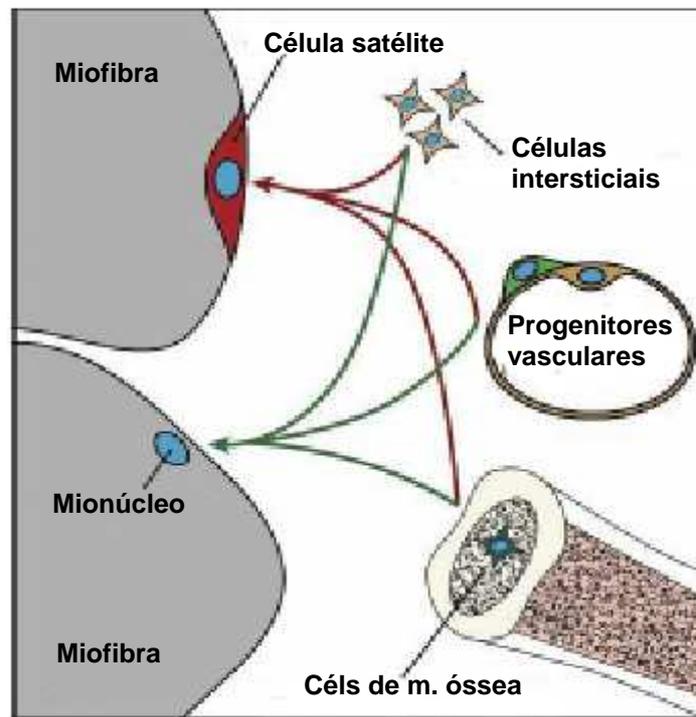
EGF - Fator de crescimento para endotélio, FGF - Fator de crescimento para fibroblasto, HGF – Fator de crescimento de hepatócito, IGF-I - Fator de crescimento tipo insulina 1, IGF-II - Fator de crescimento tipo insulina 2, IL-6 - Interleucina-6, LIF - Fator de inibição da migração macrófago, NO - Óxido Nítrico, PDGF - Fator de crescimento derivado de plaqueta, TGF- $\beta$  - Fator de crescimento de transformação- $\beta$ .

#### **1.4.2 Contribuição de outras células miogênicas no reparo do tecido muscular**

Nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado que outras populações celulares podem participar da regeneração muscular. Os experimentos de Ferrari e colaboradores mostraram que após um transplante de medula óssea, células derivadas do doador são capazes de participar da regeneração do

tecido muscular (Ferrari *et al.*, 1998). Apesar das células derivadas da medula óssea contribuir bem menos que as células satélites, este experimento criou enorme interesse no potencial de diferenciação plástica e na possibilidade de novas estratégias terapêuticas. Essas populações residem no músculo esquelético ou podem ser recrutadas de compartimentos não musculares em resposta à injúria e regeneração (figura 7).

As SP (*side population*), caracterizadas pela expressão de Sca-1<sup>high</sup> e CD45<sup>low</sup>, constituem uma população de células progenitoras residentes nos tecidos adultos (medula óssea; músculo esquelético). Estas células aumentam em número após a injúria e participam na regeneração (Meeson *et al.*, 2004). MDSC (muscle-derived stem cells) são outra população de células tronco com potencial miogênico isoladas do músculo esquelético adulto expressando os marcadores Sca-1 e CD34 (revisado em Shi & Garry, 2006).



**Figura 7: Possíveis repositores de mionúcleos durante a regeneração muscular.**

A maioria das células satélites (Pax3+/Pax7+) é derivada do somito. Células progenitoras que também contribuem para o pool de células satélites e regeneração muscular incluem: células intersticiais (muscle derived stem cells ou MDSC, SP, CD45+/Sca-1+, Sca-1+, CD34+); células de medula óssea (células tronco hematopoéticas, células tronco mesenquimais, células progenitoras adultas multipotentes) e progenitores vasculares (Shi & Garry, 2006)

Existe evidência experimental que progenitores associados a vasos derivados da aorta dorsal apresentam potencial miogênico e são capazes de participar da regeneração muscular. Outros componentes vasculares como progenitores endoteliais e pericitos também apresentam potencial miogênico (Shi & Garry, 2006). As MDSCs residentes no músculo estão intimamente associadas a vasculatura, especificamente aos capilares ao redor da fibra, apesar de também serem encontradas sob a lâmina basal das miofibras, um

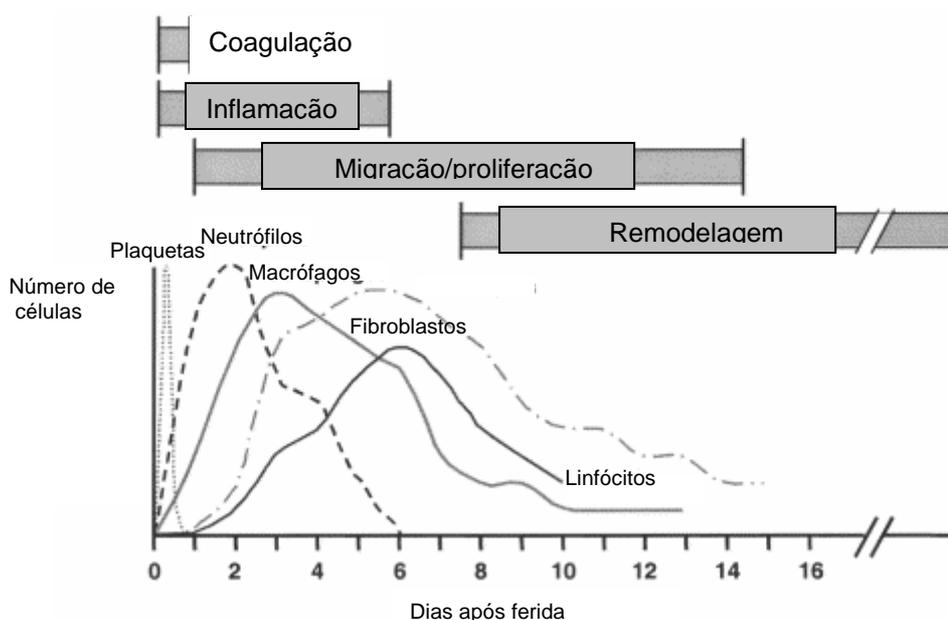
sítio preferencial das células satélites. Tanto as células endoteliais como 60% das MDSCs são CD34<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup> sugerindo serem subpopulações de células endoteliais. Essas células se diferenciariam em células do endotélio vascular e fibras do músculo esquelético após serem implantadas no músculo (Peng & Huard, 2004).

As células precursoras miogênicas não somente contribuem para regenerar miofibras no músculo lesionado, mas também são capazes de reconstituir o compartimento de células satélites. Contudo, a frequência é muito baixa (mesmo na injúria) comparando-se com o número de mioblastos derivados de células satélites. O aumento do recrutamento dessas células para a lesão através do aumento da expressão local de IGF-1 ou SDF-1 não aumentou o número de mionúcleos originados do doador (Askari *et al.*, 2003; Musaro *et al.*, 2004). Por isto, é importante investigar os mecanismos e sinais envolvidos na fusão ou transdiferenciação a fim de propor novas estratégias para aumentar a eficiência da conversão de outras células precursoras (Long *et al.*, 2005).

## **1.5 PARTICIPAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO REPARO TECIDUAL**

O dano tecidual inicia uma invasão rápida e seqüencial de células inflamatórias que persistem por dias ou meses, enquanto ocorre a regeneração e/ou reparo do tecido (figura 8). A participação da inflamação no reparo é um fenômeno complexo e nem sempre é benéfico para o tecido. Mesher e Neff propuseram que a evolução do sistema imune de mamíferos gerou interações celulares inflamatórias nos sítios de injúria proporcionando maior defesa contra microorganismos e facilitação do reparo tecidual, embora prejudicando a

capacidade regenerativa do tecido. A lesão normalmente está associada à formação de tecido cicatricial e fibrose, sendo este fenômeno um resultado direto das interações inflamatórias do sistema imune e fibroblastos no sítio da injúria (Mescher & Neff, 2005).



**Figura 8 - Cinética da migração celular nas fases da lesão tecidual (Witte & Barbul, 1997)**

Os macrófagos e neutrófilos possuem papel importante na injúria, pela sua atividade microbicida e fagocítica de modo a garantir não só a destruição de agentes infecciosos, mas promovendo a remoção de debris celulares que possam amplificar a inflamação e atrapalhar o processo de reparo do tecido. Entretanto, em modelos de lesão muscular já foi mostrado que neutrófilos podem promover dano muscular através da produção de moléculas citotóxicas e citolíticas (Tidball, 2005). Além da atividade fagocítica, os macrófagos secretam citocinas, fatores de crescimento e óxido nítrico (NO), agentes que

estão envolvidos em diversos processos necessários para o reparo em diferentes tecidos como por exemplo: pele, tecido muscular, fígado, endotélio e pulmão (Shi *et al.*, 1997; Cowin *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2000; Sandler *et al.*, 2003; Park & Barbul, 2004).

Citocinas e fatores de crescimento regulam a quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno e a angiogênese (Granstein *et al.*, 1987; Gillery *et al.*, 1992; Park & Barbul, 2004). A liberação de NO regula a formação de colágeno, a proliferação celular e a contração da lesão em modelos animais de reparo tecidual (Hesse *et al.*, 2001; Witte & Barbul, 2002; Park & Barbul, 2004). No músculo esquelético já foi mostrado que macrófagos são essenciais para desencadear o processo de regeneração após transplante de mioblastos (Lescaudron *et al.*, 1999). Além disso, meio condicionado de cultura de macrófagos peritoneais pode aumentar a proliferação de mioblastos *in vitro* bem como o número de células expressando Myo-D. Entretanto os mecanismos envolvidos nesses processos não são claros (Tidball, 2005).

Células do sistema imune inato possuem mecanismos para integrar a resposta imune e reparo tecidual, incluindo uma variedade de receptores de superfície como “Toll” (TLRs) que reconhecem todas as classes de microorganismos invasores como também proteínas de choque térmico que são liberadas do tecido necrosado ou danificado. A ligação a tais receptores ativa a síntese de citocinas que amplificam a inflamação, aumentando a resposta a microorganismos e promovendo o reparo tecidual. Receptores Toll foram primeiramente descritos em drosófilas controlando o padrão dorso-ventral nos embriões em desenvolvimento porém TLR de vertebrados possui efeitos além do reconhecimento imune (Mescher & Neff, 2005), isto porque a

via TLR de células imunes induz a expressão de muitos genes diretamente envolvidos no reparo tecidual, incluindo metaloproteases, citocinas e fatores angiogênicos (Li *et al.*, 2001).

O papel dos linfócitos na inflamação e reparo tecidual é complexo e ainda pouco compreendido. Não existem evidências claras da participação direta de linfócitos B no reparo tecidual contudo imunoglobulinas reativas facilitam na remoção do tecido lesionado facilitando a fagocitose e/ou citotoxicidade por macrófagos (Casadevall & Pirofski, 2003; Park & Barbul, 2004). Os linfócitos T podem participar do processo de reparo, tanto propiciando a melhora tecidual como amplificando a lesão, direcionando o processo para uma remodelagem não funcional, que é peculiar a cada tipo de tecido (Kovacs & DiPietro, 1994; Sandler *et al.*, 2003). Ablação do timo em ratos aumenta a maturação de feridas e a produção de um colágeno mais fibroso com alto grau de hidroxilação (Barbul *et al.*, 1982). Esse efeito é inibido por enxerto de timo na cavidade peritoneal. Camundongos nude atímicos, independentemente da linhagem de origem, produzem cicatrizes mais finas, quase indistinguíveis do tecido normal adjacente, associadas com a diminuição de células T CD8<sup>+</sup> das lesões (Gawronska-Kozak *et al.*, 2006). Neste sentido, Morrison e colaboradores mostraram que o acúmulo de colágeno intramuscular no camundongo mdx, modelo murino de distrofia muscular, é muito influenciado pela presença de linfócitos T (Morrison *et al.*, 2000).

A contribuição de células T CD4<sup>+</sup> no reparo tecidual seria principalmente pela secreção de citocinas. Durante a inflamação ou infecção, linfócitos T são polarizados em células efetoras Th1 e Th2 com perfis distintos de produção de citocinas. As chamadas citocinas Th1 incluem IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 e

produzem imunidade celular por ativar células T citotóxicas, NK e macrófagos. Citocinas Th2, notadamente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 estimulam uma resposta imune humoral. Vários autores sugerem que citocinas Th1 promovem regeneração da arquitetura do tecido normal, enquanto citocinas Th2 favorecem a ativação de fibroblastos, produção de colágeno e fibrogênese (Sime & O'Reilly, 2001; Azouz *et al.*, 2004). Essas citocinas podem ser produzidas também por outras células incluindo fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Sime & O'Reilly, 2001). A influência do perfil de citocinas na indução de fibrose é evidente no modelo de lesão hepática, onde camundongos BALB/c com padrão Th2 apresentam intensa fibrose após lesão hepática ao contrário dos camundongos C57BL6 com padrão típico Th1, que apresentam menos fibrose. O envolvimento das citocinas na indução de fibrose foi mostrado pelo tratamento destes animais com anticorpos neutralizantes para IL-4 ou com IFN- $\gamma$  exógeno resultando na atenuação da fibrose (Shi *et al.*, 1997). IFN- $\gamma$  é um potente inibidor da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno e também um regulador positivo da ação dos macrófagos (Shäffer & Barbul, 1998). IFN- $\gamma$  inibe a sinalização do TGF- $\beta$ 1 que é um estimulador de fibrose, sendo assim, reduz a formação de fibrose e aumenta a cicatrização. Recentemente foi mostrado que a inoculação de IFN- $\gamma$  reduz a fibrose e melhora o reparo do tecido muscular no modelo de lesão muscular lacerante (Foster *et al.*, 2003). A remodelagem tecidual associada com padrão Th2 induz um aumento na produção de colágeno por vários mecanismos, contudo IL-13 parece ser o mediador crucial através da estimulação da produção de TGF- $\beta$ 1 por macrófagos. Outro mecanismo provável de ação de Th1 no reparo é

através da indução da expressão de iNOS em macrófagos, uma vez que regula a produção de colágeno (Hesse *et al.*, 2001).

TGF- $\beta$ , citocina produzida principalmente por fibroblastos, algumas células epiteliais, macrófagos e linfócitos T é indiscutivelmente, o regulador de fibrose mais intensivamente estudado (Mescher & Neff, 2005). *In vitro*, o TGF- $\beta$  é um potente quimioatraente para fibroblasto que estimula a síntese de colágeno e fibronectina (Shäffer & Barbul, 1998). Existem 3 isoformas de TGF- $\beta$  em mamíferos – TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 e  $\beta$ -3. A fibrose tecidual é principalmente atribuída a isoforma  $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 é uma citocina armazenada na forma inativa, como um homodímero que é não covalentemente acoplado a uma proteína associada à latência (LAP). A ligação da citocina aos seus receptores requer a dissociação do LAP, um processo catalisado por vários agentes, entre eles plasminogênio, trombospondina e MMPs (metaloproteases). Além da indução da produção de TGF- $\beta$ 1 latente, a IL-13 ativa TGF- $\beta$  ao regular a expressão de MMPs que clivam o complexo TGF $\beta$ /LAP. No músculo, a cascata fibrogênica também é iniciada por TGF- $\beta$ 1 e recentemente foi mostrado que este induz células precursoras miogênicas a se diferenciarem em miofibroblastos no músculo lesado (Li *et al.*, 2004). Sabe-se que o TGF- $\beta$  inibe a diferenciação das células miogênicas e impede a expressão do MyoD (Tidball, 2005). O processo de fibrose é uma das etapas patológicas mais importantes da regeneração muscular. Acredita-se que a fibrose ocorra em resposta ao estímulo de mediadores inflamatórios como o TGF- $\beta$ , que acelera a deposição e síntese da matriz extracelular mas inibe a sua degradação (Li *et al.*, 2004). O aumento da expressão de TGF- $\beta$ 1 acarreta na diferenciação de miofibroblastos em células fibróticas mas o tratamento com decorina, um inibidor do TGF- $\beta$ 1, evita

esse processo (Li *et al.*, 2004). O papel do TNF- $\alpha$  na lesão muscular e regeneração pode variar com o tipo, a gravidade, localização e estágio da lesão.(Tidball, 2005). Já foi visto que TNF- $\alpha$  é capaz de inibir a síntese de colágeno e fibronectina pelos fibroblastos e diminuir a proliferação das células endoteliais (Shäffer & Barbul, 1998). TNF- $\alpha$  também aumenta a proliferação e a agregação de mioblastos. Em contraste o TNF inibe a expressão dos fatores de transcrição MyoD e miogenina, que regulam a atividade de genes específicos como genes de proteínas de miofilamentos, e bloqueia a síntese de mRNAs de marcadores de diferenciação miogênicos como  $\alpha$ -actina (Szalay *et al.*, 1997).

Fibroblastos e outras células estruturais expressam o receptor de superfície CD40 e são por isto capazes de receber ativação adicional por CD40L na superfície de linfócitos T helper, mastócitos, basófilos eosinófilos e plaquetas. A sinalização via CD40 em fibroblastos ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ b que em fibroblastos estimula a síntese de citocinas adicionais, componentes da matriz extracelular (ECM) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2). COX-2 em fibroblastos induz a produção de PGE2 (prostaglandina E2). PGE2 além de estimular vários aspectos da inflamação como dor e febre também estimula a produção de citocinas Th2 promovendo a fibrose (revisado em Mescher & Neff, 2005) - ver Figura 9.

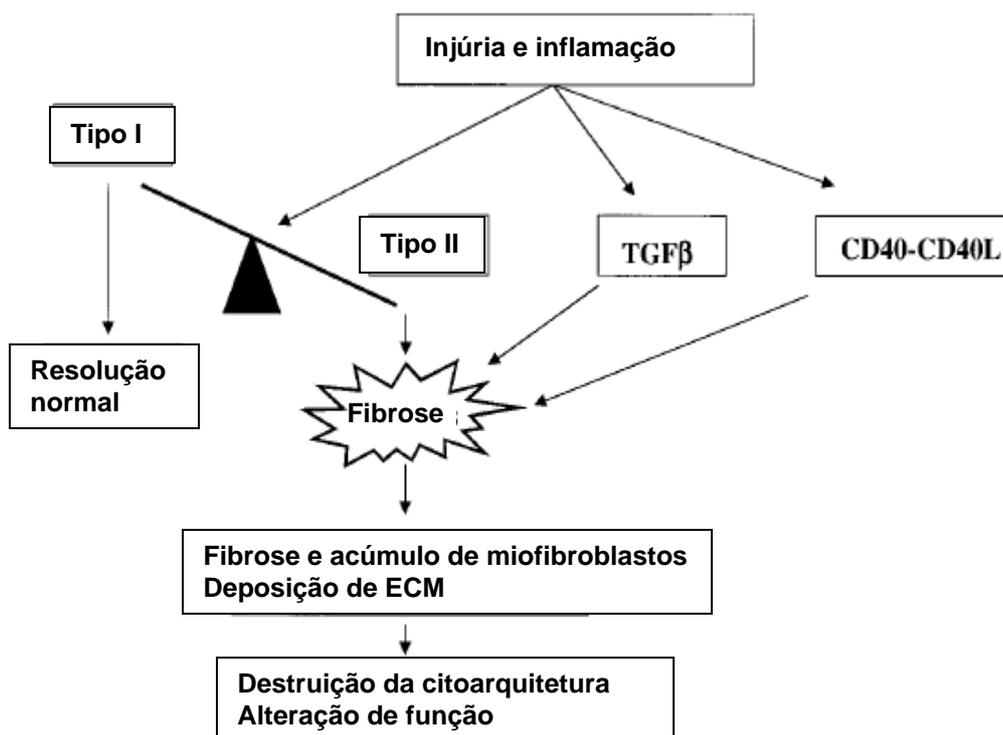


Figura 9 – Regulação do desenvolvimento de fibrose na lesão tecidual. (Sime & O'Reilly, 2001)

## 1.6 METALOPROTEASES NA REGENERAÇÃO E REPARO DO TECIDO MUSCULAR

Durante a degeneração e regeneração do músculo esquelético ocorre uma remodelagem da ECM. Esse processo é coordenado pelas metaloproteases (MMP) e serino-proteases endopeptidases dependentes de íons  $Zn^{+2}$  e/ou  $Ca^{+2}$  com estrutura molecular composta por pelo menos de três domínios: um peptídeo sinal de aproximadamente 20 aminoácidos; um pro-peptídeo que mantém a latência da proteína por possuir uma conformação específica entre cisteínas e um íon  $Zn^{+2}$  contendo aproximadamente 80 aminoácidos e um sítio catalítico de aproximadamente 170 aminoácidos

(Goldman *et al.*, 2003). A expressão e atividade das MMPs são reguladas tanto ao nível de transcrição pelas citocinas e fatores de crescimento e a nível pós-tradução, pela secreção dessas enzimas em formas latentes (pré-pró-MMP) e ativação de zimogênios (pró-MMP) por integrinas e proteases presentes tanto no meio extracelular como as associadas à membrana celular (Lafreniere *et al.*, 2004). Existe um balanço delicado entre a produção endógena de inibidores teciduais TIMPs (inibidores de MMP no tecido) e a produção de MMP no microambiente determinando a remodelagem fisiológica ou destruição patológica do tecido (Nagase *et al.*, 2006).

Existem cinco famílias de metaloproteases: as gelatinases, as collagenases, as estromelisinases, as metaloelastases e as metaloproteases de membrana que são proteínas integrais de membrana. Sua ativação se dá em duas etapas. Primeiramente ocorre uma clivagem inicial por ativadores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento e NO desestabilizando a coordenação entre o  $Zn^{+2}$  e as cisteínas, e em seguida ocorre uma clivagem final geralmente por outra MMP liberando o radical amino terminal da enzima madura (Johnson *et al.*, 1998).

Durante o processo inflamatório as MMPs são produzidas por quase todas as populações recrutadas, além estarem aumentadas nas células residentes como miofibrosas próximas a uma lesão e em progenitores como as células satélites (Kherif *et al.*, 1999). As MMPs participam do processo inflamatório regulando a atividade das citocinas e quimiocinas e modulando a sua biodisponibilidade, uma vez que estas estão aderidas a matriz extracelular (Roach *et al.*, 2002). Como exemplo podemos citar a MMP-2, que é capaz de clivar a quimiocina CCL7. A quimiocina clivada ainda é capaz de se ligar aos

seus receptores, porém perde sua capacidade quimiotática e atua como antagonista de todas quimiocinas que se ligam aos mesmos receptores que a CCL7. Por outro lado a MMP-8 quando cliva a quimiocina CXCL5 gera diversos peptídeos com ação quimiotática para neutrófilos (Parks *et al.*, 2004).

As MMP-9 (gelatinase A) e MMP-2 (gelatinase B) constituem as principais metaloproteases envolvidas no reparo do tecido muscular (Kherif *et al.*, 1999; Carmeli *et al.*, 2004). A MMP-9 está associada com a migração de células inflamatórias e possivelmente à ativação de células satélites, enquanto a MMP-2 é constitutiva do tecido muscular, mas está aumentada durante o processo de regeneração muscular (Kherif *et al.*, 1999). Em camundongos C57BL10 com lesão muscular induzida por cardiotoxina, a MMP-9 está muito aumentada durante o auge da inflamação com predomínio de macrófagos e neutrófilos (Kherif *et al.*, 1999). A partir da segunda semana, os níveis de MMP-9 diminuem e a MMP-2 atinge o máximo. A expressão de MMP-2, presente de forma constitutiva no tecido muscular, regula a integridade e composição da composição da ECM, e também a proliferação e diferenciação de mioblastos (revisado em (Carmeli *et al.*, 2004). A participação de MMP-2 durante a fusão de mioblastos deve-se em parte à degradação de colágeno tipo IV como também outros componentes da membrana basal como a entactina (Kherif *et al.*, 1999).

## **1.7 MODELOS ANIMAIS DE INJÚRIA MUSCULAR**

Os modelos animais de injúria muscular (mecânicos, físicos ou químicos) têm sido utilizados com o intuito de trazer uma melhor compreensão

na dinâmica da lesão e reparo do tecido muscular (Hawke & Garry, 2001). O modelo de lesão muscular pelo esmagamento é muito utilizado para estudar fatores que influenciam a fibrose. Outros modelos também muito utilizados são a denervação (Mussuni *et al.*, 1987) e indução de lesão por congelamento (Creuzet *et al.*, 1998). Para estudar o processo de regeneração muscular de forma controlada e reproduzível utilizam-se as miotoxinas, entre elas a cardiotoxina (CTX), notexina (NTX) e bupivacaína. Essas toxinas têm uma ampla gama de atividades biológicas, que não são completamente conhecidas. A cardiotoxina é um peptídeo extraído do veneno de cobra que induz a desorganização do sarcolema. NTX é uma fosfatase A2 neurotóxica também retirado do veneno de cobra que bloqueia a transmissão neuromuscular inibindo a liberação da acetilcolina. CTX induz uma forma bastante reproduzível de lesão muscular, porém ainda não são conhecidos os efeitos dessa toxina sobre os vários tipos de células musculares, incluindo as miogênicas progenitoras (Charge & Rudnicki, 2004).

Bupivacaína, um anestésico muito utilizado em obstetrícia, induz um processo de regeneração muscular com etapas bem definidas de mionecrose e inflamação seguida de regeneração do tecido muscular. Neste modelo normalmente após 10 dias de indução da injúria ocorre estabilização da arquitetura tecidual (Hawke & Garry, 2001; Sandri, 2001; Charge & Rudnicki, 2004). A regeneração rápida neste modelo é devido à preservação das células satélites, do suprimento sanguíneo e da inervação (Nonaka *et al.*, 1983). A bupivacaina induz necrose, e em menor extensão, apoptose das miofibras pelo aumento de cálcio intracelular (Zink & Graf, 2004). As células satélites parecem

mais resistentes à ação lesiva da bupivacaína do que as células musculares maduras (Nonaka *et al.*, 1983).

Modelos de animais de laboratório com degeneração anormal devido a desregulação espontânea ou artificial de genes específicos também são de grande interesse. Por exemplo, o camundongo mdx é comumente usado como modelo animal da distrofia muscular de Duchenne (DMD) e como um modelo alternativo de degeneração para estudo do reparo muscular. Esses animais apresentam uma mutação no cromossoma X o que determina a não expressão de distrofina, uma proteína localizada internamente no sarcolema associada ao citoesqueleto, essencial para manter a integridade da fibra muscular. Os camundongos mdx apresentam miopatia inflamatória com ciclos de mionecrose e regeneração do tecido muscular (De la Porte *et al.*, 1999). Ao contrário dos camundongos mdx, a doença é fatal nos humanos, sendo este modelo animal muito utilizado para estudar os fatores que influenciam a regeneração do tecido muscular. Existem ainda outros modelos com particularidades genéticas, onde se estuda a regeneração em camundongos deficientes de genes miogênicos como Pax7 e MyoD e transgênicos para fatores sistêmicos com influência no crescimento muscular como IGF-1 (Charge & Rudnicki, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a influência do microambiente no processo de regeneração muscular em linhagens de camundongos com padrão de citocinas Th1 ou Th2 utilizando o modelo de indução de lesão muscular da bupivacaína.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar as alterações histológicas na área da lesão induzidas por bupivacaína entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57.
- Analisar a expressão de colágeno na lesão através da coloração especial de picrosírius
- Caracterizar por imuno-histoquímica as células mononucleares do infiltrado celular presente na lesão.
- Caracterizar por citometria de fluxo os subtipos de linfócitos nos linfonodos de drenagem do tecido muscular lesionado
- Analisar a atividade das metaloproteases MMP-2 e MMP-9 no músculo lesionado pela técnica de zimografia
- Analisar a expressão do mRNA para citocina TGF- $\beta$  no músculo lesionado através da técnica de RT-PCR.

### **3. MATERIAL & MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Nos experimentos foram utilizados camundongos machos isogênicos na idade de 5 a 6 semanas das linhagens C57BL10, C57BL6, BALB/c. Os animais foram mantidos em ambiente refrigerado (20° C) e aclimatado com ciclo de iluminação 12:12 horas, no Biotério da Fundação Oswaldo Cruz e no Biotério de Patologia Celular do Instituto de Biologia da UFF. Os animais foram mantidos em gaiolas de prolipropileno forradas com maravalha peneirada e autoclavada recebendo ração Nuvital (Curitiba, Brasil), suplementação alimentar (farelo de trigo e semente de girassol) e vitamínica (Vitagold), água filtrada *ad libitum*.

#### **3.2 Indução da lesão muscular**

A lesão muscular foi induzida nos animais saudáveis pela inoculação de 34µl de cloridato de bupivacaína a 0,5% diluído em salina estéril (Mussuni *et al.*, 1987) no músculo *Triceps brachii* de ambos os membros. A inoculação foi realizada com seringa Hamilton de 100µL acoplada a dosador mecânico. Os grupos controle e sham foram submetidos às mesmas condições experimentais porém inoculados com PBS. Os animais foram sacrificados com vapor de CO<sub>2</sub> 1, 4, 8 e 12 dias após a indução de lesão. O músculo *T.brachii* foi processado adequadamente para realização das técnicas de histologia, imuno-

histoquímica, zimografia, PCR e western blot e os linfonodos braquial e axilar para citometria de fluxo.

### **3.3 Processamento histológico**

Para o processamento histológico os músculos foram fixados durante 24 horas em formol tamponado Milloning a 10% pH 7,2. Os tecidos foram desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 60 minutos cada, passados 3 vezes em álcool absoluto e 3 vezes em Xilol (Reagen). A impregnação e inclusão em parafina (paraplast, Sigma, USA) foi efetuada em duas incubações durante 1 hora a 60 °C. Os músculos foram clivados e incluídos transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais externamente no bloco. Foram feitos em média 10 cortes de 5µm de espessura no micrótomo Spencer 820 (American Optical, EUA) após chegar no nível da lesão muscular. Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e previamente filmadas com solução de glicerol-albumina (0,5%), mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas e submetidos às colorações histológicas de hematoxilina-eosina (HE), Picrosírius e Giemsa.

### **3.4 Imuno-histoquímica**

O músculo *T. brachii* foi cuidadosamente removido, congelado em nitrogênio líquido e incluído em OCT (Sakura, EUA). Cortes de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas desengorduradas e previamente filmadas com poli-L-lisina (Sigma Chem. Co, Mo, EUA). Após a fixação por 10

minutos em acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , os cortes foram mergulhados em solução de salina-fosfato tamponada (PBS pH 7,2) por 5 minutos. A inibição da peroxidase endógena foi feita com 3% peróxido de hidrogênio (Merck do Brasil) por 30 minutos. Os cortes foram hidratados com PBS por 5 minutos e, posteriormente feito o bloqueio de antígenos inespecíficos incubando com PBS contendo 2% de albumina bovina (BSA fração V, Sigma Chem. Co., EUA) durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A seguir os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS (30 $\mu\text{l}$ ) por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  (ver tabela 1). Após três lavagens sucessivas de 5 minutos com PBS, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo secundário apropriado diluído em PBS (30 $\mu\text{l}$ ) por uma hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens com tampão PBS, a revelação da peroxidase foi feita com aminoetilcarbazol (AEC, Sigma Chem. Co., EUA) na presença de 3% de peróxido de hidrogênio (Merck do Brasil). Todos os cortes foram contra-corados suavemente com hematoxilina de Mayer por 2 minutos e montados em meio de montagem a base de gelatina.

**Tabela 1: Relação dos anticorpos monoclonais utilizados na imuno-histoquímica.**

Anti-CD4.biotina	rato	Caltag	1/80
Anti-CD8.biotina	rato	Caltag	1/80
Anti-F4-80	rato	Serotec	1/40
Anti-Mac-1.biotina	rato	Pharmingen	1/30
Anticorpos monoclonais	Origem	Fonte	Diluição

### 3.5 Histomorfometria

Nas lâminas com coloração para Picrosírius foi realizada a quantificação do percentual de área de depósito de colágeno por área de lesão com o programa Anisys (Soft Image System, Alemanha). Foram escolhidos 3 campos aleatórios em cada análise.

### 3.6 Citometria de fluxo

Os linfonodos braquiais e axilares dos camundongos controles, sham e inoculados foram cuidadosamente retirados e dissociados com o auxílio de pinças finas e tamiz de nylon em meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., EUA) contendo 2% de soro bovino fetal (Cultilab, São Paulo, Brasil). Após a determinação da celularidade através de contagem em câmara de Neubauer,  $10^6$  células foram incubadas com PBS contendo 10% de soro normal de camundongo e 2% de soro bovino fetal durante 10 minutos para evitar ligações não específicas. A tripla marcação foi feita pela incubação das células com os anticorpos monoclonais na diluição apropriada previamente determinada (Tabela 2) durante 20 minutos a 4°C. As células foram então lavadas duas vezes em PBS contendo 2% de soro bovino fetal, recolhidas em tubos e fixadas em PBS contendo formol 1% e azida sódica 0,05% e analisadas num FACScalibur® (Becton Dickinson, San Diego, EUA). A região de células vivas foi determinada usando os parâmetros de *forward versus side scatter* e foram coletados 10000 eventos em cada amostra. Para a análise dos dados foi utilizado o software Winwind versão 2,8 (Scion Corporation, EUA).

**Tabela 2: Relação dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.**

<b>Anticorpos monoclonais</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Fonte</b>	<b>Diluição</b>
Anti-CD3	Fitc	Pharmingen	1/300
Anti-B220	Fitc	Pharmingen	1/400
Anti-CD4	Pe	Pharmingen	1/300
Anti-CD8	Spectral red	Southern	1/600
Anti-CD25	Fitc	Sigma	1/5
Anti-CD62L	Fitc	Pharmingen	1/100
Anti-CD44	Fitc	Pharmingen	1/50

### **3.7 RT-PCR**

#### **3.7.1 Extração de RNA total**

O RNA total foi isolado pelo método de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, CA, EUA). Os músculos foram homogeneizados na proporção de 50mg de tecido para 1000µl de Trizol e centrifugados a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C para remover o fragmento de tecido não dissolvido. Os sobrenadantes foram congelados a -20°C até o momento de uso. Após serem descongelados, foi adicionado 200µl de uma solução de clorofórmio/ álcool isoamílico na proporção 24:1 (v:v) seguindo-se nova homogeneização. Após 10 minutos no gelo, a mistura foi centrifugada a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol (Merck do Brasil). As soluções foram agitadas até a homogeneização, armazenadas a -20°C por no mínimo 30 minutos e

centrifugadas novamente a 14.000 xg por 20 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com 600µl de etanol gelado a 70% e submetido à nova centrifugação de 14.000 xg por 15 minutos a 4°C. O RNA foi dissolvido em 15 µl de H<sub>2</sub>O livre de RNase e estocado a -70°C.

### **3.7.2 Eletroforese de RNA**

Após a extração do RNA total, a sua integridade foi verificada em gel desnaturante de agarose-formaldeído 1,2%. A amostra de RNA (5µl) foi diluída em 10µl de formamida (Merck do Brasil), 4µl de tampão MOPS 5X (Invitrogen, Brasil), 1,3µl de 37% formaldeído (Merck do Brasil), 1µl de (1µl/ml) brometo de etídio (Sigma Chem. Co., EUA) e 1µl de azul de bromofenol (Merck do Brasil), seguido de incubação por 10 minutos a 65°C. A mistura foi mantida no gelo até sua aplicação no gel. A corrida de eletroforese foi feita a 75V por 1 hora em cuba horizontal (Kodak, EUA). A integridade do RNA foi avaliada no transiluminador de luz ultravioleta observando-se a integridade das bandas de RNA ribossomal de 17 e 28S. A pureza e a concentração do RNA extraído foi determinada através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 260 e 280nm. Considerando-se que 1 unidade de DO<sub>260</sub> equivale a 40 µg/mL de RNA, foi realizado o cálculo da razão entre a DO em 260 e 280nm para estimar o grau de pureza do RNA total. Somente foi utilizado RNA com a razão entre 1,6 e 2,0.

### 3.7.3 Transcrição reversa do RNA e PCR

Foi utilizado o kit SuperScrip One-Step com Platinum *Taq* (Gibco-BRL Life Technologies, NY, EUA), onde se realiza a produção do cDNA e o PCR concomitantemente. Em um tubo contendo 1µg de RNA foi adicionado 25 µl do Mix de reação 2x, 0,4 µl de MgSO<sub>4</sub> a 50 mM, 1 µl da seqüência de oligonucleotídeos (primer) sense, 1 µl do primer anti-sense, 1 µl de RT/Platinum *Taq* Mix e completado o volume para 50 µl de água livre de RNase (RF). As amostras foram colocadas no termociclador (Amersham, Inglaterra) a 50°C por 30min para síntese do cDNA e a 94°C por 2 min para ativação da *Taq* e desnaturação do RNA/ cDNA. As amplificações foram realizadas em 30 ciclos: desnaturação 94°C por 15 s , anelamento 60°C por 30s e síntese em 72°C por 3 min. A extensão final foi feita em 1 ciclo a 72°C por 10 min. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,7% contendo 1 µg/ml de brometo de etídio e visualizadas no transiluminador, e o resultado expresso como razão TGF-β/gene constitutivo GAPDH.

. Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos:

	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>
<b>TGF-β</b>	CAAGGAGACGGAATACAGGGCT	CGCACACAGCAGTTCTTCTCTGT
<b>GAPDH</b>	GGTGAAGGTCGGTGTGAACGGA	TGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG

### 3.8 Zimografia

#### 3.8.1 Preparo do extrato tecidual

Os músculos inoculados e controles foram coletados e imediatamente congelados e preservados em nitrogênio líquido (-165°C). Os músculos foram pesados e homogeneizados (1/10, p/v) em tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200mM NaCl, 100mM CaCl<sub>2</sub> e 1% Triton X-100) à 4°C. Após a centrifugação (15.000 xg), o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 100 µl, e a concentração protéica determinada utilizando-se uma curva padrão de albumina pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). A mesma quantidade de proteína total foi usada para zimografia (60 µg/poço).

#### 3.8.2 Gel para zimografia

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito (Heussen & Dowdle, 1980) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 7,5% contendo gelatina do tipo A de pele suína (Sigma Chem. Co, St. Louis, Mo. EUA) na concentração de 2 mg/mL e os géis de entrada poliacrilamida 5% (w/v). A eletroforese foi realizada com a concentração de 60µg de proteína para cada uma das amostras aplicadas nos géis a 165 Volts por um tempo médio de 60 minutos (Power Pac 200 – Bio-Rad, EUA). Após a eletroforese os géis foram lavados duas vezes em 2.5% Triton X-100 para total remoção do SDS seguido de incubação a 37°C em tampão contendo o substrato (10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> 1µM ) por 24 horas. SDS é o agente responsável pela ativação das metaloproteases mesmo na forma inativa sem clivagem proteolítica (Talhok *et al.*, 1991). Os géis foram corados pelo

Coomassie blue R250 (Sigma Chem. Co, EUA) e descorados em solução descorante contendo 50% metanol, 10% ácido acético e 40% qsp de H<sub>2</sub>O. A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. As metaloproteases são secretadas na forma latente e necessitam da clivagem do terminal peptídico NH<sub>2</sub> para ativação. A análise semiquantitativa foi feita usando o programa de análise de imagem (Scion Program National Institutes of Health, Image Program, EUA).

### **3.9 Análise estatística**

Microsoft Excel software (Microsoft, EUA) foi usado para calcular médias e desvios padrões. O teste t de Student's foi aplicado para acessar o nível de significância estatística das amostras.

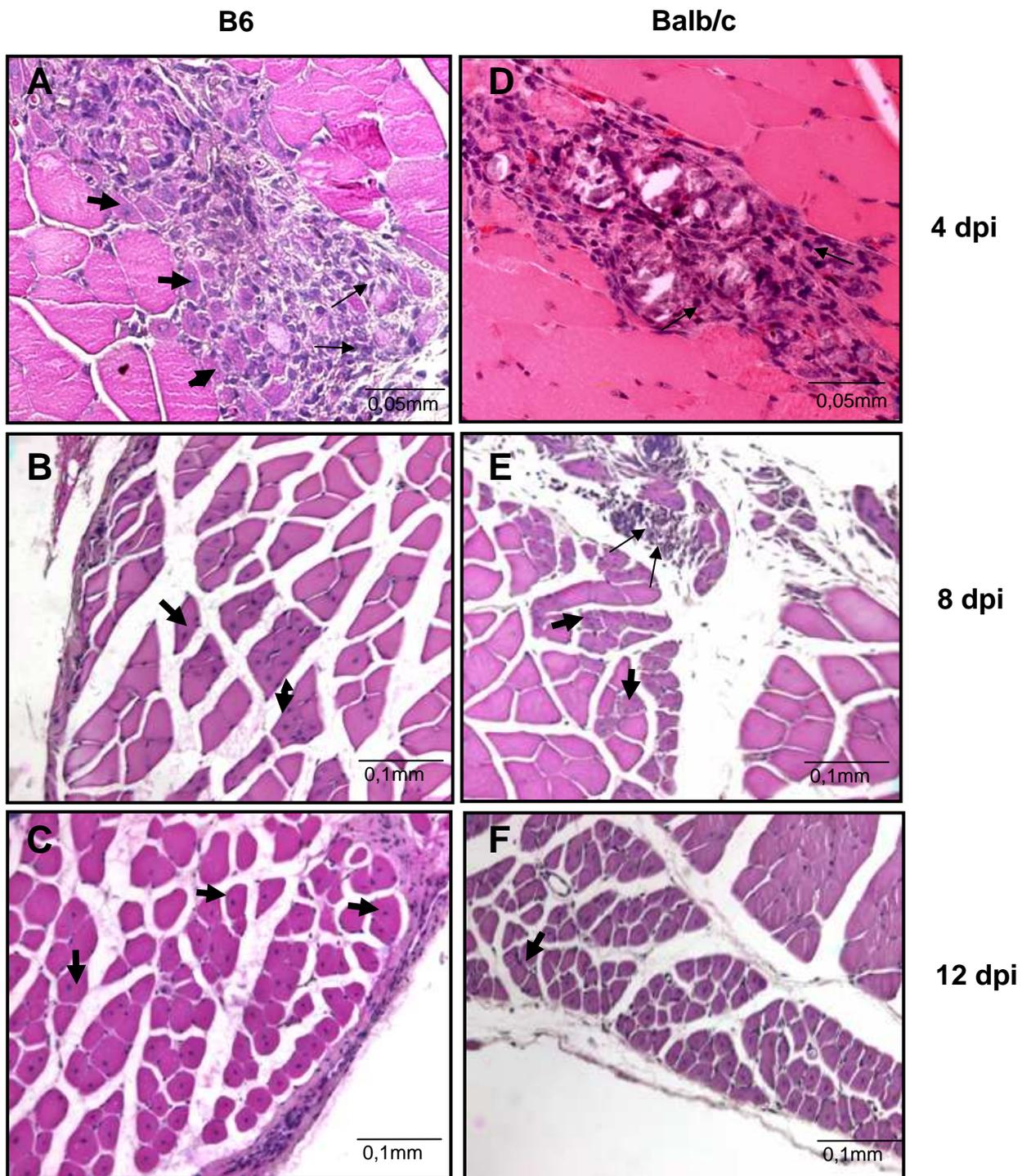
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise histológica da lesão muscular

Os animais foram sacrificados 4, 8 e 12 dias após inoculação (dpi) de bupivacaína. Os músculos *Triceps brachii* foram processados e emblocados em parafina, posteriormente foram feitos cortes de 5 µm de espessura no micrótomo manual. Como colorações de estudo foram escolhidas o H-E pois permite evidenciar mais claramente a citoarquitetura e a nucleação da miofibrila, e o Giemsa por evidenciar mais claramente as miofibrilas regenerando e o infiltrado inflamatório. Para cada grupo foram utilizados no mínimo 3 animais.

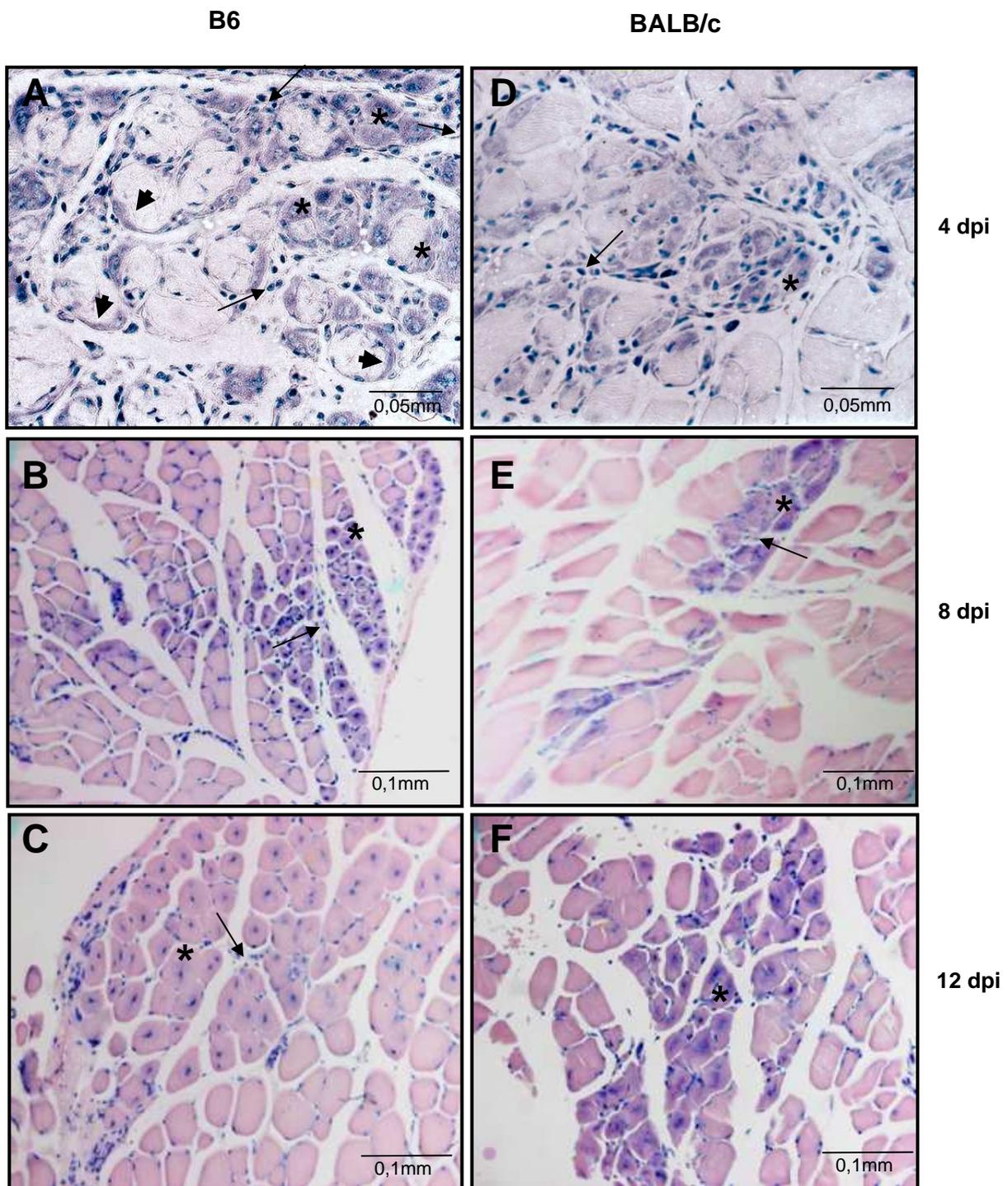
A análise histológica do músculo esquelético dos camundongos BALB/c sacrificados no quarto dia após a inoculação (4dpi), mostrou grandes áreas de lesão com predomínio de células mononucleares no infiltrado inflamatório, mionecrose e perda da citoarquitetura normal da miofibrila (Figura 10D). Os camundongos C57BL6 apresentaram infiltrado inflamatório mais intenso e menor alteração da citoarquitetura (Figura 10A). Pela coloração de Giemsa, podemos observar um grande número de miofibrilas regenerando evidenciadas pelo citoplasma basofílico e nucleação central principalmente nos camundongos C57BL6. Inclusive, pode-se evidenciar nestes animais mioblastos se fusionando para formação de novas miofibrilas (Figura 11A). Em 8 dpi (Figura 10E e 11E) camundongos BALB/c apresentaram miofibrilas regenerando mas ainda com áreas de infiltrado inflamatório intenso, contudo em camundongos C57BL6 era

restrito. Em 12 dpi ambas as linhagens de camundongos apresentaram miofibras regenerando com nucleação central (Figura 10C, 10F, 11C, 11F).



**Figura 10 : Cinética da lesão muscular induzida por bupivacaína nas linhagens de camundongo**

Painel com fotomicrografias da lesão muscular corada por H-E em 4 (A, D), 8 (B, E) e 12 (C, F) dias após inoculação de bupivacaína nos camundongos C57BL6 (A, B, C) e BALB/c (D, E, F). Infiltrado inflamatório (seta), células musculares regenerando (setas largas). dpi (dias após inoculação)



**Figura 11 : Painel com fotomicrografias da lesão muscular coradas pelo Giemsa**

Fotomicrografias da lesão muscular em 4 (A, D), 8 (B, E) e 12 (C, F) dias após inoculação de bupivacaína nos camundongos C57BL6 (A, B, C) e BALB/c (D, E, F). Infiltrado inflamatório (seta fina), células musculares regenerando (asterisco). Setas grossas indicam mioblastos com citoplasma basofílico circundando fibras musculares.

## 4.2 Alterações no microambiente da lesão muscular

### 4.2.1 Coloração de picrossírius

Confirmadas as diferenças entre as lesões musculares nas diferentes linhagens passamos para um estudo mais minucioso das alterações observadas. Esse estudo é essencial para sabermos os possíveis mecanismos contribuindo para regeneração muscular. O primeiro fator abordado foi alteração do microambiente quanto à produção de colágeno. Este componente da matriz extracelular exerce papel importante durante o processo de reparo, influenciando na migração de leucócitos e no curso da regeneração, para uma resolução cicatricial ou mais fisiológica. Para visualização do colágeno escolhemos a coloração de picrossírius que marca em vermelho as fibras colágenas.

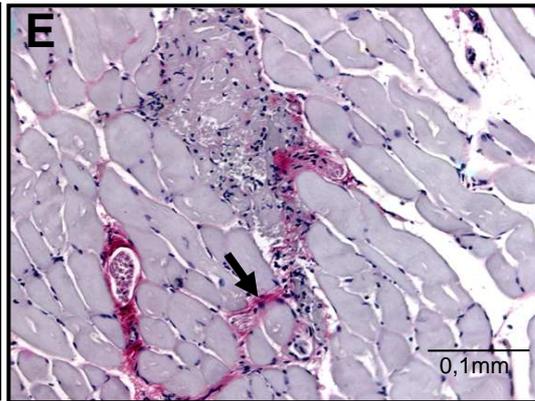
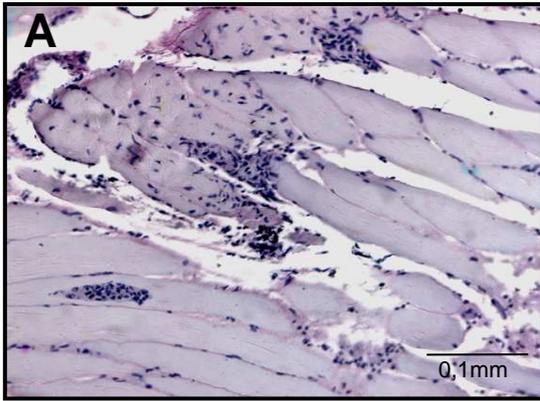
A lesão muscular em 1dpi com bupivacaína mostrou uma expressão discreta de colágeno entre as fibras musculares tanto na linhagem C57BL6 (Figura 12A) como BALB/c (Figura 12E), porém intenso depósito de colágeno próximo aos vasos no camundongo BALB/c (Figura 12E). Após 4 dias de inoculação com bupivacaína essa diferença era bem evidente. Enquanto os camundongos C57BL6 (Figura 12B) apresentavam maior regeneração, com várias fibras com nucleação central e discreta deposição de colágeno, os camundongos BALB/c (Figura 12F) apresentavam grandes áreas com mionecrose e aumento na deposição de colágeno em relação ao ponto anterior.

Em 8 (Figuras 12C e G) e 12 dpi (Figuras 12D e 12H) não foi encontrada diferença na expressão de colágeno entre as miofibras em duas linhagens

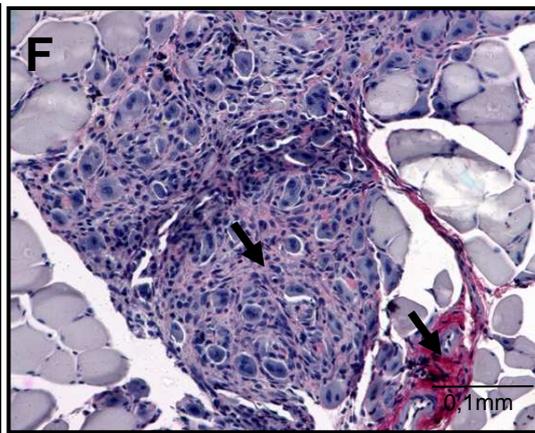
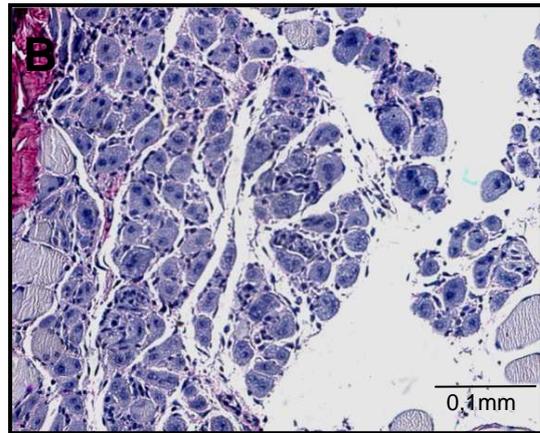
A quantificação do colágeno utilizado o programa Analysis foi realizada somente dentro das áreas de lesão, evitando quantificar vasos e as fâcias musculares. Os resultados apresentados na figura 13 mostram que em 1 dpi não existe diferença na média da expressão de colágeno. Contudo, 4dpi após inoculação (Figura 13B) foi observado que o percentual da área de lesão ocupada por colágeno no BALB/c era 5,2 vezes maior do que no camundongo C57BL6 ( $p < 0,05$ ).

B6

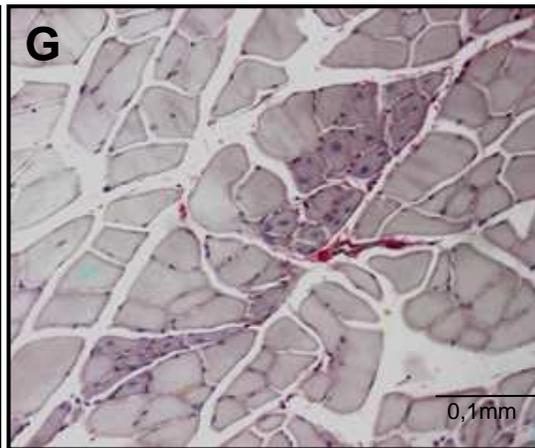
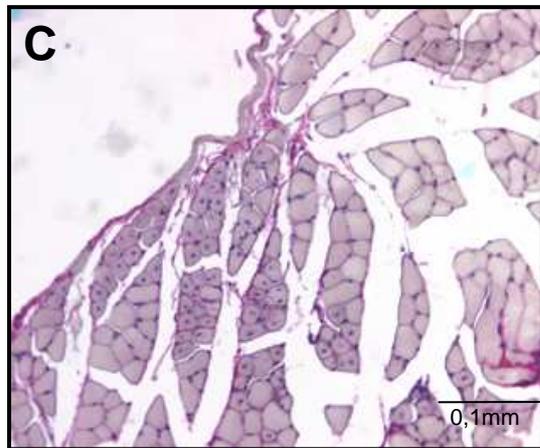
BALB/c



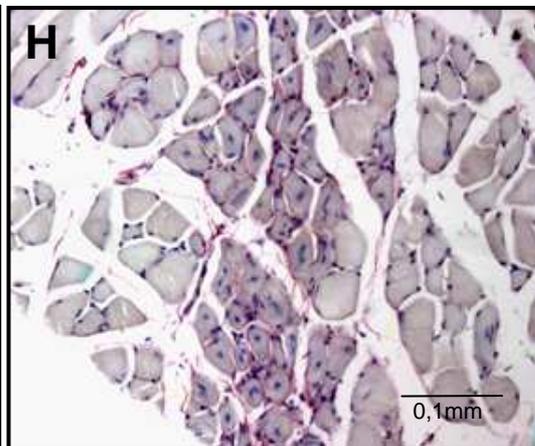
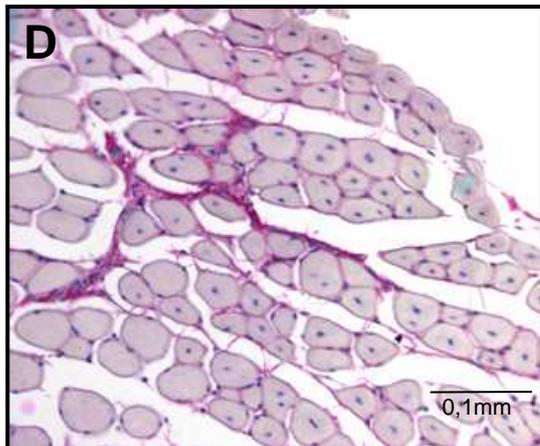
1 dpi



4 dpi



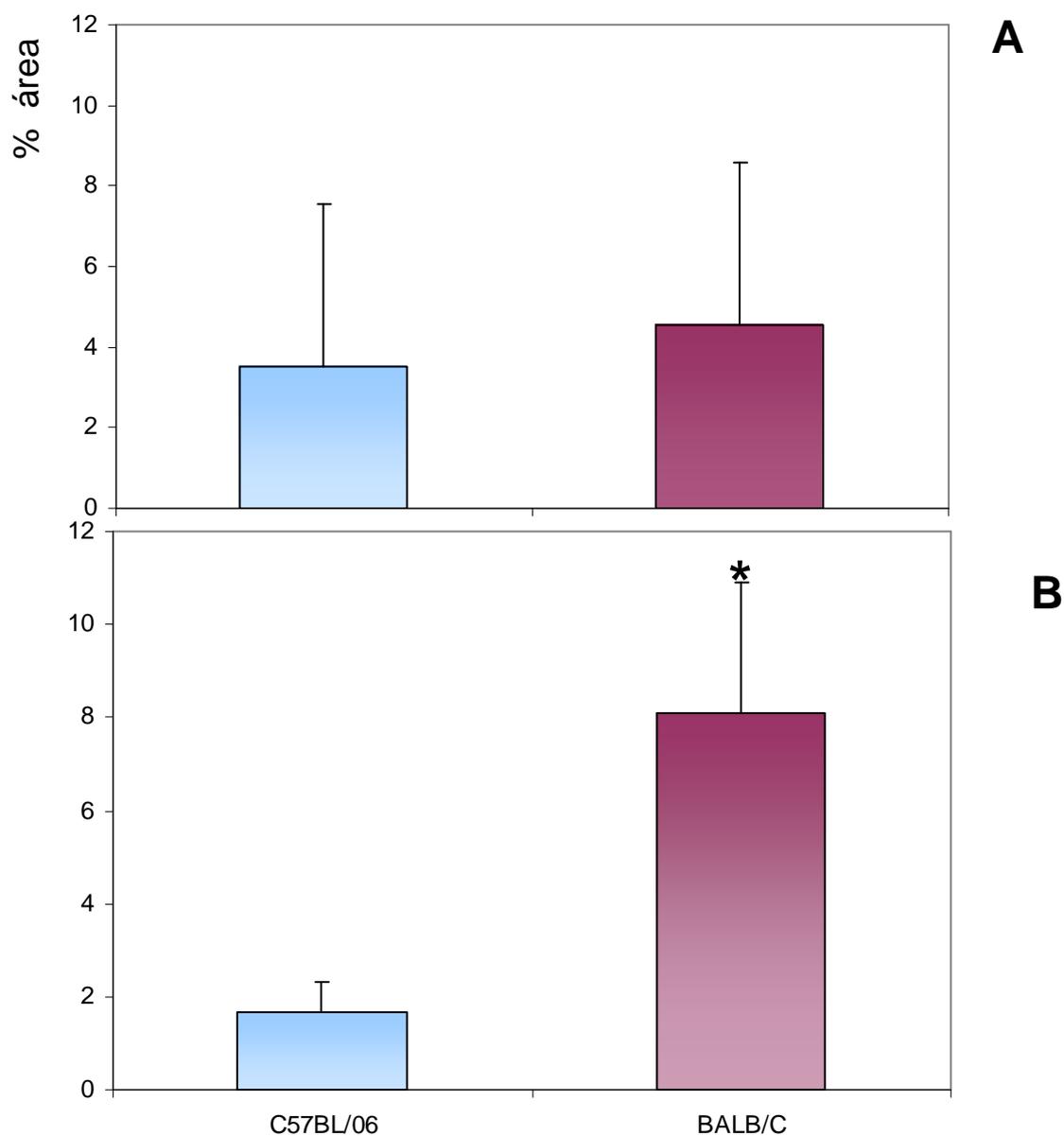
8 dpi



12 dpi

**Figura 12- Coloração de picrosírius da lesão muscular**

Fotomicrografias de Tríceps brachii coradas com picrosírius em 1 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) e 12 (D, H) dias após inoculação de bupivacaína nos camundongos C57BL6 (A, B, C, D) e BALB/c (E, F, G, H). As setas indicam expressão de colágeno na lesão e em torno dos vasos próximos a área de lesão. Barra = 0,1 mm; dpi: dias após inoculação.



**Figura 13: Histomorfometria da área da lesão ocupada por colágeno.**

Representação gráfica da quantificação de colágeno pelo programa Analysis na lesão em 1 dpi (A) e 4 dpi (B). As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo \*  $p < 0,05$ .

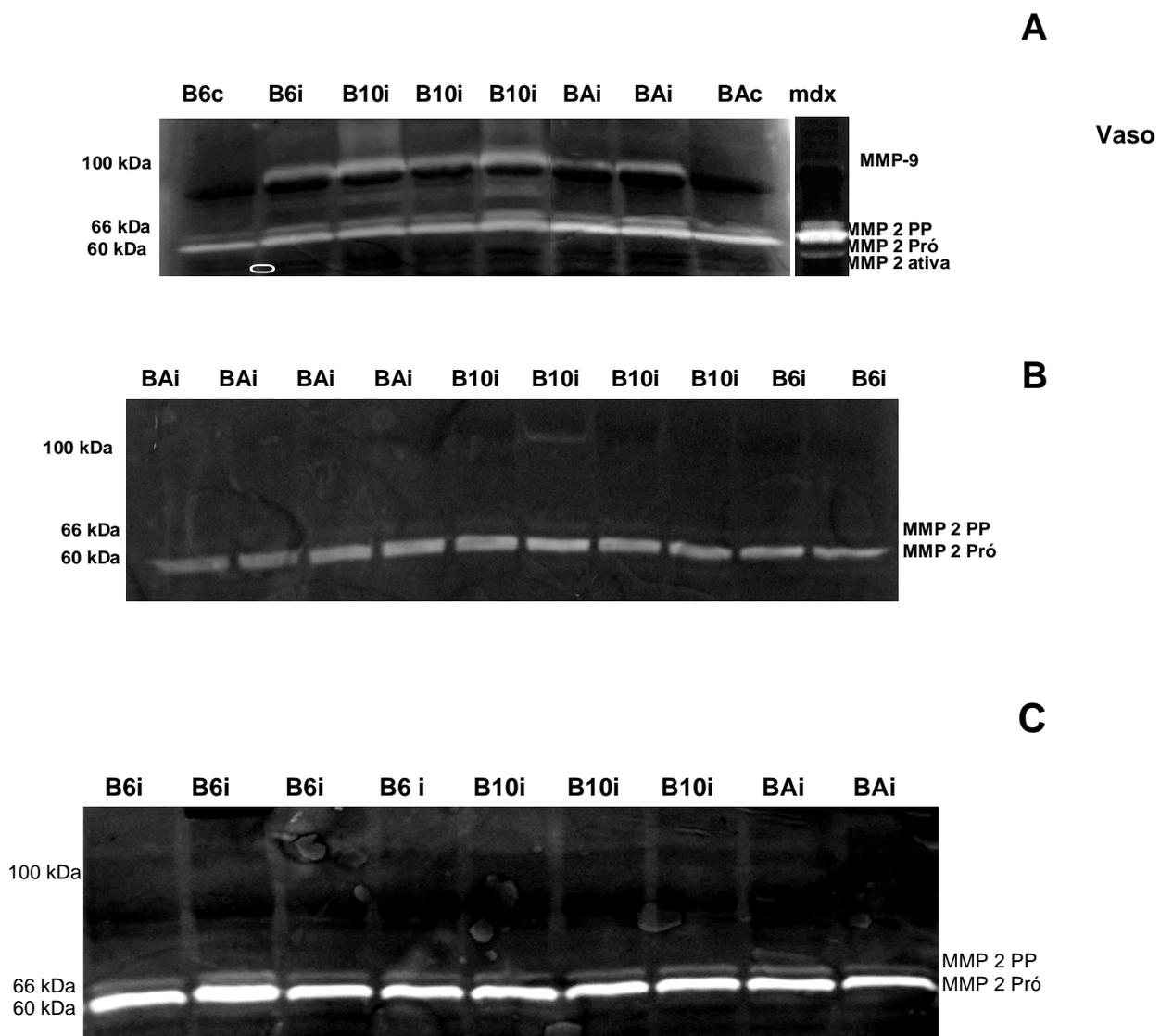
#### 4.2.2 Atividade de metaloproteases no músculo lesionado

Utilizamos a técnica de zimografia a fim de investigar a atividade da MMP-9 (100 kDa), pré-pró-MMP-2 (66 kDa), pro-MMP-2 (60 kDa) e a forma ativa da MMP-2 (55kDa). Foram coletados os músculos *Triceps brachii* inoculados com bupivacaína de camundongos C57BL6, C57BL10 e Balb/c após 1, 4 e 12 dpi. Semelhantemente ao encontrado anteriormente (Kheriff, 1999), os animais controles de ambas as linhagens apresentaram atividade da pré-pró MMP-2 (MMP-2PP) e da pró-MMP-2 e nenhuma atividade da MMP-9. A forma ativa da MMP-2 não foi encontrada nas amostras de músculo dos animais controles e inoculados com bupivacaína, mas foi evidenciada em amostras de músculo de camundongo distrófico mdx utilizado como controle positivo (Figura 14A).

A atividade da MMP-9, normalmente associada com processo inflamatório, somente foi evidenciada nas lesões musculares em 1 dpi (figura 14). Quando a atividade da MMP-9 foi comparada entre as linhagens verificou-se que C57BL10 apresentava um aumento de 3,8 vezes em relação ao BALB/c. A linhagem C57BL6 também apresentou níveis mais altos (2,5 vezes) que o BALB/c, porém esta diferença não foi significativa (figura 15A).

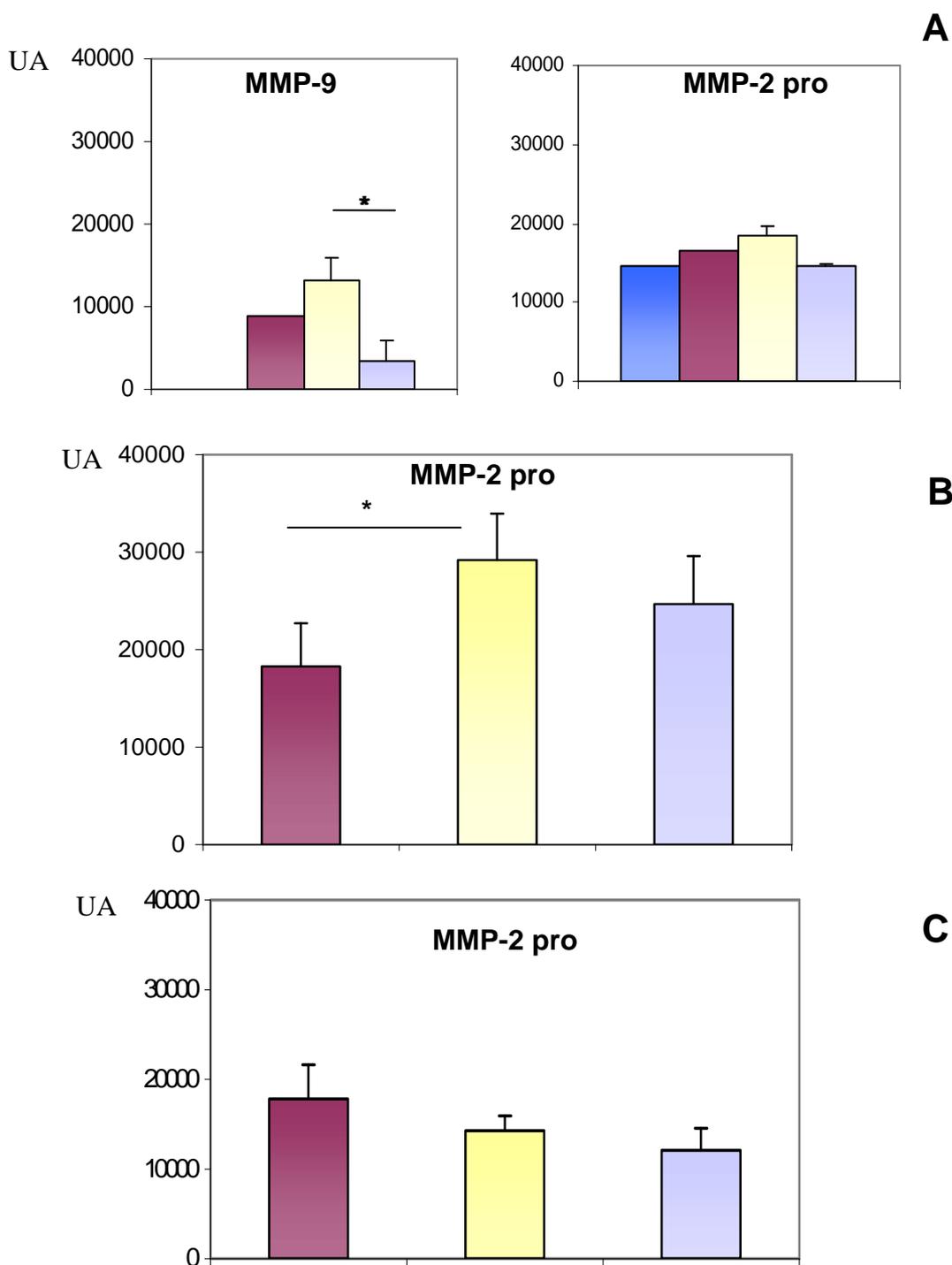
A análise da atividade da pro-MMP2 mostrou atividade próxima a encontrada no grupo controle e sem diferença significativa entre as linhagens em 1 dpi, apesar de ser encontrado níveis mais altos no camundongo C57BL10. Após 4 dias de inoculação da bupivacaína, foi evidenciada maior atividade da MMP-2 pro em todas as linhagens em relação a 1 dpi, apesar da forma ativa não ter sido detectada (figura 15B). O estudo comparativo entre

as linhagens mostrou que os camundongos BALB/c apresentavam atividade 1,1 vez menor que C57BL10. Entretanto foi observada uma diferença significativa entre as duas linhagens de C57, onde C57BL6 apresentava 1,6 vezes ( $p < 0.05$ ) menos pró-MMP-2. Após 12 dias de induzida a lesão muscular, os níveis da pró-MMP2 diminuíram aproximando dos valores do camundongo controle. Entretanto os camundongos C57BL10 e C57BL6 mantiveram níveis mais altos quando comparados com o BALB/c, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (figura 15C).



**Figura 14- Atividade de metaloproteases no músculo esquelético.**

Zimografia de músculo esquelético de camundongos controles e após 1 (A), 4 (B) e 12 (C) dias após inoculação de bupivacaína. B6 = C57BL6, B10 = C57BL10, BA = BALB/c, c = controle, i = inoculado com bupivacaína, mdx = camundongo distrófico.



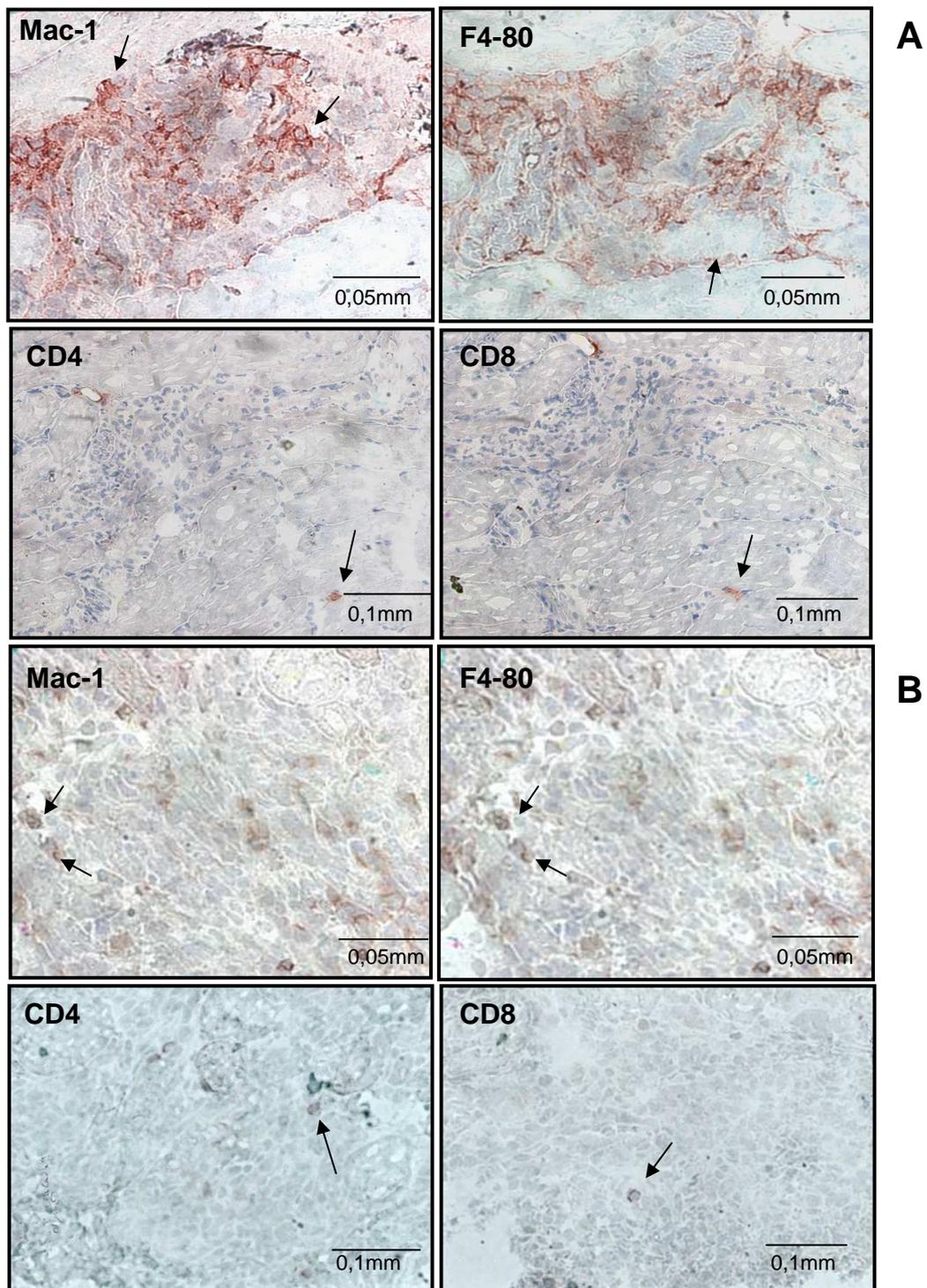
**Figura 15: Atividade das MMP-9 e MMP-2 pró no músculo esquelético**

Representação gráfica da quantificação da atividade das MMPs pelo programa Scion em 1 (A), 4 (B) e 12 (C) dias após inoculação de bupivacaína. As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Coluna vinho (C57BL6), amarela (C57BL10) e lilás (BALB/c). Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo significativo valores \*  $p < 0,05$ . UA = unidade arbitrária.

### 4.3 Fenotipagem do Infiltrado Inflamatório

As células presentes no infiltrado inflamatório foram caracterizadas pela técnica de imuno-histoquímica. Utilizamos anticorpos monoclonais específicos para Mac-1 para evidenciar células mononucleares, F4-80 para macrófagos, CD4 e CD8 para os linfócitos T. Foram coletados os músculos *Triceps brachii* de camundongos C57BL6 e BALB/c inoculado com bupivacaína em 4 dpi por ser o ponto de maior infiltrado inflamatório. Foram realizados cortes de 5µm de espessura de músculos congelados e emblocados em substância criopreservante OCT.

Em 4 dias pós-inoculação não encontramos diferenças quanto aos tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório entre as linhagens estudadas (Figura 16). A grande maioria das células presentes no infiltrado inflamatório expressou intensa marcação para Mac-1, um ótimo marcador de inflamação, expresso em níveis variados em vários tipos celulares como: macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Flotte *et al*, 1983, Springer *et al*, 1979). A marcação foi muito similar quando utilizamos o anticorpo F4-80 que é específico para macrófagos. Isto indica que macrófagos representam a maioria das células do infiltrado inflamatório nestes animais. Camundongos BALB/c apresentaram infiltrado inflamatório com menor quantidade de macrófagos que os camundongos C57BL6 (figura 16). Em contrapartida não observamos uma marcação expressiva para linfócitos T, tanto CD4+ quanto CD8+. Um dado já esperado porque esta é uma fase inicial e possivelmente essas células ainda não foram ativadas.



**Figura 16: Fenotipagem das células do infiltrado inflamatório da lesão muscular induzida por bupivacaína.**

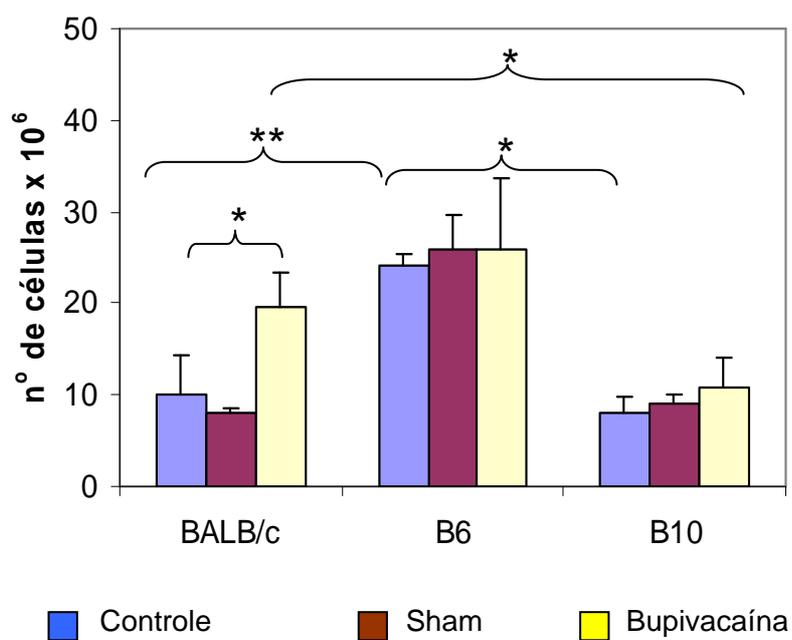
Imuno-histoquímica para os antígenos Mac-1, F4-80, CD4 e CD8 na lesão muscular nos camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B). As setas evidenciam as células com imunomarcação positiva.

#### 4.4 Fenotipagem do Linfonodo de Drenagem

Nesta etapa decidimos investigar se mesmo em um período inicial da lesão muscular ocorreria alguma interferência nos órgãos linfóides de drenagem muscular. Para isso coletamos os linfonodos axilar e braquial que fazem a drenagem do músculo *Triceps brachii* inoculado com bupivacaína e realizamos pela técnica de citometria de fluxo, a marcação para linfócitos B (B220), linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. Além disto analisamos a expressão dos antígenos CD62L, CD44 e CD25 nas subpopulações de linfócitos T.

Os camundongos C57BL6 apresentaram celularidade significativamente maior que os camundongos C57BL10 e BALB/c ( $p < 0,001$  e  $0,05$  respectivamente). Entretanto os animais BALB/c foram os únicos que apresentaram um aumento (1,9 vezes) significativo ( $p < 0,05$ ) entre os grupos sham e inoculados (Figura 17).

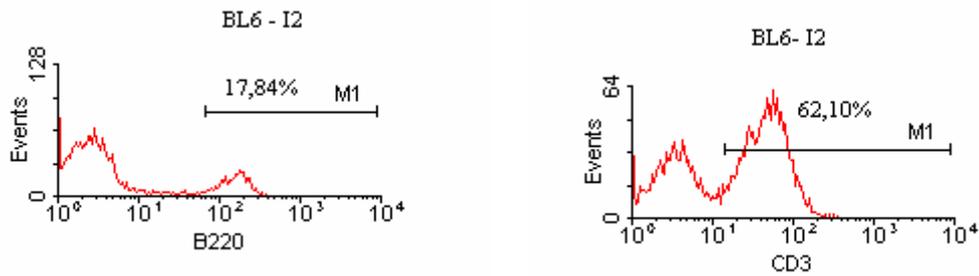
Com a finalidade de quantificar os subtipos de linfócitos T e B utilizamos a marcação com anticorpos específicos para B220 e CD3 respectivamente (Figura 18A). Não observamos diferença significativa no percentual de células marcadas entre os camundongos controle, sham e inoculados. Os camundongos BALB/c foram os únicos que apresentaram um aumento significativo do número absoluto de células B220+ e CD3+ talvez devido a maior celularidade do linfonodo .



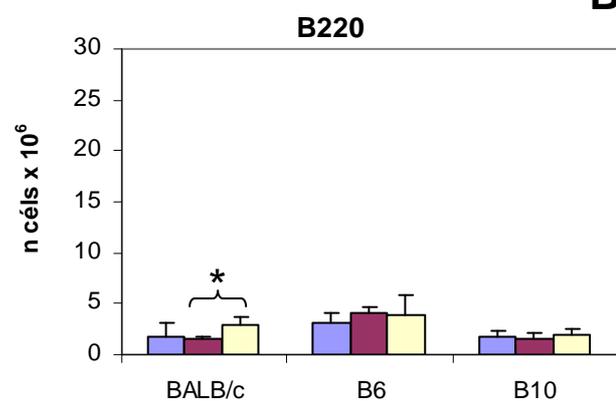
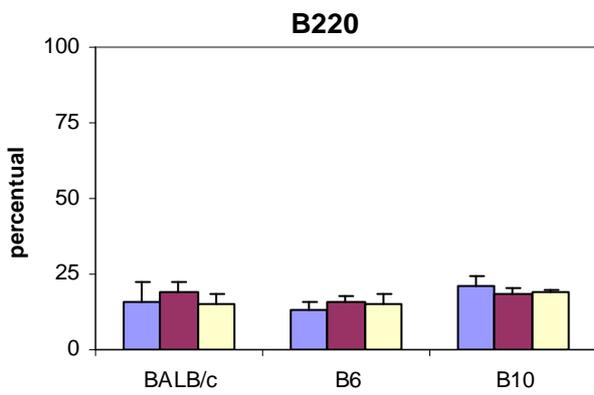
**Figura 17: Celularidade dos linfonodos axilar e braquial**

As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo \* p < 0,05, \*\*p<0,001.

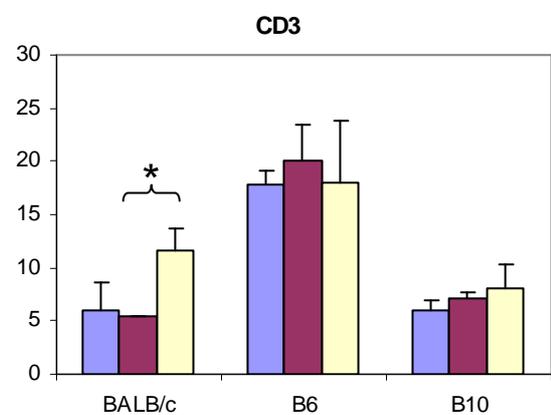
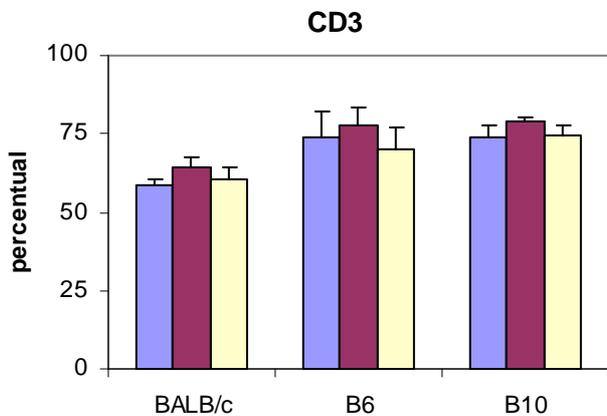
A



B



C



■ Controle      ■ Sham      ■ Bupivacaína

**Figura 18: Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos presentes nos linfonodos de drenagem em 4 dpi.**

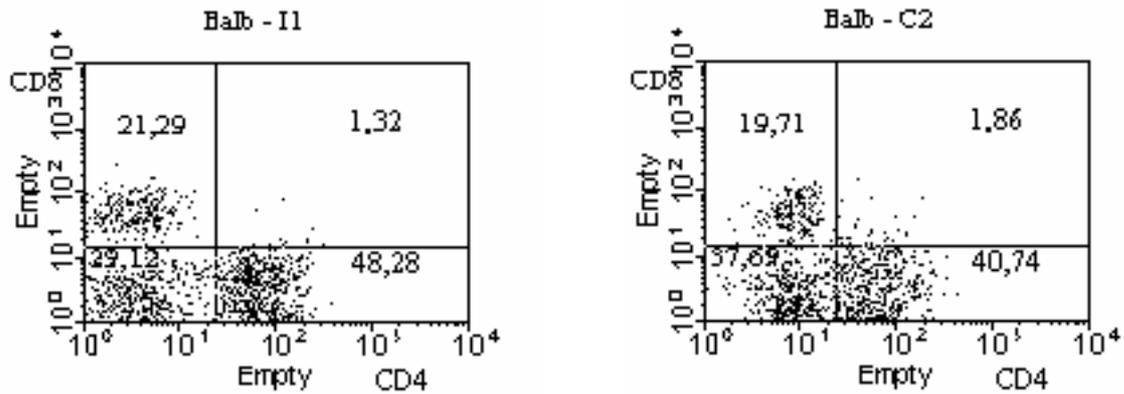
Em A mostramos um histograma com perfil representativo da marcação para B220 e CD3 num camundongo C57BL6 inoculado com bupivacaína.

Os gráficos dos números relativos e absolutos da marcação de B220 e CD3 são mostrados nos painéis B e C respectivamente. As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo \*  $p < 0,05$ .

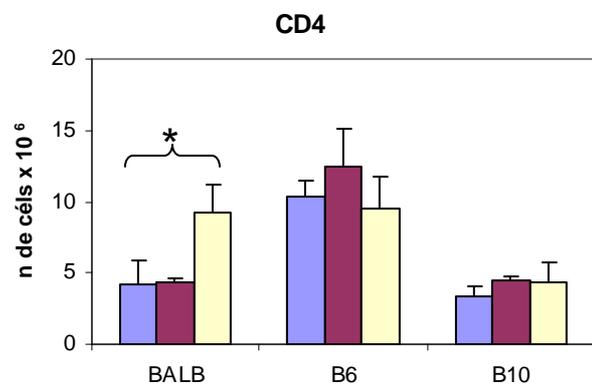
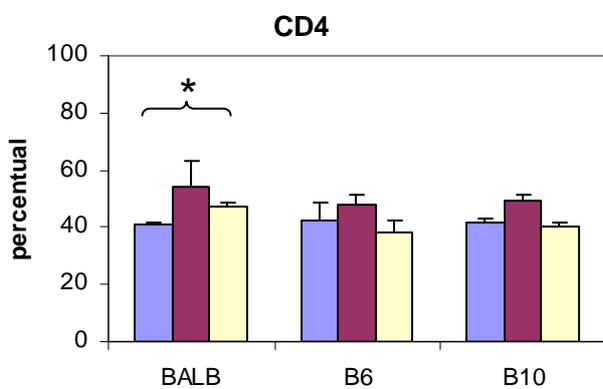
Camundongos BALB/c inoculados com bupivacaína (Figura 19B) apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do percentual de linfócitos T CD4+. Camundongos sham inoculados também apresentaram um aumento no número relativo de linfócitos T CD4+. Não foi observada diferença significativa no número percentual de linfócitos T CD8+ entre o grupo dos animais inoculados e não inoculados em ambas as linhagens estudadas.

Dentre os subtipos de linfócitos T CD4+ verificamos quais deles seriam CD62L+, CD44+ e CD25+ (Figuras 20 e 21). O antígeno CD62 é uma L-selectina, presente principalmente em células virgens, CD25 é um receptor de alta afinidade de IL-2 e marcador de células ativadas e/ou regulatórias e CD44 receptor de ácido araquidônico, um dos marcadores de células de memória. Não foi encontrada diferença significativa nos percentuais das células CD62L+ entre os grupos controle e inoculados (Figura 21). Entretanto o número absoluto de CD62L+ foi 1,4 vezes maior nos camundongos BALB/c inoculados com bupivacaína do que no controle não inoculado sugerindo um maior influxo de células virgens para o linfonodo dos camundongos BALB/c (Figura 21). Foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos números relativos nas subpopulações de células CD44+ e CD25+ entre os grupos inoculados e não inoculados da linhagem BALB/c (Figura 21). Com relação às células CD8+ os únicos resultados que apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) foram para os linfócitos T CD8+CD62L+ dos camundongos BALB/c inoculados em relação ao grupo sham (Figuras 22 e 23).

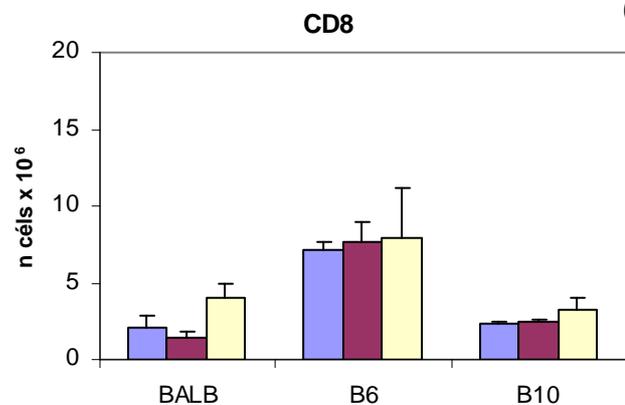
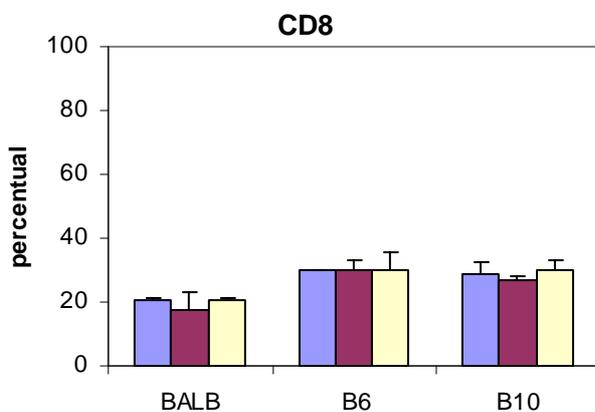
A



B



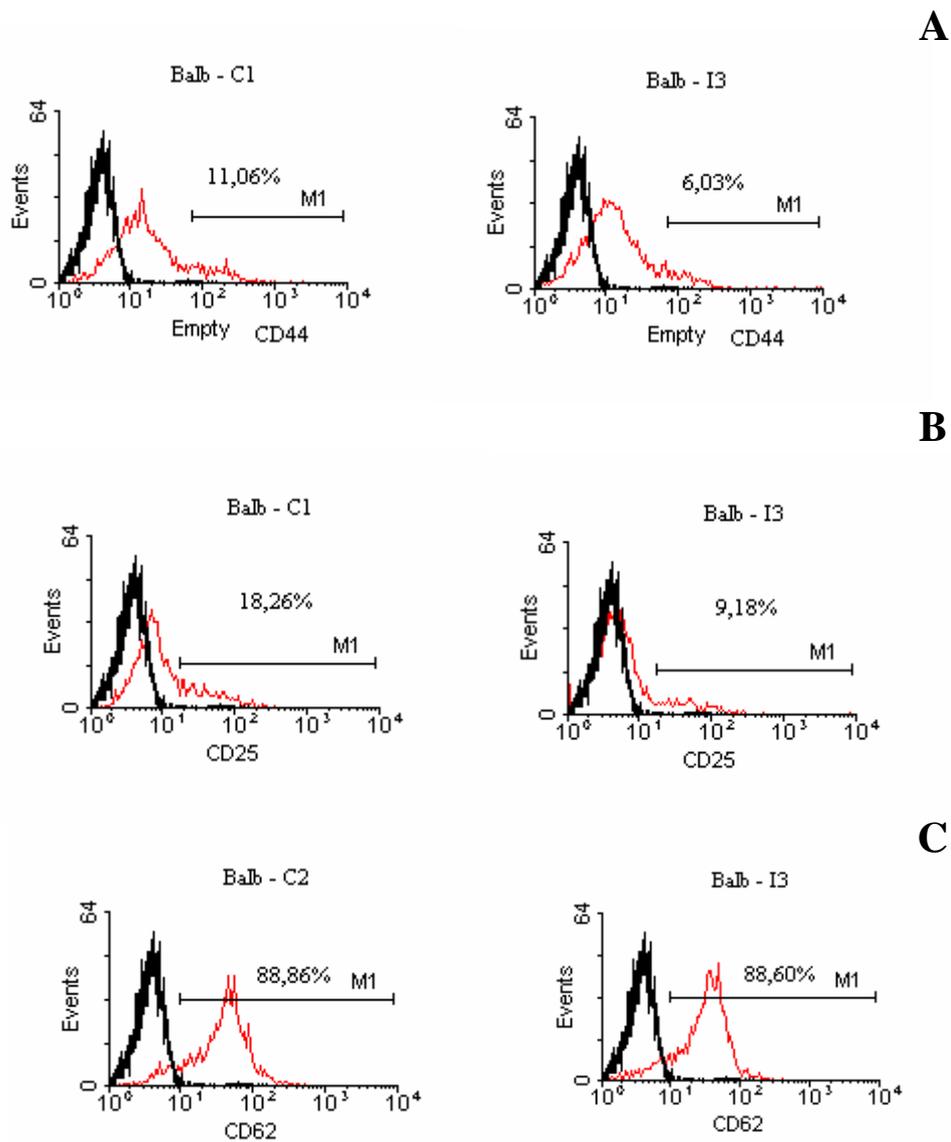
C



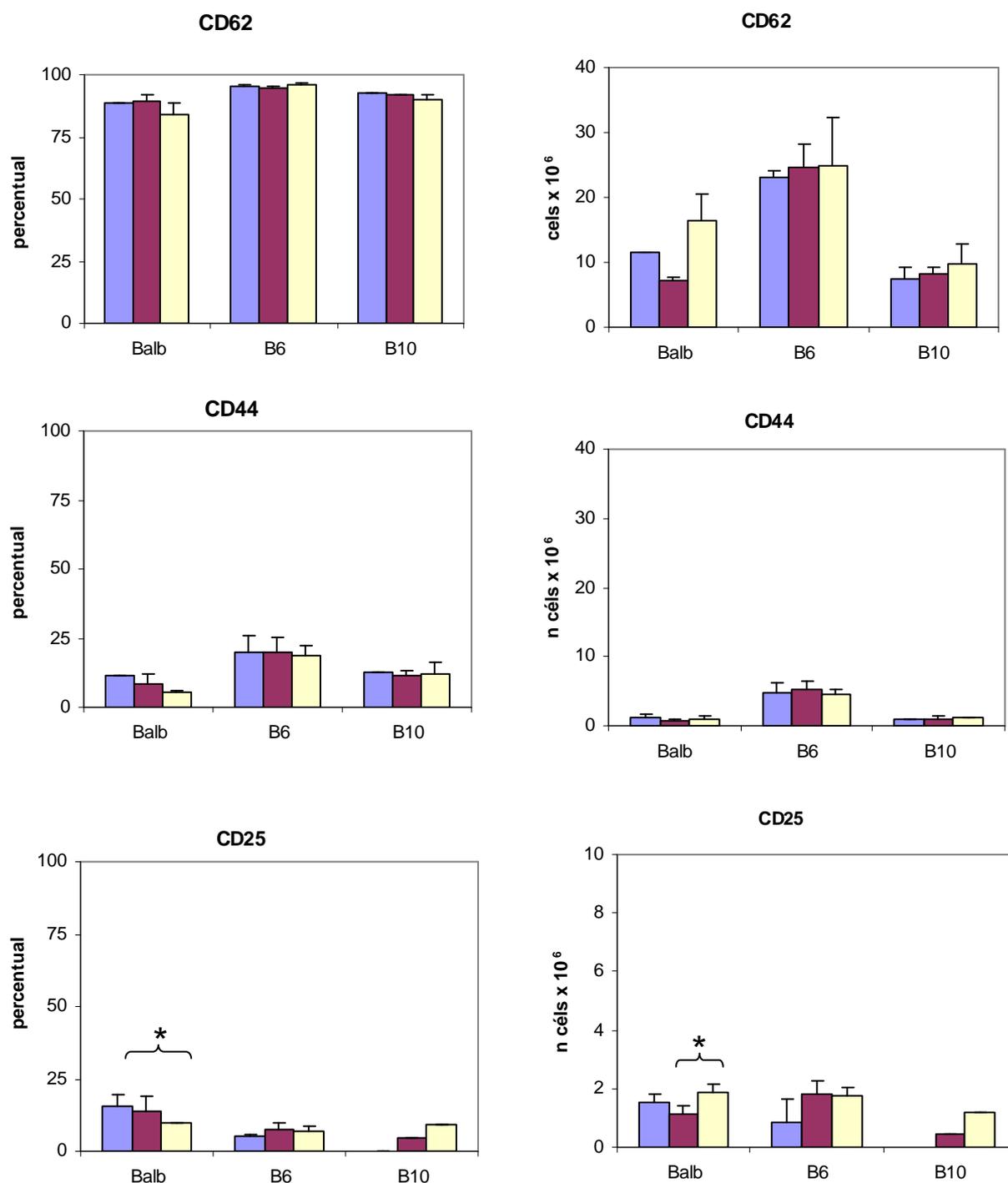
**Figura 19: Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos T presentes nos linfonodos de drenagem em 4 dpi.**

A- mostra um perfil representativo da marcação para CD4 e CD8 dentro da população total no camundongo BALB/c inoculado (i) e controle não inoculado (c)

Em B e C mostramos os gráficos dos números relativos e absolutos da marcação de CD4 e CD8 respectivamente. As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo \*  $p < 0,05$ . As colunas azuis representam os animais controles, vinho os animais sham inoculados e em amarelo os animais inoculados com bupivacaína.

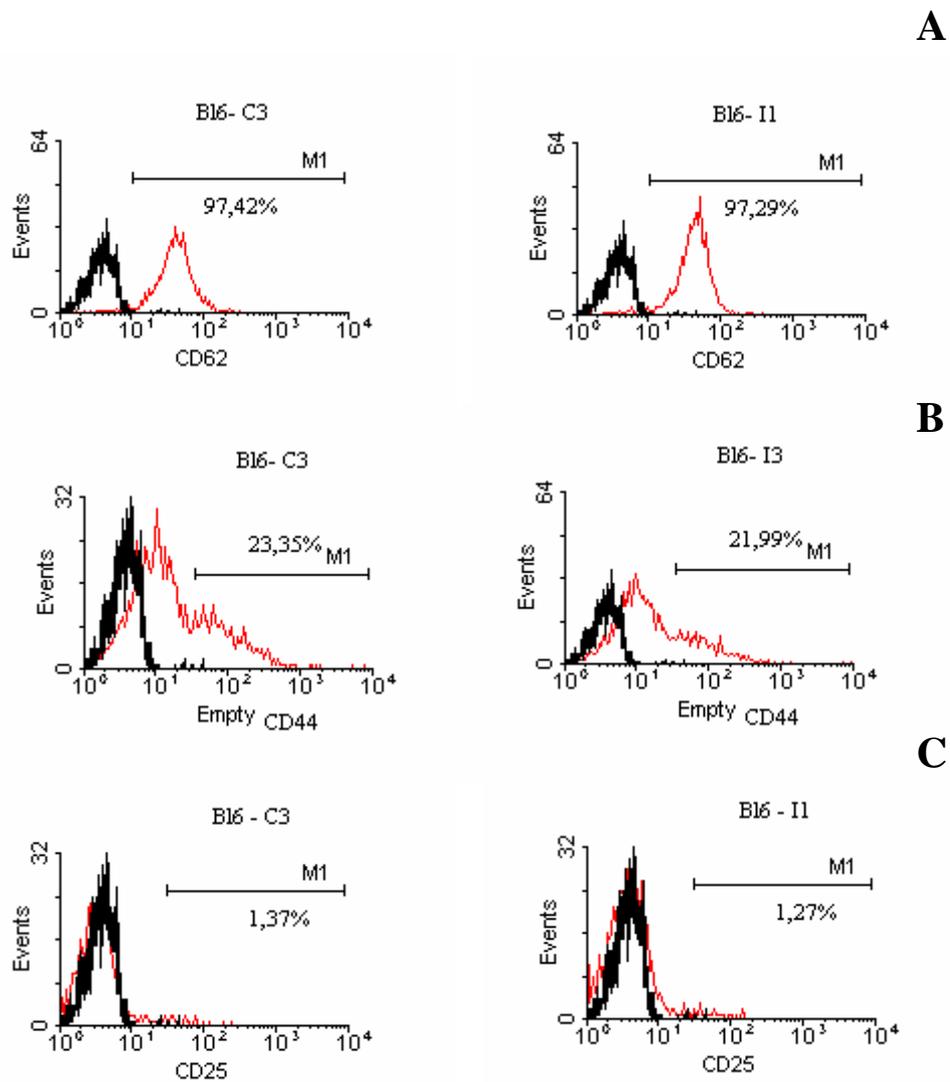


**Figura 20: Perfis representativos da expressão de CD44 (A), CD25 (B) e CD62L (C) nas células T CD4<sup>+</sup> de camundongos BALB/c.**  
C= controle não inoculado I = inoculado



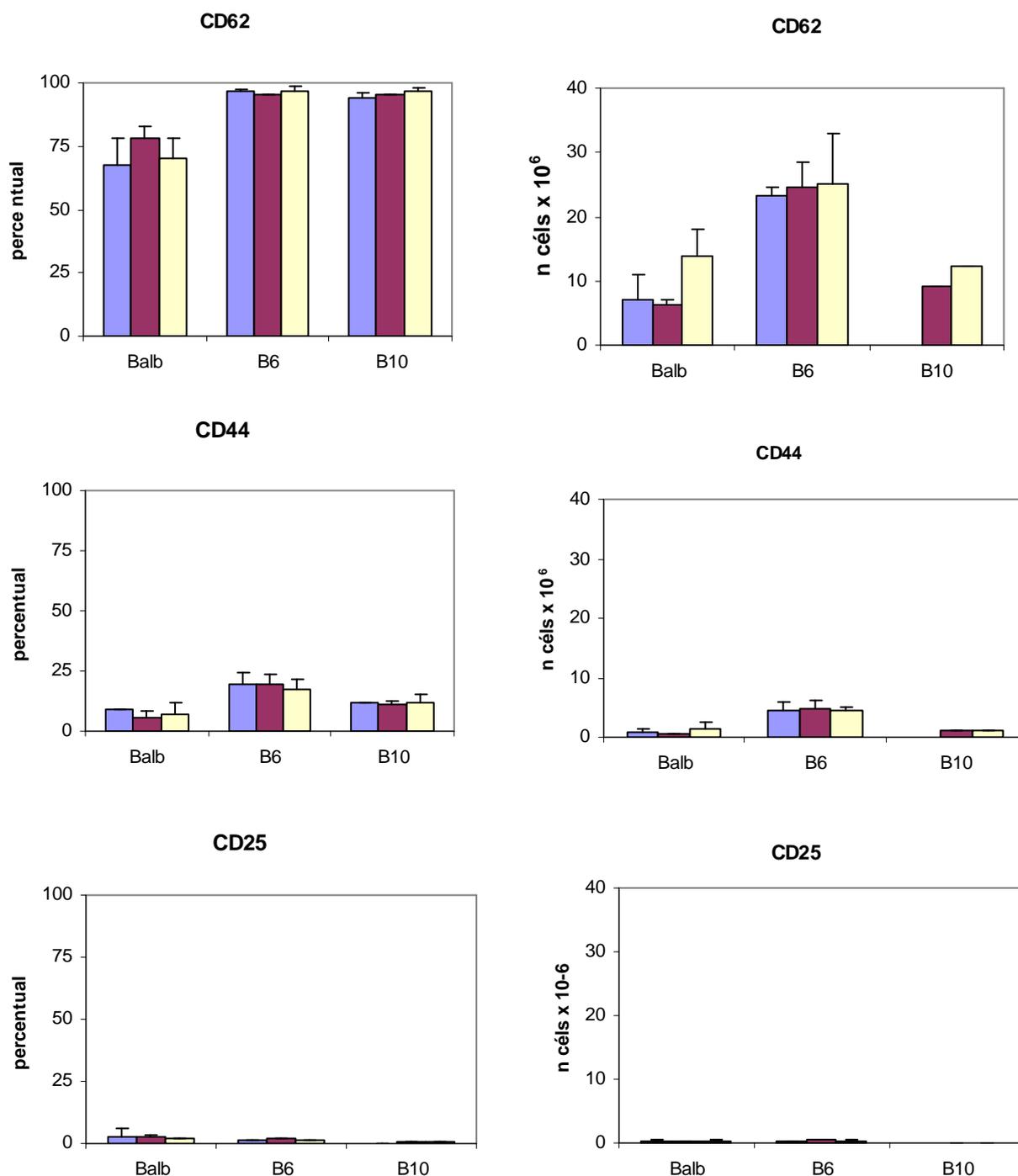
**Figura 21: Análise por citometria de fluxo da expressão dos antígenos CD62L, CD44 e CD25 nas células CD4+.**

São mostrados os números relativos e absolutos da expressão de CD62L (A), CD44 (B) e CD25 (C) As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo \*  $p < 0,05$ . As colunas azuis representam os animais controles, vinho os animais sham inoculados e as amarelas os animais inoculados com bupivacaína. ND = não determinado.



**Figura 22: Perfis representativos da expressão de CD62L, CD44 e CD25 nas células T CD8+ de camundongos C57BL6.**

C= controle não inoculado I = inoculado



**Figura 23: Análise por citometria de fluxo da expressão dos antígenos CD62L, CD44 e CD25 nas células CD8+.**

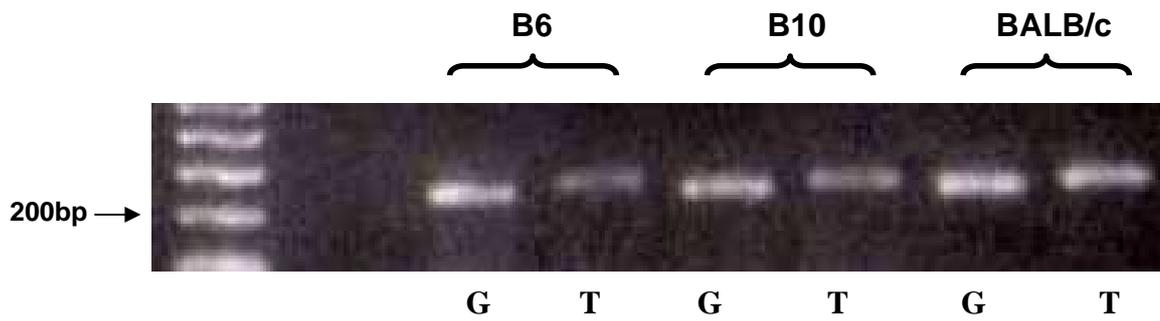
São mostrados os números relativos e absolutos da expressão de CD62L (A), CD44 (B) e CD25 (C) As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo \*  $p < 0,05$ . As colunas azuis representam os animais controles, vinho os animais sham inoculados e as amarelas os animais inoculados com bupivacaína. ND = não determinado.

#### 4.5 Expressão de RNAm para TGF- $\beta$ no músculo esquelético

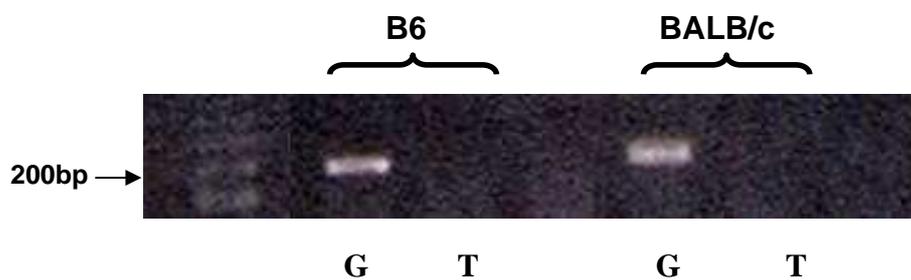
Devido às alterações com relação a expressão de colágeno entre as linhagens resolvemos verificar a expressão de TGF- $\beta$  pelo seu importante papel durante a fase de inflamação e reparo. Para isso coletamos com 1 dia após inoculação com bupivacaína os músculos *Triceps brachii* de camundongos das linhagens C57BL6 e BALB/c. Cada grupo foi formado por no mínimo três animais. A expressão do RNAm para TGF- $\beta$  foi detectada por RT-PCR e sua expressão foi calculada em relação à expressão de proteína constitutiva GAPDH.

Nossos resultados mostraram que em 1 dpi os camundongos C57BL10 e C57BL6 apresentaram expressão de RNAm para TGF- $\beta$  similar aos camundongos controles (figura 24). Com a quantificação (Figura 24C) observamos que os camundongos BALB/c, de perfil Th2 apresentavam uma expressão muito maior (2 vezes em relação ao controle pareado) após a inoculação de bupivacaína. Em 4 dpi, não encontramos a presença de RNAm para TGF- $\beta$  (Figura 24B).

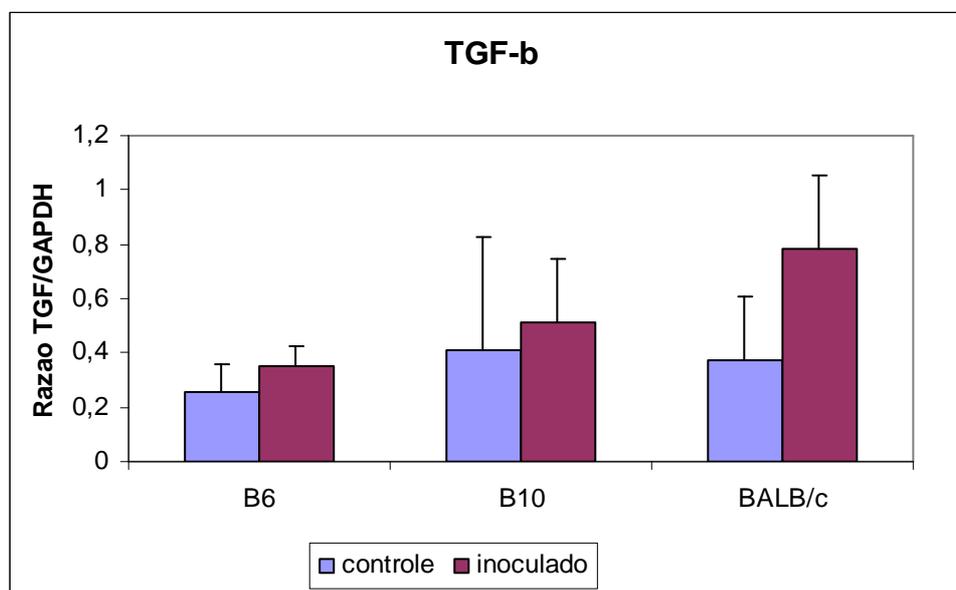
A



B



C



**Figura 24: Expressão de RNA mensageiro para TGF-β no músculo esquelético.**

Na porção superior é mostrado um gel representativo da expressão de RNAm para TGF-β (T) e para o gene constitutivo GAPDH (G) no músculo esquelético após 1 (A) e 4 (B) dias da inoculação da bupivacaína. TGF-β = 260bp e GAPDH = 245bp.

Em C, gráfico representativo da razão da expressão de TGF-β/GAPDH nos músculos inoculados com bupivacaína e nos músculos controles não inoculados. As barras representam a média de três animais e seu respectivo desvio padrão.

## 5. DISCUSSÃO

O reparo tecidual é orquestrado por uma seqüência de eventos bioquímicos e celulares organizados de forma a restaurar a integridade tecidual após a lesão. A participação do sistema imune no reparo de feridas tem sido questionada pela seqüência de migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Park & Barbul, 2004). O estudo em camundongos imunodeficientes tem mostrado que a participação dos componentes do sistema imune vai além da proteção dos tecidos lesionados contra possíveis infecções, reforçando sua participação na manutenção e reparo pela secreção de citocinas e fatores de crescimento (Park & Barbul, 2004; Gawronska-Kozak *et al.*, 2006). Este trabalho teve como objetivo estudar a lesão muscular induzida pela bupivacaína em camundongos apresentando padrão divergente (Th1, Th2) de produção de citocinas. O modelo de lesão muscular induzida pela bupivacaína é muito utilizado para se estudar as diferentes fases do reparo muscular, porque a lesão é autolimitada e permite a regeneração do tecido muscular (Sandri, 2001; Charge & Rudnicki, 2004).

A imunidade inata não específica é um mecanismo imediato importante caracterizado pela participação de leucócitos (tais como neutrófilos, macrófagos, monócitos, plaquetas) e seus mediadores. A resposta imune adaptativa é mais específica e duradoura podendo ser classificada em perfil Th1 e Th2, baseada na secreção de citocinas (Mosmann *et al.*, 1986). Nas células do tipo Th2 predominam as interleucinas 4, 5 e 13, que favorecem a produção de anticorpos pelos linfócitos B e a síntese de colágeno pelos

fibroblastos. Em contrapartida as células do tipo Th1 secretam grandes quantidades de interferon  $\gamma$  e ativam produção de citocinas com atividade pró-inflamatória. Os dois tipos de resposta não agem isoladamente, o equilíbrio na produção das citocinas do tipo Th1 e Th2 é influenciado pelo padrão genético do indivíduo e também pelo microambiente, de modo que alterações nas respostas Th1 e Th2 contribuem para a patogênese de diversas infecções, respostas alérgicas e doenças autoimunes (Wynn, 2004).

Camundongos C57BL6 e BALB/c, com padrão genético imune distinto quanto à produção de citocinas Th1 ou Th2, apresentam fenótipo de resistência ou suscetibilidade à infecção e uma cinética de remodelagem tecidual diferente (Hsieh *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006). Os linfócitos T dos camundongos C57BL6 produzem preferencialmente citocinas do tipo Th1 com mais interferon- $\gamma$  e pouco interleucina 4 enquanto no BALB/c ocorre uma maior produção de citocinas do perfil Th2 (Yu *et al.*, 2006). Neste trabalho, na coloração por HE e no Giemsa, as lesões se apresentaram de forma distintas entre as duas linhagens, sobretudo no quarto dia pós-inoculação. Camundongos da linhagem BALB/c (padrão Th2) apresentaram lesões com maior predomínio de mionecrose do que camundongos C57BL6 e C57BL10 (padrão Th1). Fatores do microambiente poderiam estar protegendo da necrose muscular intensa nos camundongos C57BL10, talvez devido à presença *in situ* de fatores tróficos controlando também o estresse oxidativo. Neste sentido foi relatado que um paciente com distrofia muscular de Becker e artrite apresentava diminuição da enzima creatina quinase associada com o aumento da produção de citocinas inflamatórias durante as crises de agudização da artrite (Maegaki *et al.*, 1999). Em outros modelos de reparo

tecidual, como no sistema nervoso, tem sido mostrado que citocinas produzidas por linfócitos são capazes de induzir proteção da degeneração secundária de neurônios durante a fase do desenvolvimento e após indução de lesão (Otten & Gadiant, 1995; Schwartz & Moalem, 2001; Barouch & Schwartz, 2002). Uma outra possibilidade está relacionada ao fato que a capacidade de gerar respostas Th1 ou Th2 não é somente dependente de linfócitos T (Mills *et al.*, 2000). Neste sentido, foi visto que após estímulo com LPS, macrófagos dos camundongos C57BL6 produzem maiores níveis de TNF- $\alpha$  e interleucina 12 do que os de camundongos BALB/c. A maior produção de IL-12 aumenta os níveis de IFN- $\gamma$  e diminui a produção de IL-13 por linfócitos T CD4+. Além disso, macrófagos de C57BL6 produzem mais enzimas lisossomais e óxido nítrico (Watanabe *et al.*, 2004).

A análise das alterações no microambiente mostrou que os camundongos BALB/c apresentaram maior deposição de colágeno em todas as fases analisadas. No quarto dia pós-inoculação, o percentual da área de lesão ocupada por colágeno era 5,2 vezes maior no camundongo BALB/c em relação ao camundongo C57BL6. A influência do perfil de citocinas na indução de fibrose é evidente no modelo de lesão hepática, onde camundongos BALB/c com padrão Th2 apresentam intensa fibrose ao contrário dos camundongos C57BL6 com padrão típico Th1, que apresentam menos fibrose. O envolvimento das citocinas na indução de fibrose foi mostrado pelo tratamento destes animais com anticorpos neutralizantes para IL-4 ou com IFN- $\gamma$  exógeno resultando na atenuação da fibrose (Shi *et al.*, 1997). Recentemente, foi mostrado que a remodelagem do músculo cardíaco em resposta a hipertensão

também está relacionado com camundongos predispostos ao padrão Th1 ou Th2 (Yu *et al.*, 2006).

Os principais produtores de componentes estruturais da matriz extracelular são os fibroblastos, atualmente reconhecidos como os maiores reguladores da inflamação. Existem três mecanismos principais envolvidos no controle da atividade local dos fibroblastos durante a inflamação e regeneração. As citocinas produzidas pelos subtipos de linfócito Th auxiliar também podem ser sintetizadas por fibroblastos, macrófagos e mastócitos no sítio da lesão. Os próprios fibroblastos são alvo de vários fatores e a natureza das citocinas vai definir a proporção entre reparo e fibrose. As citocinas do tipo Th1 geralmente promovem regeneração normal do tecido enquanto as do tipo Th2 levam a ativação de fibroblastos, produção de colágeno e fibrose (Mescher & Neff, 2005). Dentre as citocinas secretadas durante a resposta do tipo Th2 as IL-4, IL-13 e o TGF- $\beta$  são as maiores responsáveis pela fibrogênese (Wynn, 2004). As alterações no microambiente da lesão muscular nas linhagens C57BL6 e BALB/c foram condizentes com o perfil de citocinas produzidos por estas linhagens bem como pela expressão duas vezes maior de RNAm para TGF- $\beta$  nos camundongos BALB/c. A atividade de TGF- $\beta$ 1 também pode ser regulada pela liberação de TGF ativo da forma latente por vários fatores como: plasminogênio, trombospondina e metaloproteases (Wynn, 2004). Sabendo-se que o TGF- $\beta$  inibe a diferenciação das células miogênicas, acelera a deposição e síntese da matriz extracelular (ECM) e inibe a degradação da mesma (Li *et al.*, 2004; Tidball, 2005), podemos sugerir que TGF- $\beta$  possua participação fundamental nas alterações observadas nos camundongos BALB/c. TGF- $\beta$ 1

está aumentado em vários tecidos lesionados sendo liberado principalmente por linfócitos, células do parênquima local e miofibroblastos (Li *et al.*, 2004).

A remodelagem da ECM durante a degeneração e regeneração do músculo esquelético sugere uma alta regulação da atividade de degradação da matriz durante a regeneração muscular (Carmeli *et al.*, 2004). Nos camundongos C57BL10 com lesão muscular induzida por cardiotoxina, a MMP-9 está muito aumentada durante os primeiros três dias após a inoculação, correspondendo ao pico da inflamação, causada em parte pela presença de macrófagos e neutrófilos (Kherif *et al.*, 1999). As células satélites ativadas presentes na periferia do sítio de injúria são outra possível fonte de MMP-9 (Roach *et al.*, 2002). Neste trabalho mostramos que na fase mais aguda da inflamação, os camundongos com perfil Th1 (C57) apresentaram maior expressão de MMP9, associada à maior degradação de componentes da matriz, facilitando o trânsito de componentes inflamatórios e “limpeza” dos debris. Isto está condizente com o maior infiltrado inflamatório e menor deposição de colágeno evidenciado na histologia nos camundongos C57BL6 e C57BL10. Após o quarto dia da inoculação de bupivacaína, os níveis de MMP-9 diminuíram e a pró-MMP-2 atingiu o auge de sua expressão, talvez pela necessidade da degradação do colágeno tipo IV e outros componentes da membrana basal e a estimulação de células satélites, via fatores de crescimento que são liberados durante o processo (Kherif *et al.*, 1999). Camundongos mdx, modelo murino da distrofia muscular de Duchenne, expressam níveis basais da MMP-9 de forma constante, e a MMP-2 está regulada positivamente tanto na sua forma latente (60kDa) e ativa (55kDa). A presença da forma ativa da MMP-2 sugere um desequilíbrio entre a produção

demetaloprotease e seu inibidor (Kherif *et al.*, 1999). A MMP-2 ativa não foi encontrada no modelo de lesão muscular por bupivacaína possivelmente pelo tamanho reduzido da lesão.

A resposta inflamatória e imunológica além de ajudar na eliminação dos tecidos danificados é essencial para iniciar o reparo tecidual, inclusive favorecendo o transplante de mioblastos (Shäffer & Barbul, 1998; Sicard, 2002; Henry & Garner, 2003; Prisk & Huard, 2003). Devido a isto, foram realizadas marcações por imuno-histoquímica para a caracterização das células do infiltrado inflamatório. Em ambas as linhagens de camundongos estudadas a presença de linfócitos T foi muito escassa na área de lesão muscular. A grande maioria das células foram macrófagos, entretanto camundongos BALB/c apresentaram infiltrado inflamatório com menor quantidade de macrófagos que os camundongos C57BL6. A regeneração muscular é mais lenta em animais mais velhos coincidindo com a diminuição de células fagocíticas e inflamatórias como também em linhagens com menor proporção de fagocitose e remoção de debris celulares (Tidball, 2005). Tratamento de cobaias com soro anti-macrófagos e esteróides para total retirada de monócitos circulantes causou piora na cicatrização (Park & Barbul, 2004). A resposta imune inata difere entre linhagens de camundongos com resposta imune dominante Th1 e Th2. Macrófagos de camundongos BALB/c apresentam menor atividade bactericida e menor produção de citocinas como IL-12 em relação ao C57BL6 (Watanabe *et al.*, 2004).

O papel dos macrófagos durante a lesão e a remodelagem é complexo, por serem ricas fontes de diversos fatores de crescimento e citocinas, grandes produtores de espécies reativas de oxigênio. Eles também são células

apresentadoras de antígenos por isso também regulam a resposta imune celular. A depleção de macrófagos em camundongos distróficos mdx resulta em uma diminuição de 80% na lise da membrana muscular *in vivo* (Tidball, 2005). A ablação de macrófagos e monócitos pela irradiação também prejudica a regeneração muscular pós transplante de células miogênicas. Macrófagos fagocitam e removem debris tissulares e células mortas, inclusive neutrófilos presentes inicialmente na lesão, preparando o ambiente para a formação de uma nova ECM. Ao mesmo tempo essas células também secretam citocinas com atividade mitogênica e angiogênica promovendo o reparo do tecido. Meio condicionado de macrófagos peritoneais induz proliferação de mioblasto *in vitro* assim como a maior expressão de MyoD. Além disto, óxido nítrico (NO) pode ser um importante regulador da inflamação e lesão causada por células inflamatórias, reduzindo a lise de células musculares, a concentração de superóxido no meio e a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular (Mills *et al.*, 2000).

Camundongos BALB/c apresentaram um aumento da celularidade nos linfonodos de drenagem e um aumento do percentual de células T CD4+ expressando CD62L sugerindo aumento do influxo de células do tipo virgem, possivelmente por maior ativação das HEV. Diferenças nas respostas imunológicas e inflamatórias entre reparo e regeneração parece direcionar o curso da resolução de uma injúria tecidual. Linfócitos T, principalmente CD8+ estão associados com fibrose e formação de cicatriz hipertrófica (Castagnoli *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 2000). Além disso, camundongos *nude*, independentemente do seu padrão genético, apresentam uma capacidade

aumentada de reparo com cicatrizes mais finas e quase indistinguíveis dos tecidos adjacentes (Gawronska-Kozak *et al.*, 2006).

## 6. CONCLUSÕES

A compreensão dos processos regulatórios que medeiam a remodelagem muscular pode contribuir para o surgimento de estratégias adequadas nas lesões musculares. Em conjunto este trabalho mostra que:

- A indução de lesão muscular pelo modelo da bupivacaína causou nos camundongos C57 com perfil de citocinas Th1 uma lesão muscular com predomínio de miofibras regenerando e macrófagos enquanto camundongos BALB/c (perfil Th2) apresentaram áreas extensas com mionecrose.
- Camundongos BALB/c apresentaram maior deposição de colágeno na lesão muscular associado com menor atividade de MMP-9 em relação aos camundongos C57BL10 e C57BL6. A produção de RNAm para TGF- $\beta$  também estava aumentada nos camundongos BALB/c sugerindo maior indução de fibrose nestes animais.
- Este trabalho mostra que camundongos com distinto padrão imune de citocinas Th1 e Th2 apresentam diferentes remodelagens do tecido muscular esquelético após inoculação de bupivacaína. Neste contexto, camundongos C57BL6 e BALB/c são bons modelos respectivamente para o estudo da regeneração e fibrose do músculo esquelético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Askari, A. T., Unzek, S., Popovic, Z. B., Goldman, C. K., Forudi, F., Kiedrowski, M., Rovner, A., Ellis, S. G., Thomas, J. D., DiCorleto, P. E., Topol, E. J. & Penn, M. S. (2003). "Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy." *Lancet* 362(9385): 697-703.

Azouz, A., Razzaque, M. S., El-Hallak, M. & Taguchi, T. (2004). "Immunoinflammatory responses and fibrogenesis." *Med Electron Microsc* 37(3): 141-8.

Barbul, A., Sisto, D., Rettura, G., Levenson, S. M., Seifter, E. & Efron, G. (1982). "Thymic inhibition of wound healing: abrogation by adult thymectomy." *J Surg Res* 32(4): 338-42.

Barouch, R. & Schwartz, M. (2002). "Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity." *Faseb J* 16(10): 1304-6.

Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. (2006). "Signaling pathways in skeletal muscle remodeling." *Annu Rev Biochem* 75: 19-37.

Buckingham, M. (2006). "Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates." *Curr Opin Genet Dev* 16(5): 525-32.

- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D. & Relaix, F. (2003). "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." *J Anat* 202(1): 59-68.
- Cardasis, C. A. & Cooper, G. W. (1975). "An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: a satellite cell-muscle fiber growth unit." *J Exp Zool* 191(3): 347-58.
- Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A. Z. & Coleman, R. (2004). "Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review." *Muscle Nerve* 29(2): 191-7.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. (2003). "Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response." *Trends Immunol* 24(9): 474-8.
- Castagnoli, C., Trombotto, C., Ondei, S., Stella, M., Calcagni, M., Magliacani, G. & Alasia, S. T. (1997). "Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues." *Burns* 23(7-8): 565-72.
- Charge, S. B. & Rudnicki, M. A. (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev* 84(1): 209-38.
- Chen, J. C. & Goldhamer, D. J. (2003). "Skeletal muscle stem cells." *Reprod Biol Endocrinol* 1: 101.
- Christ, B. & Ordahl, C. P. (1995). "Early stages of chick somite development." *Anat Embryol (Berl)* 191(5): 381-96.

- Cornelison, D. D. W. & Wold, B. J. (1997). "Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells." *Develop. Biol.* 191: 270-283.
- Cowin, A. J., Brosnan, M. P., Holmes, T. M. & Ferguson, M. W. (1998). "Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse." *Dev Dyn* 212(3): 385-93.
- De la Porte, S., Morin, S. & Koenig, J. (1999). "Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice." *Int Rev Cytol* 191: 99-148.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." *Science* 279: 1528-1530.
- Foster, W., Li, Y., Usas, A., Somogyi, G. & Huard, J. (2003). "Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle." *J Orthop Res* 21(5): 798-804.
- Gawronska-Kozak, B., Bogacki, M., Rim, J. S., Monroe, W. T. & Manuel, J. A. (2006). "Scarless skin repair in immunodeficient mice." *Wound Repair Regen* 14(3): 265-76.
- Gillery, P., Serpier, H., Polette, M., Bellon, G., Clavel, C., Wegrowski, Y., Birembaut, P., Kalis, B., Cariou, R. & Maquart, F. X. (1992). "Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts." *Eur J Cell Biol* 57(2): 244-53.

- Goldman, S., Weiss, A., Eyali, V. & Shalev, E. (2003). "Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour." *Mol Hum Reprod* 9(6): 367-73.
- Granstein, R. D., Murphy, G. F., Margolis, R. J., Byrne, M. H. & Amento, E. P. (1987). "Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse." *J Clin Invest* 79(4): 1254-8.
- Hawke, T. J. & Garry, D. J. (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol* 91(2): 534-51.
- Henry, G. & Garner, W. L. (2003). "Inflammatory mediators in wound healing." *Surg Clin North Am* 83(3): 483-507.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J. & Wynn, T. A. (2001). "Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism." *J Immunol* 167(11): 6533-44.
- Heussen, C. & Dowdle, E. B. (1980). "Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates." *Anal Biochem* 102(1): 196-202.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A. & Murphy, K. M. (1995). "T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro." *J Exp Med* 181(2): 713-21.

- Jarvinen, T. A., Jarvinen, T. L., Kaariainen, M., Kalimo, H. & Jarvinen, M. (2005). "Muscle injuries: biology and treatment." *Am J Sports Med* 33(5): 745-64.
- Johnson, B. J., Halstead, N., White, M. E., Hathaway, M. R., Dicostanzo, A. & Dayton, W. R. (1998). "Activation state of muscle stellite cells isolated from steers implanted with a combined trenbolone acetate and estradiol implant." *J. Anim. Sci.* 76: 2779-2786.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*, Guanabara Koogan.
- Kerr, J. B. (2000). *Atlas de Histologia Funcional*, Artes Médicas.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J. G., Verdiere-Sahuque, M., Fardeau, M. & Alameddine, H. S. (1999). "Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles." *Dev Biol* 205(1): 158-70.
- Kovacs, E. J. & DiPietro, L. A. (1994). "Fibrogenic cytokines and connective tissue production." *Faseb J* 8(11): 854-61.
- Lafreniere, J. F., Mills, P., Tremblay, J. P. & El Fahime, E. (2004). "Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity." *Transplantation* 77(11): 1741-7.
- Lescaudron, L., Peltekian, E., Fontaine-Perus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L. & Parrish, E. (1999). "Blood borne macrophages are essential

for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant." *Neuromuscul Disord* 9(2): 72-80.

Li, M., Carpio, D. F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R. M. & Beg, A. A. (2001). "An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells." *J Immunol* 166(12): 7128-35.

Li, Y., Foster, W., Deasy, B. M., Chan, Y., Prisk, V., Tang, Y., Cummins, J. & Huard, J. (2004). "Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis." *Am J Pathol* 164(3): 1007-19.

Long, M. A., Corbel, S. Y. & Rossi, F. M. (2005). "Circulating myogenic progenitors and muscle repair." *Semin Cell Dev Biol* 16(4-5): 632-40.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-75.

Maegaki, Y., Ogura, K., Maeoka, Y. & Takeshita, K. (1999). "Normalization of creatine kinase level during arthritis in a patient with Becker muscular dystrophy." *Neurology* 52(1): 172-174.

Mauro, A. (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-5.

- Meeson, A. P., Hawke, T. J., Graham, S., Jiang, N., Elterman, J., Hutcheson, K., Dimaio, J. M., Gallardo, T. D. & Garry, D. J. (2004). "Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells." *Stem Cells* 22(7): 1305-20.
- Mescher, A. L. & Neff, A. W. (2005). "Regenerative capacity and the developing immune system." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 93: 39-66.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." *J Immunol* 164(12): 6166-73.
- Morrison, J., Lu, Q. L., Pastoret, C., Partridge, T. & Bou-Guarius, G. (2000). "T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse." *Lab. Invest.* 80(6): 881-891.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* 136(7): 2348-57.
- Muntoni, F., Fisher, I., Morgan, J. E. & Abraham, D. (2002). "Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research." *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1: S162-5.
- Musaro, A., Giacinti, C., Borsellino, G., Dobrowolny, G., Pelosi, L., Cairns, L., Ottolenghi, S., Cossu, G., Bernardi, G., Battistini, L., Molinaro, M. & Rosenthal, N. (2004). "Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1206-10.

- Mussuni, M. D., Favaro, D. & Carraro, U. (1987). "Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regeneration in the absence of nerve." *J. NeuroPathol. And Exp. Neurol.* 46(3): 315-331.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovasc Res* 69(3): 562-73.
- Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. & Sugita, H. (1983). "Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine)." *Acta Neuropathol (Berl)* 60(3-4): 167-74.
- Oliveira, V. R., El-Cheikh, M. C., Aguiar, A. M., Balduino, A., Pinho, M. F. B., Reis, F. L. & Borojevic, R. (2000). "Schistosoma mansoni egg-induced hepatic granuloma in mice deficient for the interferon-gamma receptor have altered population of macrophages, lymphocytes and connective tissue cells." *Microbes Infect.* 2: 1817-1826.
- Otten, U. & Gadiant, R. A. (1995). "Neurotrophins and cytokines--intermediaries between the immune and nervous systems." *Int J Dev Neurosci* 13(3-4): 147-51.
- Park, J. E. & Barbul, A. (2004). "Understanding the role of immune regulation in wound healing." *Am J Surg* 187(5A): 11S-16S.
- Parks, W. C., Wilson, C. L. & Lopez-Boado, Y. S. (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* 4(8): 617-29.

- Peng, H. & Huard, J. (2004). "Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair." *Transpl Immunol* 12(3-4): 311-9.
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K. & Emerson, C. P., Jr. (2002). "Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos." *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 747-83.
- Prisk, V. & Huard, J. (2003). "Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation." *Histol Histopathol* 18(4): 1243-56.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A. & Buckingham, M. (2006). "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." *J Cell Biol* 172(1): 91-102.
- Roach, D. M., Fitridge, R. A., Laws, P. E., Millard, S. H., Varelias, A. & Cowled, P. A. (2002). "Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline." *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23(3): 260-9.
- Rudnicki, M. A., Schlegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. & Jaenisch, R. (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." *Cell* 75(7): 1351-9.
- Sabourin, L. A. & Rudnicki, M. A. (2000). "The molecular regulation of myogenesis." *Clin. Genet.* 57: 16-25.

- Sandler, N. G., Mentink-Kane, M. M., Cheever, A. W. & Wynn, T. A. (2003). "Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair." *J Immunol* 171(7): 3655-67.
- Sandri, M., Sandri, C., Brun, B., Giurisato, E., Cantini, M., Rossini, K., Destro, C., Arslan, P., Carraro, U. (2001). "Inhibition of FasL sustains phagocytic cells and delays myogenesis in regenerating muscle fibers." *J. Leuk. Biol.* 69: 482-489.
- Schwartz, M. & Moalem, G. (2001). "Beneficial immune activity after CNS injury: prospects for vaccination." *J Neuroimmunol* 113(2): 185-92.
- Scott, W., Stevens, J. & Binder-Macleod, S. A. (2001). "Human skeletal muscle fiber type classifications." *Phys Ther* 81(11): 1810-6.
- Shäffer, M. & Barbul, A. (1998). "Lymphocyte function in wound healing and following injury." *British Journal of Surgery* 85: 444-460.
- Shi, X. & Garry, D. J. (2006). "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease." *Genes Dev* 20(13): 1692-708.
- Shi, Z., Wakil, A. E. & Rockey, D. C. (1997). "Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10663-8.
- Sicard, R. E. (2002). "Differential inflammatory and immunological responses in tissue regeneration and repair." *Ann N Y Acad Sci* 961: 368-71.

- Sime, P. J. & O'Reilly, K. M. (2001). "Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment." *Clin Immunol* 99(3): 308-19.
- Szalay, K., Razga, Z. & Duda, E. (1997). "TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin." *Eur J Cell Biol* 74(4): 391-8.
- Talhok, R. S., Chin, J. R., Unemori, E. N., Werb, Z. & Bissell, M. J. (1991). "Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture." *Development* 112(2): 439-49.
- Tidball, J. G. (2005). "Inflammatory processes in muscle injury and repair." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(2): R345-53.
- Warren, G. L., O'Farrell, L., Summan, M., Hulderman, T., Mishra, D., Luster, M. I., Kuziel, W. A. & Simeonova, P. P. (2004). "Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5): C1031-1036.
- Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K. & Matsukawa, A. (2004). "Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains." *Shock* 22(5): 460-6.
- Witte, M. B. & Barbul, A. (1997). "General principles of wound healing." *Surg Clin North Am* 77(3): 509-28.
- Witte, M. B. & Barbul, A. (2002). "Role of nitric oxide in wound repair." *Am J Surg* 183(4): 406-12.

Wynn, T. A. (2004). "Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm." *Nat Rev Immunol* 4(8): 583-94.

Yu, Q., Horak, K. & Larson, D. F. (2006). "Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling." *Hypertension* 48(1): 98-104.

Zammit, P. S., Partridge, T. A. & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). "The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold." *J Histochem Cytochem* 54(11): 1177-91.

Zink, W. & Graf, B. M. (2004). "Local anesthetic myotoxicity." *Reg Anesth Pain Med* 29(4): 333-40.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)