

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DOUGLAS FLORINDO PINHEIRO

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE DA CAVIDADE
PERITONEAL DO CAMUNDONGO *mdx*: POSSÍVEL
IMPLICAÇÃO NA LESÃO DO MÚSCULO DIAFRAGMA**

NITERÓI
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE DA CAVIDADE PERITONEAL DO
CAMUNDONGO *mdx*: POSSÍVEL IMPLICAÇÃO NA LESÃO DO MÚSCULO
DIAFRAGMA**

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.

Orientadores: Jussara Machado Lagrota Cândido
Thereza Quírico dos Santos

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE DA CAVIDADE PERITONEAL DO
CAMUNDONGO *mdx*: POSSÍVEL IMPLICAÇÃO NA LESÃO DO MÚSCULO
DIAFRAGMA**

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.

Aprovada em 18 de Agosto de 2009

BANCA EXAMINADORA



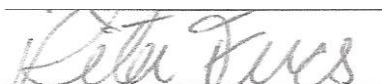
Claudia Sondermann Freitas (INCA)



Maria Bellio (UFRJ)



Maria de Fatima Pinho (UFF)



Rita Fucs (revisora e suplente - UFF)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por não apenas me dar a vida, mas por me ensinar a vivê-la.

A todos os meus amigos da faculdade pelo apoio e por tudo mais.

A todos meus grandes amigos do laboratório em especial a Maria Cristina (em especial mesmo), Guilherme, Rafael, Paulo Emílio, Gabriele, Marcela Salazar, Isabella Mesquita, Ana Lúcia, Kristiane Murad e Eustáquio, pela longa caminhada e pelos bons e maus momentos que passamos juntos.

A professora Rita Fucs que cordialmente disponibilizou o laboratório e anticorpos para alguns experimentos de citometria.

A pesquisadora Andrea Henriques Pons por ceder vários dos anticorpos para citometria de fluxo, o laboratório para realização de alguns experimentos e a doutoranda Cristiane Bani que me ensinou com paciência como operar o citômetro, equipamento primordial neste trabalho.

Ao Alexandre (operador do citômetro da Fiocruz) por sempre arrumar brechas milagrosas nos horários de utilização do citômetro para que pudesse realizar a maioria das minhas longas leituras.

A Regina Caetano, que com muita paciência e gentileza me ensinou muito dos procedimentos de laboratório que conheço hoje.

A Bartira e Nina pela amizade e também pelo excelente trabalho técnico prestado no processamento histológico.

Ao aluno Lian Felipe Pontes de Carvalho que me acompanhou e auxiliou no projeto de mestrado como um aluno e amigo exemplar.

A todos os professores da UFF por sua participação única e esforço exemplar na minha formação enquanto biólogo e mestre.

A professora e ex-orientadora Carla Eponina por me apresentar propriamente ao mundo científico.

A professora Maria de Fátima Pinho pela orientação que não foi menos importante pela informalidade, obrigado por me apresentar ao omento, esse órgão tão peculiar.

As professoras Jussara Machado Lagrota Cândido e Thereza Quirico dos Santos pela exemplar orientação e pela paciência. Agradeço a elas por toda a luta para na medida do possível comprar tudo que precisei durante a elaboração do trabalho e pela dedicação única na correção desta tese em um período tão desfavorável.

SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO.....	I
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	II
AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE SIGLAS	X
EPÍGRAFE	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características gerais das distrofias musculares.....	1
1.1.1. Distrofia muscular de Duchenne	3
1.2. Camundongo <i>mdx</i> - Modelo murino da DMD	6
1.3. Características gerais do tecido muscular	8
1.3.1. Reparo do tecido muscular	14
1.3.2. Progenitores miogênicos.....	16
1.3.3. Influência do microambiente no reparo do tecido muscular	21
1.4. Controle imunoneuroendócrino do reparo tecidual	25
1.5. A cavidade peritoneal e seus sistemas de drenagem.....	31
1.6. O omento.....	33
1.7. As metaloproteinases	35
1.7.1. Importância das metaloproteinases na lesão muscular.....	38
2. RACIONAL	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo geral:	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL & MÉTODOS	42
4.1. Animais.....	42
4.2. Laparotomia e omentectomia	42
4.3. Processamento histológico	43
4.4. Imunohistoquímica.....	43
4.5. Histomorfometria	45
4.6. Citometria de fluxo.....	45
4.7. Preparo do extrato tecidual.....	47
4.8. Zimografia.....	47
4.9. Análise Estatística.....	48
5. RESULTADOS	49

5.1.	Análise histológica do diafragma de camundongos <i>mdx</i>	49
5.2.	Análise histológica do omento do camundongo <i>mdx</i>	54
5.3.	Alterações no microambiente do omento	59
5.4.	Expressão de FGF-2 no omento	60
5.5.	Distribuição Topográfica das Células Linfóides No Omento	64
5.6.	Presença de mastócitos no omento nas diferentes fases da distrofia do camundongo <i>mdx</i>	69
5.7.	Expressão de Sca-1 no omento do camundongo <i>mdx</i>	73
5.8.	Fenotipagem das células do omento do camundongo <i>mdx</i> :.....	75
5.8.1.	Determinação da celularidade do omento.....	75
5.8.2.	Fenotipagem dos linfócitos T	76
5.8.3.	Presença de células NK e NKT no omento e peritônio	85
5.8.4.	Linfócitos B no omento e peritônio de camundongos <i>mdx</i>	88
5.9.	Análise de progenitores no omento e peritônio do camundongo <i>mdx</i>	90
5.9.1.	Análise das células com fenótipo Sca-1 ⁺ B220 ⁺ ckit ⁻	92
5.9.2.	Análise de células com fenótipo Sca-1 ⁺ B220 ⁺ ckit ⁺	93
5.9.3.	Análise de células com fenótipo Sca-1 ⁺ B220 ⁻ ckit ⁺	94
5.9.4.	Análise de células com fenótipo Sca-1 ⁺ B220 ⁻ ckit ⁻	96
5.10.	Atividade de metaloproteinases.....	98
5.10.1.	Atividade das metaloproteinases no diafragma	99
5.10.2.	Atividade das metaloproteinases no lavado peritoneal	101
5.10.3.	Influência da omentectomia na atividade das metaloproteinases	104
6.	DISCUSSÃO	108
7.	CONCLUSÕES.....	131
8.	REFERÊNCIAS	135
9.	ANEXO	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Complexo de distroglicanas e sarcoglicanas e mecanismos envolvidos na DMD.	3
Figura 2- Estrutura do músculo esquelético.	9
Figura 3 - Unidade contrátil da fibra muscular.	12
Figura 4- Miogênese da célula satélite e marcadores típicos de cada estágio de diferenciação muscular.	16
Figura 5- Possíveis repositores de mionúcleos durante a regeneração muscular. ...	17
Figura 6- Influência do microambiente na ativação das células satélites.	24
Figura 7- HMBG1 é um mediador comum de dano tecidual e invasão microbiana. ...	29
Figura 8- Regulação mutua entre MIF e estradiol no reparo tecidual e na oncogênese.	30
Figura 9 - Estrutura molecular das metaloproteinases.	37
Figura 10 - Análise histológica do diafragma de camundongos C57BL/10 corados pelo picrosírius.	50
Figura 11- Análise histológica do diafragma de camundongos <i>mdx</i> corados pelo H-E.	52
Figura 12- Análise histológica do diafragma de camundongos <i>mdx</i> corados pelo picrosírius.	54
Figura 13: Morfologia do omento de camundongos C57BL/10.	54
Figura 14- Morfologia do omento de camundongos <i>mdx</i>	56
Figura 15- Análise histológica do diafragma de camundongo <i>mdx</i> corado por Giemsa.	56
Figura 16- Porcentual da área total ocupada por <i>milk spot</i> e tecido adiposo no omento de camundongos <i>mdx</i>	58
Figura 17- Distribuição das fibras reticulares no omento.	60
Figura 18- Imunomarcacão para FGF-2 no omento de camundongos C57BL/10 com 12 (A) e 24 semanas (B).	62
Figura 19- Imunomarcacão para FGF-2 no omento de camundongos <i>mdx</i>	63
Figura 20- Porcentual de imunomarcacão de FGF-2 no omento.	64
Figura 21- Imunomarcacão para linfócitos no omento de camundongos C57BL/10.	65

Figura 22- Fenotipagem de linfócitos na região de <i>milk spot</i> do omento de camundongo <i>mdx</i>	66
Figura 23- Imunomarcção para B220 no omento do camundongo <i>mdx</i>	67
Figura 24- Dupla marcação para B220(vermelho) e PCNA(preto) no omento.	68
Figura 25 - Fotomicrografia do omento de camundongos machos corados pelo Giemsa.....	70
Figura 26 - Fotomicrografia do omento de camundongos fêmeas corado pelo Giemsa.....	71
Figura 27- Morfometria de mastócitos no omento.....	72
Figura 28- Imunomarcção para Sca-1 no omento de camundongos fêmeas.....	74
Figura 29 - Celularidade do omento.	76
Figura 30- Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos T no omento. ..	79
Figura 31 - Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos T no peritônio.	80
Figura 32 - Análise dos subtipos de linfócitos T no omento e peritônio.....	81
Figura 33 – Análise das populações CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ no omento e peritônio.	82
Figura 34 - Perfil representativo da subpopulação CD4 ⁺ CD25 ⁺ no omento	83
Figura 35 - Análise da expressão do antígeno CD25 nas células CD4 ⁺	84
Figura 36 Presença de células NK e NKT no lavado peritoneal.....	86
Figura 37 - Análise das populações de células NK e NKT no omento e peritônio.....	87
Figura 38 – Análise das células B no omento e peritônio.....	89
Figura 39 - Células progenitoras no omento do <i>mdx</i> com 24 semanas.	91
Figura 40 - Análise dos progenitores Sca-1 ⁺ B220 ⁺ ckit ⁻	93
Figura 41 - Análise dos progenitores Sca-1 ⁺ B220 ⁺ ckit ⁺	94
Figura 42 - Análise dos progenitores Sca-1 ⁺ B220 ⁻ ckit ⁺	96
Figura 43 - Análise de progenitores Sca-1 ⁺ B220 ⁻ ckit ⁻	98
Figura 44 - Atividade das metaloproteinases no diafragma.	100
Figura 45 - Atividade das metaloproteinases no lavado peritoneal.	103
Figura 46- Efeito da omentectomia(OTX) na atividade das metaloproteinases.	106
Figura 47 – Análise densitométrica da atividade de metaloproteinases após omentectomia (OTX).	107
Figura 48 - Sumário das alterações encontradas no omento, diafragma peritônio.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tipos celulares envolvidos na regeneração muscular.....	20
Tabela 2 - Relação dos anticorpos monoclonais utilizados na imuno-histoquímica. .	44
Tabela 3- Relação dos anticorpos e conjugados utilizados na citometria de fluxo....	46

LISTA DE SIGLAS

ATP-	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
B10	C57BL/10
BHLH	<i>Basic-helix-loop-helix</i>
BMP	Proteína morfogênica óssea
BCR	Receptor de célula B
CMD	Distrofia muscular congênita
C-kit	Receptor do fator de crescimento de células tronco
DGC	Complexo de distroglicanos
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
Foxk-1	Forkhead Box -1
FOXP3	Forkhead box P3
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos.
FCR	Receptor da região Fc de imunoglobulina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GATA-3	Fator de transcrição ligador de regiões GATA no DNA
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HMGB1	Proteína do tipo high mobility group Box-1
HSP	Proteína de choque térmico
IGF	Fator de crescimento do tipo insulina

IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
LGMD	Distrofia muscular de cintura e membros
LARGE-1	Proteína semelhante à acetilglucosaminiltransferase
LIF	Fator inibidor de leucemia
MAC-1	Antígeno macrofágico
MadCam-1	Molécula de adesão e adressina de mucosa
MRF	Fator regulador de miogênese
MBP1	Proteína básica principal
MMP	Metaloproteinase de matriz
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MDSC	Células tronco derivadas de músculo
MT-MMP	Metaloproteinase de membrana
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
NK	Célula citotóxica natural
NO	Óxido nítrico
NGF	Fator de crescimento de nervo
NF κ -B	Fator nuclear K β
Oct-4	Octâmero
Otx	Omentectomizado
Pax	<i>Paired Box</i>
PPAR γ	Receptor gama de ativação proliferadora do peroxossoma
PAI	Inibidor do ativador do plasminogênio
ROR- γ	Membro da família de receptores hormonais nucleares relacionados ao receptor órfão de ácido retinóico

Runx2	Fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2
STAT	Sinal de transcrição e tradução
SDF	Fator derivado de célula do estroma
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	<i>Side population</i>
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
Sca-1	Antígeno de célula tronco-1
SSEA	Antígeno embrionário estágio específico
TGF- β 1	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TCR	Receptor de célula T
TACE	Enzima conversora do fator de necrose tumoral- α
T-bet	Membro da família de fatores de transcrição da família T-box
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
V-CAM	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
Wnt	Deriva dos dois primeiros fatores da família descobertos int-1(camundongo) e wingless (drosófila)
WT	Antígeno tumoral de Wilm

EPÍGRAFE

Mau será o dia do homem, quando ele se tornar absolutamente satisfeito com a vida que está levando, quando não estiver mais eternamente nas portas de sua alma batendo um enorme desejo de fazer algo maior.

(Phillips Brooks, pensador do século XVII)

RESUMO

O camundongo *mdx*, modelo animal da distrofia muscular de Duchenne, desenvolve uma miopatia inflamatória recessiva ligada ao cromossoma X, caracterizada por degeneração das miofibras esqueléticas e substituição por tecido conjuntivo. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma relação entre as peculiaridades da cavidade peritoneal com o perfil distinto de remodelagem do diafragma. Foram realizados experimentos *ex vivo* pareados, com camundongos machos e fêmeas *mdx* distróficos e controle C57BL/10 não distrófico com diferentes idades. Os músculos (diafragma, gastrocnêmio), o lavado peritoneal e o omento foram processados para análise morfológica, imunohistoquímica, determinação da atividade da metaloproteinase e citometria de fluxo para identificação de progenitores e perfil fenotípico das populações linfocitárias presentes no microambiente da cavidade peritoneal e do omento. A omentectomia foi utilizada como estratégia para determinar a possível influência do omento na remodelagem tecidual. O diafragma do camundongo *mdx* apresentou infiltrado inflamatório intenso em 5 semanas e 12 semanas, mas intensa atividade das metaloproteinases -2 e -9 em 12 semanas e predominante regeneração das miofibras nos animais com 24 semanas. O omento do *mdx* apresentou-se ativado como evidenciado pela maior área ocupada por *milk spot*, organização estrutural semelhante a órgãos linfóides, inclusive com formação de folículos com centros germinativos e grupos de células fortemente marcadas para o fator de crescimento de fibroblastos FGF-2 a partir de 12 semanas. As principais células mononucleares presentes no omento do *mdx* eram linfócitos B, TCD4⁺, TCD8⁺ e mastócitos, sendo a celularidade mais proeminente nas fêmeas com 24 semanas. A quantidade total de mastócitos no omento foi menor nas fêmeas *mdx* em todas as idades analisadas em relação aos machos *mdx*. O lavado peritoneal do camundongo *mdx* apresentou celularidade elevada formada de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células NKT. Camundongos *mdx* com 12 semanas, no período antecedendo a regeneração do diafragma, apresentaram aumento de células Sca-1⁺B220⁺ckit⁻ e Sca-1⁺B220⁻ckit⁻ no omento e peritônio. A omentectomia no camundongo distrófico afetou profundamente a atividade das metaloproteinases no diafragma, no peritônio e no músculo gastrocnêmio. Os resultados mostram uma persistente ativação do omento e uma possível indicação de sua importância influenciando a inflamação, regeneração e remodelagem muscular, em especial dos músculos diafragma e gastrocnêmio do camundongo com distrofia muscular de Duchenne.

ABSTRACT

Mdx mice, used as a murine model of Duchenne muscular dystrophy, develop a recessive X-linked inflammatory myopathy characterized by progressive degeneration of skeletal muscle fibers and replacement by connective tissue. The present work aimed to establish a relationship between inherent aspects of the peritoneal cavity with the distinct remodeling pattern of diaphragm skeletal muscle. *Ex vivo* experiments were carried out with male and female *mdx* dystrophic and paired control nondystrophic C57BL10 at different ages for analysis of skeletal muscles (diaphragm, gastrocnemius), peritoneal lavage fluid and omentum. Tissues were adequately processed for morphological and immunohistochemistry analysis and metalloproteinase activity. Flow cytometry was performed for identification of progenitors and phenotype characterization of lymphoid cells present within the microenvironment of peritoneal cavity and omentum. Omentectomy was performed to assess the possible influence of the omentum upon tissue remodeling. Diaphragm from *mdx* mice with 5 and 12 weeks-old (wk) had marked inflammatory infiltration, but increased metalloproteinase -2 and -9 activity at 12 wk and predominant regeneration at 24 wk. Omentum from *mdx* mice presented features characteristics of activation, such as large areas with *milk spot* formation, structural organization similar to classic lymphoid organs including follicles, germinative centers and many cells with strong immunolabeling for the fibroblast growth factor FGF-2 at 12 wk. Mononuclear cells present in the *mdx* omento were mainly B lymphocytes, TCD4⁺, TCD8⁺ and mast cells. Females *mdx* mice at 24wk, showed increased cellularity in comparison with males *mdx* mice. Omentum of females *mdx* mice had less mast cells than age-matched males *mdx*. Peritoneal lavage fluid of *mdx* mice had higher percentage of T CD4⁺, CD8⁺ and NKT lymphocytes. *Mdx* mice with 12 wk, in the period previous to regeneration of diaphragm muscle, showed increased numbers of Sca-1⁺B220⁺ckit⁻ e Sca-1⁺B220⁻ckit⁻ in the omento and peritoneal fluid. Omentectomy of *mdx* mice markedly altered the activity of metalloproteinase in the diaphragm, peritoneal fluid and gastrocnemius skeletal muscle. Altogether the results indicate that persistent activation of the *mdx* omento during different ages of the myopathy might exert an important influence upon the physiopathology of muscular inflammation, regeneration and tissue remodeling of the diaphragm and gastrocnemius skeletal muscles of mice with Duchenne muscular dystrophy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais das distrofias musculares

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas que determinam uma contínua perda de fibras musculares decorrentes da deleção e/ou mutação de proteínas estruturais podendo levar a efeitos sistêmicos (Wallace e McNally, 2008). Em geral, as mutações que geram distrofias estão de alguma forma relacionadas com a organização do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (DGC), localizado na porção interna do sarcolema (Figura 1). O complexo DGC composto principalmente por distroglicanas, distrobrevina, sintrofinas, sarcospanas e sarcoglicanas α , β , γ , δ é considerado essencial para a manutenção da função muscular, porque promove interação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (Vachon, Loechel *et al.*, 1996). Na ausência de uma dessas proteínas, o estresse mecânico associado à contração muscular causa degeneração progressiva das fibras musculares.

Distrofia muscular de Duchenne (DMD), causada pela deleção e / ou mutação da distrofina, é a forma mais comum e grave de distrofia que acomete 1 a cada

3500 meninos nascidos vivos. Já a distrofia muscular de Becker, uma variante mais branda, é causada por mutações em regiões do gene sem comprometimento total da molécula, mas com redução na quantidade ou tamanho da distrofina (Nowak e Davies, 2004). Mutações na laminina $\alpha 2$ ou (Rooney, Welser *et al.*, 2006; Wallace e McNally, 2008) glicosil-transferases e proteínas associadas ao complexo de Golgi como a fukutina e a proteína LARGE-1 (*Like Acetylglucosaminyltransferase*) causam a distrofia muscular congênita (CMD) ao romper a interação da laminina ao complexo DGC (Grewal e Hewitt, 2003; Percival e Froehner, 2007; Muntoni, Torelli *et al.*, 2008). Muitas das mutações nos genes do complexo DGC afetam a musculatura dos membros e tronco proximal sendo denominadas de distrofias musculares da cintura e membros (LGMD). Elas podem estar relacionadas a múltiplas mutações no complexo sarcoglicana como também deleções em sistemas de reparo de membrana. Mutações na disferlina, parte integrante desse sistema, torna o sarcolema incapaz de suportar o estresse fisiológico submetido nas fibras musculares (Hernandez-Deviez, Martin *et al.*, 2006; Tidball e Wehling-Henricks, 2007a; Wallace e McNally, 2008).

Além das distrofias associadas ao complexo DGC existem distrofias associadas a moléculas importantes para a manutenção da integridade da membrana nuclear como na distrofia muscular de Emery Dreifuss (Wallace e McNally, 2008) e deleções no gene responsável pela expressão de colágeno tipo IV, importante componente da lamina basal das fibras musculares, como na miopatia de Bethlem (Bernardi e Bonaldo, 2008). O sistema imunológico também pode estar associado com distrofias musculares como na dermatomiosite onde ocorre ativação do sistema imune para antígenos da pele e músculo (Brunelli e Rovere-Querini, 2008).

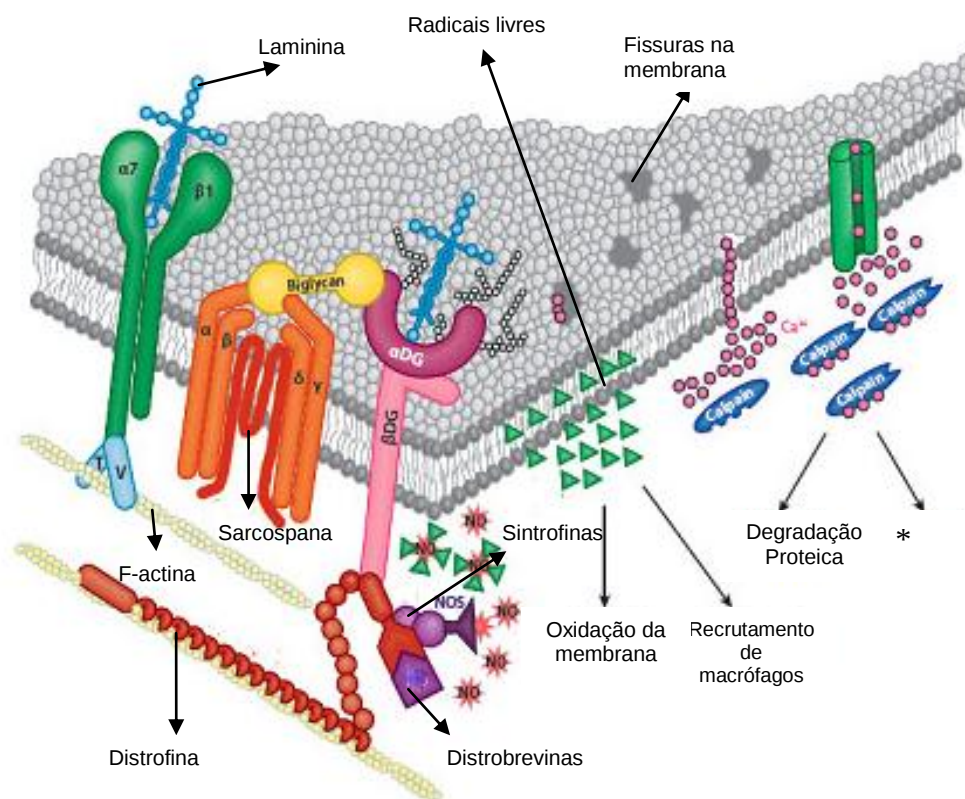


Figura 1- Complexo de distroglicanas e sarcoglicanas e mecanismos envolvidos na DMD.

(Wallace e McNally, 2008).

1.1.1. Distrofia muscular de Duchenne

O sequenciamento e clonagem completa do gene DMD mostrou que mais de 50% da mutação em humanos é caracterizada por extensa deleção no locus Xp21 resultando na não expressão da isoforma 427-kDa da distrofina e/ou formação de uma proteína não funcional com 1/3 do tamanho normal (Kapsa, Kornberg *et al.*, 2003). Esta isoforma está presente normalmente em fibras musculares esqueléticas e em outros tipos celulares como, por exemplo, em algumas populações neuronais (Blake, Weir *et al.*, 2002; Ehmsen, Poon *et al.*, 2002). A grande complexidade do gene da distrofina propicia uma alta taxa de novas mutações, deleções ou

duplicações gênicas que são evidenciadas em um terço dos pacientes com DMD (Hoffman, 1996).

Alguns pacientes com DMD apresentam retardo mental, porém a principal alteração clínica é fraqueza muscular evidente inicialmente por volta de 3 a 5 anos, nos músculos da cintura pélvica e posteriormente nos músculos da cintura escapular. A perda da capacidade de deambular ocorre entre oito a dez anos de idade, havendo a necessidade do uso de cadeira de rodas. A substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e adiposo causa pseudo-hipertrofia dos músculos afetados. A evolução para o óbito ocorre em torno da segunda década de vida, geralmente devido à insuficiência cardíaca ou respiratória (Anderson, Head *et al.*, 2002; Jejurikar e Kuzon, 2003). As características histológicas do músculo distrófico no início da doença são os inúmeros focos de mionecrose, intenso infiltrado inflamatório, miofibras hipertróficas com tamanhos variados e altos níveis de creatina quinase no soro. Os ciclos repetidos de degeneração e regeneração esgotam a capacidade regenerativa das células satélites levando à substituição progressiva do tecido muscular contrátil por tecido fibroso (Collins e Morgan, 2003; Wallace e McNally, 2008). As miofibras também apresentam sarcoplasma grosseiramente granular e vacuolizado com fragmentação e nucleação central.

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DMD ainda continuam pouco compreendidos, sabe-se que a ausência da distrofina gera instabilidade na membrana acarretando numerosas fissuras e aumento no influxo de íons Ca^{+2} atingindo níveis tóxicos (Figura 1). A desestruturação do citoesqueleto também acarreta numa desorganização dos receptores na membrana alterando os gradientes de Ca^{+2} e outros íons (Grounds, 2008; Wallace e McNally, 2008) Outra possibilidade seria uma diminuição de NOS (óxido nítrico sintase) que está

diretamente ancorado nas sintrofina do complexo DGC, levando à alteração na produção de NO (óxido nítrico), determinando alteração no tônus vascular e aumento no estresse oxidativo (Tidball e Wehling-Henricks, 2007b). Isto, juntamente com altos níveis de Ca^{+2} levaria a alterações importantes na função das mitocôndrias e ativação da via mitocondrial de apoptose (Kuo, Zhu *et al.*, 2002; Wallace e McNally, 2008). Algumas evidências apontam para desorganização na distribuição de complexos de Golgi nas miofibras distróficas, o que determinaria alteração do padrão de glicosilação do complexo de distroglicanas (Percival e Froehner, 2007; Bernardi e Bonaldo, 2008). Uma outra hipótese seria uma resposta autoimune mediada por linfócitos CD4^{+} e CD8^{+} agravando o processo (Spencer, Montecino-Rodriguez *et al.*, 2001; Spencer e Tidball, 2001; Wagner, 2008).

Até o momento não existe uma terapia curativa para os pacientes com DMD, no entanto, novas estratégias de tratamento alteraram o curso da doença aumentando a expectativa de vida dos pacientes que agora ultrapassa a segunda década de vida (Skuk, Vilquin *et al.*, 2002; Wagner, Lechtzin *et al.*, 2007; Wagner, 2008). A terapia gênica somática com mioblastos transfectados com o gene da distrofina surgiu como uma esperança para o tratamento da DMD. Contudo, existem várias dificuldades nesse tipo de tratamento, como a obtenção de um vetor apropriado para um gene tão grande como o da distrofina, a expressão limitada de distrofina numa pequena área próxima à inoculação e a meia-vida curta do mioblasto transfectado (Howell, 1999). Nos últimos anos tem sido testada a transfecção de genes de microdistrofina, que codificam moléculas de distrofina bem menores, porém mantendo os sítios críticos para a função biológica da molécula e vetores sobrepostos, onde a molécula seria transfectada por dois vetores cujas sequências

se completariam por recombinação para formar a distrofina inteira (Wagner, Lechtzin *et al.*, 2007).

Recentemente foi identificado que o antibiótico gentamicina apresenta a capacidade de promover a transposição ao acaso de alguns códons de terminação, um efeito colateral que pode ser usado em doenças causadas por mutações que geram terminação prematura de proteínas como a DMD e a fibrose cística (Barton-Davis, Cordier *et al.*, 1999; Wagner, Hamed *et al.*, 2001; Politano, Nigro *et al.*, 2003; Aurino e Nigro, 2006; De Luca, Nico *et al.*, 2008).

Outra estratégia é a administração de oligonucleotídeos que pareiem especificamente com regiões de terminação alterando a clivagem e promovendo a transposição de códons de terminação no RNA da distrofina restaurando a expressão da molécula (Vitiello, Bassi *et al.*, 2008). Outra possibilidade terapêutica é o transplante de células progenitoras oriundas de diversas regiões do organismo adulto ou de embriões (Ferrari, Cusella-De Angelis *et al.*, 1998; Peault, Rudnicki *et al.*, 2007; Habib, Caspi *et al.*, 2008).

1.2. Camundongo *mdx* - Modelo murino da DMD

O camundongo distrófico *mdx*, mutante de uma colônia de C57BL/10 ScSn, apresenta uma mutação pontual na região HqBpa do cromossomo X (Smith e Schofield, 1994), ocasionando a substituição de uma Citosina por Timina no par de nucleotídeos 3185 do exon 23 do gene da distrofina. Isto determina um código de terminação no lugar da Glutamina, gerando uma proteína truncada com 27% do tamanho normal que não é estável (Sicinski, Geng *et al.*, 1989). O camundongo *mdx* apresenta níveis muito elevados da enzima creatina quinase no soro, o que indica

extensa degeneração muscular. Contudo, esses animais desenvolvem fenótipo benigno da doença com poucos sintomas clínicos aparentes, apresentando sobrevida praticamente normal e regeneração eficiente do tecido muscular (Bulfield, Siller *et al.*, 1984).

O músculo do *mdx* apresenta poucas alterações histológicas no período pós-natal, porém logo após o desmame, inicia-se a fase de mionecrose extensa (Cullen e Mastaglia, 1980) acompanhada por intenso infiltrado inflamatório constituído principalmente de macrófagos, linfócitos T e raros linfócitos B (Mcdouall, Dunn *et al.*, 1990; Spencer, Walsh *et al.*, 1997; Lagrota-Candido, Vasconcellos *et al.*, 2002). Na oitava semana de vida pós-natal, a mionecrose é parcialmente compensada pela regeneração da miofibra, sendo evidente um número elevado de fibras regeneradas com nucleação central (Nonaka, 1998). Nos camundongos *mdx* adultos com 24 semanas, ainda ocorre uma discreta mionecrose com redução na regeneração e aumento na fibrose. Contudo após 52 semanas de vida pós-natal, os camundongos *mdx* apresentam um declínio significativo do peso corporal e da massa muscular (Lefaucheur, Pastoret *et al.*, 1995). As fibras musculares do *mdx* idoso apresentam grande variação no tamanho, inclusive com miofibras atrofiadas, fragmentadas e aumento da fibrose no endomísio (Lefaucheur, Pastoret *et al.*, 1995; Lagrota-Candido, Vasconcellos *et al.*, 2002).

Existem camundongos *mdx* com fenótipos diferenciados que foram originados por outras mutações no gene da distrofina. O camundongo *mdx* nocaute para o exon 52 da distrofina (*mdx*⁵²) foi gerado para não permitir a expressão das quatro isoformas de distrofina e apresenta uma doença muito mais grave e menos fibras revertans, fibras que ao acaso e por mecanismos não bem elucidados expressam isoformas levemente menores, porém funcionais da distrofina. A linhagem *mdx*^{5cv} foi

criada com fenótipo alterado pelo tratamento com etilnitrosourea gerando um sítio de quebra aberrante no exon10 determinando a eliminação completa da expressão da distrofina (Haslett, Kang *et al.*, 2005; Grounds, Radley *et al.*, 2008).

Dados prévios do nosso grupo (Salimena, Lagrota-Candido *et al.*, 2004) mostraram que camundongos *mdx* machos e fêmeas apresentavam diferenças no processo de regeneração muscular nas diferentes fases da doença. As fêmeas apresentavam menor inflamação e mionecrose com maior regeneração muscular e deposição de tecido adiposo que os camundongos machos na idade adulto jovem (6 semanas pós-natal), porém a fibrose era mais graves nas fêmeas adultas (24 semanas). Estes dados sugeriram que hormônios femininos seriam particularmente responsáveis pelas diferenças na lesão muscular do camundongo *mdx*, favorecendo a resolução da mionecrose e promovendo a regeneração dos músculos esqueléticos.

1.3. Características gerais do tecido muscular

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 de comprimento. Cada fibra muscular é revestida por uma camada de tecido conjuntivo chamado endomísio e agrupada em feixes mantidos juntos por outra camada de tecido conjuntivo, o perimísio. Esse grupo revestido ou feixe de fibras é denominado fascículo. Os grupos de fascículos com feixes de fibras, cada qual com vascularização sanguínea e tecido nervoso associado, 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 2).

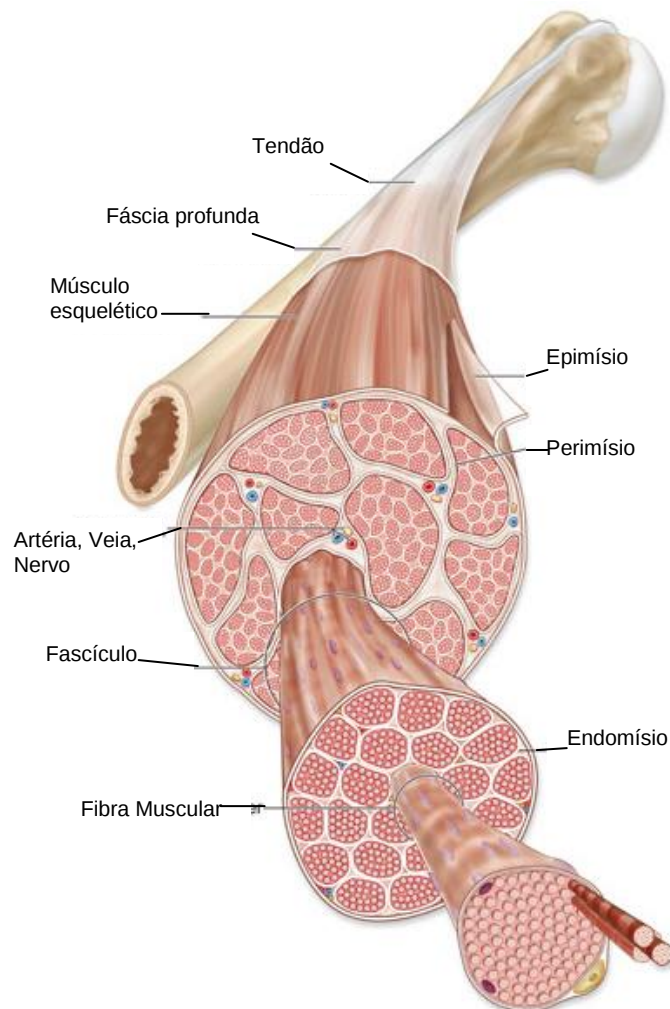


Figura 2- Estrutura do músculo esquelético.

(modificado a partir de http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/muscular.htm – acessado em agosto de 2006).

O fásia 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, ligamentos e, também influencie na distribuição dos vasos sanguíneos, linfáticos e inervação(Junqueira, 2004). 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.

O músculo esquelético é formado por células cilíndricas alongadas com núcleos periféricos. As células musculares esqueléticas (fibras musculares) encontram-se dispostas em paralelo, o sarcoplasma é preenchido principalmente por fibrilas paralelas, as miofibrilas, que ao microscópio ótico aparecem como estriações transversais, pela alteração de faixas claras e escuras (David Randall, 2000). A estriação da miofibrila deve-se à repetição de unidades iguais, chamadas sarcômeros. Cada sarcômero, formado pela região da miofibrila compreendida entre duas linhas Z sucessivas com uma banda A separando duas semibandas I (Figura 3), é constituído de filamentos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente (Tortora, 2005). Essa organização é mantida por diversas proteínas, como a desmina que liga as miofibrilas umas às outras e a distrofina que liga os filamentos de actina às proteínas integrais da membrana plasmática (Michele e Campbell, 2003). Para a contração muscular ocorrer, é necessário que as cabeças das miosinas puxem os filamentos finos deslizando-os para a direção central do

sarcômero, ocasionando o encurtamento do sarcômero sem o encurtamento (em comprimento) dos filamentos {Maughan, 2000}.

As miofibras são heterogêneas no tamanho, no metabolismo e na função contrátil. Isto 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, Stevens *et al.*, 2001).

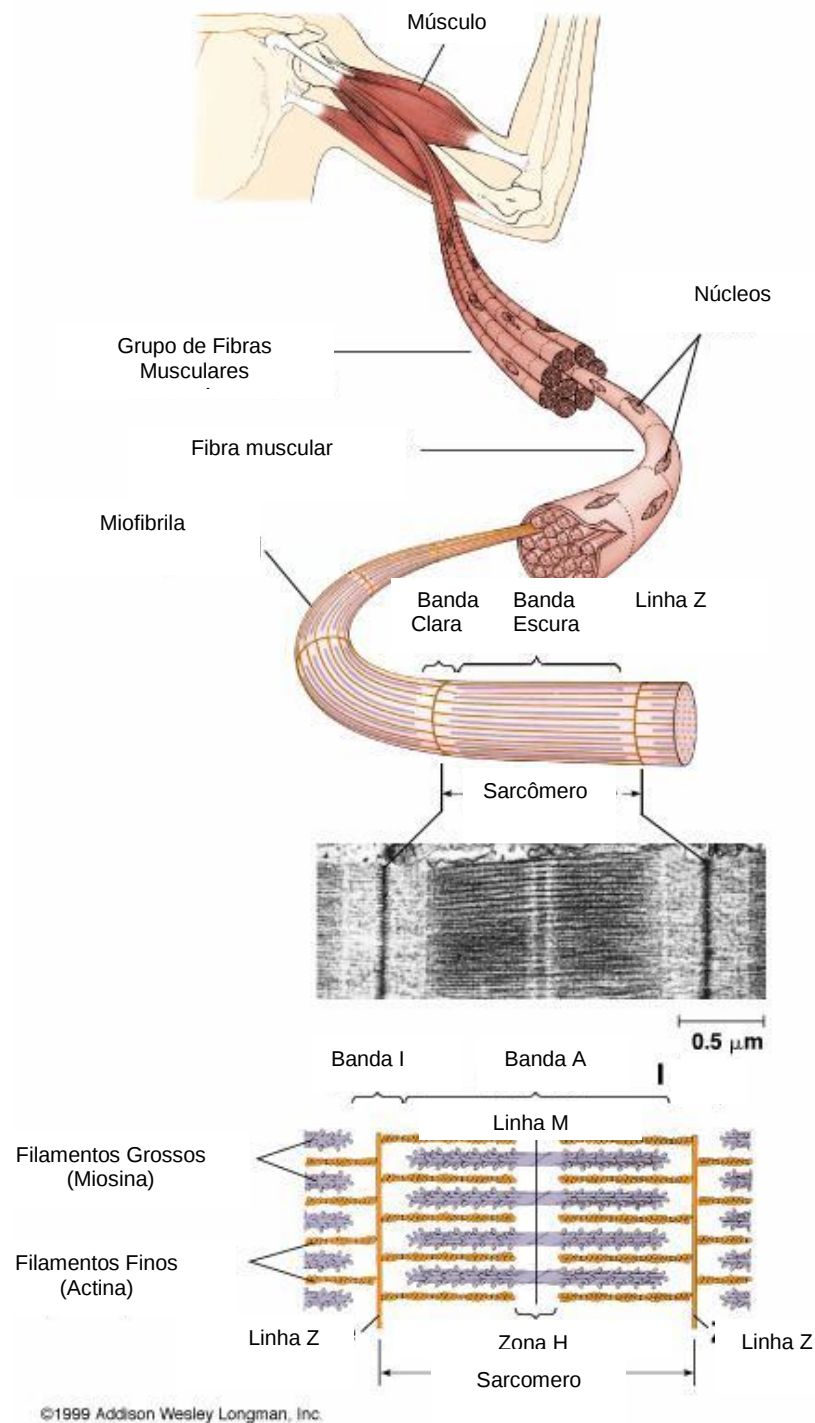


Figura 3 - Unidade contrátil da fibra muscular.

Modificado a partir de http://fajerpc.magnet.fsu.edu/Education/2010/Lectures/37_Muscle_System_files/image010.jpg (acessado em 03/02/2009).

O processo de formação do tecido muscular é complexo e envolve diferentes processos de sinalização intracelular que levam a ativação de programas gênicos específicos, bem como a migração e a diferenciação de mioblastos. Os fatores de transcrição da família Pax são caracterizados pela presença de um domínio de ligação ao DNA composto por 128 aminoácidos altamente conservados (*“paired box”*) e estão envolvidos no comprometimento e proliferação de diversos grupos de progenitores (Christophe, 2004; Kozmik, 2005; Singh, Pongubala *et al.*, 2007). No tecido muscular os fatores de transcrição Pax3 e Pax7 estão diretamente envolvidos com o comprometimento de precursores celulares com a linhagem muscular (Yan, Choi *et al.*, 2003; Charge e Rudnicki, 2004), sendo o Pax3 mais diretamente relacionado com progenitores embrionários do que Pax7. Camundongos deficientes de Pax3 não apresentam células capazes de migrar dos somitos para povoar os membros e gerar músculos, enquanto animais deficientes de Pax7 apresentam miogênese embrionária normal, porém com uma profunda deficiência de células satélites e de regeneração muscular (Charge e Rudnicki, 2004; Holterman e Rudnicki, 2005). As poucas células satélites desses animais são altamente susceptíveis à apoptose, sugerindo que Pax-7 possua um importante papel anti-apoptótico (Relaix, Montarras *et al.*, 2006). Além disso, foi mostrado que células CD45+Sca1+ de camundongos nocautes para Pax 7 são incapazes de se diferenciar em mioblastos (Peault, Rudnicki *et al.*, 2007). Esses genes também estão associados com a manutenção do estado de quiescência visto que sua expressão é diminuída com a saída do ciclo celular e indução da diferenciação das células musculares (Holterman e Rudnicki, 2005; Kassam-Duchossoy, Giaccone *et al.*, 2005; Zammit, Partridge *et al.*, 2006; Buckingham e Montarras, 2008).

Os fatores reguladores miogênicos (MRF) pertencem a uma família de fatores de transcrição que apresenta um domínio básico *hélice-alça-hélice* e desempenha papel fundamental na diferenciação das células musculares. A família MRF compreende MyoD (Myf-3), Myf-5, miogenina (Myf-1) e MRF4 (Myf-6/Herculin) (Sabourin e Rudnicki, 2000). Myf5 é o primeiro fator expresso na região dorsomedial do dermatomiotoma, gerando os músculos epiaxiais; enquanto o fator MyoD é expresso posteriormente nas células ventrolaterais gerando os músculos hipoaxiais (Rescan, 2001). Células expressando miogenina aparecem posteriormente à expressão de MyoD e Myf5 durante a formação do miotoma. O MRF4 apresenta uma expressão bifásica sendo importante na diferenciação tardia das miofibras sendo induzido posteriormente à expressão de miogenina na fase de ativação das células do somito e também durante a formação das fibras secundárias juntamente com a fase de inervação. Estes dois últimos são considerados fatores de diferenciação terminal e antecedem a expressão de antígenos musculares de fibras maduras como a creatina quinase e a cadeia pesada de miosina (MHC) (Charge e Rudnicki, 2004). Aparentemente o MRF4 é fundamental na vida embrionária, enquanto miogenina é importante durante toda a vida (Zammit, Partridge *et al.*, 2006; Manceau, Gros *et al.*, 2008).

1.3.1. Reparo do tecido muscular

O músculo esquelético de mamíferos tem capacidade de regeneração rápida e extensa em resposta a injúria grave devido a defeitos genéticos e/ou atividade física intensa. O processo de regeneração muscular é complexo, caracterizado por fases de degeneração, reparo e remodelagem. A necrose das fibras musculares pode ser

considerada o evento inicial da degeneração muscular, iniciado geralmente pela ruptura do sarcolema resultando em aumento da permeabilidade e ruptura da miofibrila, que se reflete pelo aumento dos níveis séricos da proteína muscular creatina quinase (Jarvinen, Jarvinen *et al.*, 2005). Na fase de reparo, ocorre fagocitose do tecido lesionado, regeneração das miofibrilas, formação do tecido cicatricial e revascularização. A remodelagem é caracterizada pela contração e reorganização do tecido cicatricial e recuperação da capacidade funcional do músculo (Peng e Huard, 2004).

Na fase inicial da lesão muscular geralmente ocorre ativação de células mononucleares, principalmente células inflamatórias e 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 e Rudnicki, 2004). Diversos fatores liberados do sítio de injúria ativam e promovem a quimiotaxia de células inflamatórias residentes e não residentes. No músculo lesionado por miotoxinas, neutrófilos constituem o primeiro tipo celular a invadir a área lesada, enquanto macrófagos predominam nas 48 horas subseqüentes (Tidball, 2005).

Apesar de certas peculiaridades, o processo de reparo muscular é nitidamente uma retomada do processo de desenvolvimento muscular que envolve ativação de vários genes em comum. Células satélites quiescentes expressam Pax7, CD34, enquanto Myf5 está envolvido na proliferação de mioblastos adultos. A sua não expressão em camundongos leva a um acúmulo de adipócitos em lesões induzidas, hipertrofia de fibras, atraso na diferenciação e discreta degeneração muscular (Gayraud-Morel, Chretien *et al.*, 2007). A ativação de células satélites é marcada pela expressão de MyoD, enquanto a expressão de miogenina ocorre

tardiamente durante a fusão e diferenciação (Zammit, Partridge *et al.*, 2006) – ver Figura 4.

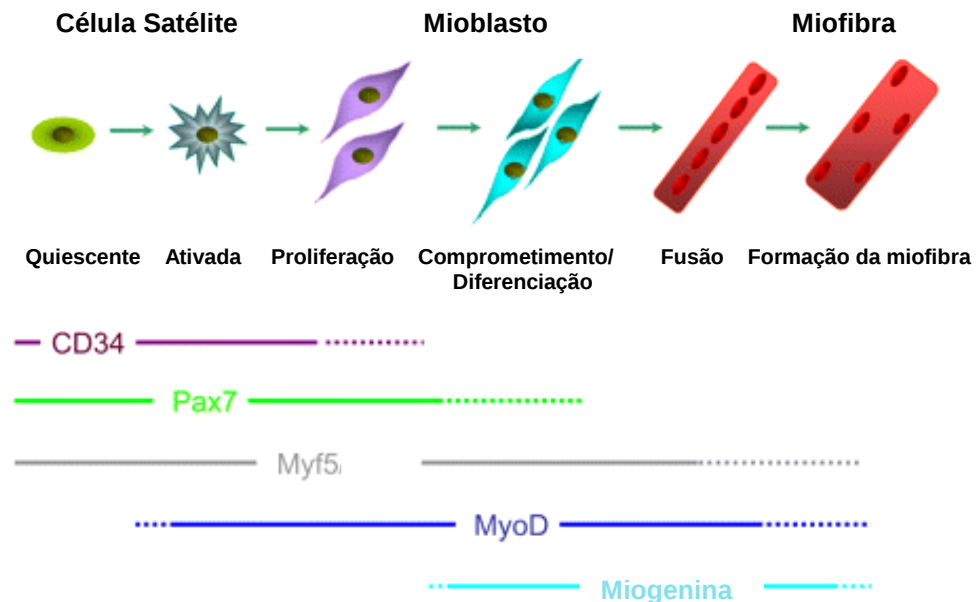


Figura 4- Miogênese da célula satélite e marcadores típicos de cada estágio de diferenciação muscular.

(modificado a partir de Zammit 2006)

1.3.2. Progenitores miogênicos

Diversas células podem atuar como progenitores miogênicos (Figura 5). As células satélites constituem a principal fonte de precursores musculares e são encontradas em abundância logo após o nascimento, correspondendo em camundongos normais a 30% dos núcleos musculares sublaminares (Cardasis e Cooper, 1975; Chen e Goldhamer, 2003), mas após o nascimento essa proporção diminui para menos de 5% no camundongo adulto (Chen e Goldhamer, 2003; Charge e Rudnicki, 2004).

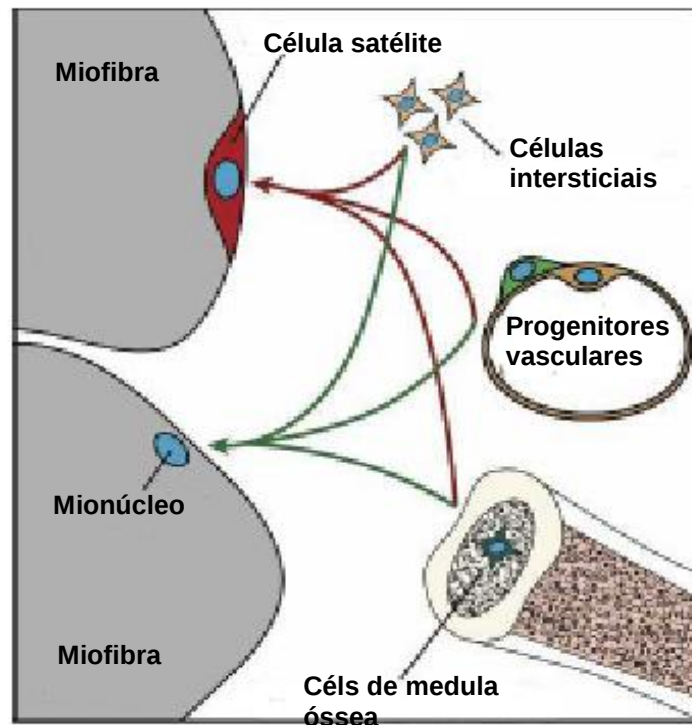


Figura 5- Possíveis repositores de mionúcleos durante a regeneração muscular.

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 e Garry, 2006)

No músculo normal células satélites são normalmente quiescentes e expressam marcadores como Pax-7+, CD34, M-caderina, VCAM, c-met (receptor de HGF), Foxk1, CD56 e sindecana 3 e 4. As células satélites miogênicas, apesar de serem mais diferenciadas que as células-tronco, ainda apresentam plasticidade e quando estimuladas adequadamente podem expressar fatores de diferenciação osteogênica ou de adipócitos, *Runx2* e *PPAR γ* respectivamente (Zammit, Partridge *et al.*, 2006). A importância dos sinais do microambiente no processo de diferenciação dessas células fica ainda mais evidente pela ineficiente regeneração e

conversão de células progenitoras em tecido adiposo no modelo de lesão muscular em camundongos deficientes para o receptor de quimiocinas CCR2 (Contreras-Shannon, Ochoa *et al.*, 2007).

As células derivadas da medula óssea contribuem bem menos que as células satélites, porém experimentos de transplante de medula óssea mostrando que células do doador eram capazes de participar da regeneração do tecido muscular indicaram uma possibilidade como estratégia terapêutica (Ferrari, Cusella-De Angelis *et al.*, 1998). As células mióides tímicas, envolvidas no controle da maturação de timócitos, também expressam vários antígenos musculares e possuem potencial de participar da regeneração muscular quando transferidas para o sítio de injúria muscular (Pagel, Morgan *et al.*, 2000).

As SP (*side population*), caracterizadas pela expressão de Sca-1^{high} constituem uma população de células progenitoras residentes nos tecidos adultos (medula óssea; músculo esquelético). As SP hematopoéticas na medula óssea apresentam marcadores clássicos de progenitores como CD45, CD43 e c-kit, mas no tecido muscular a grande maioria dessas células não apresenta nenhum desses marcadores (Shi e Garry, 2006; Luth, Jun *et al.*, 2008), talvez porque 60% das SP musculares tenham origem embrionária semelhante a das células satélites (Peault, Rudnicki *et al.*, 2007). Após injúria muscular aumentam em número e participam na regeneração secretando fatores que influenciam na regeneração ou se diferenciando em mioblastos (Meeson, Hawke *et al.*, 2004; Peault, Rudnicki *et al.*, 2007). As células tronco derivadas de músculo (MDSC) expressando os marcadores Sca-1 e CD34 são células - tronco progenitoras com potencial miogênico isoladas do

músculo esquelético adulto capazes de inibir a ativação de linfócitos T (Shi e Garry, 2006).

Outras populações celulares associadas a vasos sanguíneos, como os pericitos, mesoangioblastos e células CD131⁺ proliferam *in vitro* mantendo por várias gerações o potencial miogênico (Dellavalle, Sampaolesi *et al.*, 2007). As células mioendoteliais representam uma população distinta de progenitores que expressam tanto marcadores endoteliais (CD34⁺CD144⁺) quanto de células satélites (CD56) e apresentam alta capacidade de renovar a população de células satélites (Peault, Rudnicki *et al.*, 2007).

	Origem	Localização	Potencial de diferenciação	Função fisiológica	Marcadores humanos	Marcadores murinos
Mioblastos	Mesoderma	Células em proliferação oriundas da ativação das células satélites presentes no espaço subsarcolemal entre a fibra e a lâmina basal	Miogênica Osteogênica Adipogênica	Regeneração muscular	CD56+ Myod+ Myf5+ Desmina+	Myod+ Desmina+ CD56+
Side population	60% somito 40% desconhecida	Intersticial, possivelmente associada a vasos	Miogênica Hematopoiética	Desconhecida	CD34+/- CD133+/- C-kit- CD45-	CD34+/- Sca-1+ C-kit- CD45- CD31+/-
MDSC	Desconhecida	Periferia de miofibras, muito associadas a vasos sanguíneos	Miogênica Osteogênica Adipogênica Hematopoiética Condrogênica Cardíaca	Desconhecida	Desconhecido	CD34+/- Sca-1+/- CD45- C-Kit- BCL-2+
Células mioendoteliais	Desconhecida	Periferia de miofibras próximas a vasos sanguíneos	Miogênica Osteogênica Condrogênica cardíaca	Desconhecida	CD34+ CD144+ CD56+ CD31+ CD45-	Desconhecidos
Pericitos	Mesoderma na cabeça e corpo mas precisa de mais investigação	Periferia de capilares e microvasos em todos os tecidos corporais	Miogênica Osteogênica Adipogênica Condrogênica Cardíaca	Controle do fluxo sanguíneo controle da angiogênese	CD144- PDGFRB+ CD146+ NG2+ CD34- CD45-	A-SMA+
Mesoangioblastos	Mesoderma; paredes de vasos sanguíneos	Associados a parede de micro vasos	Miogênica (incluindo fibras musculares lisas) Osteogênica (baixa) Adipogênica Cardíaca (baixa)	Desconhecida	CD34- CD 133- CD31- NG2+ CD45-	CD34+ Sca-1+ CD31+ C-Kit+/- CD45-
Células Cd133+	Mesoderma	Periferia de miofibras próximo a microvasos	Miogênica hematopoiética vasculogênica (endotélio)	Angiogenese em tecidos lesados hematopoiese	CD34+/- Thy-1+/- CD133+ CD146+	CD34+/- Sca-1+

Tabela 1- Tipos celulares envolvidos na regeneração muscular.

(Peault, Rudnicki *et al.*, 2007)

Algumas moléculas como a purina sintética reversina são capazes de reverter o estado de diferenciação de algumas células adultas e promover a dediferenciação de miocitos e fibrolastos. A reversina inclusive causa nos fibroblastos a perda da expressão do marcador HSP47 e a sua fusão a células C2C12 *in vitro* (Anastasia, Sampaolesi *et al.*, 2006).

1.3.3. Influência do microambiente no reparo do tecido muscular

No processo inflamatório que acompanha a lesão muscular, macrófagos e neutrófilos apresentam um papel importante na remoção de restos celulares e no processo de regeneração (Lescaudron, Peltekian *et al.*, 1999). Neutrófilos podem promover dano muscular através da produção de moléculas citotóxicas e citolíticas (Tidball, 2005) além de aumentar o estresse oxidativo (Beray-Berthat, Croci *et al.*, 2003; Singh, Gudehithlu *et al.*, 2007; Tidball e Wehling-Henricks, 2007b), mas também podem influenciar na regeneração, visto que camundongos deficientes de neutrófilos apresentam regeneração tecidual eficiente sem formação de cicatriz (Wadman, 2005).

Os macrófagos apresentam atividade fagocítica, secretam citocinas, fatores de crescimento e óxido nítrico (NO) (Shi, Wakil *et al.*, 1997; Cowin, Brosnan *et al.*, 1998; Oliveira, El-Cheikh *et al.*, 2000; Sandler, Mentink-Kane *et al.*, 2003; Parks, Wilson *et al.*, 2004). NO regula a formação de colágeno, a proliferação celular e a contração da lesão em modelos animais de reparo tecidual (Hesse, Modolell *et al.*, 2001; Witte e Barbul, 2002; Parks, Wilson *et al.*, 2004). Relato da literatura mostra que meio condicionado de cultura de macrófago peritoneal pode aumentar a proliferação de mioblastos *in vitro* bem como o número de células expressando

Myo-d (Charge e Rudnicki, 2004; Tidball, 2005). Recentemente foi proposto que a população de macrófagos inicialmente presente no músculo lesionado apresentaria alta capacidade fagocítica para retirada de restos celulares, e mais tardiamente uma população de macrófagos com característica regulatória que estimularia a regeneração e o reparo dos sarcolema lesionados ao estabilizar os níveis de disferlina, uma molécula reguladora da remodelagem membranar (Tidball e Wehling-Henricks, 2007a). Recentemente, também foi mostrado que eosinófilos induzem fibrose nos músculos de camundongos *mdx* pela secreção da MBP1 (proteína básica principal 1) e por influenciar a resposta imunológica para um perfil mais Th2 (Wehling-Henricks, Sokolow *et al.*, 2008).

Mastócitos também são elementos essenciais na modulação do reparo do músculo esquelético, a depleção de mastócitos minimiza a amplificação da lesão muscular no modelo de injúria por reperfusão (Bortolotto, Morrison *et al.*, 2004), e nos camundongos distróficos *mdx* em tratamento com cromoglicato a mionecrose diminui (Radley e Grounds, 2006).

Diversas moléculas estão envolvidas no reparo do tecido muscular (Figura 6). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF), FGFs (fator de crescimento de fibroblastos) e IGFs (fator de crescimento semelhante a insulina) estão aumentados durante a regeneração muscular. HGF participa na fase inicial de ativação das células satélites quiescentes e induz proliferação celular (Charge e Rudnicki, 2004). A melhora na proliferação das células satélites após a administração exógena de FGF-2 *in situ* em camundongos distróficos *mdx* e o aumento da expressão do receptor FGFR-1 após a sua ativação realçam a importância do FGF-2 no processo de reparo tecidual (Charge e Rudnicki, 2004). IGF induz ativação e diferenciação de mioblastos, além de modular o processo inflamatório suprimindo a expressão e

atividade de MIF, HMGB-1 e NFkB dentre outros fatores pró-inflamatórios (Charge e Rudnicki, 2004; Pelosi, Giacinti *et al.*, 2007). Além desses fatores de crescimento, algumas citocinas produzidas pelo tecido muscular influenciam na regeneração da miofibrila. O interferon gama (INF- γ) é produzido endogenamente no tecido e induz o proliferação e fusão de mioblastos (Cheng, Nguyen *et al.*, 2008); IL-6 e LIF estimulam a proliferação de mioblastos e IL-4 é fundamental por estimular a migração de mioblastos (Charge e Rudnicki, 2004; Lafreniere, Mills *et al.*, 2006). Também as neurotrofinas são importantes na regeneração muscular por serem capazes de aumentar a diferenciação de MDSC normais transplantadas para músculo de camundongos *mdx* (Lavasani, Lu *et al.*, 2006). Administração de fator neurotrófico ciliar é capaz de aumentar a diferenciação de miotubos em ratos submetidos a denervação/ devascularização (Marques e Neto, 1997).

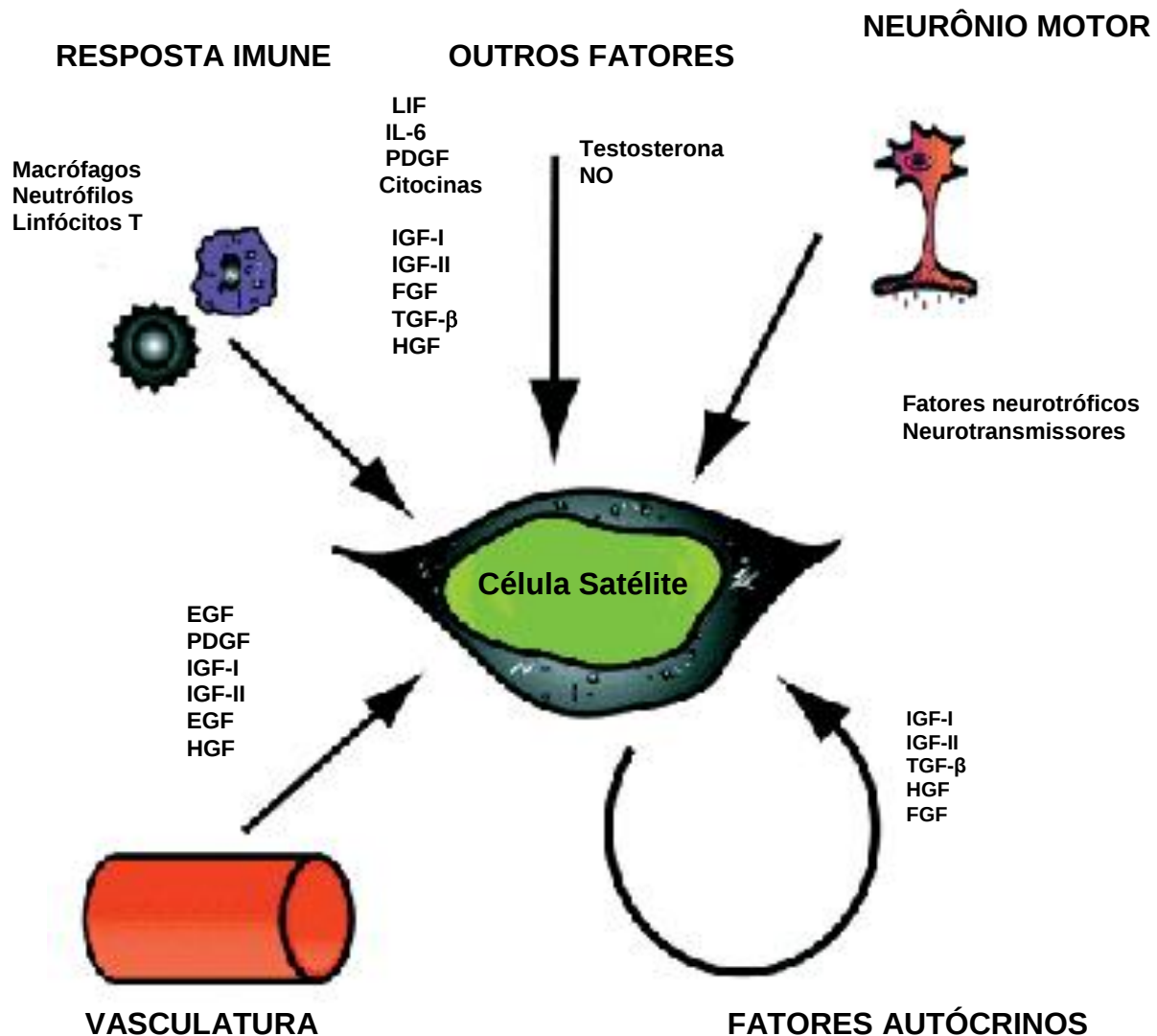


Figura 6- Influência do microambiente na ativação das células satélites.

As células satélites sofrem influência de fatores oriundos da vasculatura periférica, da inervação, de células do sistema imune além de ser influenciada por fatores autócrinos que modulam os processos de ativação, proliferação e diferenciação.

EGF - Fator de crescimento de endotélio, FGF - Fator de crescimento de fibroblasto, HGF – Fator de crescimento de hepatócito, IGF-I - Fator de crescimento tipo insulina 1, IGF-II - Fator de crescimento tipo insulina 2, IL-4 Interleucina 4. IL-6 - Interleucina-6, LIF - Fator de inibição de leucemia, NO - Óxido nítrico, PDGF - Fator de crescimento derivado de plaqueta, TGF- β - Fator de transformação do crescimento- β (Hawke e Garry, 2001).

1.4. Controle imunoneuroendócrino do reparo tecidual

O dano tecidual gera um desequilíbrio na homeostase do tecido lesionado bem como a ativação de mecanismos de restabelecimento. Ao longo da evolução do sistema imunológico os componentes da inflamação passaram a estar presentes durante todas as fases do reparo tecidual, porém nem sempre de forma benéfica para o organismo. A evolução do sistema imunológico nos mamíferos determinou desenvolvimento de mecanismos visando proteção eficiente contra microorganismos e um reparo tecidual cicatricial rápido (Mescher e Neff, 2005).

O papel dos linfócitos na inflamação e reparo tecidual é complexo e ainda pouco compreendido. Os linfócitos T podem participar do processo de reparo, tanto propiciando a melhora tecidual como amplificando a lesão induzindo uma remodelagem não funcional, peculiar para cada tipo de tecido (Kovacs e Dipietro, 1994; Sandler, Mentink-Kane *et al.*, 2003). Ablação do timo em ratos retarda a maturação de feridas e a produção de um colágeno mais fibroso com alto grau de hidroxilação (Barbul, Sisto *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, semelhantes ao tecido normal adjacente (Gawronska-Kozak, Bogacki *et al.*, 2006), o mesmo se observa em camundongos *mdx nude* que apresentam redução na deposição de colágeno no músculo esquelético (Morrison, Lu *et al.*, 2000).

A contribuição de células T CD4⁺ no reparo tecidual seria principalmente pela secreção de citocinas. Durante a inflamação, linfócitos T podem ser polarizados em células efectoras Th1 e Th2 com perfis distintos de produção de citocinas. As chamadas citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2) ativam células T citotóxicas, NK e macrófagos;

promovem regeneração tecidual, enquanto citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) estimulam notadamente uma resposta imune humoral, favorecem a ativação de fibroblastos, produção de colágeno e fibrogênese (Sime e O'reilly, 2001; Azouz, Razzaque *et al.*, 2004). Essas citocinas podem ser produzidas também por outras células incluindo fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Sime e O'reilly, 2001). A influência do perfil de citocinas na indução da fibrose é evidente no modelo de lesão hepática, onde camundongos BALB/c com padrão Th2 apresentam intensa fibrose ao contrário dos camundongos C57BL/6 com padrão típico Th1, que apresentam menos fibrose. O envolvimento das citocinas na indução de fibrose foi mostrado pelo tratamento desses animais com anticorpos neutralizantes para IL-4 ou com IFN- γ exógeno resultando na atenuação da fibrose (Shi, Wakil *et al.*, 1997). IFN- γ é um potente inibidor da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno (Schaffer e Barbul, 1998), com ação inibitória na sinalização do TGF- β 1, reduzindo a fibrose e aumentando a cicatrização, melhorando o reparo tecidual no modelo de lesão muscular lacerante (Foster, Li *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 da estimulação de macrófagos para produção de TGF- β 1. Além da indução da produção de TGF- β 1 latente, a IL-13 ativa TGF- β ao regular a expressão de MMPs que clivam o LAP (proteína associada a latência) do TGF β inativo armazenado.

O TGF- β , citocina produzida principalmente por fibroblastos, algumas células epiteliais, macrófagos e linfócitos T, é indiscutivelmente o regulador de fibrose mais estudado (Mescher e Neff, 2005). *In vitro*, o TGF- β é um potente quimioatraente para fibroblasto, estimula a síntese de colágeno e fibronectina (Schaffer e Barbul, 1998).

Existem 3 isoformas de TGF- β em mamíferos – TGF- β 1, - β 2 e β -3. A fibrose tecidual é principalmente atribuída a isoforma β 1. TGF- β 1 é uma citocina armazenada na forma inativa, como um homodímero que é acoplado de forma não covalente a uma proteína associada à latência (LAP). A ligação da citocina aos seus receptores requer a dissociação do LAP, um processo catalisado por várias moléculas, como o plasminogênio, trombospondina e MMPs (metaloproteinases). A citocina IL-13 induz a produção de TGF- β 1 latente e ativa TGF- β ao regular a expressão de MMPs que clivam o complexo TGF β /LAP. No músculo, a cascata fibrogênica também é iniciada por TGF- β 1, porque inibe a diferenciação de células miogênicas e induz células precursoras miogênicas a se diferenciarem em miofibroblastos no músculo lesionado (Li, Foster *et al.*, 2004; Tidball, 2005). No entanto a isoforma embrionária TGF- β 3 apresenta efeitos distintos de todas as outras isoformas, estimulando uma regeneração eficiente e sem fibrose em diversos tecidos tanto em embriões quanto em organismos adultos (Wadman, 2005).

Não existem evidências claras da participação direta de linfócitos B no reparo tecidual, contudo imunoglobulinas autoreativas participam da remoção dos restos tissulares ativando a fagocitose pelos macrófagos (Casadevall and Pirofski 2003; Parks, Wilson *et al.* 2004). A existência fisiológica de anticorpos anti-citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-18, bem como para antígenos próprios como histonas, DNA e fosforilcolina levantam a possibilidade da intervenção direta desses linfócitos na resolução de injúrias teciduais (Revoltella, 1998). Neste sentido, a administração endovenosa de imunoglobulinas (IVIg) de indivíduos normais tem sido usada eficazmente como agente antiinflamatório em doenças inflamatórias e autoimunes, inclusive em miopatias autoimunes (Dalakas, 2006; Nimmerjahn e Ravetch, 2007). Por outro lado, linfócitos B também estão relacionados à produção de maior fibrose

tecidual pela indução de perfil de citocinas Th2 como evidenciado no modelo murino *tight-skin* de esclerose sistêmica (Hasegawa, Hamaguchi *et al.*, 2006).

Citocinas e fatores de crescimento são capazes de regular quimiotaxia, além de influenciar a remodelagem da matriz extracelular e angiogênese. A citocina HMGB1, proteína nuclear liberada por células necróticas e macrófagos ativados, (Dumitriu, Baruah *et al.*, 2005; Yamada e Maruyama, 2007) representa um dos primeiros sinais liberados na injúria tecidual. Essa molécula é capaz de ativar o recrutamento de leucócitos para o sítio de injúria, atuar na maturação de células dendríticas e regular a atividade de linfócitos T estimulando um perfil de resposta Th1 (Dumitriu, Baruah *et al.*, 2005). HMGB1 também é capaz de estimular a migração de células-tronco oriundas de vasos sanguíneos adultos e embrionários contribuindo para regeneração e o reparo tecidual (Yamada e Maruyama, 2007) – ver Figura 7.

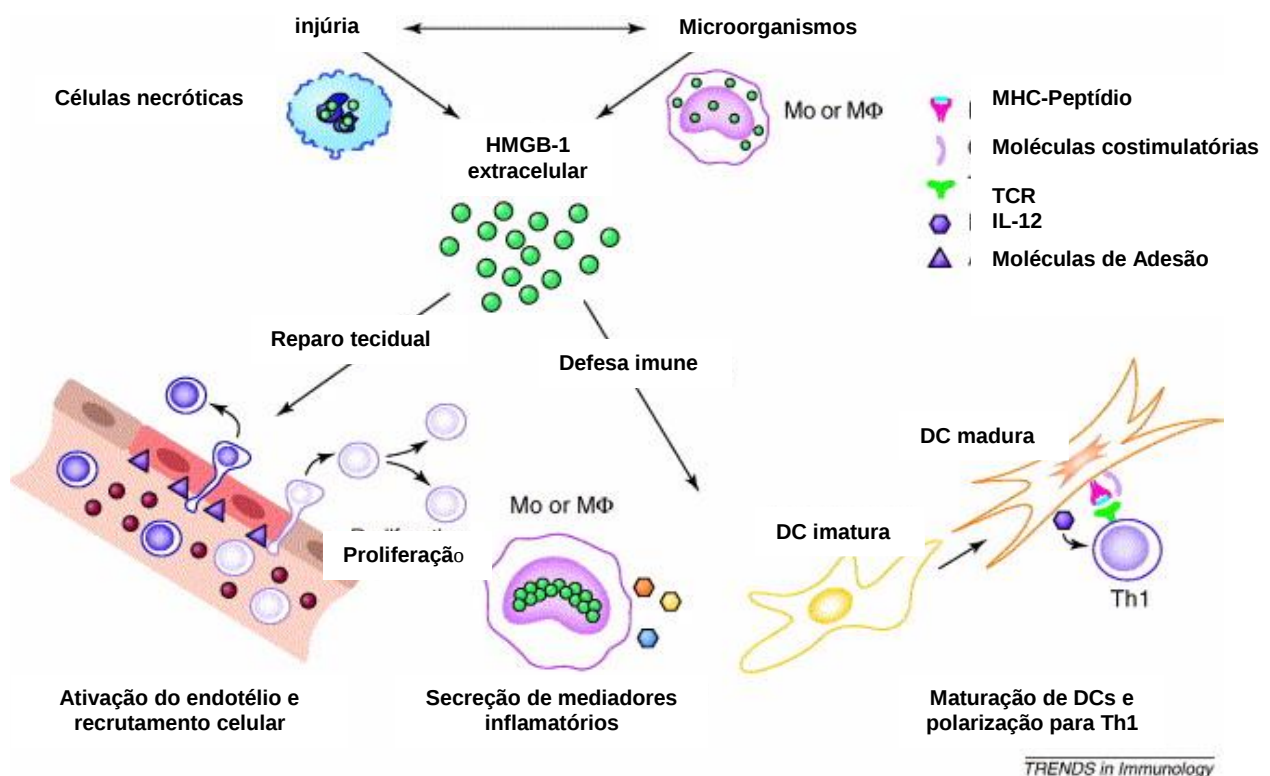


Figura 7- HMGB1 é um mediador comum de dano tecidual e invasão microbiana.

(Modificado a partir de (Dumitriu, Baruah *et al.*, 2005))

Nos últimos anos tem sido evidenciado o envolvimento de MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) no reparo tecidual (Figura 8). MIF é uma citocina de produção ubíqua por quase todos os tecidos do corpo (Donn e Ray, 2004) e altos níveis estão relacionados com exacerbação do processo inflamatório, atraso no reparo, estimulação da proliferação de fibroblastos e indução de fibrose (Taylor, Zhu *et al.*, 2006). Corticosteróides induzem a produção de MIF enquanto o hormônio estradiol é um dos principais antagonistas de seus efeitos deletérios no reparo tecidual (Hardman, Waite *et al.*, 2005). Aldosterona também influencia o reparo tecidual, sendo capaz de ativar macrófagos, aumentar a resposta inflamatória através da indução de citocinas inflamatórias, aumentar a expressão de colágeno e TGFβ-1, gerando ao mesmo tempo um microambiente proinflamatório e profibrogênico (Weber, 2003).

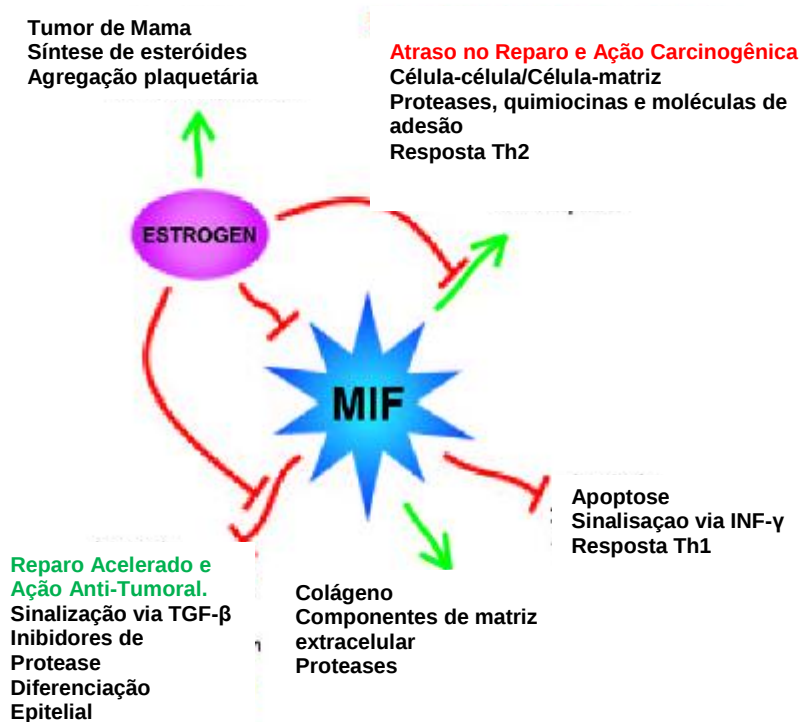


Figura 8- Regulação mutua entre MIF e estradiol no reparo tecidual e na oncogênese.
(Hardman, Waite *et al.*, 2005)

O tecido adiposo tem sido considerado como um tecido imunoneuroendócrino, porque além de secretar hormônios, esse tecido secreta citocinas importantes como a leptina, adiponectina, resistina, visfatina, apelina, vaspina, hepaticina, chemerina e omentina (Tilg e Moschen, 2006). Um de seus importantes mediadores é a leptina que estimula a secreção de citocinas por linfócitos T, em especial a IL-6, IL-12, INF- γ e GM-CSF (Tilg e Moschen, 2006). Adicionalmente, a leptina apresenta efeitos pró-fibrogênicos por induzir a conversão de células mesoteliais em fibroblastos além de estimular a produção de TGF- β e colágeno tipo IV (Yang, Huang *et al.*, 2007). Já a adiponectina possui uma ação ambígua, a de alto peso molecular, intacta e não clivada pela elastase de neutrófilos,

apresenta efeito proinflamatório, estimulando a produção de IL-6 e quimiocina CXCL8, enquanto a forma de baixo peso molecular apresenta efeito antinflamatório e antifibrogênico em modelos de lesão hepática (Tilg e Moschen, 2006).

Neurotransmissores também são importantes no reparo tecidual. A norepinefrina é importante nas respostas profibróticas no tecido hepático agindo em sinergismo com a leptina estimulando a expressão de colágeno nas HSC (células estreladas hepáticas) (Oben, Roskams *et al.*, 2004). Dados da literatura mostram que camundongos nocaute para o receptor de opioides- δ apresentam retardo no reparo de feridas de pele e alta produção local de colágeno tipo IV e MMP-2 (Bigliardi-Qi, Gaveriaux-Ruff *et al.*, 2006).

1.5. A cavidade peritoneal e seus sistemas de drenagem

A cavidade peritoneal se desenvolve bem cedo durante a embriogênese e se mantém relativamente isolada da circulação periférica ao longo da vida (Moore, 2000). Essa cavidade apresenta um microambiente único em relação à produção de fatores de crescimento especialmente pelas células mesoteliais presentes na membrana peritoneal. As células mesoteliais podem sofrer transdiferenciação para diversos tipos celulares mediada pela ação de citocinas, hormônios e fatores de crescimento (Nachtsheim, Dudley *et al.*, 2006; Witkowicz, 2008). A cavidade peritoneal também é um reservatório de populações linfóides e mielóides distintas dos compartimentos periféricos, por serem oriundos em parte dos tecidos mesentéricos e omentais (Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2002).

Macrófagos peritoneais expressam constitutivamente mais CD86 quando comparados a macrófagos esplênicos e, quando estimulados com LPS, expressam mais CD11c, CD80, CD54 e CD23. Também apresentam maior atividade fagocítica, porém menor capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T e a produção de INF- γ (Liu, Xia *et al.*, 2006). Linfócitos peritoneais apresentam em relação a outros sítios do organismo, um fenótipo com maior expressão de receptores clonais, TCR e imunoglobulinas por célula (Kroemer, Cuende *et al.*, 1993).

Outro aspecto importante é que a cavidade peritoneal representa um dos principais locais do organismo que abriga linfócitos B-1, uma população distinta de linfócitos B que apresentam repertório mais restrito, talvez pela não expressão da enzima TDT durante sua gênese (Berland e Wortis, 2002). Acredita-se que tais linfócitos são gerados majoritariamente durante os ciclos de linfopoese embrionária e estão distribuídos na cavidade peritoneal, mediastinal, baço e omento. Essa população linfocitária está envolvida com a produção de anticorpos autoreativos de baixa especificidade especialmente das classes IgM e IgA (Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2006; Tung e Herzenberg, 2007) e apresenta ação imunoregulatória. A população de linfócitos B-1 está aumentada em diversas patologias de natureza autoimune e inflamatória (Duan e Morel, 2006).

Outra particularidade da cavidade peritoneal é representada pelo seu sistema de drenagem linfática diferenciado. Neste contexto, o diafragma é considerado como tecido importante porque nele se concentram os estômatos que são orifícios revestidos de células mesoteliais e endoteliais cubóides com especializações de membrana que permitem o ajuste do diâmetro do orifício (Abu-Hijleh, Habbal *et al.*, 1995; Michailova, 2001; Li e Li, 2003). Os estômatos estão presentes entre as fibras musculares tanto na superfície pleural quanto na peritoneal do diafragma e se

interconectam com uma grande rede de vasos linfáticos, chamados lagunas (Abu-Hijleh, Habbal *et al.*, 1995; Michailova, 2001). Os vasos linfáticos presentes no diafragma conectam o peritônio com a rede linfática periférica (via linfonodos, meadistinais e paratímicos) e com a cisterna de cheli, se conectando com linfonodos mesentéricos e renais (Abu-Hijleh, Habbal *et al.*, 1995). A ativação de leucócitos peritoneais induz maior abertura dos estômatos, possivelmente pela secreção de citocinas e NO, e pelo rearranjo da rede de lagunas propiciando maior fluxo de células e fluidos por esses vasos (Michailova, 2001; Li e Li, 2008).

1.6. O omento

O omento é o principal tecido linfóide associado à cavidade celomática, sendo constituído por uma dupla camada mesotelial envolta por tecido adiposo apresentando estruturas linfóides denominados *milk spots*. Durante a embriogênese, o omento apresenta atividade hematopoética simultaneamente ao fígado fetal e anteriormente ao baço (Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2005). Este órgão está envolvido nos mecanismos de imunidade da cavidade peritoneal pela grande produção de anticorpos naturais (Palming, Gabrielsson *et al.*, 2006), de fatores envolvidos na hematopoese (GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-5, IL-7 e SDF1- α ativado) e manutenção do fenótipo (LIF), de células tronco (Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2002; Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2005), de fatores de crescimento como neurotrofinas e FGF, e também de moléculas (VEGF) com atividade angiogênica (Gabrielsson, Johansson *et al.*, 2002; Nachtsheim, Dudley *et al.*, 2006; Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007). Contrastando com outros tecidos linfóides secundários, o omento retém durante a

vida adulta progenitores hematopoéticos, a atividade linfomieloepoética e um potencial eritropoético latente que pode ser estimulado com a administração de eritropoietina (Hirai, Takemori *et al.*, 1994). Evidências mais recentes indicam que o omento atua como um detector inato não apenas de infecções, mas de processos relacionados com injúria tecidual. Nestas situações a parte não adiposa do omento aumentaria determinando sua aderência no sítio de injúria, produzindo fatores de crescimento, promovendo um aumento no aporte sanguíneo e reduzindo assim o estresse isquêmico (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007).

Recentemente foi demonstrado que o omento ativado pela administração de partículas de celulose (atuando como corpo estranho) apresenta células com marcadores de células tronco adultas (SDF1- α , CXCR4, WT-1) e embrionárias (Nanog, Oct-4, SSEA-1) (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Patel *et al.*, 2008). Além disso, o extrato de omento ativado por esse protocolo se mostrou igual, e em alguns casos mais eficiente, que o soro fetal bovino na indução do crescimento *in vitro* de diferentes linhagens celulares (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007). Dessa forma acredita-se que o órgão inteiro se transforma num microambiente propício à regeneração tecidual, sendo neste contexto alvo de estudos de bioengenharia. Recentemente foi visto que tecidos e órgãos inteiros como rim, bexiga e dentes podem ser produzidos no omento. (Baumert, Simon *et al.*, 2007; Kim, Gwak *et al.*, 2007).

A literatura sugere que o omento necessita de sinais intrínsecos do tecido lesionado para selecionar os tipos de fatores de crescimento a serem produzidos. (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007). O implante de tecido pancreático com ilhotas necrosadas no omento ativado de camundongos submetidos à indução de diabetes por estreptozotocina estimulou a expressão de fatores de transcrição específicos e

de insulina revertendo a hiperglicemia (Singh, Gudehithlu *et al.*, 2007). Além disso, no modelo de lesão hepática, o omento ativado se mostrou capaz de aderir e fornecer progenitores hepáticos e progenitores com os marcadores embrionários como Nanog, Oct-4, SSEA-1 na interface dos dois órgãos, determinando regeneração eficiente com aumento de 50% da massa total do órgão após a resolução da injúria (Singh, Pancholi *et al.*, 2009). A manipulação do omento como abordagem terapêutica é evidente pelos benefícios observados em doenças neurodegenerativas e em lesões de medula espinal, onde a transposição de omento mostrou-se eficiente na recuperação clínica de um paciente, que recuperou parcialmente a capacidade de andar (Goldsmith, Wu *et al.*, 2003; Goldsmith, 2004; Goldsmith, Fonseca *et al.*, 2005).

1.7. As metaloproteinases

A degradação e síntese da matriz extracelular é um processo coordenado pelas metaloproteinases (MMP) e serino-proteases. Elas apresentam uma serina reativa no sítio ativo e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos inclusive, na migração celular. Nesse contexto, além da capacidade da MMP-2 de clivar a poly-ADP-ribose polimerase e se integrar à cromatina; a surpreendente atividade gelatinolítica de extratos nucleares bem como a translocação nuclear da MMP-3 e TIMP-1 levantam a possibilidade de uma participação direta das MMPs na remodelagem nuclear influenciando o ciclo celular e a expressão gênica (Mannello, Tonti *et al.*, 2006).

As MMP são endopeptidases dependentes de ions Zn^{2+} e/ou Ca^{+} com estrutura molecular composta pelo menos de três domínios (Figura 9): um peptídeo sinal de aproximadamente 20 aminoácidos; um propeptídeo 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 e Shalev, 2003). Existem 5 famílias de metaloproteinases: as gelatinases, as collagenases, as estromelisinases, as metaloelastases e as metaloproteinases de membrana (MT-MMP) que são proteínas integrais de membrana (Hemmann, Graf *et al.*, 2007)

A ativação das MMPs se dá em duas etapas. Primeiro ocorre uma clivagem inicial por ativadores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento e NO (Gu, Kaul *et al.*, 2002; Zhang, Wang *et al.*, 2004) na região sinal exposta no propeptídeo, desestabilizando a interação entre o Zn^{2+} e as cisteínas, e em seguida ocorre uma clivagem, geralmente por outra MMP, liberando o radical amino terminal da enzima madura (Johnson *et al.* 1998).

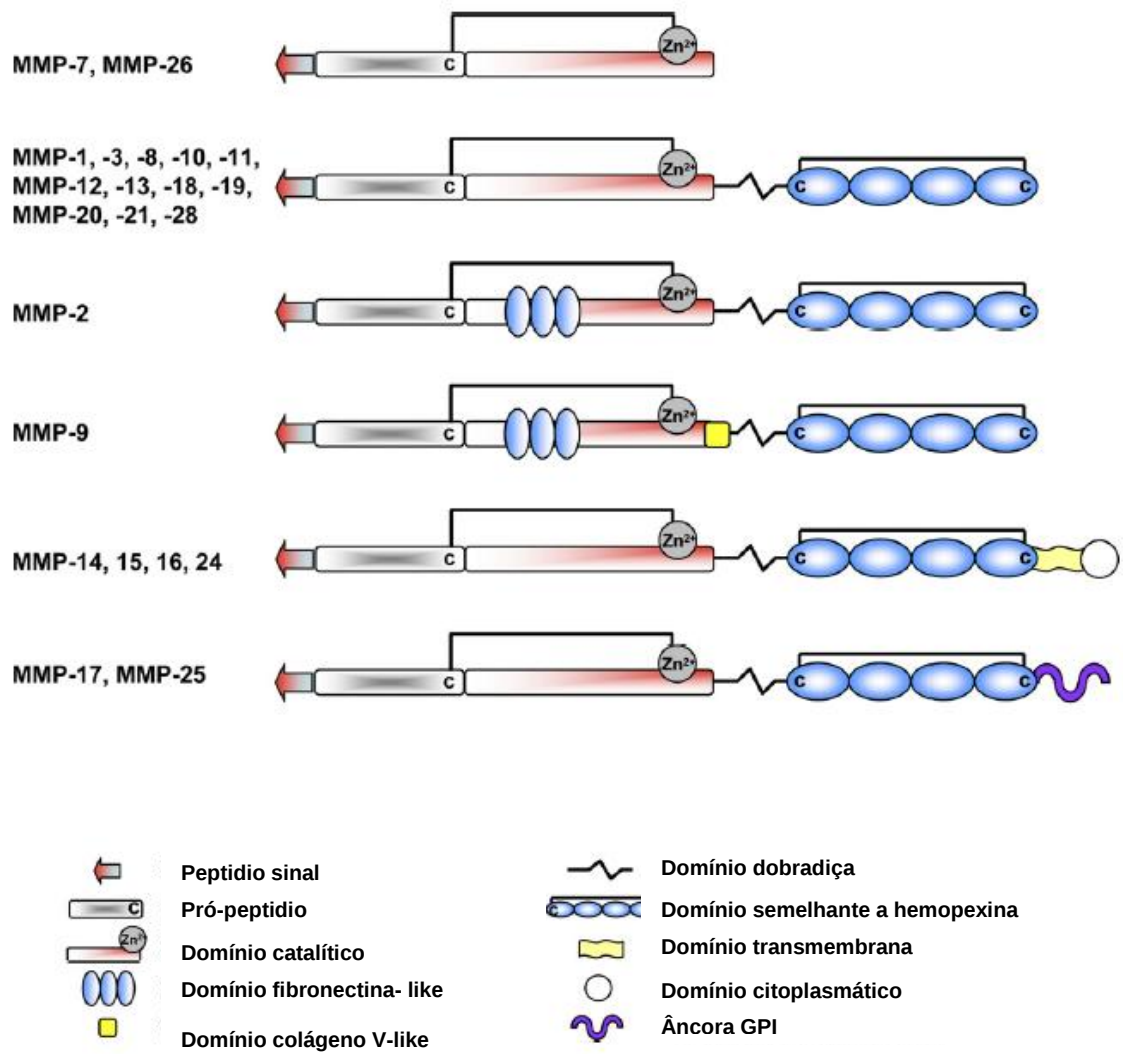


Figura 9 - Estrutura molecular das metaloproteinases.

Modificado a partir de (Hemmann, Graf *et al.*, 2007)

1.7.1. Importância das metaloproteinases na lesão muscular

A remodelagem da matriz extracelular na degeneração e regeneração muscular sugere uma participação efetiva das metaloproteinases e TIMPS nesses processos. A produção de MMP-9 por células inflamatórias e células satélites ativadas influencia na migração de células-tronco expressando MAdCam-1 nos vasos inflamados (Stahle-Backdahl, Inoue *et al.*, 1994; Kherif, Dehaupas *et al.*, 1998; Kherif, Lafuma *et al.*, 1999; Torrente, Camirand *et al.*, 2003).

No modelo de lesão muscular induzida por cardiotoxina, a MMP-9 está muito aumentada durante os primeiros três dias após a inoculação coincidindo com presença de macrófagos e polimorfonucleares (Kherif, Dehaupas *et al.*, 1998). Contudo outra possível fonte de MMP-9 são as células satélites ativadas presentes na periferia do sítio de injúria (Roach, Fitridge *et al.*, 2002). A partir da segunda semana, quando predomina a regeneração do tecido, os níveis de MMP-9 diminuem e a MMP-2 atinge o auge de produção. A participação da MMP-2 na fusão de mioblastos parece associada à degradação do colágeno tipo IV e outros componentes da membrana basal para a estimulação de células satélites, via fatores de crescimento que são liberados durante o processo (Kherif, Dehaupas *et al.*, 1998; El Fahime, Torrente *et al.*, 2000). De fato, nos camundongos distróficos *mdx* a MMP-2 está regulada positivamente tanto em sua forma latente (60-kDa) como a ativa (55-kDa) nos músculos gastrocnêmio, solear e triceps especialmente entre 8 e 12 semanas, e no diafragma, durante todas as fases da miopatia (Kherif, Dehaupas *et al.*, 1998; Bani, Lagrota-Candido *et al.*, 2008). A presença da forma ativa da MMP-2 sugere um desequilíbrio entre a produção de metaloproteinase e seu inibidor (Kherif, Dehaupas *et al.*, 1998). Uma das justificativas para a ativação da MMP-2 é a

incapacidade das fibras musculares do *mdx* regular os níveis de cálcio intracelular, um íon necessário para a ativação das MMPs. Alterações no sarcoplasma podem induzir a mionecrose, permitindo extravasamento do cálcio intracelular determinando ativação das MMPs e alteração do microambiente (Roma, Munell *et al.*, 2004).

A MT-MMP1 é uma protease importante por seu papel na ativação de MMP-2, na clivagem dos componentes da matriz extracelular fibronectina e laminina, na indução de diferenciação e migração de mioblastos e na manutenção estrutural das miofibras diferenciadas (Ohtake, Tojo *et al.*, 2006). A deleção de MT-MMP-1 em células C2C12 de linhagem de mioblastos inibe a fusão dos mioblastos e a diferenciação celular (Lluri e Jaworski, 2005; Ohtake, Tojo *et al.*, 2006).

2. RACIONAL

Dados prévios do grupo apontam para um pico tórdio de regeneração no diafragma (24 semanas) de camundongos mdx que é acompanhado de um período de remodelagem contínua de componentes da lâmina basal de miofibras como evidenciado pela alta atividade da MMP-2 no diafragma(Bani, Lagrota-Candido *et al.*, 2008). O diafragma apresenta uma função diferenciada dos outros músculos relacionando-se intimamente com a drenagem linfática peritoneal(Abu-Hijleh, Habbal *et al.*, 1995) este microambiente é um importante sítio onde residem células linfóides e mielóides distintas em relação a outros órgãos linfóides(Singh, Patel *et al.*, 2008; Carlow, Gold *et al.*, 2009). Desta forma é possível que os aspectos diferenciados desse músculo na miopatia do camundongo mdx possam estar relacionados pelo contato contínuo de células e moléculas peritoneais com esse músculo. Assim sendo, é relevante avaliar uma possível influência da ativação, expansão e/ou recirculação de populações linfóides, mielóides e de progenitores, bem como a produção de fatores de crescimento nesse microambiente como um importante viés das particularidades do diafragma na DMD.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Estudar o microambiente do omento e peritônio do camundongo *mdx* a fim de avaliar uma possível influência na fisiopatologia da lesão do diafragma.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterização imunofenotípica, por citometria de fluxo, do perfil das populações de leucócitos e de progenitores hematopoéticos no omento e peritônio nas diferentes fases da miopatia .
- Estudar o microambiente do omento, peritônio e diafragma com relação às características morfológicas de citoarquitetura e funcionais: produção de fator de crescimento FGF, proliferação celular e atividade das metaloproteinases..
- Analisar o efeito da omentectomia no microambiente da cavidade peritoneal e na lesão do músculo diafragma do *mdx* em relação ao controle não distrófico.

4. MATERIAL & MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos isogênicos machos C57BL/10 e *mdx* foram mantidos no Biotério de Patologia Celular do Instituto de Biologia da UFF em ambiente refrigerado (20°C) e aclimatado com ciclo de iluminação 12:12 horas. Os animais receberam ração Nuvital (Curitiba, Brasil), suplementação alimentar (farelo de trigo) e vitamínica (Vitagold) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram sacrificados com éter e para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma mistura de xilasina e ketamina (70 e 20 mg/kg de peso corporal)

4.2. Laparotomia e omentectomia

Uma incisão de aproximadamente um centímetro foi feita no quadrante superior esquerdo do abdômen de camundongos *mdx* com 5 semanas para remoção do omento aderido na curvatura maior do estômago. O fechamento do abdômen foi efetuado com a sutura sucessiva da membrana peritoneal e da pele. Nos animais sham operados foi realizado apenas um corte na pele mantendo a

membrana peritoneal intacta. Os animais operados foram sacrificados quando completaram 12 semanas e o diafragma, o gastrocnêmio e o lavado peritoneal foram removidos e processados para a zimografia.

4.3. Processamento histológico

O diafragma e omento foram fixados durante 24 horas em formol tamponado Milloning a 10% pH 7,2 desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) durante 60 minutos cada etapa, passados 3 vezes em álcool absoluto e 3 vezes em xilol (Reagen) seguida de duas incubações durante 1 hora a 60°C para impregnação e inclusão em paraplast (Sigma, USA). Foram feitos em média 10 cortes de 5 µm de espessura no micrótomo Spencer 820 (American Optical, EUA). Os cortes foram colocados em lâminas desengorduradas previamente filmadas com solução de glicerol - albumina (0,5%), mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas e submetidos às colorações histológicas de picrossírius, reticulina de Gomori e giemsa.

4.4. Imunohistoquímica

O omento foi cuidadosamente removido, congelado em nitrogênio líquido e incluído em OCT (Sakura, EUA) e criocortes de 8 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°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°C. A seguir os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS (30 µl) por 1 hora a 37° C (ver Tabela 2). Após três lavagens sucessivas de 5 minutos com PBS, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo secundário apropriado diluído em PBS (30 µl) por uma hora à temperatura ambiente, seguido quando necessário do conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma Chem. Co, EUA – 1/200) ou estreptoavidina-fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co, EUA – 1/150). 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). Para as marcações duplas a fosfatase foi revelada com NBT/BCIP (Dako) após a revelação da peroxidase. Todos os cortes foram contra-corados rapidamente com hematoxilina de Mayer por 2 minutos e montados em meio de montagem a base de gelatina.

Anticorpo	Origem	Conjugado	Marca	Diluição
Anti-CD4	rato	biotina	Caltag	1/80
Anti-CD8	rato	biotina	Caltag	1/80
Anti-PCNA	rato	biotina	Sigma	1/25
Anti-B220	rato	purificado	Pharmingen	1/200
Anti-FGF	cabra	purificado	Santa Cruz	1/100
Anti-Ig de cabra	Coelho	peroxidase	Sigma	1/200
Anti-Ig de rato	Coelho	peroxidase	Sigma	1/200

Tabela 2 - Relação dos anticorpos monoclonais utilizados na imuno-histoquímica.

4.5. Histomorfometria

A área total do corte foi obtida através da obtenção de fotografias na menor objetiva e construção de uma foto contendo todo o corte no programa adobe photoshop Cs (com a opção photomerge). A partir de então diferentes medições foram feitas dependendo da coloração.

Nas lâminas com coloração para picrossírius foi realizada a quantificação do percentual de área de *milk spot* (roxo) mesotélio (vermelho) e tecido adiposo (halo claro) relacionada a área total do corte. Nas lâminas de omento coradas pelo Giemsa, a área total do corte foi mensurada e todos os mastócitos presentes no corte foram contados para calcular a relação mastócito/mm² e nas imunohistoquímicas para FGF-2 foi determinado o percentual da área de marcação em todo corte. Todas as análises foram realizadas com o programa Image Pro-Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Inc.).

4.6. Citometria de fluxo

O omento foi cuidadosamente removido e imerso em meio modificado de Dulbecco contendo 1mg/ml colagenase tipo IA (Sigma, EUA) sob agitação constante por no máximo 90 min. As células dissociadas foram lavadas em RPMI com 10% de SBF (soro bovino fetal) para interromper a reação. Para a obtenção das células do lavado peritoneal, 3 ml de RPMI e 100 UI de heparina foram injetados na cavidade peritoneal. Após 1 minuto de massagem suave o líquido foi removido e as suspensões celulares foram passadas em malhas de nylon com porosidade 40 µm (BD REF) para exclusão de restos celulares. O sobrenadante foi aliquoteado para ensaios de zimografia. Após a determinação da celularidade em câmara de

Neubauer utilizando o corante azul tripan para exclusão de células mortas, pelo menos $1,5 \times 10^6$ células viáveis foram incubadas com PBS contendo 5% de soro normal de camundongo e 5% de SBF durante 10 minutos para evitar ligações não específicas. Em média os experimentos foram realizados em pools de 3 a 6 animais por grupo para atingir a celularidade desejada. As marcações múltiplas (3 e 5 cores) foram feitas pela incubação das células com os anticorpos monoclonais na diluição apropriada previamente determinada (30µl por poço – ver Tabela 3) durante 20 minutos a 4°C. As células foram então lavadas duas vezes em PBS contendo 2% de SBF, fixadas em PBS contendo 1,6% de formol, e analisadas no citômetro Cyan® (Dako Colorado Inc., EUA). A exclusão de debris tissulares e a determinação da região de linfócitos foi realizada utilizando os parâmetros de *forward versus side scatter* e foram coletados pelo menos 10.000 eventos na região de linfócitos em cada amostra. Para análise de progenitores foram coletadas pelo menos 50.000 células na região de linfócitos. A análise dos dados foi feita com o software SUMMIT versão 4.3.2 (DAKO Colorado Inc., EUA).

Marcadores para células progenitoras e linfócitos B				
Anticorpo	Fluorocromo	Diluição	origem	Marca
Anti-B220	Pe-Texas-Red	1/100	Rato	Pharmingen
Anti-MAC-1	Pe	1/30	Rato	Pharmingen
Anti-CD3	Pe	1/30	Rato	Pharmingen
Anti-CD117	PeCy7	1/60	Rato	Pharmingen
Anti-Sca1	Fitc	1/60	Rato	Pharmingen
Anti-CD19	APC	1/160	Rato	Pharmingen
Subpopulações de linfócito T				
Anti-CD8	PeCy5	1/120	Rato	Pharmingen
Anti-CD4	PeCy7	1/160	Rato	Pharmingen
Anti-CD3	APCCy7	1/30	Rato	Pharmingen
Anti-NK1.1	Fitc	1/300	Rato	Pharmingen
Ativação de linfócitos T				
Anti-CD8	Spectral Red	1/200	Rato	Southern
Anti-CD25	APC	1/160	Rato	Invitrogen
Anti-CD4	Pe	1/150	Rato	Pharmingen

Tabela 3- Relação dos anticorpos e conjugados utilizados na citometria de fluxo.

4.7. Preparo do extrato tecidual

Antes da masceração os músculos congelados e preservados em nitrogênio líquido (-165°C) sendo posteriormente foram pesados e homogeneizados na proporção 1/10, p/v, em tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200mM NaCl, 100mM CaCl_2 and 1% Triton X-100 a 4°C . Após a centrifugação (15.000 RPM), o sobrenadante foi separado em alíquotas de 100 μL , e a concentração proteica determinada utilizando-se uma curva padrão de albumina pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951).

4.8. Zimografia

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito (Heussen e 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. USA) na concentração de 2 mg/mL e os géis de entrada poliacrilamida 5% (w/v). A eletroforese foi realizada com a concentração de 60 μg de proteína para amostras de músculo e 20 μg para amostras de lavado por poço. As amostras foram aplicadas nos géis e a eletroforese ocorreu a 175 V 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 de incubação (10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 5 mM CaCl_2 , ZnCl_2 1 μM) por 24 horas. As metaloproteinases são secretadas na forma latente e necessitam da clivagem do peptídeo da região NH_2 terminal para ativação. O SDS(duodecil sulfato de sódio) é o agente responsável pela ativação das metaloproteinases mesmo na

forma inativa sem clivagem proteolítica (Talhouk, Chin *et al.*, 1991). Os géis foram corados pelo Coomassie blue R250 (Sigma Chem. Co, USA) e descorados em solução descorante contendo 50% metanol, 10% ácido acético e 40% qsp de H₂O. A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. A análise semiquantitativa foi feita usando o programa de análise de imagem (Scion Program National Institutes of Health, Image Program, USA).

4.9. Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o teste T de Student não pareado que foram realizados no software GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Análise histológica do diafragma de camundongos *mdx*

Os animais foram sacrificados com 5, 12, 24 e 48 semanas para analisarmos o diafragma nas diversas fases da miopatia. Como colorações de estudo foram escolhidas o H-E para avaliação da citoarquitetura e a nucleação da miofibra e o picrosírius para verificar a deposição de colágeno. Para cada grupo foram utilizados no mínimo 3 animais.

Nos camundongos controle não observamos alterações histopatológicas em nenhuma idade nem diferenças com relação a distribuição do conteúdo de colágeno (Figura 10).

A coloração de H-E foi a que melhor evidenciou a mionecrose (fibras hialinas), inflamação e a regeneração caracterizada pelas fibras basofílicas com nucleação central. A análise histológica mostrou que os músculos de camundongos *mdx* de 5 semanas já apresentavam focos de infiltrado inflamatório e mionecrose (Figura 11). Nos animais com 12 semanas, a inflamação e mionecrose persistem e já foram detectados pequenos focos de regeneração. Com 24 semanas foram observados maiores focos de regeneração, mas em 48 semanas a regeneração diminuiu, sendo evidenciadas grandes áreas com substituição por tecido conjuntivo.

A coloração de picrossírius mostrou tanto nos machos e fêmeas, que a deposição de colágeno é evidente em 12 semanas, intensifica em 24 semanas e atinge o auge em 48 semanas (ver Figura 12).

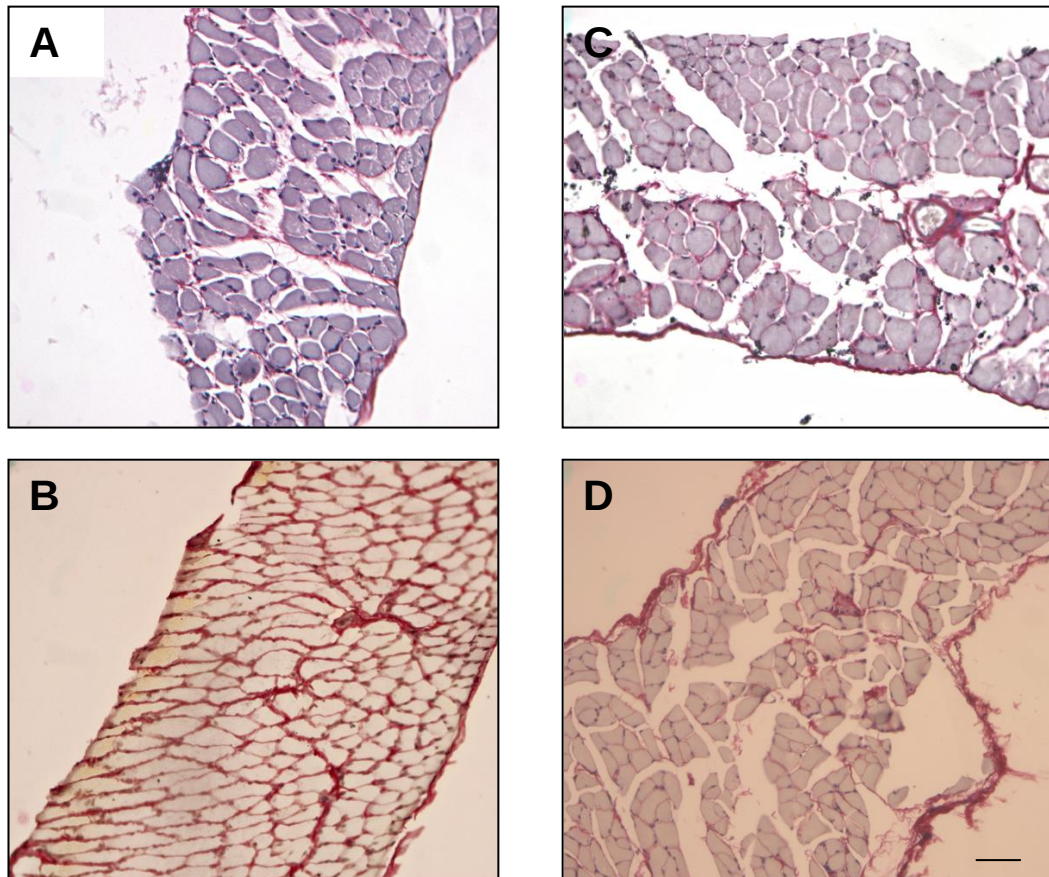


Figura 10 - Análise histológica do diafragma de camundongos C57BL/10 corados pelo picrossírius.

Fotomicrografias representativas das idades de 5 (A), 12 (B), 24 (C) e 48 semanas (D). Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Seta = fibras musculares

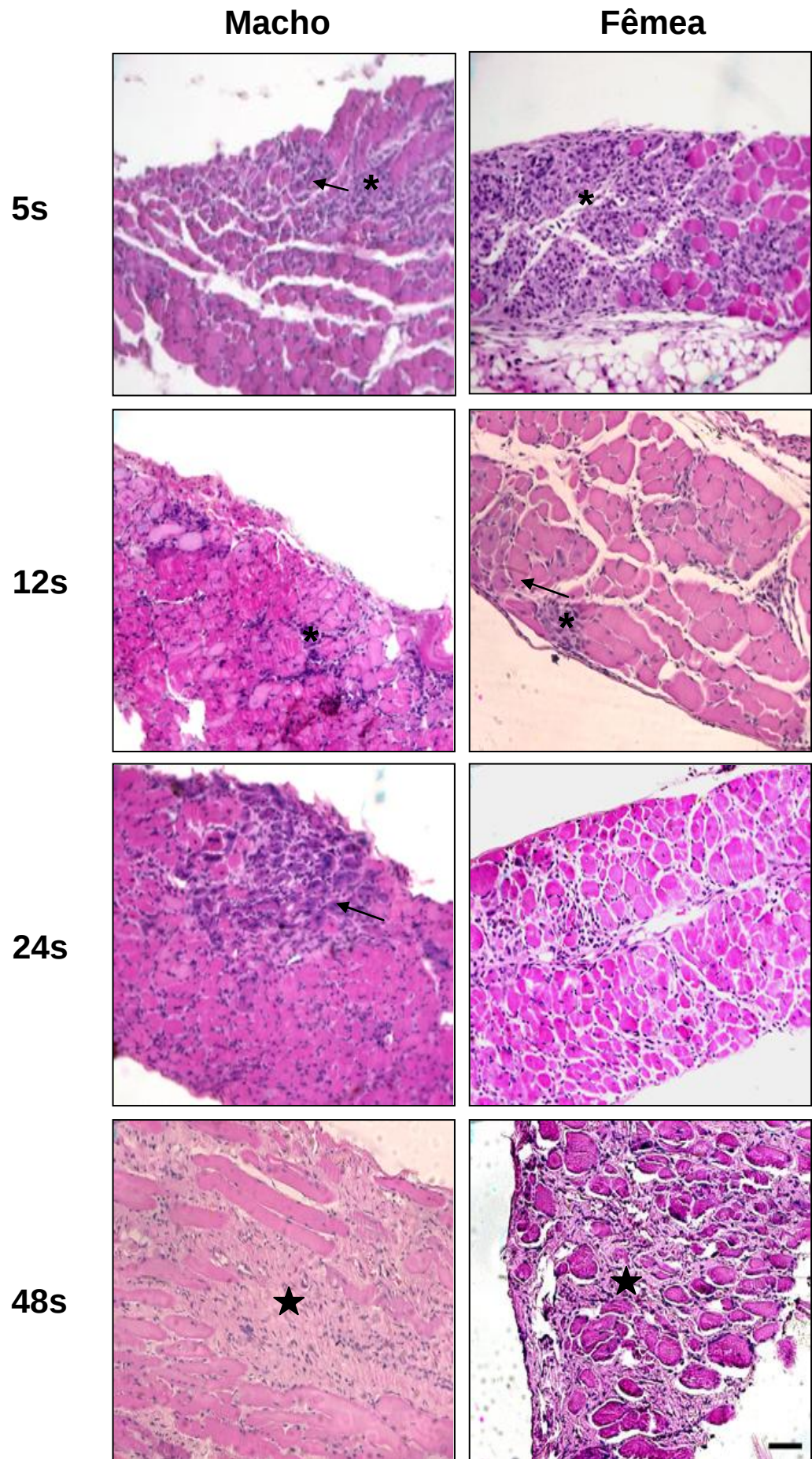


Figura 11- Análise histológica do diafragma de camundongos *mdx* corados pelo H-E.

Fotomicrografias representativas das idades de 5, 12, 24 e 48 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Asterisco = infiltrado inflamatório, seta = miofibras regenerando e estrela = conjuntivo. Barra = 50 μ m.

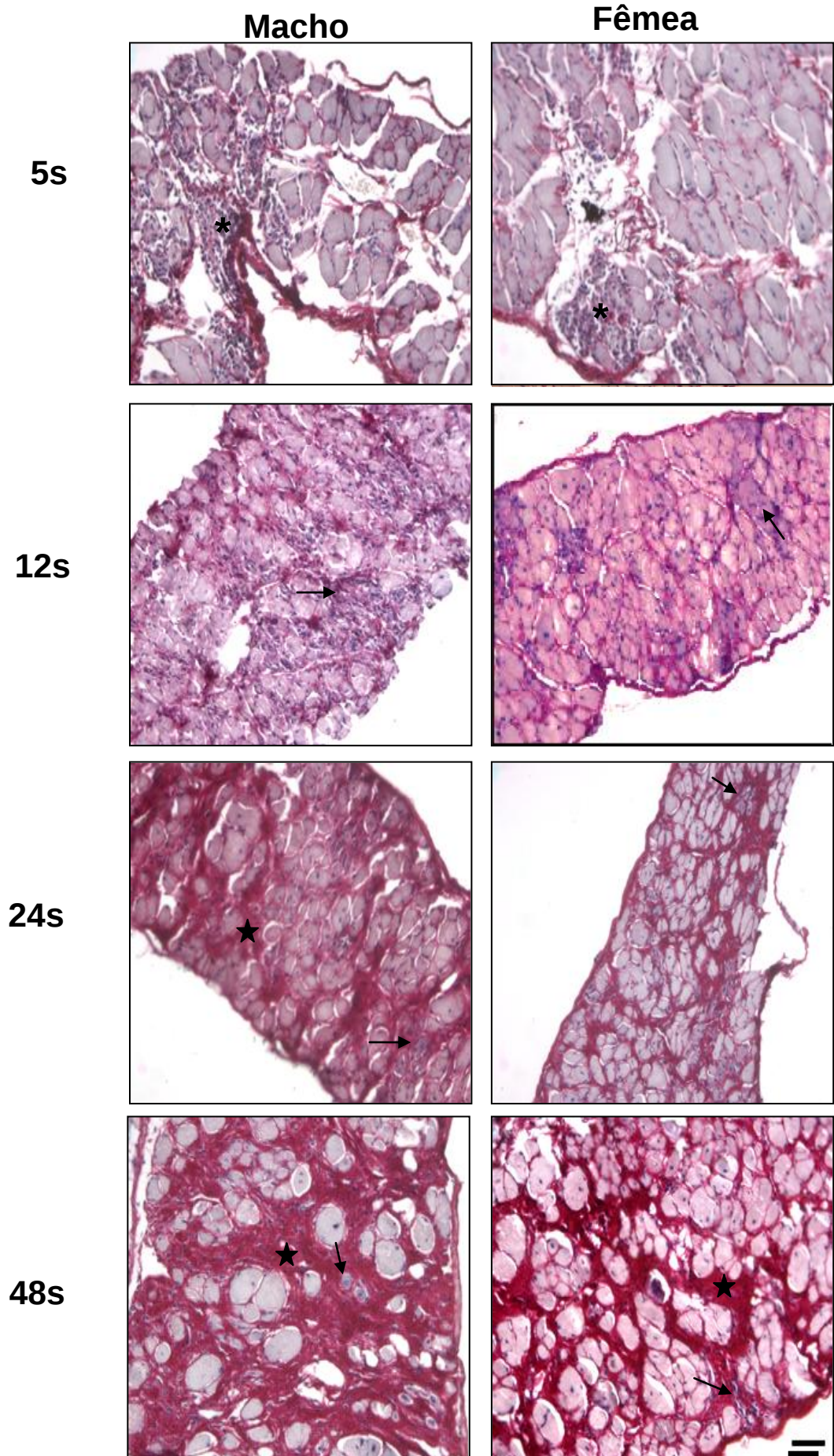


Figura 12- Análise histológica do diafragma de camundongos *mdx* corados pelo picrosírius.

Fotomicrografias representativas das idades de 5, 12, 24 e 48 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Asterisco = infiltrado inflamatório, seta = miofibras regenerando e estrela = conjuntivo. Barra = 50 μ m.

5.2. Análise histológica do omento do camundongo *mdx*.

O omento do camundongo C57BL/10 apresentou extensas áreas de tecido adiposo e pequenos aglomerados de *milk spots* em todas as idades estudadas (ver Figura 13). Em contraste, o omento do *mdx* mostrou um aumento das áreas de *milk spots* em todas as idades (Figura 14). Esse aumento foi mais evidente nas fêmeas de 48 semanas. Considerando-se que o omento é um sensor inato de dano tecidual tendendo a aderir nos órgãos com injúria tecidual (Singh, Patel *et al.*, 2008; Singh, Pancholi *et al.*, 2009), observamos no diafragma de alguns camundongos *mdx* com 24 semanas, fragmentos de omento associados ao tecido muscular (Figura 15).

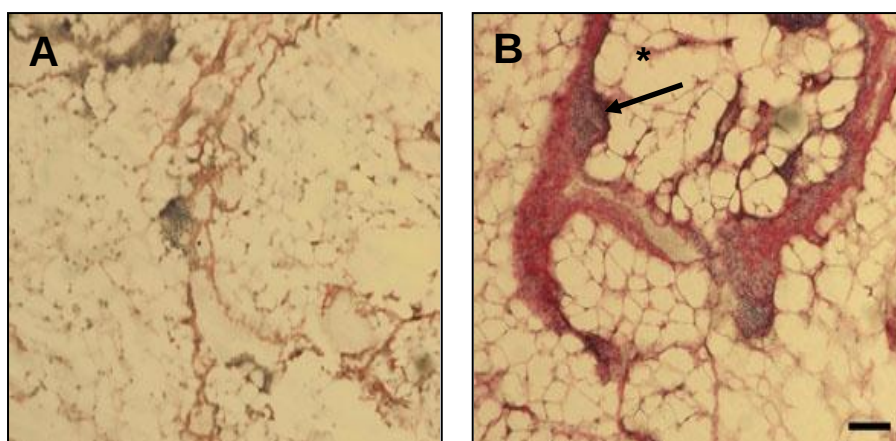


Figura 13: Morfologia do omento de camundongos C57BL/10.

Coloração de picrosírius de cortes histológicos do omento de camundongos machos de 12 (A) e 24 (B) semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Asterisco = tecido adiposo, seta larga = *milk spot*. Barra = 100 μ m.

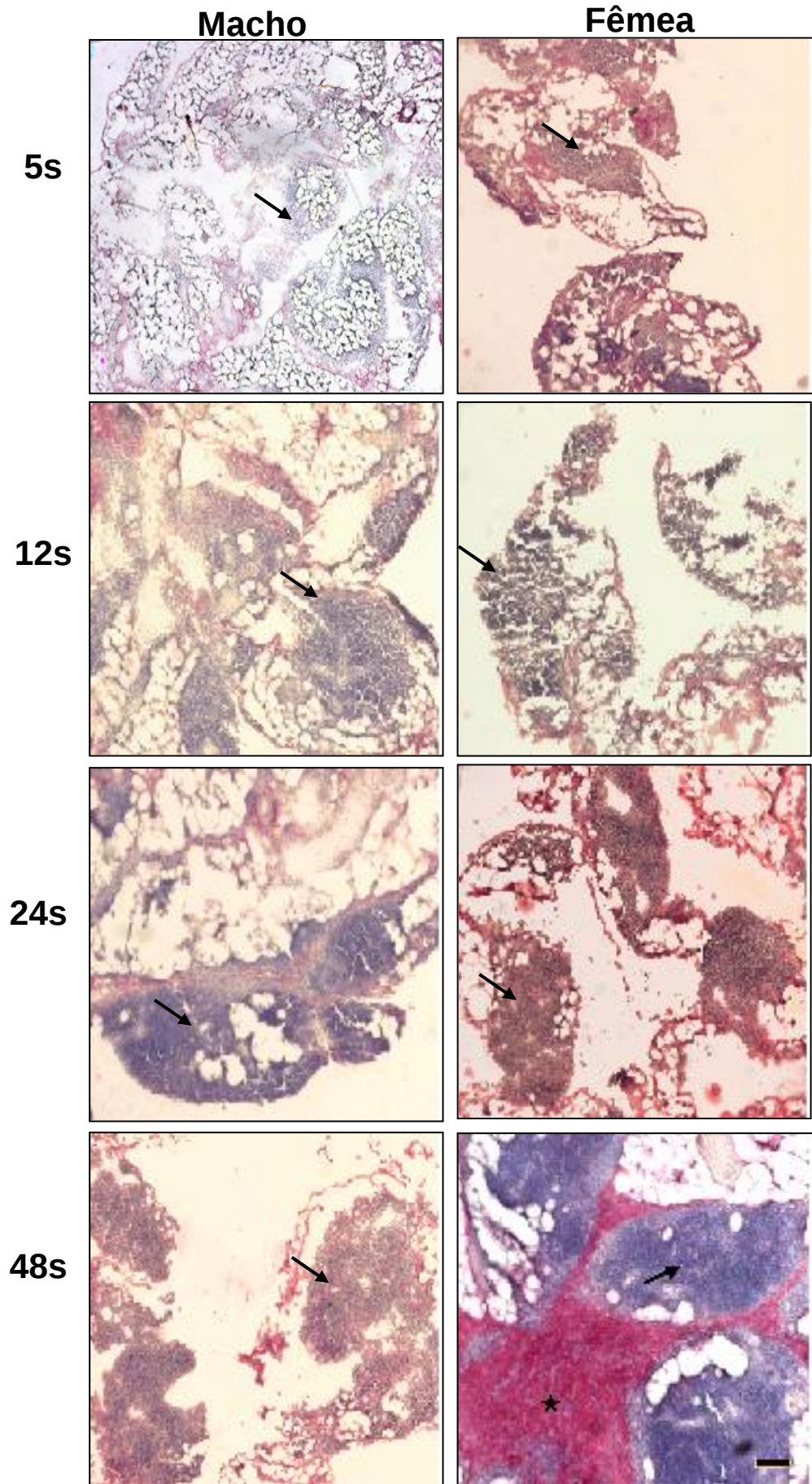


Figura 14- Morfologia do omento de camundongos *mdx* .

Coloração de picrossírius nos cortes histológicos de omento de camundongos *mdx* machos e fêmeas nas idades de 5, 12, 24 e 48 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Setas = *milk spot*, estrela = áreas de mesotélio que, em geral, coincidem com as regiões de deposição de colágeno. Barra = 100µm.

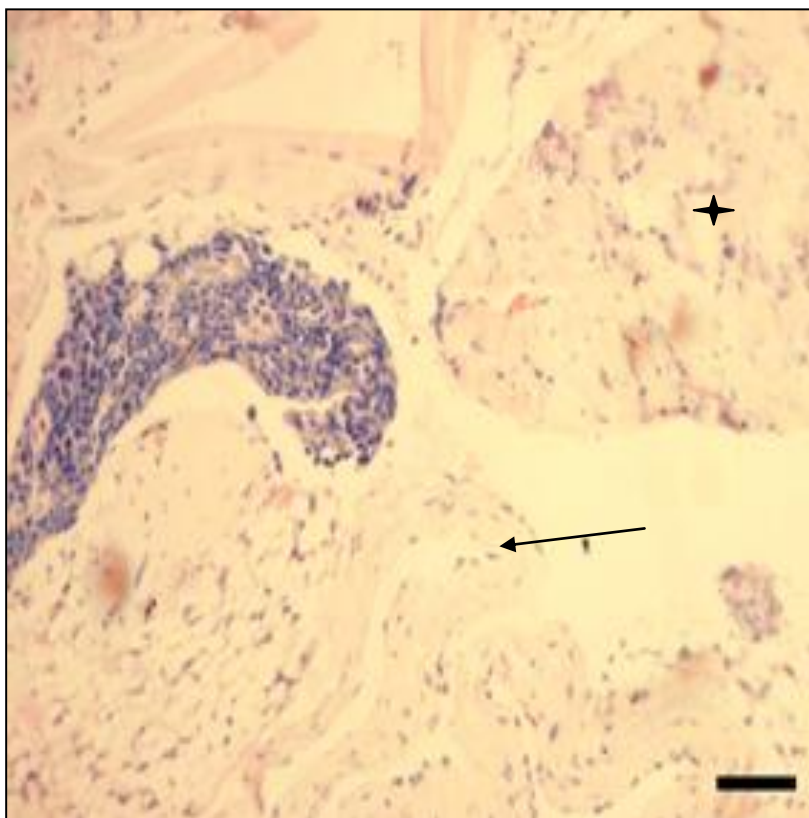


Figura 15- Análise histológica do diafragma de camundongo *mdx* corado por Giemsa.

Fotomicrografia representativa do musculo diafragma do camundongo *mdx* macho com 24 semanas mostrando uma associação a uma estrutura semelhante ao omento. Seta = omento, estrela = diafragma. Barra = 100µm.

A análise morfométrica das lâminas de picrossírius mostrou que os animais controles machos e fêmeas em todas as idades apresentaram em média 7% ($\pm$ 4,3%) da área total do tecido ocupada por *milk spots* independente do sexo (ver Figura 16). Camundongos *mdx* machos e fêmeas apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) das regiões ocupadas por *milk spot* em todas as idades.

Importante ressaltar que fêmeas *mdx* com 48 semanas apresentaram um percentual 3,5 vezes maior da área total ocupada por *milk spot* que os *mdx* machos pareados.

Os camundongos C57BL/10 apresentaram em média 81% ($\pm 8,3$) do omento ocupado por tecido adiposo, enquanto camundongos *mdx* apresentaram uma diminuição na maioria das idades estudadas. Essa diminuição foi ainda mais evidente nas *mdx* fêmeas (5 vezes) com 48 semanas. Não foi observada alteração significativa nas áreas de mesotélio (dados não mostrados).

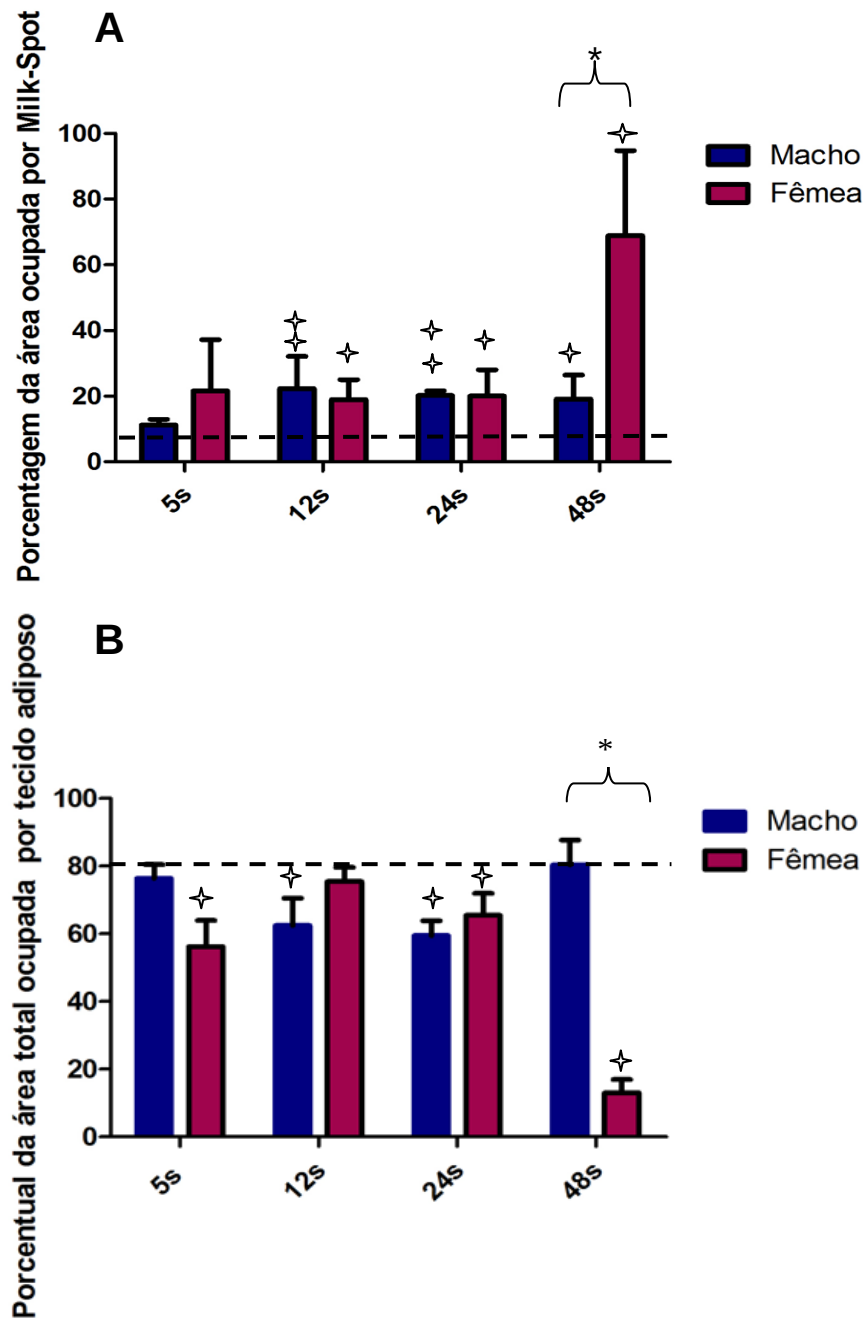


Figura 16- Porcentual da área total ocupada por *milk spot* e tecido adiposo no omento de camundongos *mdx*.

Gráficos relativos ao porcentual da área ocupada por *Milk spot* (A) e tecido adiposo (B). A linha tracejada indica a média das porcentagens dos controles C57BL/10 de todas as idades; uma estrela= $p < 0,05$, duas $p < 0,01$ em relação ao controle de mesmo sexo e idade. * $p < 0,05$. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Cada barra representa a média e seu respectivo desvio padrão (A) e erro padrão (B)

5.3. Alterações no microambiente do omento

O método de impregnação pela prata utilizando reticulina de Gomori foi selecionado para evidenciar a presença de fibras reticulares constituídas principalmente por colágeno tipo III que representam o principal arcabouço de sustentação de órgãos hematopoiéticos. As fibras reticulares são de pequeno diâmetro, formam uma rede e sofrem grande variação de forma e volume. Uma distribuição da rede de fibras reticulares foi observada principalmente nas regiões de *milk spot* que foram mais densas no omento de camundongos *mdx* com 12 semanas e 24 semanas (ver Figura17).

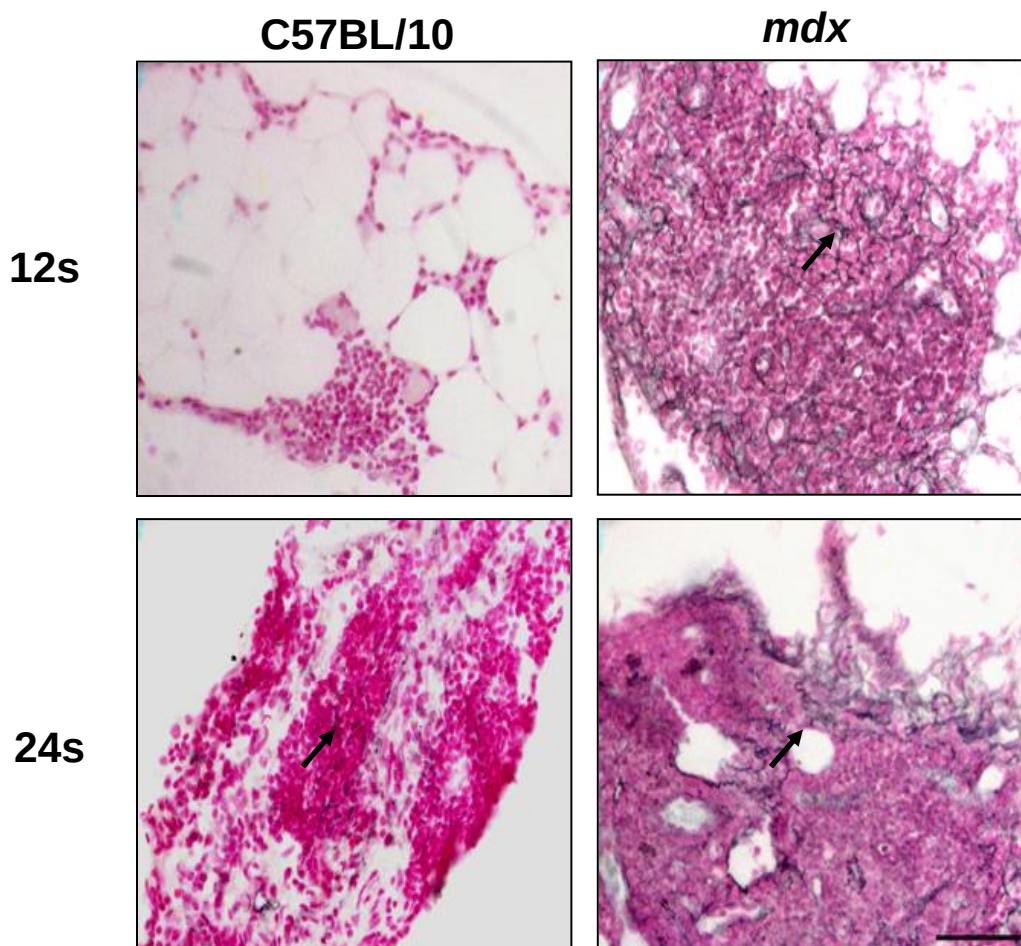


Figura 17- Distribuição das fibras reticulares no omento.

Fotomicrografia do omento de camundongos C57BL/10 e *mdx* macho nas idades de 12 e 24 semanas corado pelo método de Reticulina de Gomori. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Seta = fibras reticulares. Barra = 50µm

5.4. Expressão de FGF-2 no omento

FGF é considerado um importante fator na regeneração muscular por estimular a proliferação de mioblastos (Olwin e Rapraeger, 1992; Olwin, Arthur *et al.*, 1994; Charge e Rudnicki, 2004) sendo assim importante analisar a sua presença no omento de camundongos *mdx*. Independentemente do gênero e idade, o omento do camundongo controle C57BL/10 apresentou uma suave marcação para FGF-2

principalmente nas áreas de tecido adiposo e *milk spot* (Figura 18). Não foram encontradas diferenças na imunomarcacão para FGF no *mdx* nas idades de 5 semanas em relacão ao controle C57BL/10 pareado. Contudo, em 12 e 24 semanas foram encontradas áreas fortemente marcadas no omento do camundongo *mdx* e nas áreas de *milk spots* foi evidenciada maior formacão de aglomerados (*clusters*) de células produtoras de FGF-2 (Figura19).

A análise histomorfométrica forneceu indicacão da produção de FGF-2 nas diferentes regiões do omento além de um parâmetro relacionado também ao FGF-2 associado a componentes de matriz extracelular (Figura 20). Camundongos *mdx* machos com 5 semanas não apresentaram marcação detectável de FGF enquanto que as fêmeas apresentaram uma marcação tênue mas mensurável 0,2% ($\pm 0,3$). Não encontramos diferenças significativas com relacão aos camundongos *mdx* machos e fêmeas com 12 semanas em relacão aos camundongos C57BL/10. Independente do gênero, os camundongos *mdx* com 24 semanas apresentaram aumento significativo na área de marcação de FGF (machos: 10,9% $\pm 1,5$; fêmeas; 11,7% $\pm 6,1$) tanto em relacão ao camundongo C57BL/10 quanto a todas as outras idades analisadas.

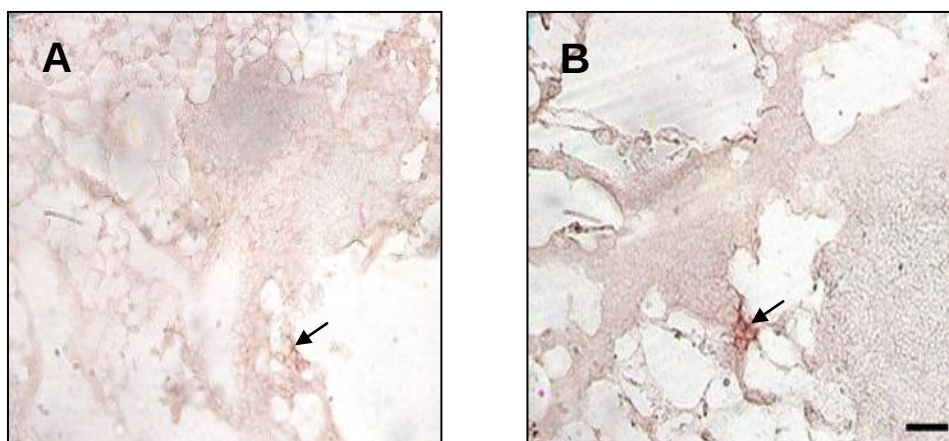


Figura 18- Imunomarcção para FGF-2 no omento de camundongos C57BL/10 com 12 (A) e 24 semanas (B).

Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Seta= Células marcadas; Barra = 50 μ m.

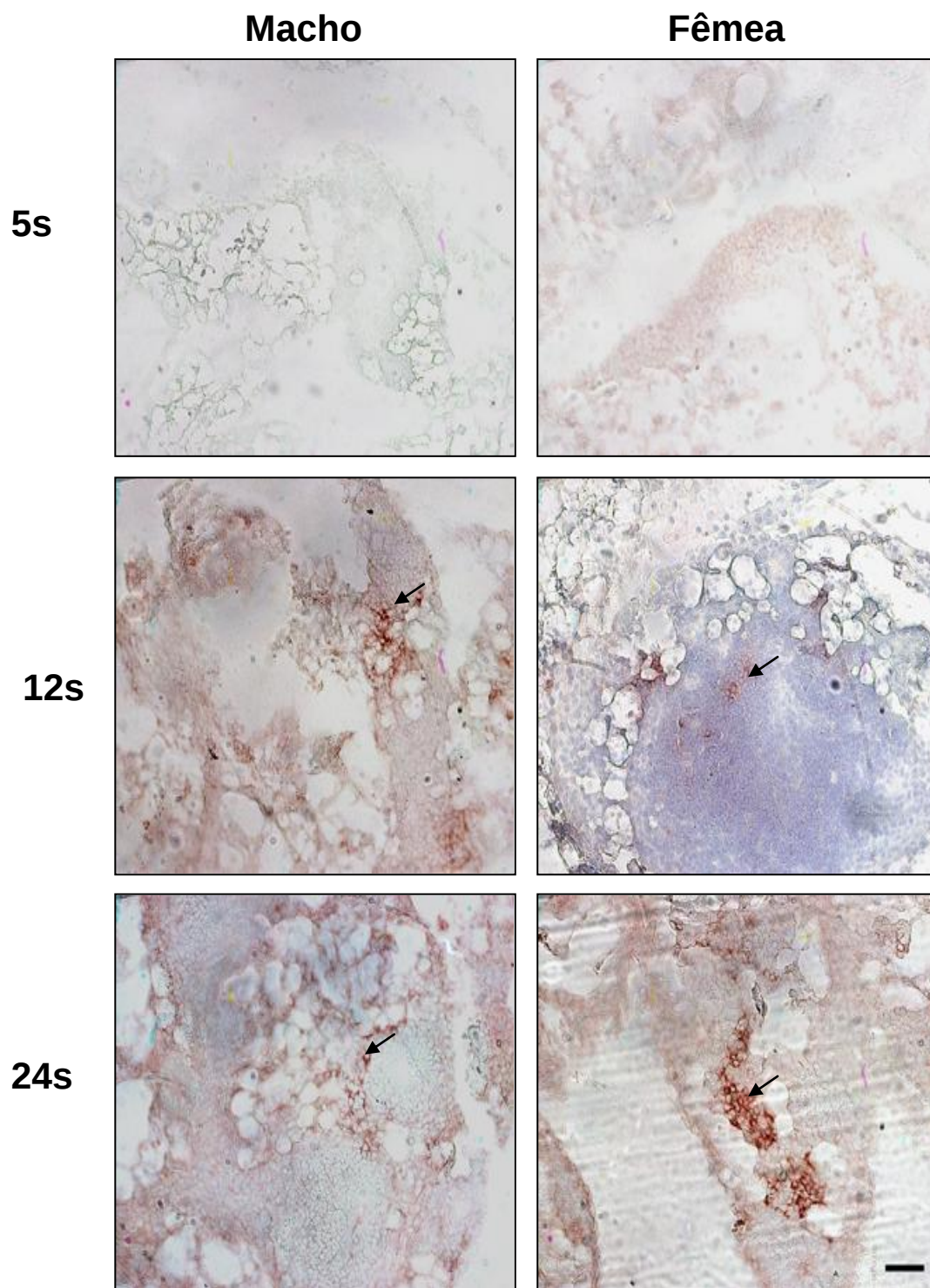


Figura 19- Imunomarcção para FGF-2 no omento de camundongos *mdx*

Fotomicrografias de omentos de camundongos *mdx* machos e fêmeas com 5, 12 e 24 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Seta = grupos de células fortemente marcadas. Barra= 50µm

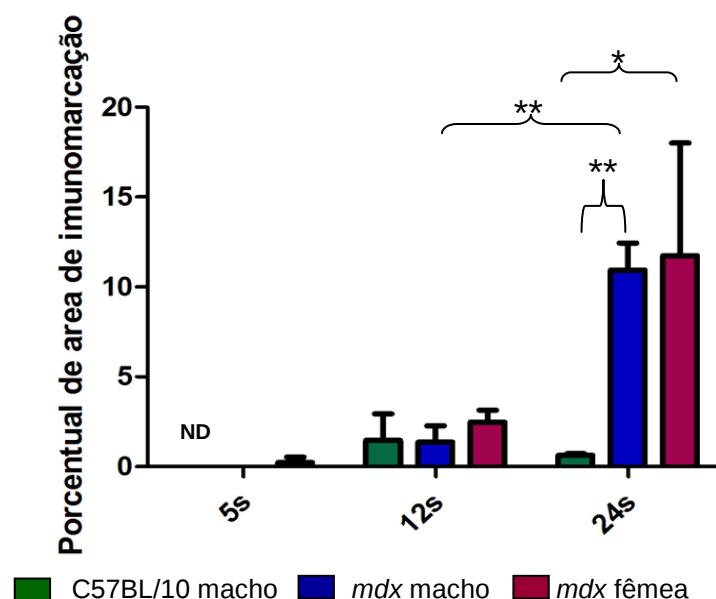


Figura 20- Porcentual de imunomarcção de FGF-2 no omento.

Resultado expresso em porcentual da área total ocupada pela imunomarcção. * = $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ND= não detectável. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Cada barra representa a média e seu respectivo desvio padrão.

5.5. Distribuição Topográfica das Células Linfóides No Omento

Para determinar a distribuição de algumas subpopulações de linfócitos T e B no omento do camundongo *mdx* foram selecionadas as moléculas de superfície: B220 (linfócitos B e progenitores hematopoiéticos), CD4 e CD8 (linfócitos T).

O omento do camundongo controle C57BL/10 com 24 semanas apresentou poucas células B e T nas raras regiões de *milk spots* em relação ao camundongo *mdx* pareado (Figura 21). Entretanto, na maioria dos camundongos *mdx*, os *milk spots* do omento apresentavam arquitetura semelhante a órgão linfóide secundário com boa definição de regiões ocupadas por linfócitos T e B (Figura 22). Inclusive com alguns animais apresentando *milk spots* quase inteiramente ocupados por

linfócitos B. Interessante ressaltar que esses aglomerados de linfócitos B foram encontrados ainda que em baixa frequência em camundongos *mdx* fêmeas com 5 semanas mas não nos camundongos *mdx* machos pareados (Figura 23).

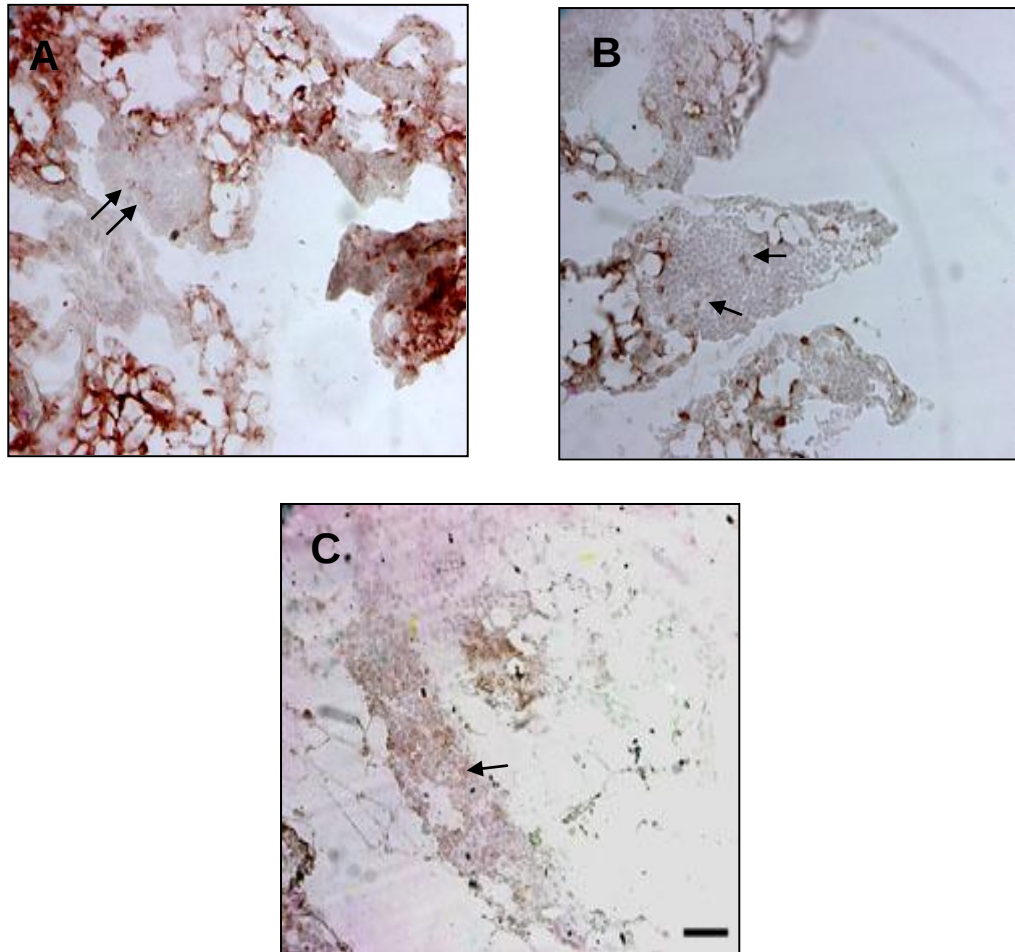


Figura 21- Imunomarcção para linfócitos no omento de camundongos C57BL/10.

Imunomarcção para CD4 (A), CD8 (B) e B220 (C) no omento de camundongos C57BL/10 machos de 24 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. As setas mostram as células com imunomarcção positiva para cada anticorpo. Barra = 50µm.

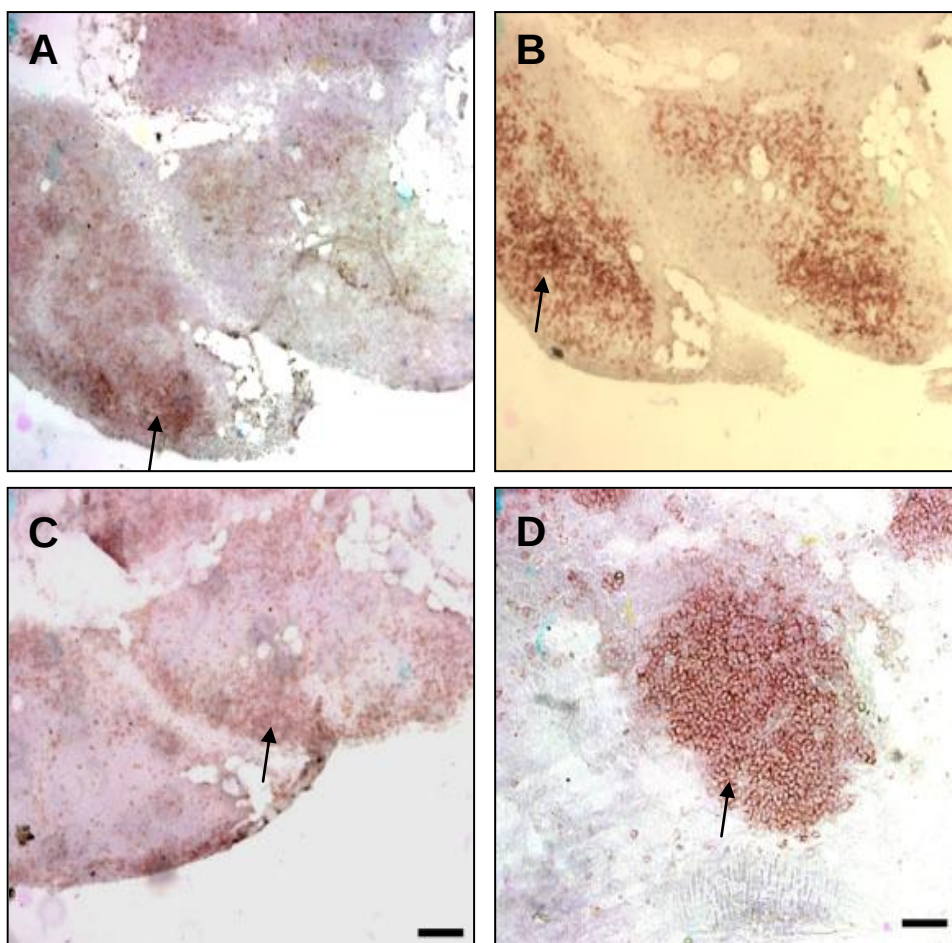


Figura 22- Fenotipagem de linfócitos na região de *milk spot* do omento de camundongo *mdx*.

Fotomicrografia representativa de omento do camundongo *mdx* com 24 semanas mostrando a presença de células $CD4^+$ (A), $CD8^+$ (B) e $B220^+$ (C) em cortes seriados do *milk spot*. Alguns *milk spots* apresentaram intensa marcação de B220 ocupando quase integralmente sua área (D). Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Setas mostram células marcadas. Barra das figuras A, B e C =100 μ m; e da figura D =50 μ m.

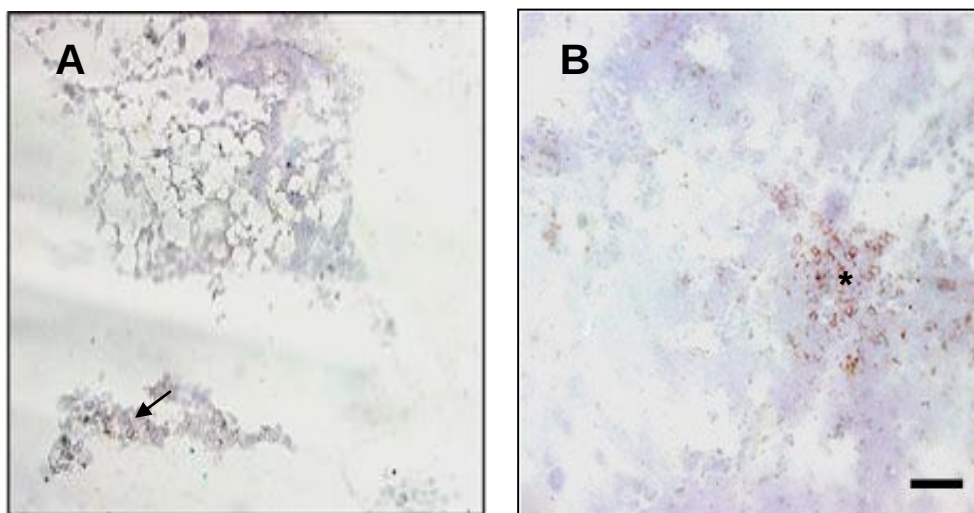


Figura 23- Imunomarcção para B220 no omento do camundongo *mdx*.

Camundongos *mdx* machos (A) e fêmeas (B) com 5 semanas de idade. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Asterisco = grupo de células B220⁺, Seta= células B220⁺ isoladas. Barra corresponde a 50 μ m.

Foram realizadas imunomarcações para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) com o intuito de analisar se aumento na área de *milk spot* no omento do camundongo *mdx* era decorrente de um aumento na proliferação celular local. Os resultados de imunomarcção mostram haver considerável aumento na proliferação de células isoladas no *milk spot* de camundongos *mdx* com 24 semanas e também de grupos de células B220⁺PCNA⁺ duplo positivas com fenótipo característico de células de estrutura folicular (Figura 24).

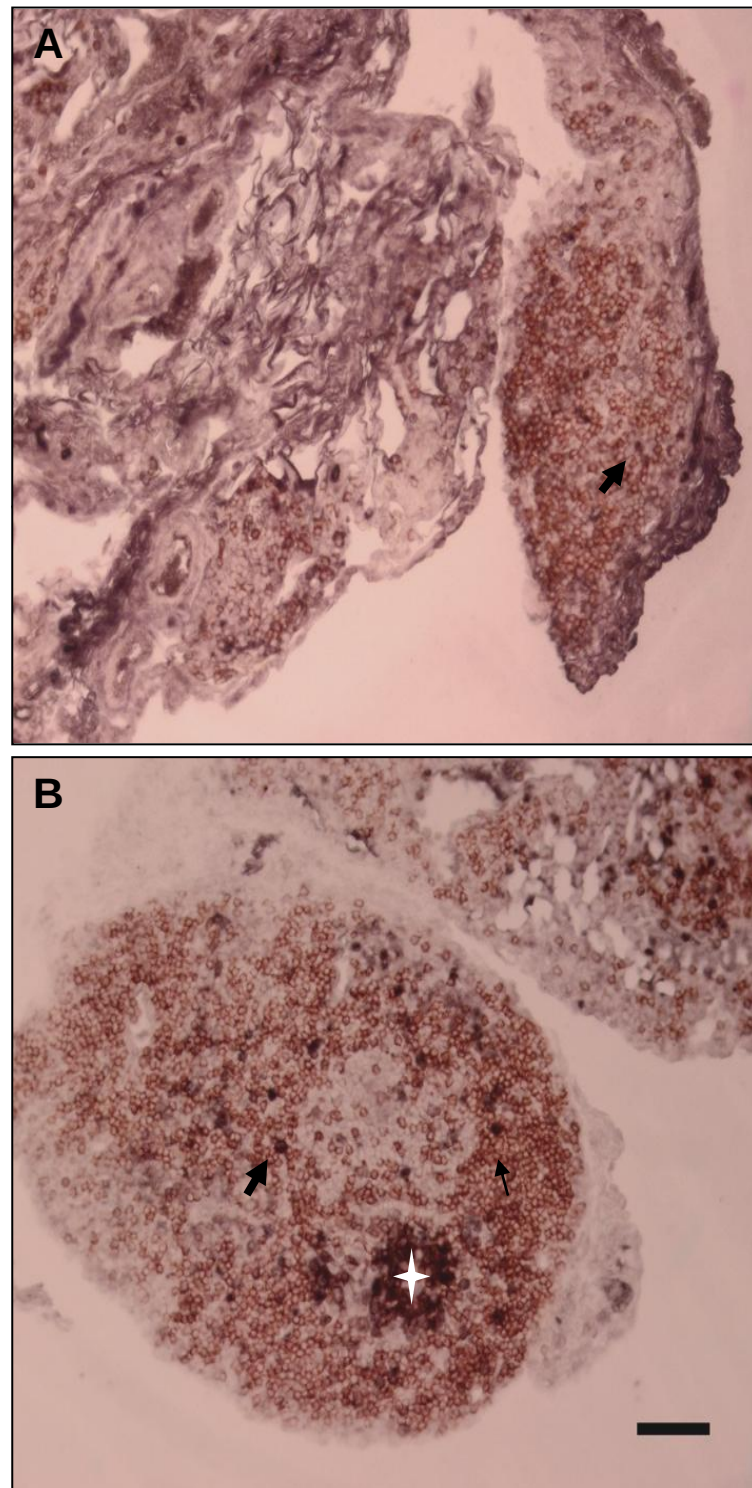


Figura 24- Dupla marcação para B220(vermelho) e PCNA(preto) no omento.

Fotomicrografia representativa mostrando aumento de proliferação de células isoladas (seta) e formação de grupos de células B220⁺PCNA⁺ (estrela) nos omentos de camundongos macho *mdx* (B) em relação ao controle pareado C57BL/10 macho de 24 semanas (A). Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Barra = 50µm.

5.6. Presença de mastócitos no omento nas diferentes fases da distrofia do camundongo *mdx*.

A coloração Giemsa, utilizada para evidenciar a presença de mastócitos, mostrou que tanto no camundongo controle como no distrófico, os mastócitos localizavam-se preferencialmente nas regiões de tecido adiposo e mesotélio (Figuras 25 e 26). A análise morfométrica indicou um aumento significativo no número de mastócitos no omento de camundongos *mdx* machos com 5 semanas em relação ao controle pareado. Não foram observadas diferenças quantitativas de mastócitos entre camundongos machos *mdx* e C57BL/10 com 12 e 24 semanas, mas camundongos *mdx* com 48 semanas apresentaram uma grande redução no número de mastócitos (Figura 27). As fêmeas *mdx* com 24 e 48 semanas apresentaram respectivamente 5 mastócitos/mm² e 4.2 mastócitos/mm², que representou média menor de mastócitos que os camundongos C57BL/10 pareados (16,8 e 68 mastócitos/mm² respectivamente). Análise comparando mastócitos nos camundongos *mdx* machos e fêmeas mostrou que os camundongos *mdx* machos com 12 semanas (24 mastócitos/mm²) e 48 semanas (15 mastócitos/mm²) apresentaram significativamente mais mastócitos do que camundongos *mdx* fêmeas pareadas.

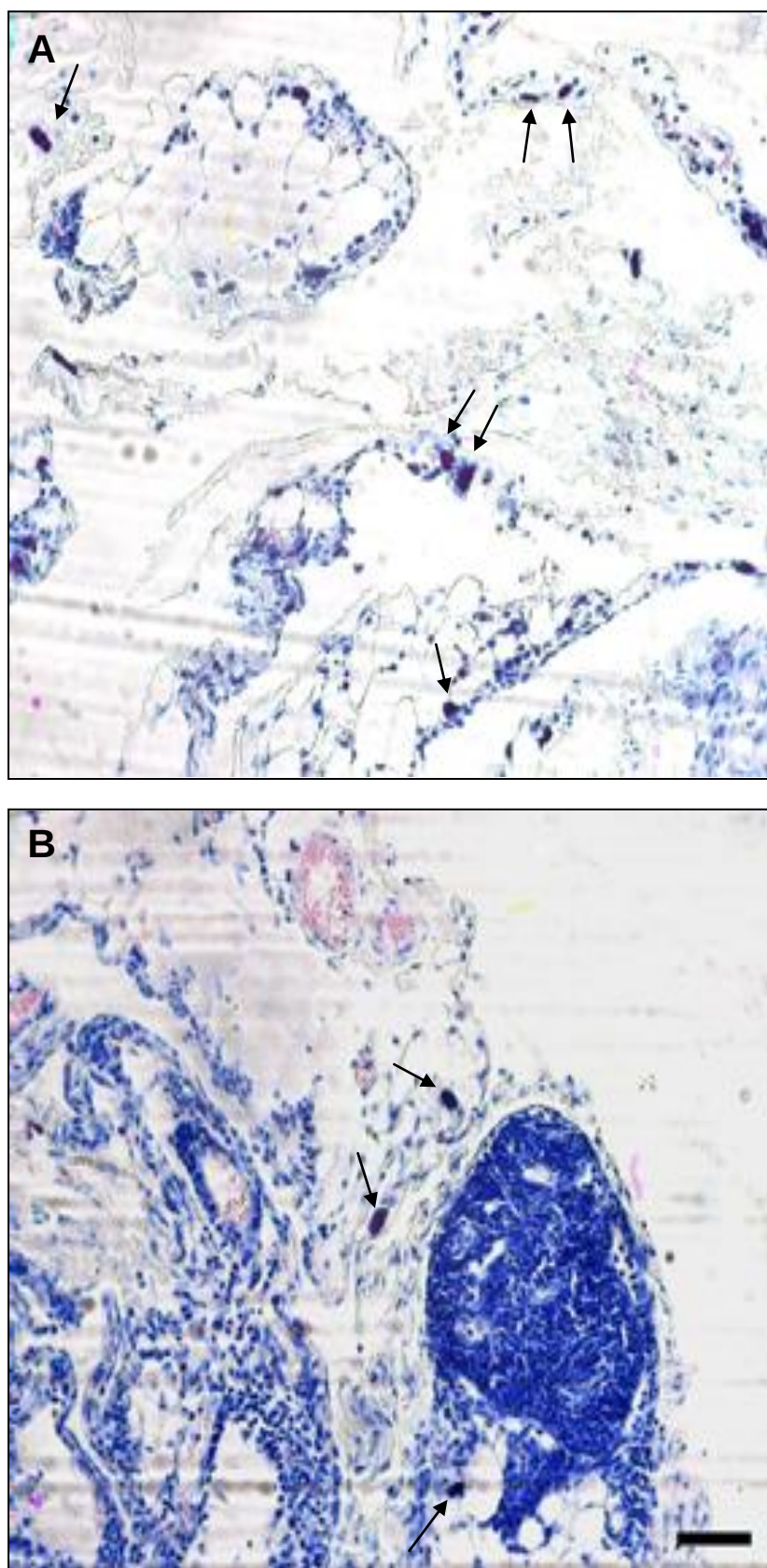


Figura 25 - Fotomicrografia do omento de camundongos machos corados pelo Giemsa.

Camundongos machos C57BL/10 (A) e *mdx* (B) com 48 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Setas = mastócitos. Barra= 50µm.

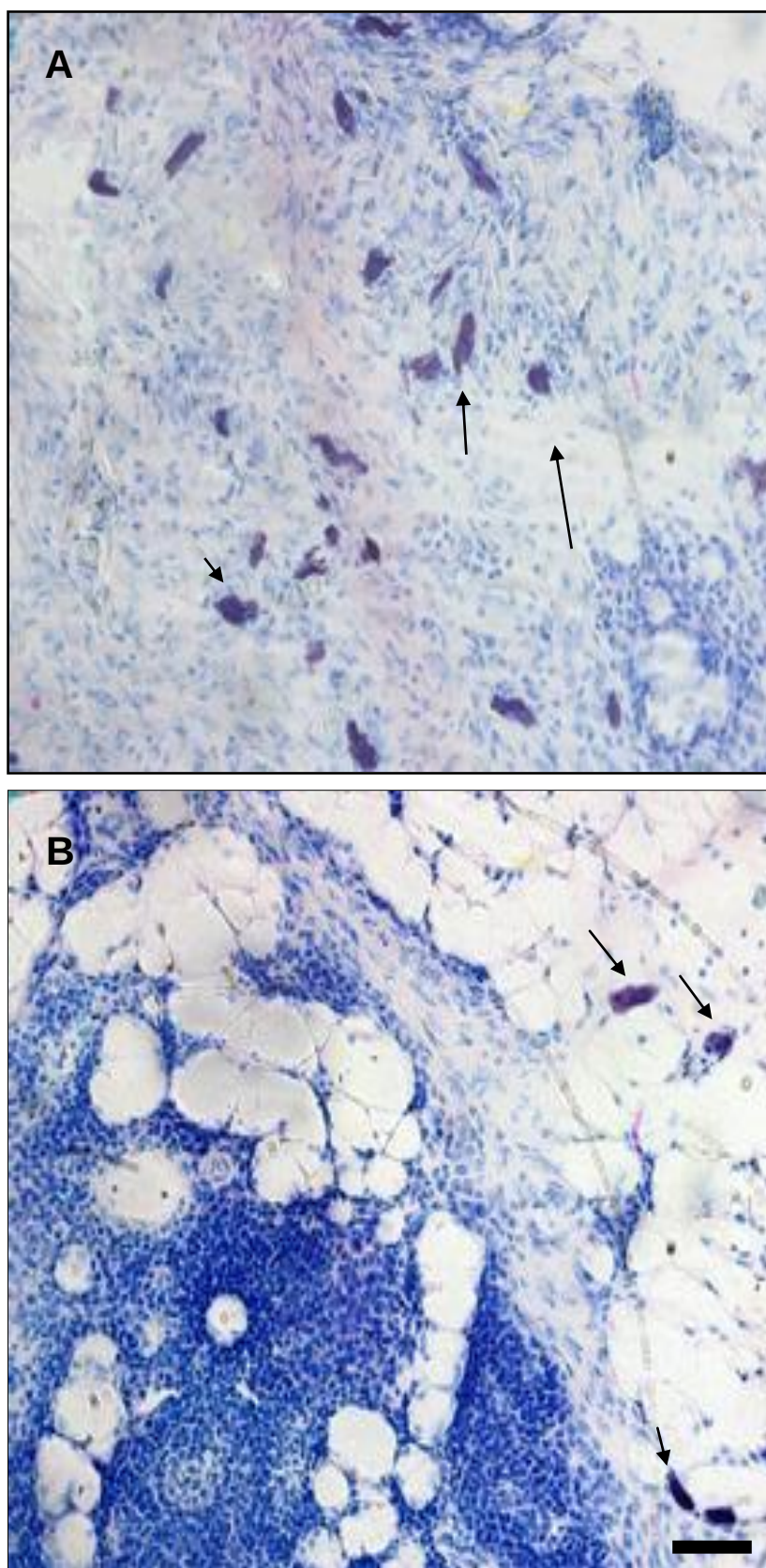


Figura 26 - Fotomicrografia do omento de camundongos fêmeas corado pelo Giemsa. Camundongos fêmeas C57BL/10 (A) e *mdx* (B) com 48 semanas. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Setas = mastócitos. Barra= 50 μ m

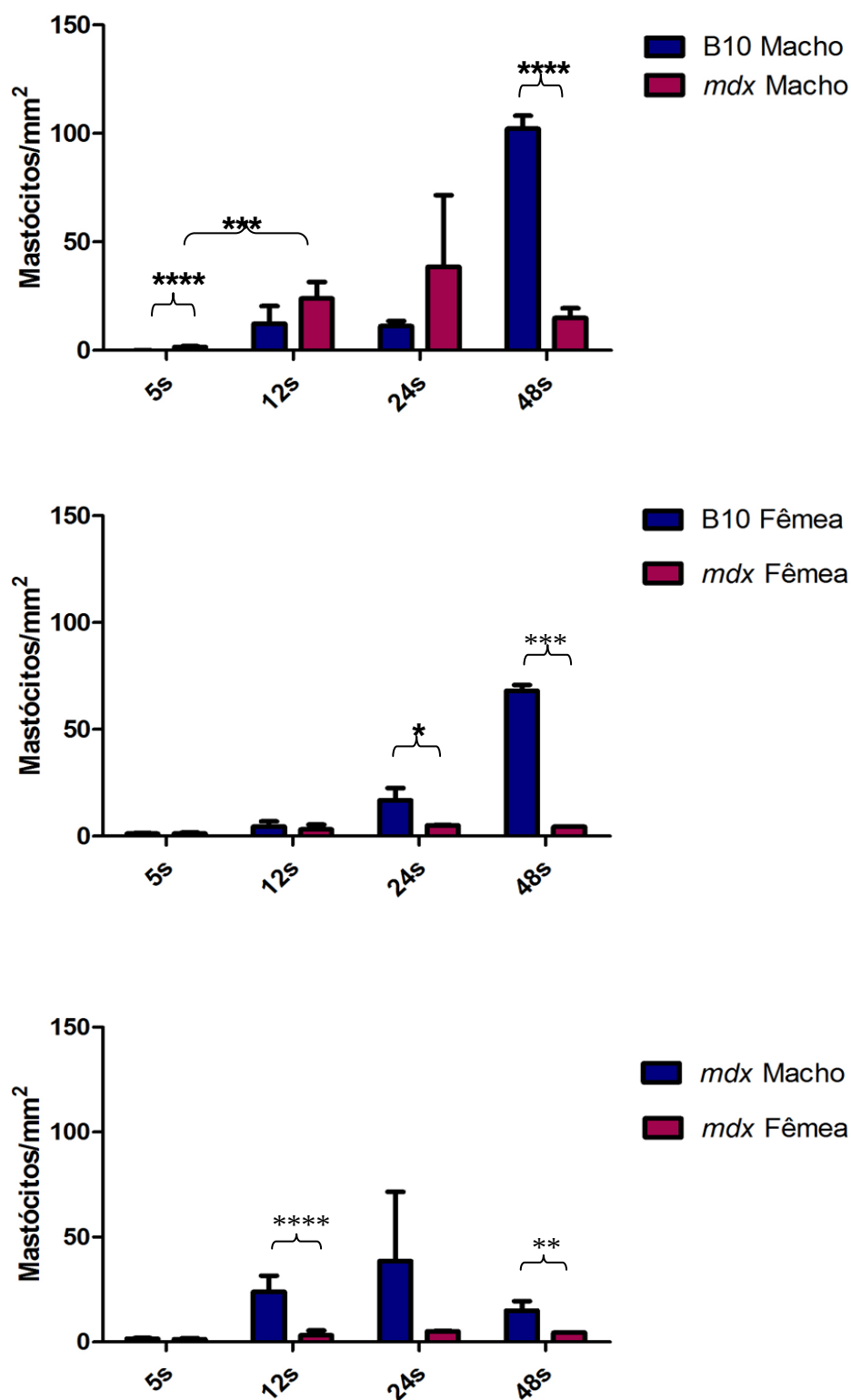


Figura 27- Morfometria de mastócitos no omento.

São representados camundongos *mdx* e C57BL/10 machos e fêmeas onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Cada barra representa a média e seu respectivo desvio padrão.

5.7. Expressão de Sca-1 no omento do camundongo *mdx*

A Imunomarcacão para antígeno Sca-1 foi feita para analisar a presença de progenitores hematopoiéticos (Ito, Li *et al.*, 2003) no omento. As células Sca-1 positivas foram encontradas em maior número nos camundongos *mdx* e localizaram-se preferencialmente nas regiões de *milk spot* (ver Figura 28).

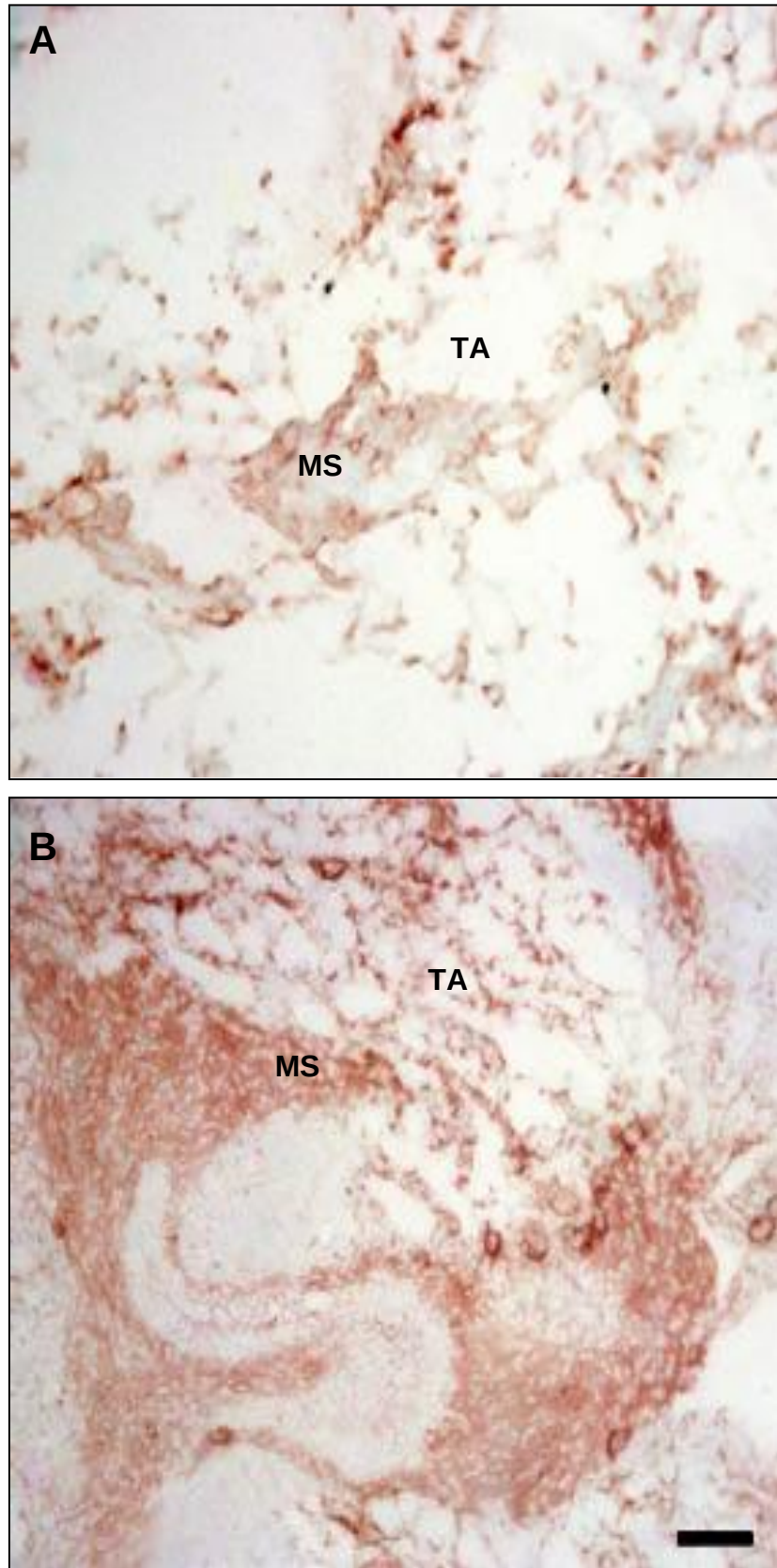


Figura 28- Imunomarcção para Sca-1 no omento de camundongos fêmeas.
Camundongos fêmeas com 24 semanas. C57BL/10 (A) e *mdx* (B). Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Barra = 50µm MS = *milk spot*, TA= Tecido adiposo.

5.8. Fenotipagem das células do omento do camundongo

mdx:

5.8.1. Determinação da celularidade do omento.

As alterações histológicas indicaram ser importante a determinação da celularidade do omento e do peritônio para confirmar uma possível ativação desses locais.

Em relação ao controle C57BL/10 pareado, a celularidade no omento do camundongo *mdx* com 12 semanas estava aumentada (Figura 29), porém uma diferença significativa só foi evidenciada no *mdx* com 24 semanas. As fêmeas C57BL/10 com 24 semanas apresentaram maior celularidade que os machos pareados. Isto foi ainda mais evidente nos camundongos *mdx* fêmeas com um aumento duas vezes maior em relação ao macho pareado.

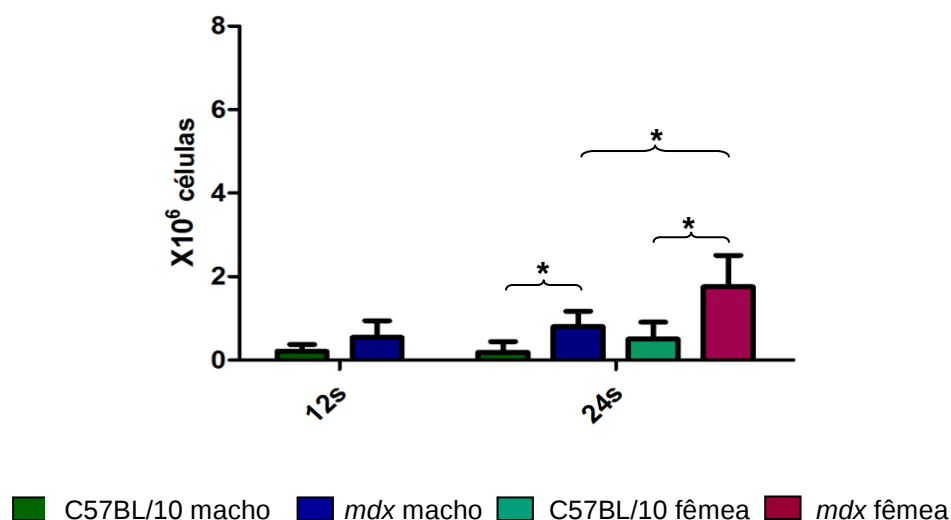


Figura 29 - Celularidade do omento.

As barras representam a média e respectivo desvio padrão dos resultados obtidos da celularidade do omento de 3 pools de animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo * $p < 0,05$.

5.8.2. Fenotipagem dos linfócitos T

Independente do gênero, o omento de camundongos *mdx* com 12 e 24 semanas apresentou em relação ao controle C57BL/10 um aumento significativo no valor absoluto de linfócito T $CD4^+$ e $CD8^+$. As fêmeas com 24 semanas apresentaram aumento significativo do percentual de células $CD8^+$ em comparação com controle C57BL/10 pareado. Também foi observado aumento significativo no percentual de células $CD4^+$ no omento de camundongos *mdx* fêmeas com 24 semanas em relação aos camundongos *mdx* machos pareados. No peritônio observamos um aumento no percentual de células $CD4^+$ no *mdx* macho com 24 semanas em relação ao controle C57BL/10, mas o camundongo *mdx* macho

apresentou valor relativo menor de células $CD4^+$ em 24 semanas em relação à fêmea pareada (Figuras 30, 31, 32).

A análise comparativa do percentual de linfócitos T $CD8^+$ no peritônio indicou uma diferença significativa entre o camundongo *mdx* com 12 semanas e o C57BL/10 pareado, também entre camundongos *mdx* com 24 semanas e o camundongo não distrófico pareado além de discreto aumento no percentual dessas células no peritônio das fêmeas *mdx* com 24 semanas em relação ao C57BL/10 pareado.

Para caracterizar a população de células $CD3^+CD4^-CD8^-$ foram feitas análises de dot plot da expressão de CD4 e CD8 dentro da população de células $CD3^+$ nos animais com 24 semanas (Figura 33). Não se observou diferença significativa em relação ao percentual de células $CD3^+CD4^-CD8^-$ tanto no omento quanto na cavidade peritoneal, mas foi possível detectar um aumento significativo nos valores absolutos do omento do *mdx* macho em relação ao C57BL/10 macho. Também se observou aumento dos valores absolutos das *mdx* fêmeas em relação a fêmea C57BL/10 e em relação aos camundongos *mdx* macho (Figura 33).

O antígeno CD25 além de ser a cadeia α do receptor de alta afinidade para IL-2 é também um marcador de células ativadas e/ou regulatórias (Polanczyk, Carson *et al.*, 2004; Anderson, Oukka *et al.*, 2007; Tiemessen, Jagger *et al.*, 2007; Tran, Ramsey *et al.*, 2007). A avaliação de CD25 nos linfócitos de $CD4^+$ (Figura 34, 35) mostrou não haver diferença significativa no percentual das células $CD4^+CD25^+$ no omento de camundongos *mdx* e C57BL/10 com 12 semanas, porém foi observado aumento 2,8 vezes maior na celularidade global (número absoluto) da subpopulação de células $CD4^+CD25^+$ nos camundongos *mdx* macho. No omento do *mdx* macho com 24 semanas foi observado aumento do percentual e número absoluto de células $CD4^+CD25^+$ em relação ao controle C57BL/10. As fêmeas *mdx* apresentaram, em relação aos machos *mdx*, percentual maior de células

CD4⁺CD25⁺. Não foi observada diferença significativa no percentual de células CD4⁺CD25⁺ no peritônio. Com relação às células CD8⁺CD25⁺ os percentuais foram sempre menores que 0,25% logo não consideramos as flutuações dessas células.

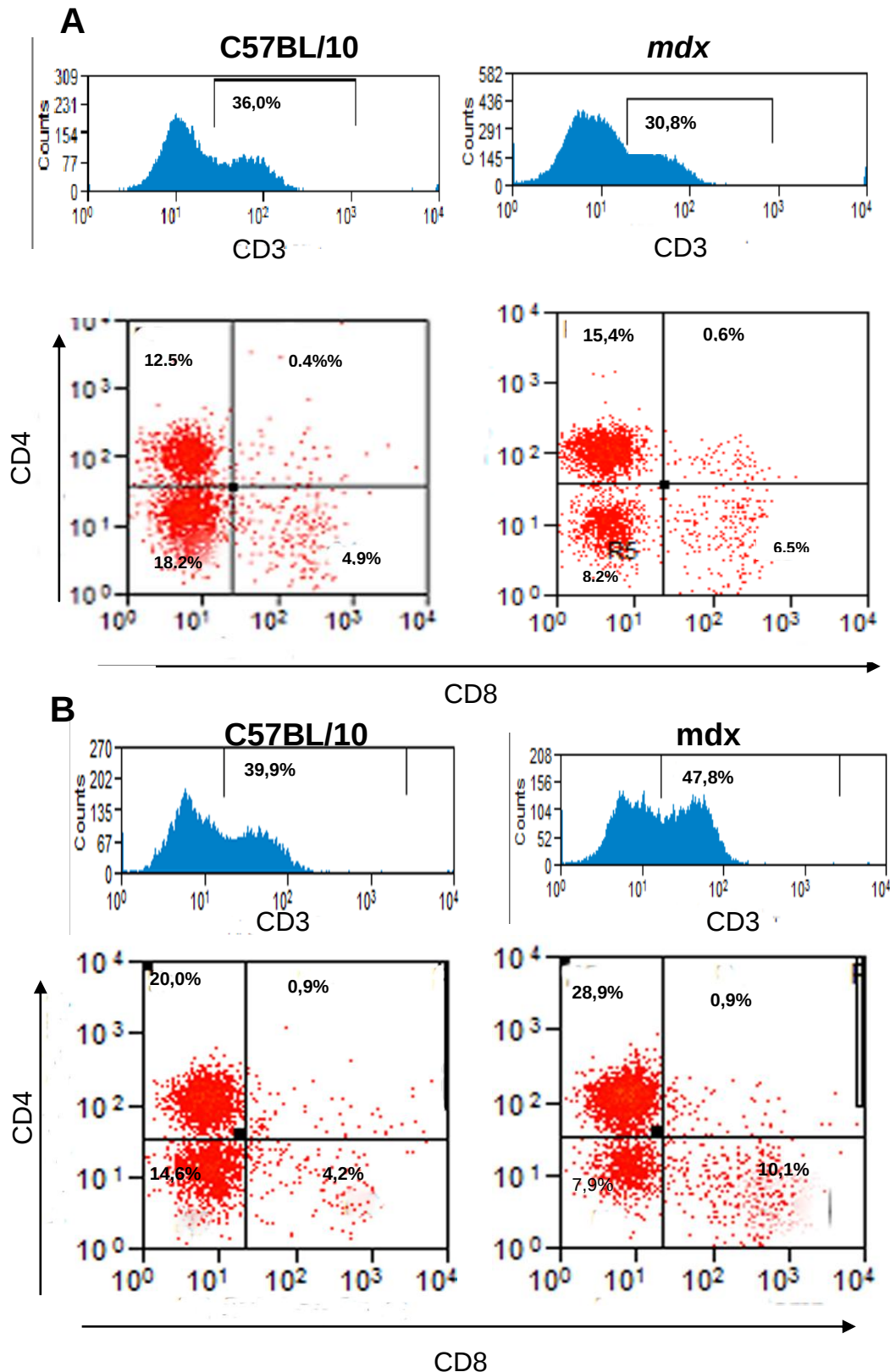


Figura 30- Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos T no omento.

São representados camundongos machos (A) e fêmeas (B) na idade de 24 semanas. Cada painel mostra um histograma com perfil representativo da marcação de CD3 nos camundongos C57BL/10 e *mdx*, e gráficos de pontos da expressão de CD4 e CD8 dentro da população de células CD3⁺.

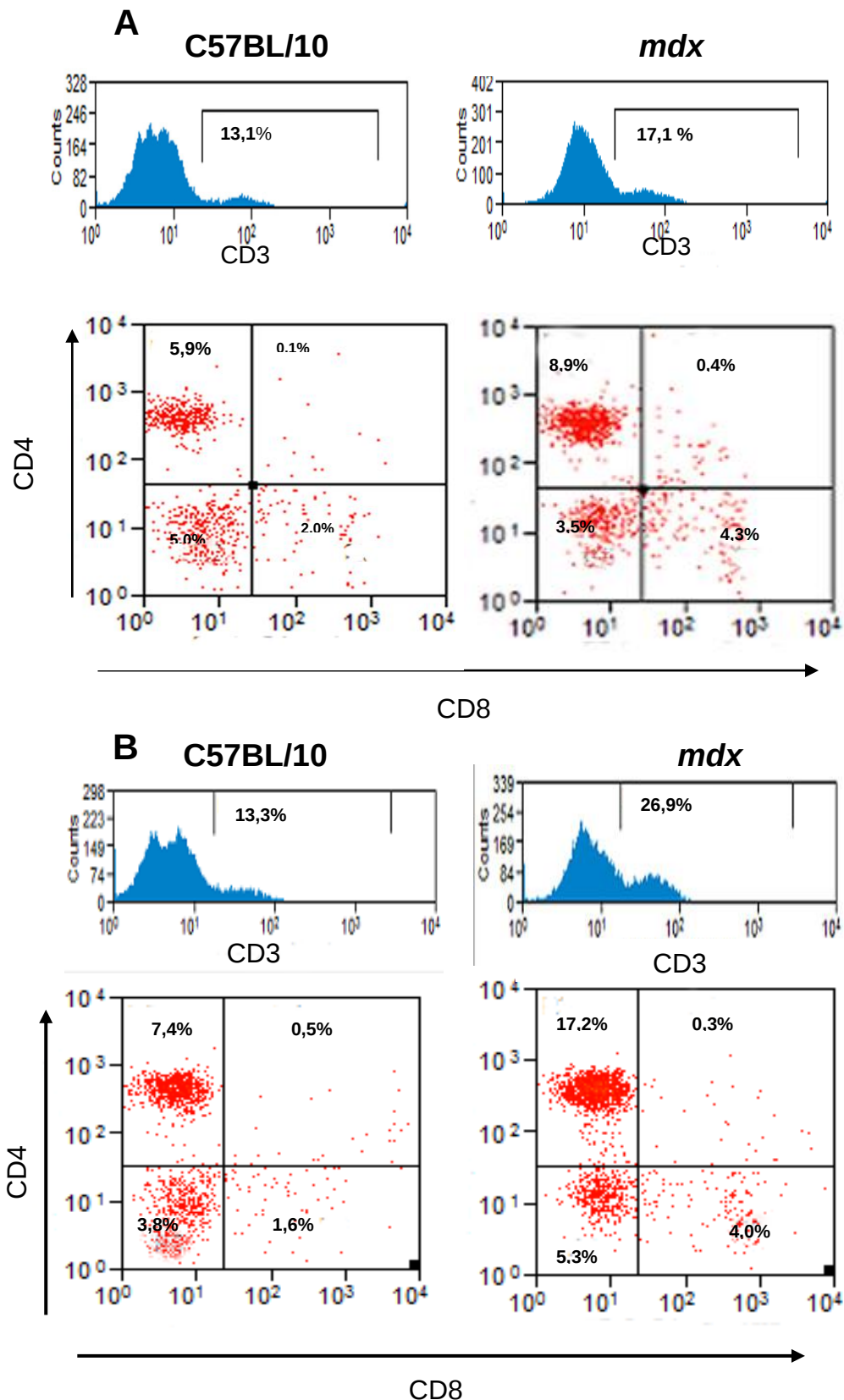


Figura 31 - Análise por citometria de fluxo dos subtipos de linfócitos T no peritônio.

São representados camundongos machos (A) e fêmeas (B) na idade de 24 semanas. Cada painel mostra um histograma com perfil representativo da marcação de CD3 nos camundongos C57BL/10 e *mdx*, e gráficos de pontos da expressão de CD4 e CD8 dentro da população de células CD3⁺.

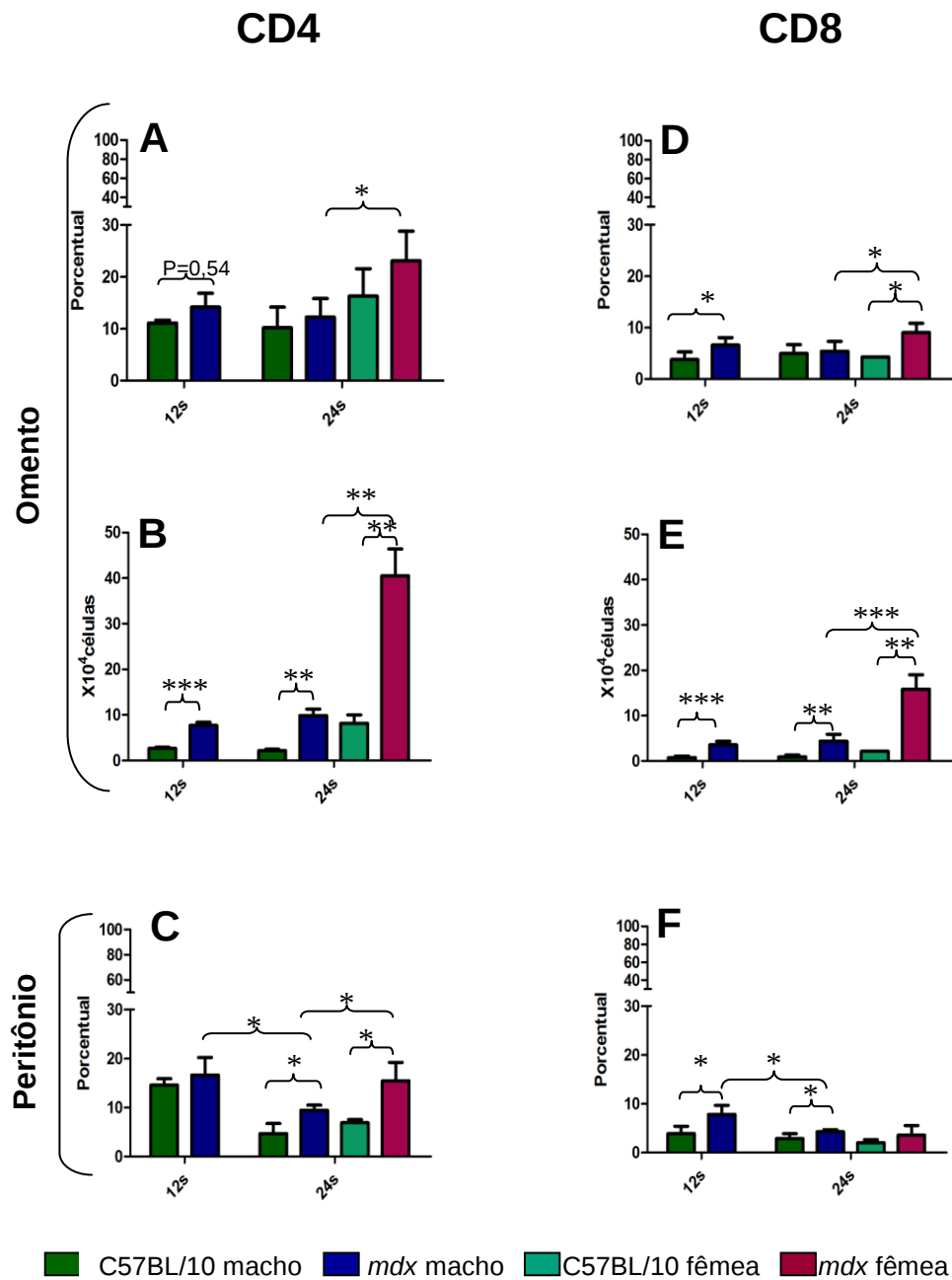


Figura 32 - Análise dos subtipos de linfócitos T no omento e peritônio.

Valores relativos (A, D, C e F) e absolutos (B, E) dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no omento (A, B, D, E) e peritônio (C, F) dos camundongos *mdx* e C57BL/10. As barras representam a média e respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 pools de animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

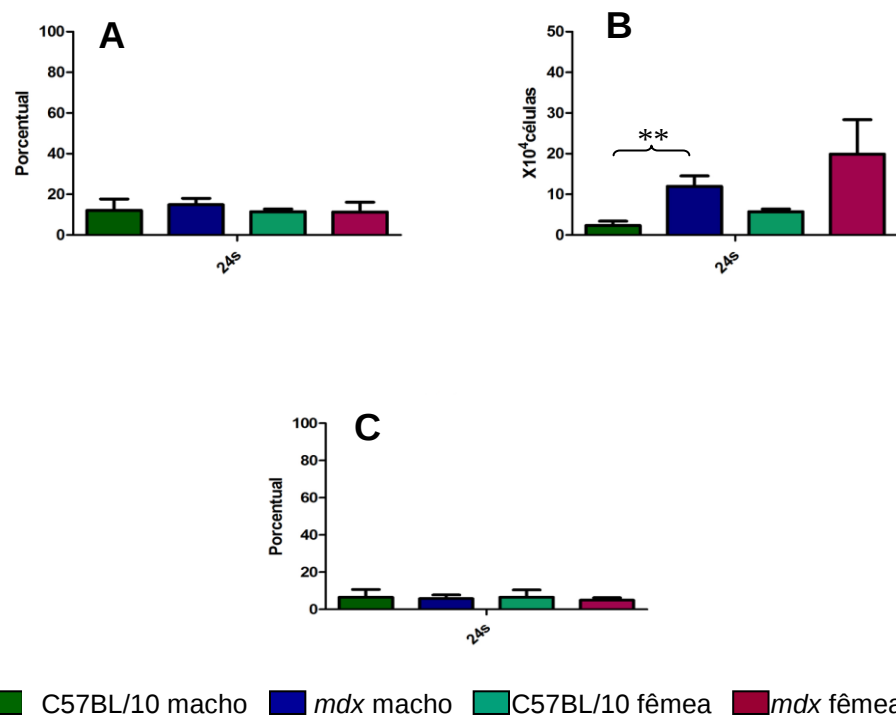


Figura 33 – Análise das populações CD3⁺CD4⁻CD8⁻ no omento e peritônio.

Gráfico com valores relativos (A) e absolutos (B) das células CD3⁺CD4⁻CD8⁻ no omento e valores relativos no peritônio(C). Foram incluídos 3 pools de animais por linhagem. Cada barra representa a média e seu desvio padrão.

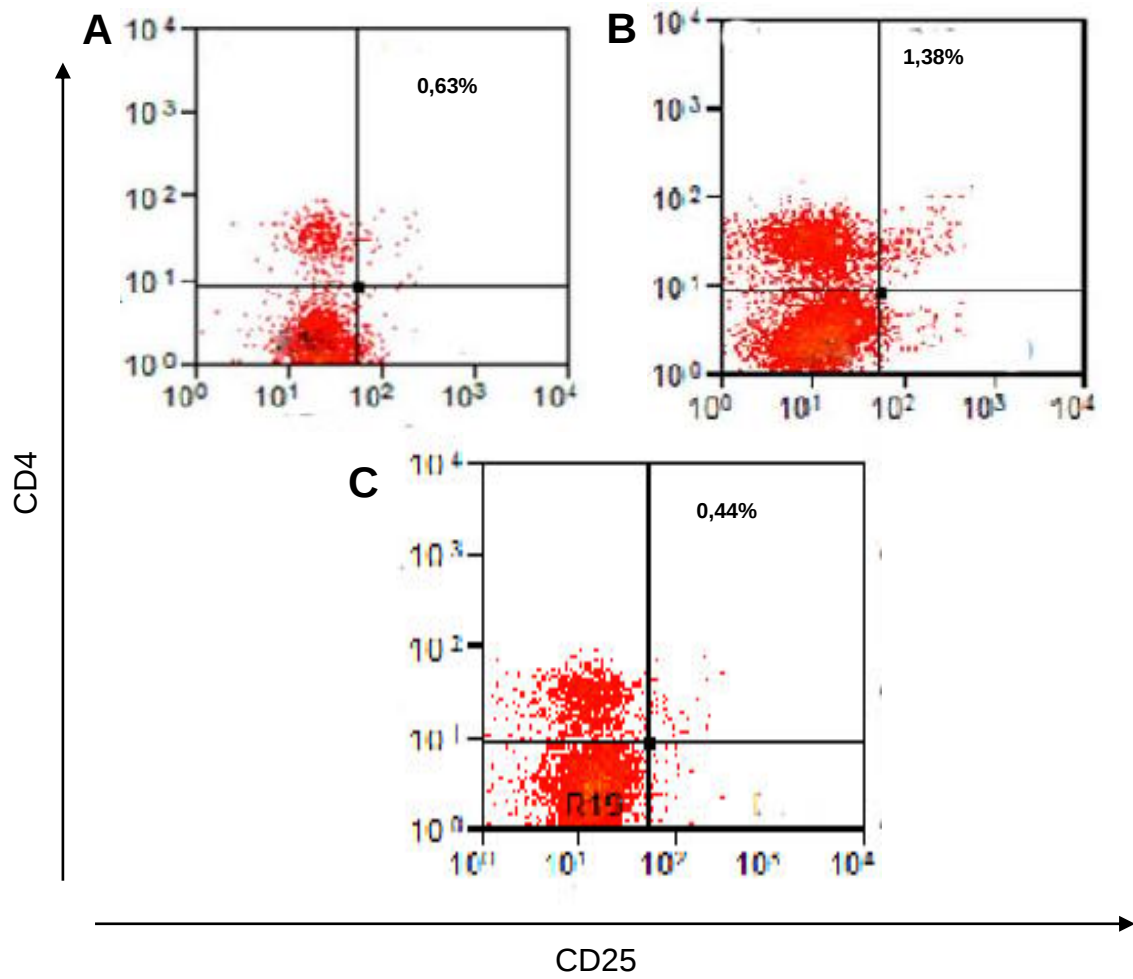


Figura 34 - Perfil representativo da subpopulação $CD4^+CD25^+$ no omento

Camundongos com 24 semanas. *mdx* macho (A), fêmea(B) e camundongos C57BL/10 macho de 24 semanas (C).

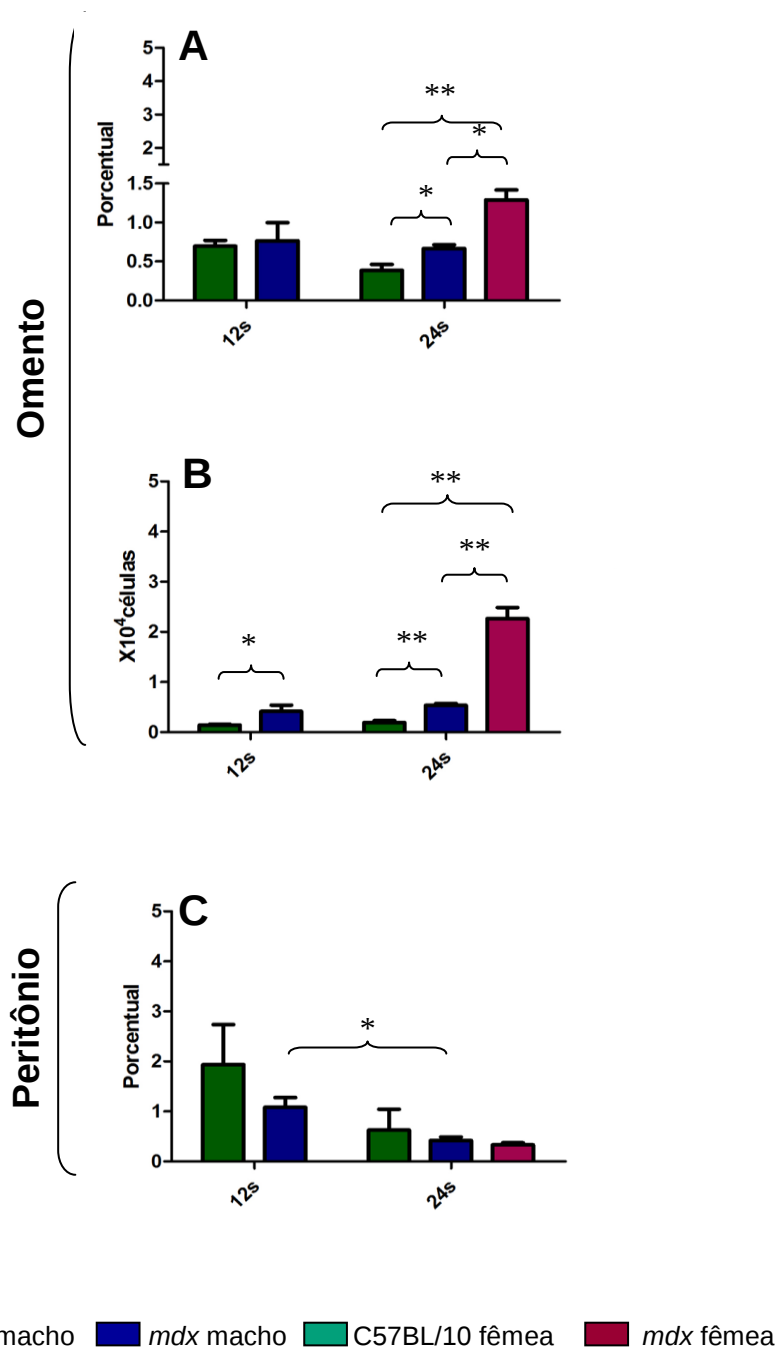


Figura 35 - Análise da expressão do antígeno CD25 nas células CD4⁺.

Valores relativos (A, C) e absolutos (B) da expressão de CD25 no omento (A, B) e peritônio (C). As barras representam a média e seu respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 pools de animais por grupo. A análise estatística foi baseada no teste t de Student. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.8.3. Presença de células NK e NKT no omento e peritônio

Os anticorpos monoclonais específicos para NK1.1 e CD3 foram utilizados para identificar como NK as células NK1.1⁺CD3⁻ e como NKT as células NK1.1⁺CD3⁺ (Figura 36).

O omento de camundongos *mdx* machos com 24 semanas mostrou uma redução significativa das células NK em relação ao camundongo C57BL/10 pareado. Camundongos *mdx* machos com 12 semanas e fêmeas com 24 semanas apresentaram redução discreta não significativa que não correspondeu à queda nos valores absolutos (Figura 37).

Camundongos *mdx* fêmeas apresentaram aumento no total dessas células em relação ao camundongo *mdx* macho com 24 semanas. Não foi observada diferença significativa no percentual de células NK no peritônio.

Os percentuais de células NKT apresentaram-se significativamente diminuídos no omento em todas as idades nos camundongos *mdx* analisados em relação ao C57BL/10 pareado. Com relação à análise absoluta observamos que os camundongos *mdx* fêmeas com 24 semanas apresentaram mais linfócitos NKT que os camundongos *mdx* machos com 24 semanas. O percentual de linfócitos NKT no peritônio dos camundongos *mdx* machos com 12 semanas e 24 semanas se mostrou maior que o dos respectivos camundongos controle C57BL/10 com 12 e 24 semanas.

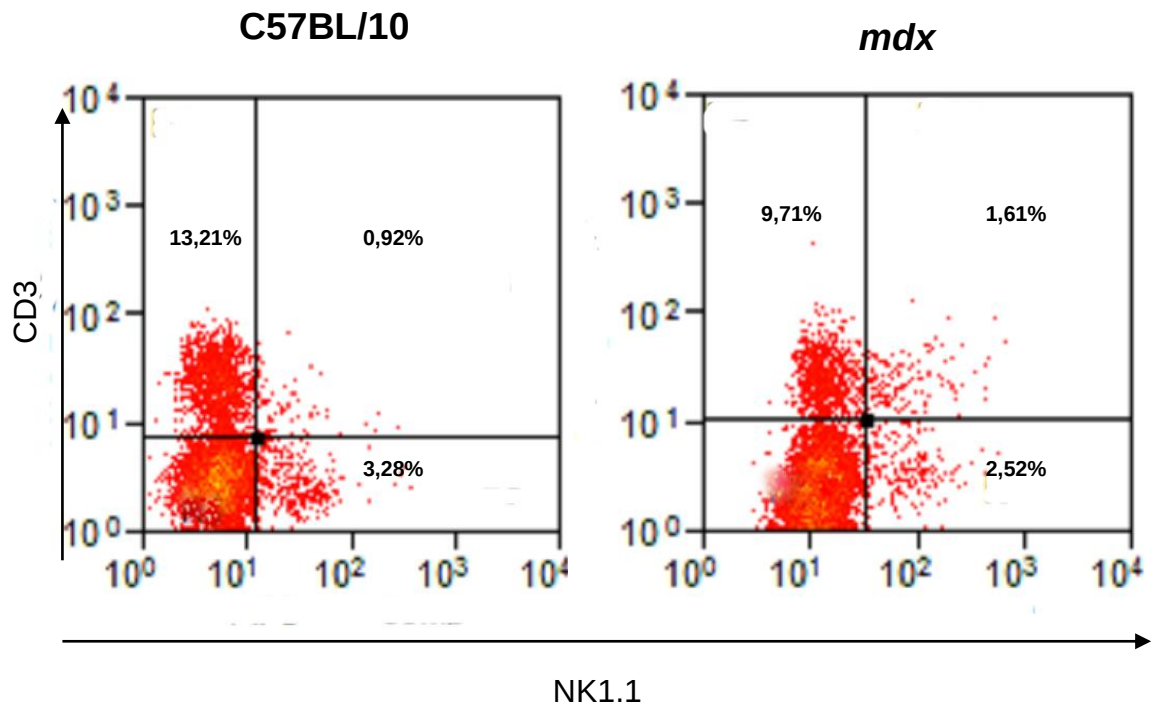


Figura 36 Presença de células NK e NKT no lavado peritoneal.

Diagrama representativo da expressão de NK1.1 e CD3 nas células do lavado peritoneal de camundongos machos C57BL/10 e *mdx* com 12 semanas.

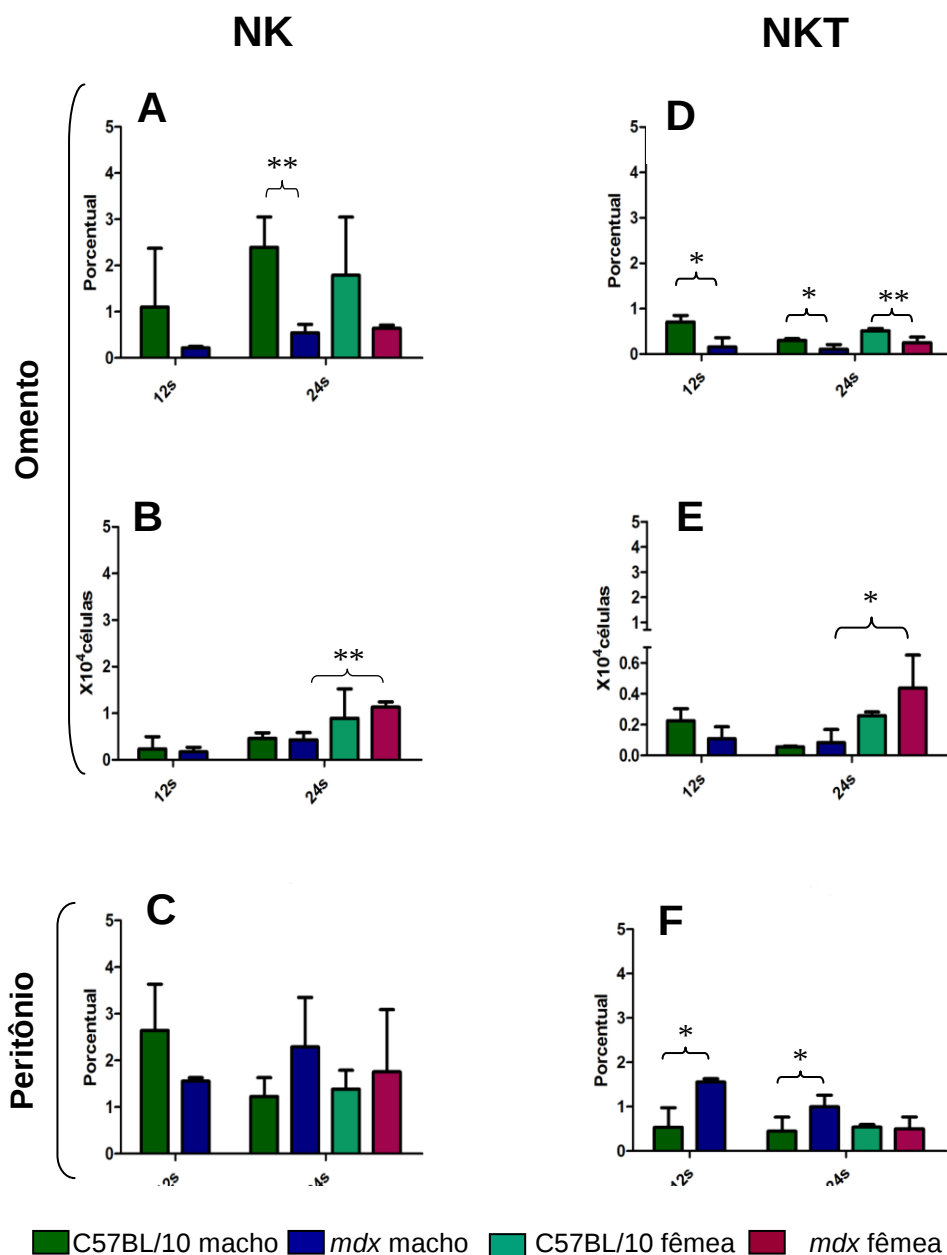


Figura 37 - Análise das populações de células NK e NKT no omento e peritônio.

Valores relativos (A, D, C e F) e absolutos (B, E) das células NK e NKT no omento (A, B, D, E) e peritônio (C, F) de camundongo *mdx* e C57BL/10. As barras representam a média e respectivo desvio padrão. Foram incluídos 3 pools de animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.8.4. Linfócitos B no omento e peritônio de camundongos *mdx*

Em relação aos camundongos C57BL/10 pareados foi observada uma redução significativa de linfócitos B (células B220⁺CD19⁺) no omento de camundongos *mdx* machos com 12 semanas e fêmeas com 24 semanas (Figura 38). Camundongos *mdx* machos com 24 semanas apresentaram em relação ao camundongo C57BL/10 um aumento significativo no porcentual de células B. Camundongos *mdx* apresentaram em todas as idades mais linfócitos B (valor absoluto) que os camundongos controle, observando-se ainda uma diferença maior (1,4 vezes) nos camundongos *mdx* com 24 semanas em comparação com os *mdx* com 12 semanas. As fêmeas *mdx* apresentaram duas vezes mais linfócitos B (valor absoluto) que os *mdx* machos. Não se observou diferença significativa no valor relativo de linfócitos B no peritônio.

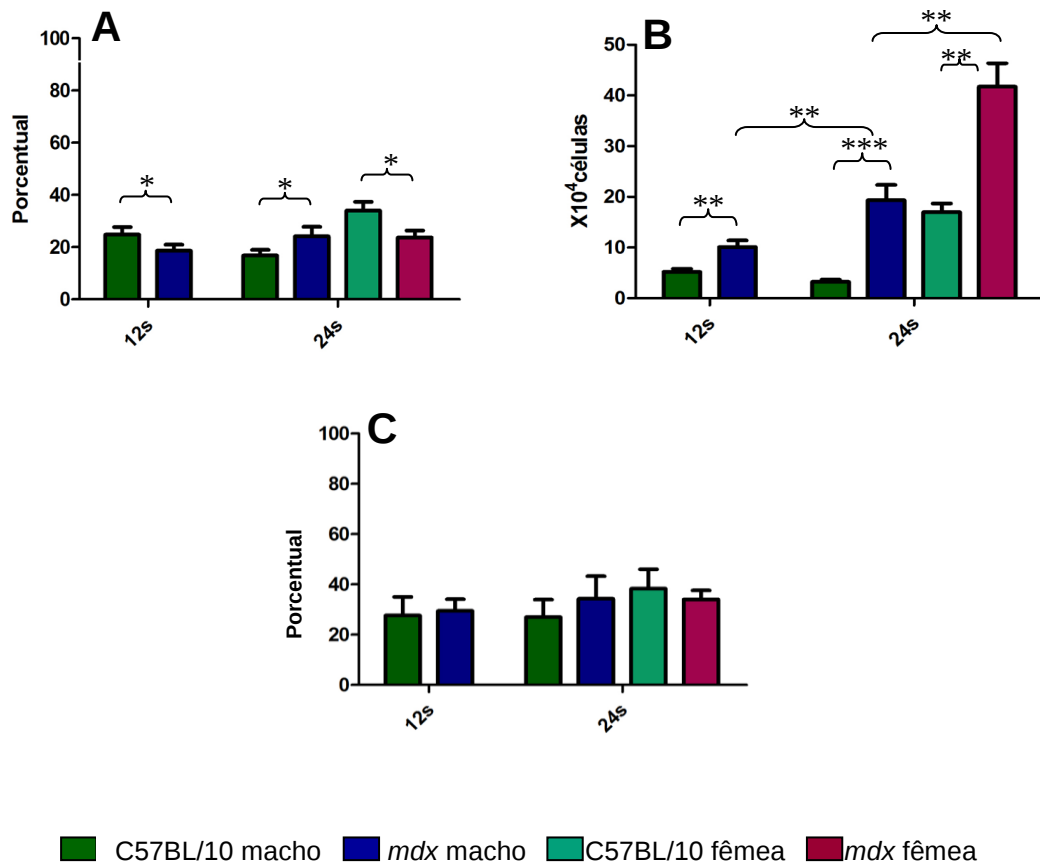


Figura 38 – Análise das células B no omento e peritônio.

Valores relativos de linfócitos B (B220⁺ CD19⁺) no omento (A) e peritônio (C) e números absolutos no omento (B). Cada barra representa a média e respectivo desvio padrão. Foram incluídos pelo menos 3 pools de animais por linhagem. A análise estatística foi baseada no teste t de Student sendo * p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

5.9. Análise de progenitores no omento e peritônio do camundongo *mdx*.

A análise de progenitores (Sca-1+) foi feita em uma região que abrangueu linfócitos, macrófagos e granulócitos sendo excluídos macrófagos (Mac-1), linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD19), que podem expressar o marcador Sca-1. As células residuais com grande probabilidade de serem progenitores foram analisadas com relação ao perfil de expressão de B220 (CD45) e c-kit (CD117). Foram definidos três grandes grupos de células pelo perfil de expressão do antígeno de células tronco: Sca-1^{lo}, Sca-1^{int}, Sca-1^{hi} (Figura 39). Foram definidas essas 3 populações pelo fato do nível de expressão desse e outros marcadores de célula tronco poderem variar de acordo com o sítio anatômico onde as células se encontram, da população analisada e do estágio de diferenciação (Wong, Lowes *et al.*, 2007; Nagano, Yoshida *et al.*, 2008). A população de células Sca-1^{lo} não foi mostrada por não apresentar flutuações significativas.

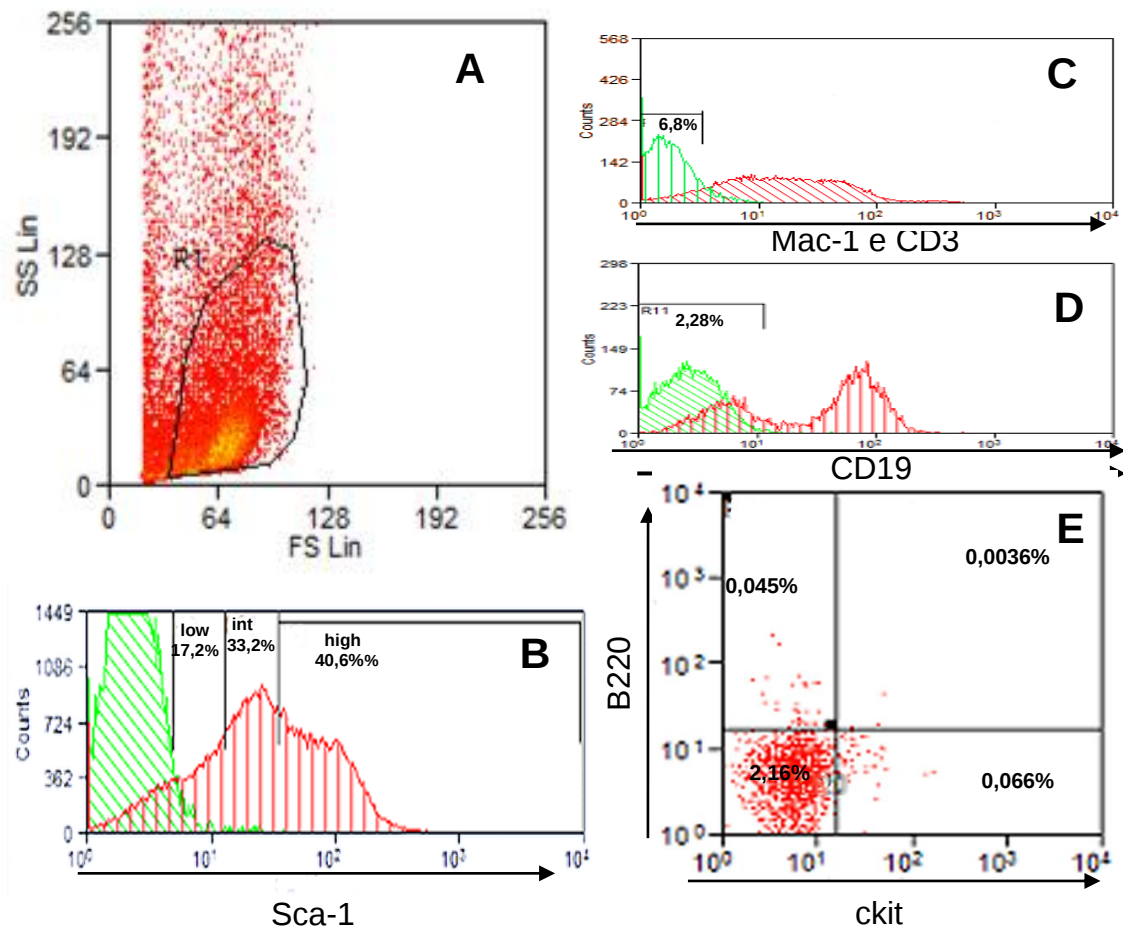


Figura 39 - Células progenitoras no omento do *mdx* com 24 semanas.

A – Gráfico de pontos para análise morfológica e seleção da região de análise. SS = side scatter (dispersão lateral) and FS = foward scatter (dispersão frontal).

B – Representação gráfica de células Sca-1. Foram delimitadas 3 regiões: Sca-1 low (baixa), int (intermediária) e high (alta).

C- Perfil da expressão de Mac-1 e CD3 nas células Sca-1^{hi}.

D - Perfil da expressão de CD19 nas células Sca-1^{hi}Mac-1^{hi}CD3⁺.

E - Perfil da expressão de cKit (CD117) e B220 (CD45) nas células Sca-1^{hi}Mac-1^{hi}CD3⁺CD19⁺. As células foram classificadas em progenitores B220⁺ckit⁺, B220⁺ckit⁻, B220⁻ckit⁺ e B220⁻ckit⁻. Verde =Autofluorescência das células sem anticorpo(puras); vermelho = marcação das células marcadas com anticorpo.

5.9.1. Análise das células com fenótipo Sca-1⁺B220⁺ckit⁻

Em relação ao controle pareado foi observado no omento e no peritônio de camundongos *mdx* com 12 semanas, um aumento de células com fenótipo Sca-1^{hi}B220⁺ckit⁻ (Figura 40). Camundongos *mdx* com 24 semanas apresentaram diminuição no percentual de células progenitoras Sca-1^{hi}B220⁺ckit⁻ em relação ao *mdx* com 12 semanas, mas não foi observada diferença no percentual dessas células entre o camundongo *mdx* e o controle C57BL/10. Camundongos *mdx* macho com 24 semanas apresentaram percentual menor de células Sca^{int} B220⁺ ckit⁻ do que *mdx* macho com 12 semanas.

A análise do valor absoluto mostrou um aumento significativo de células Sca-1^{hi} B220⁺ ckit⁻ nos camundongos *mdx* machos com 12 semanas em relação ao camundongo *mdx* macho com 24 semanas. Em relação ao controle pareado, todos os camundongos *mdx* apresentaram um discreto aumento de células com fenótipo Sca^{int}B220⁺ckit⁻ somente em relação aos camundongos com 24 semanas.

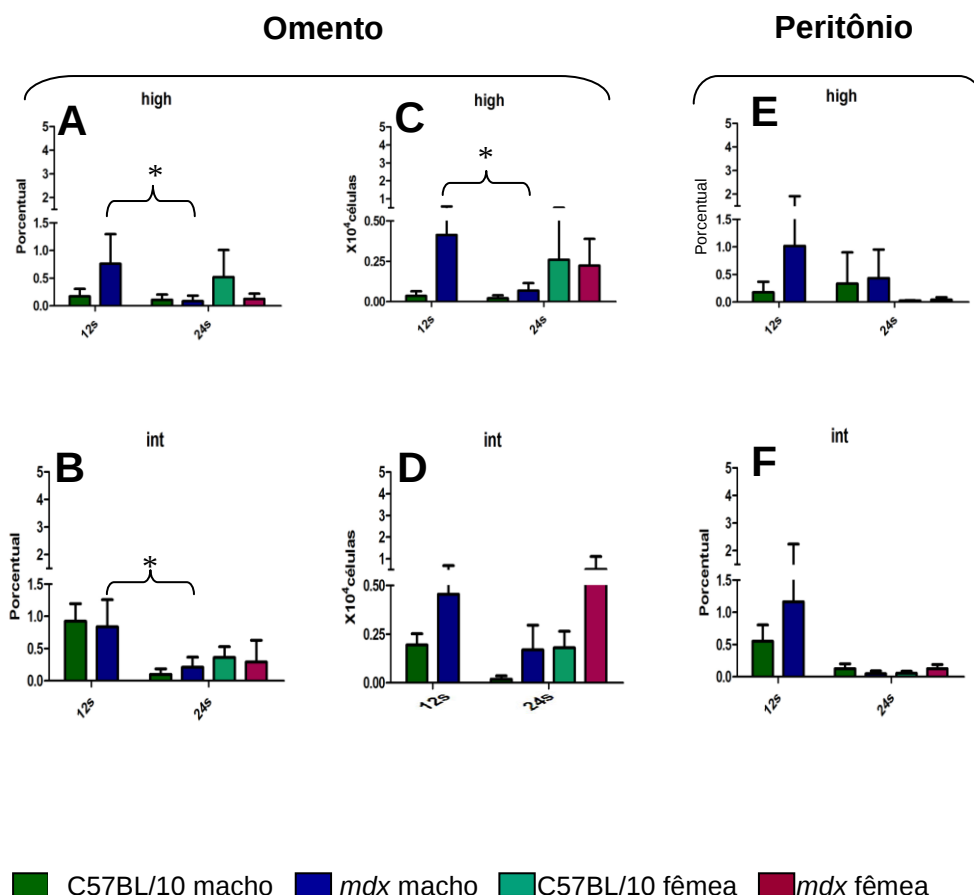


Figura 40 - Análise dos progenitores Sca-1^{hi}B220⁺ckit⁺.

Análise efetuada dentro da população de células Sca-1^{hi} (A, C, E), Sca-1^{int} (B, D, F). Valores relativos (A, B) e absolutos (C, D) no omento e valores relativos do peritônio (E, F). O percentual de células foi calculado em relação ao total de células. As barras representam a média e respectivo desvio padrão. Pelo menos três pools de animais foram analisados por grupo sendo* $p < 0,05$

5.9.2. Análise de células com fenótipo Sca-1⁺B220⁺ckit⁺

O omento do camundongo *mdx* com 12 semanas apresentou menos células Sca-1⁺B220⁺ckit⁺ em comparação com controle C57BL/10, independente da intensidade de expressão de Sca-1, mas essa diferença não foi significativa. Não foi observada diferença significativa no número de células Sca-1⁺B220⁺ckit⁺ no omento entre o camundongo controle e o distrófico *mdx* com 12 e 24 semanas (Figura 41).

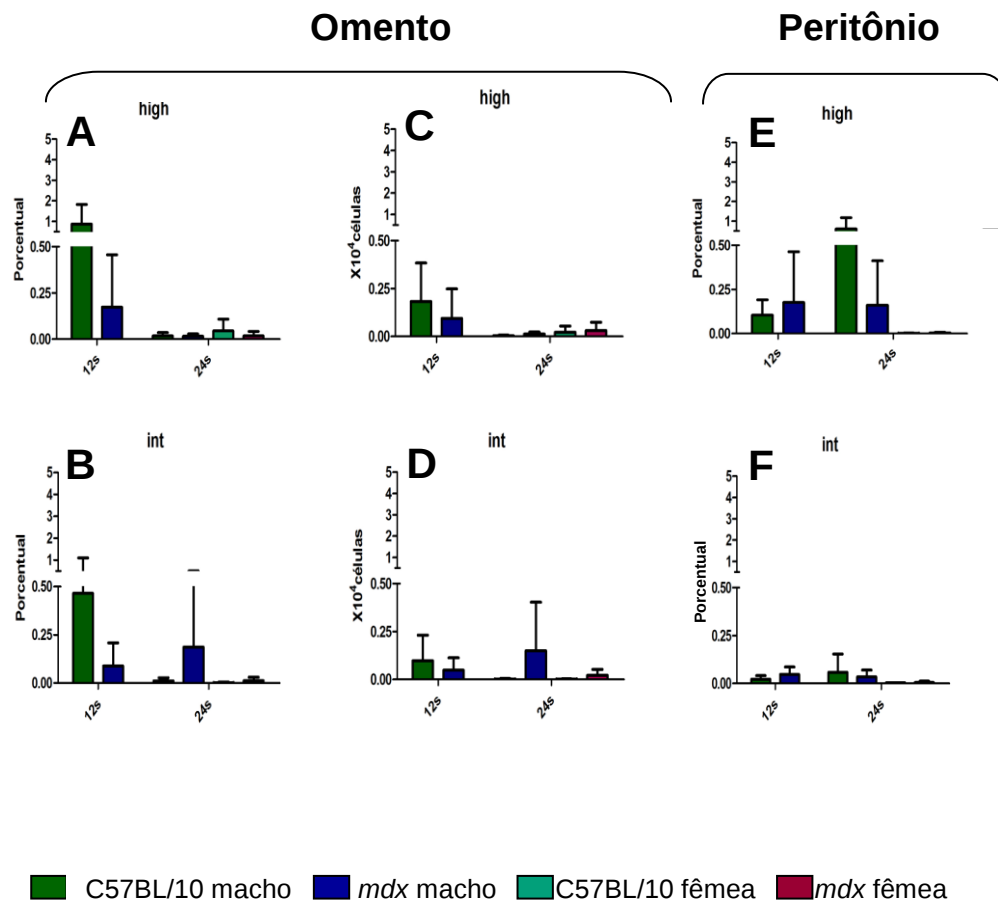


Figura 41 - Análise dos progenitores Sca-1^{hi}B220⁺ckit⁺.

Análise efetuada dentro da população de células Sca-1^{hi} (A, C, E), Sca-1^{int} (B, D, F). Valores relativos (A, B) e absolutos (C, D) no omento e valores relativos do peritônio (E, F). O porcentual de células foi calculado em relação ao total de células. As barras representam a média e respectivo desvio padrão. Pelo menos três pools de animais foram analisados por grupo.

5.9.3. Análise de células com fenótipo Sca-1^{hi}B220⁻ckit⁺

O omento de camundongos C57BL/10 com 12 semanas apresentou um porcentual maior de células Sca-1^{hi}B220⁻ckit⁺ e Sca-1^{int}B220⁻ckit⁺ que o peritônio (Figura 42). Também foi observada uma discreta queda no porcentual de células Sca-1^{hi}B220⁻ckit⁺ no omento de camundongos *mdx* machos e fêmeas em relação

aos respectivos controles C57BL/10. Omento de camundongos machos com 24 semanas apresentou em relação aos com 12 semanas discreta redução no percentual de células com fenótipo Sca-1^{int}B220⁻ckit⁺.

O omento de camundongos *mdx* macho com 24 semanas apresentou em relação ao camundongo C57BL/10 pareado, um aumento no número global de células Sca^{int} B220⁻ ckit⁺. O mesmo padrão foi observado nos animais com 12 semanas.

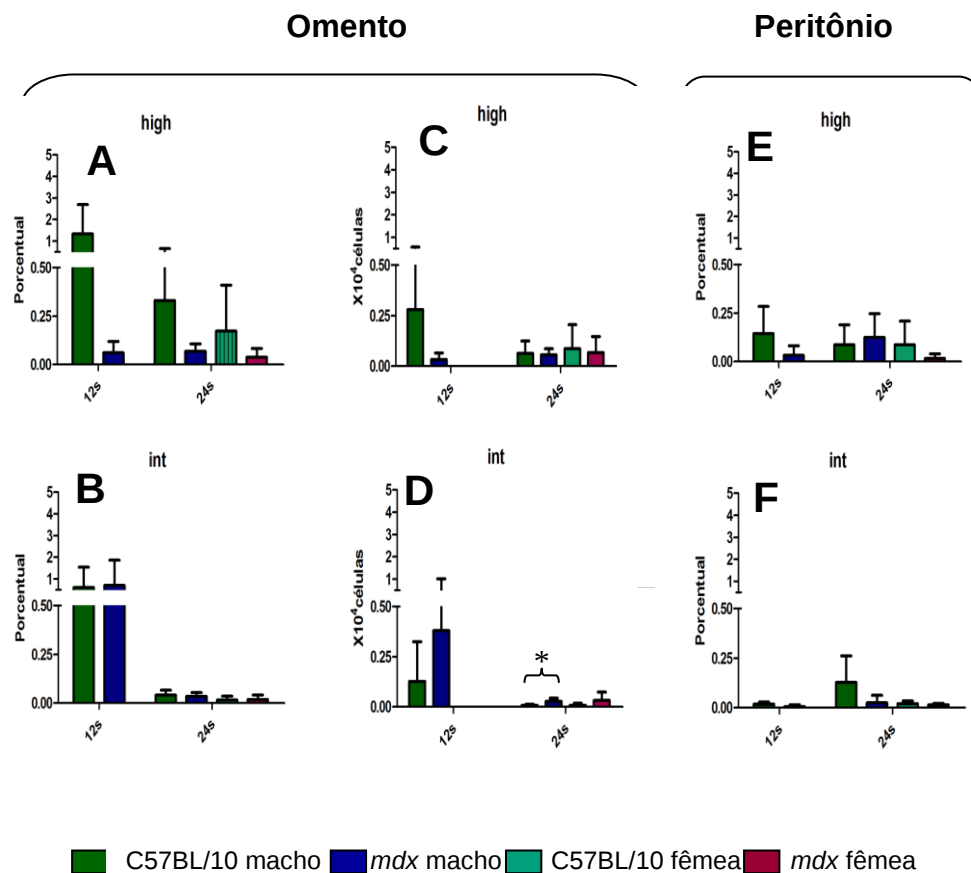


Figura 42 - Análise dos progenitores Sca-1⁺B220⁻ckit⁺.

Análise efetuada dentro da população de células Sca-1^{hi} (A, C, E), Sca-1^{int} (B, D, F). Valores relativos (A, B) e absolutos (C, D) no omento e valores relativos do peritônio (E, F). O percentual de células foi calculado em relação ao total de células. As barras representam a média e respectivo desvio padrão. Pelo menos três pools de animais foram analisados por grupo sendo* p<0,05

5.9.4. Análise de células com fenótipo Sca-1⁺ B220⁻ ckit⁻

Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de células Sca-1⁺B220⁻ckit⁻ no omento do *mdx* e C57BL/10 (Figura 43). O percentual de células Sca-1^{int}B220⁻ ckit⁻, no peritônio do camundongo *mdx* macho com 24 semanas se mostrou menor que no *mdx* macho com 12 semanas. O mesmo padrão foi

observado também entre os controles C57BL/10 com 12 e 24 semanas, porém sem significância estatística. Os camundongos *mdx* fêmeas, no entanto apresentaram porcentagem maior de células com esse perfil em relação aos camundongos *mdx* machos de mesma idade, mas essa diferença não se mostrou significativa.

Independente da intensidade da expressão de Sca-1 (exceto as células Sca-1^{lo} das fêmeas) foi observado no omento maior número de células B220⁺ckit⁻ no *mdx* com 24 semanas quando comparado com o camundongo C57BL/10 pareado (Figura 43). Além disso, essas células estão significativamente em maior número no camundongo *mdx* fêmea com 24 semanas em relação ao camundongo *mdx* macho pareado.

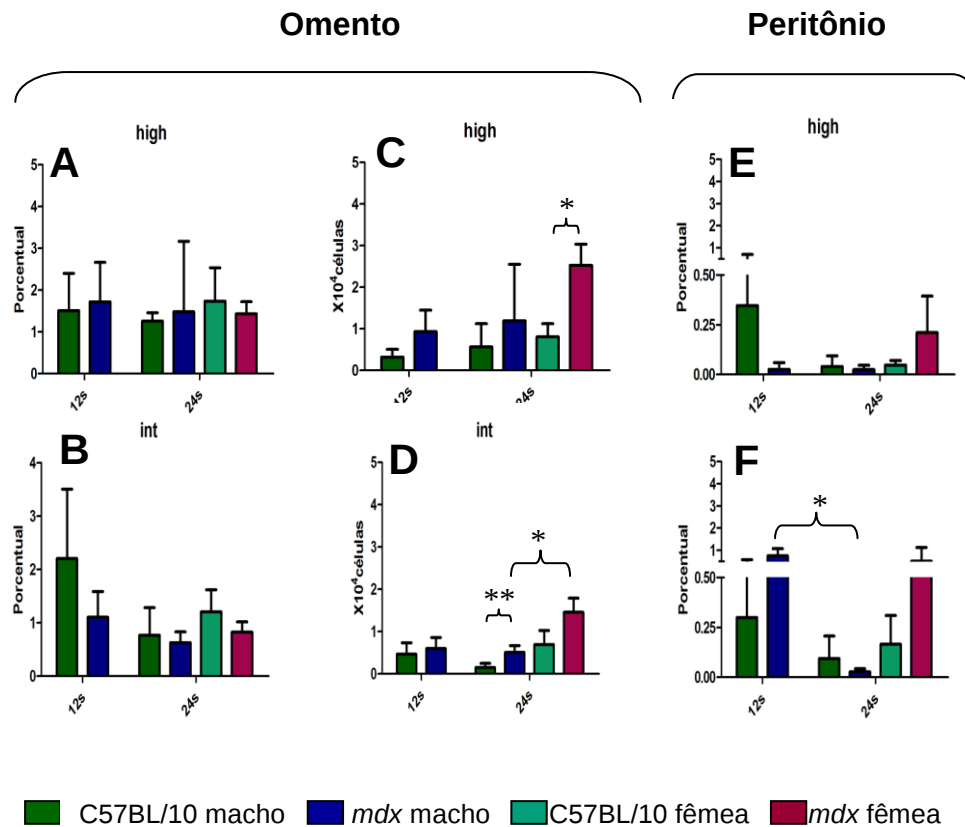


Figura 43 - Análise de progenitores Sca-1⁺B220⁻ckit⁻.

Análise efetuada dentro da população de células Sca-1^{hi} (A, C, E), Sca-1^{int} (B, D, F). Valores relativos (A, B) e absolutos (C, D) no omento e valores relativos do peritônio (E, F). O porcentual de células foi calculado em relação ao total de células. As barras representam a média e respectivo desvio padrão. Pelo menos três pools de animais foram analisados por grupo sendo* p<0,05.

5.10. Atividade de metaloproteínases

Uma vez que a capacidade regenerativa do tecido muscular está relacionada com a atividade de metaloproteínases utilizamos a técnica de zimografia a fim de investigar a atividade da MMP-9 (100kDa), da pró-MMP-2 (60kDa) e a forma ativa da MMP-2 (55kDa) no lavado peritoneal e no diafragma.

5.10.1. Atividade das metaloproteinases no diafragma

Camundongos C57BL/10 apresentaram apenas atividade da MMP-2 pre-pró e pró MMP-2, não sendo detectadas MMP-9 e MMP-2 ativas (Figura 44). Camundongos *mdx* com 5 semanas tanto machos quanto fêmeas apresentaram atividade discreta de MMP-9, porém com 12 semanas foi observado aumento significativo na atividade da MMP-9 tanto em machos quanto fêmeas, seguida por uma diminuição consistente em 24 semanas tanto nos machos quanto nas fêmeas em relação aos camundongos *mdx* da idade anterior. Também foi observada uma redução significativa na atividade da MMP-9 nas fêmeas com 24 e 48 semanas em relação aos camundongos *mdx* machos de idade pareada.

Camundongos *mdx* com 24 e 48 semanas apresentaram aumento da pró MMP-2 em relação ao controle C57BL/10 pareado. Não foi observado, no entanto, diferença na atividade da pró MMP-2 e MMP-2 ativa entre *mdx* machos e fêmeas.

Vale ressaltar que MMP-2 ativa e MMP-9 apresentaram cinética semelhante de atividade enzimática. Com 5 semanas a atividade relativamente baixa, seguida de um significativo aumento em ambos os gêneros no *mdx* com 12 semanas e redução significativa no *mdx* com 48 semanas.

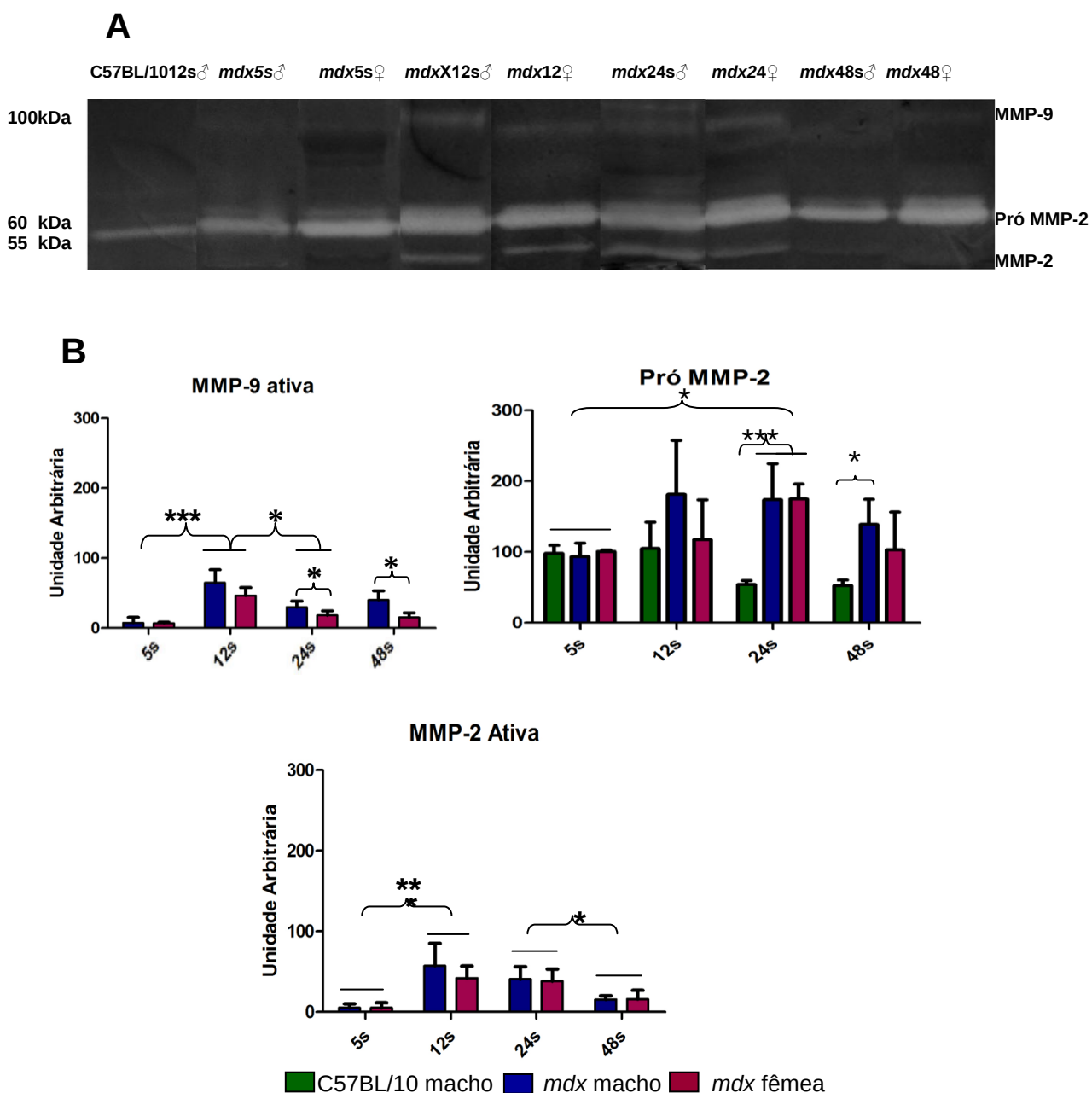


Figura 44 - Atividade das metaloproteínases no diafragma.

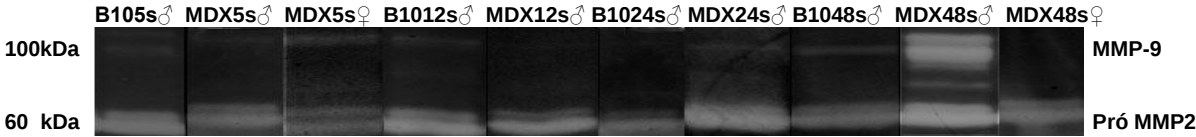
(A) Zimograma ilustrativo do diafragma de camundongos *mdx* e C57BL/10 machos e fêmeas com 5, 12, 24 e 48 semanas. (B) Análise densitométrica da atividade das MMPs pelo programa Scion. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Barra representa a média e respectivo desvio padrão.

5.10.2. Atividade das metaloproteinases no lavado peritoneal

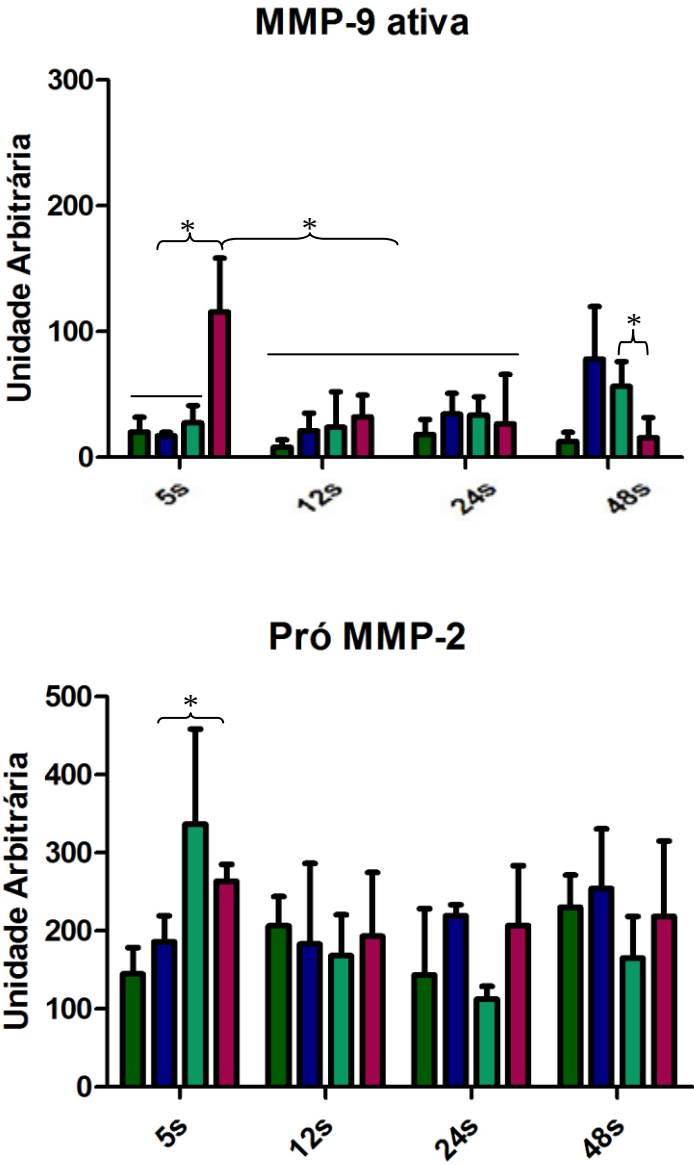
Independente da linhagem, gênero e idade, não foi detectada, de forma consistente, atividade da MMP-2 ativa no lavado peritoneal (Figura 45). As fêmeas *mdx* com 5 semanas, apresentaram um aumento significativo da atividade MMP-9 em relação aos machos *mdx* e controles C57BL/10 com 5, 12 e 24 semanas, mas uma redução significativa em 48 semanas com relação ao camundongo C57BL/10 pareado.

Não foi observada diferença significativa na atividade da pró MMP-2 entre as idades. Quando comparamos machos e fêmeas com 5 semanas, observamos um aumento significativo na atividade da pró MMP-2 nos camundongos *mdx* fêmeas em relação aos machos.

A



B



■ C57BL/10 macho ■ mdx macho ■ C57BL/10 fêmea ■ mdx fêmea

Figura 45 - Atividade das metaloproteinases no lavado peritoneal.

Zimograma ilustrativo (A) do lavado peritoneal do *mdx* e C57BL/10 macho e fêmea com 5, 12, 24 e 48 semanas. As áreas claras são de regiões de lise no fundo corado com Coomassie R-250. Em B a Representação gráfica (B) da análise densitométrica da atividade das MMPs pelo programa Scion. Pelo menos 3 animais por grupo foram analisados. Cada barra representa a média e respectivo desvio padrão.

5.10.3. Influência da omentectomia na atividade das metaloproteinases

A omentectomia (OTX) de camundongos *mdx* machos e fêmeas teve por objetivo avaliar a possível influência do omento no perfil de remodelagem do diafragma e na atividade de metaloproteinases no fluido peritoneal. Os animais foram submetidos à OTX na idade de 5 semanas quando o omento do *mdx* ainda não está aparentemente ativado e sacrificados com 12 semanas quando o diafragma apresenta atividade elevada das metaloproteinases 2 e 9, sendo coletado o diafragma, como músculo sob influencia direta da cavidade peritoneal e o gastrocnêmio como músculo distante da cavidade (Figura 46).

O camundongo *mdx* macho OTX apresentou em relação ao camundongo *mdx* controle não operado e o sham diminuição significativa da atividade da MMP-9 no diafragma (Figura 47) e também diminuição significativa na atividade da pró MMP-2 ($97,6 \pm 30$) em relação ao camundongo *mdx* controle não operado. Em contraste as fêmeas *mdx* OTX, apresentaram aumento significativo na atividade da pró MMP-2 em relação aos camundongos *mdx* sham. A MMP-2 ativa nos diafragmas de machos e fêmeas OTX apresentou redução de 2,4 e 2,7 vezes respectivamente em comparação com o *mdx* controle não operado. Camundongos *mdx* sham operados também apresentaram diminuição da MMP-2 ativa.

Não se observou diferença significativa da atividade de MMP-9 no lavado peritoneal dos grupos analisados. O lavado peritoneal dos camundongos machos OTX apresentou 2,4 vezes menos pró MMP-2 do que camundongo *mdx* controle. A atividade da pró MMP-2 no lavado peritoneal de camundongos fêmeas sham estava reduzida em relação ao controle não operado e OTX.

O músculo gastrocnêmio foi muito afetado pela omentectomia. Os camundongos *mdx* machos OTX apresentaram aumento de 1,8 vezes na atividade da MMP-9 no músculo gastrocnêmio em relação aos camundongos controle e sham. Fêmeas OTX apresentaram aumento de 4 vezes na atividade da MMP-9 em comparação com camundongos sham. A omentectomia também aumentou a atividade da pró MMP-2- no músculo gastrocnêmio dos machos em comparação com os grupos controle e sham. As fêmeas OTX apresentaram maior atividade da pró MMP-2 em comparação com grupo sham e o controle. O músculo gastrocnêmio de machos OTX mostrou aumento de 2,5 vezes na atividade da MMP-2 ativa em relação aos grupos controle e sham, enquanto as fêmeas apresentaram uma redução de 1,6 vezes da atividade da MMP-2 ativa em comparação com o grupo controle e uma suave redução em relação ao grupo sham. .

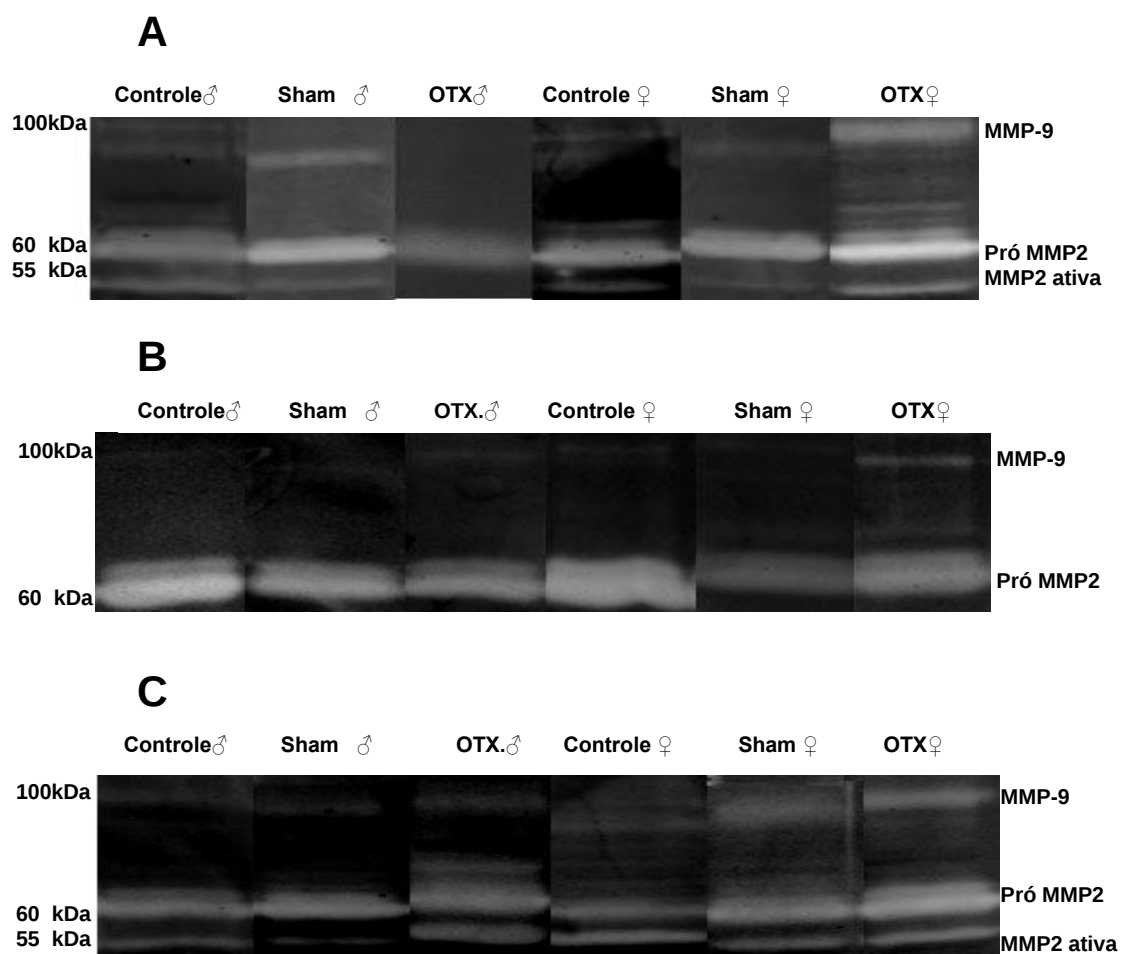


Figura 46- Efeito da omentectomia(OTX) na atividade das metaloproteinases.

Zimograma ilustrativo da MMP-2 e MMP-9 no diafragma (A), lavado peritoneal (B) e músculo gastrocnêmio (C). As áreas claras são regiões de lise no fundo corado com Coomassie R-250.

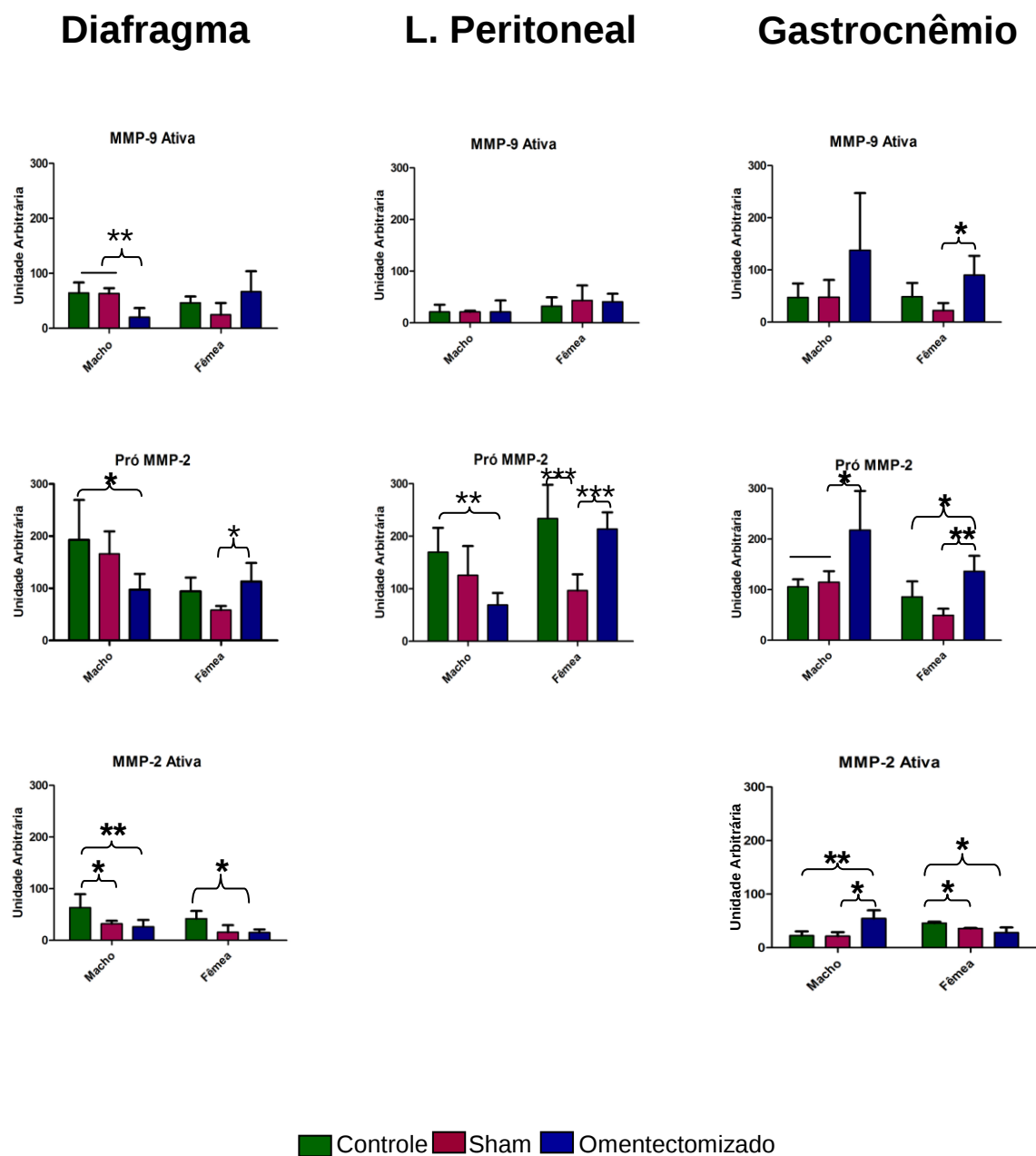


Figura 47 – Análise densitométrica da atividade de metaloproteinases após omentectomia (OTX).

São representadas a MMP-9, pró MMP-2 e MMP-2 ativa no diafragma, lavado peritoneal e músculo gastrocnêmio. Pelo menos 5 animais por grupo foram analisados. Barras representam a média e respectivo desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença crônica onde complicações cardiorrespiratórias representam a principal causa de morte (Wagner, Lechtzin *et al.*, 2007; Grounds, 2008). Já o modelo murino *mdx* apresenta uma forma de miopatia relativamente benigna e não fatal. No entanto, o músculo diafragma nesse modelo apresenta características peculiares que classicamente o aproximam do observado na DMD humana como fibrose precoce e mais intensa que em outros músculos. O diafragma do camundongo *mdx* apresenta um início de processo inflamatório mais discreto e precoce em relação aos músculos de membros inferiores e superiores, que se inicia em torno de 15 dias de vida pós-natal, que progressivamente se agrava com a idade (Grounds, Radley *et al.*, 2008).

A manutenção do processo inflamatório no diafragma, ao longo de todas as idades, é evidente pela maior produção local de quimiocinas (RANTES, MIP1- α) e expressão de seus receptores em relação aos músculos de membros inferiores em todas as fases da miopatia (Demoule, Divangahi *et al.*, 2005). Contudo, observa-se um pico de regeneração tardio (24 semanas), com alta atividade de MMP-2 e capacidade regenerativa frente a lesões induzidas em alguns momentos, até maior que o próprio camundongo não distrófico, sugerindo a existência de um

microambiente com capacidade de remodelagem intensa (Matecki, Guibinga *et al.*, 2004; Demoule, Divangahi *et al.*, 2005; Bani, Lagrota-Candido *et al.*, 2008).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma provável influência do microambiente da cavidade peritoneal com as alterações na fisiopatologia da lesão muscular do diafragma do camundongo *mdx*.

A análise histológica do diafragma confirmou as principais alterações descritas na literatura (Ishizaki, Suga *et al.*, 2008; Turgeman, Hagai *et al.*, 2008). A inflamação foi detectada em fases iniciais (5 e 12 semanas), a fibrose observada inicialmente em 12 semanas foi se intensificando nas idades subseqüentes e a regeneração do tecido muscular foi maior em 24 semanas. Todas as alterações foram vistas em machos e fêmeas sem muita diferença aparente.

Como omento é o principal órgão linfóide associado à cavidade celomática capaz de promover a hematopoese durante a vida embrionária e adulta (Abo, 1993; Hirai, Takemori *et al.*, 1994; Krist, Koenen *et al.*, 1997; Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2002; Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2005), e contribui para o reparo tecidual (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Patel *et al.*, 2008; Singh, Pancholi *et al.*, 2009).

Nos observamos que o omento de camundongos *mdx* apresentou aumento acentuado (pelo menos de 100%) no percentual de áreas ocupadas por *milk spot* nas fêmeas com 5 semanas e nos machos a partir de 12 semanas. Esse perfil condiz com um estado de ativação do órgão descrito na literatura, em omentos ativados por partículas de polidextran onde mais de 70% do órgão era constituído por *milk spot* e mesotélio (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Patel *et al.*, 2008; Singh, Pancholi *et al.*, 2009), além de apresentar aumento de progenitores e de células tronco com fenótipo adulto e embrionário

capazes de participar na regeneração tecidual (Litbarg, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Patel *et al.*, 2008; Singh, Pancholi *et al.*, 2009). Estes dados indicam que embora o omento do *mdx* esteja aparentemente ativado, ainda existe o potencial para uma indução de uma ativação mais expressiva. Neste contexto, é relevante frisar que o tecido adiposo, um componente importante do omento, é uma fonte rica de progenitores mesenquimais com potencial miogênico (Di Rocco, Iachininoto *et al.*, 2006; Kim, Choi *et al.*, 2006; Rodriguez, Alfonso *et al.*, 2006; Liu, Yan *et al.*, 2007) além de exibir propriedade imunoneuroendócrina por sua atividade hormonal e pela secreção das adipocitocinas. Por exemplo, a leptina é uma adipocitocina que estimula a linfopoiese B na medula óssea, diminui a apoptose e estimula a proliferação de timócitos com fenótipo $CD4^+CD8^+$ e $CD4^+CD8^-$ (Tilg e Moschen, 2006; Claycombe, King *et al.*, 2008). Nesse aspecto, o omento do camundongo *mdx* apresentou aumento no valor absoluto de linfócitos maduros, sugerindo a possibilidade de existir in loco, um equilíbrio eficiente entre ativação e expansão das zonas de *milk spot* e manutenção de um percentual ideal de tecido adiposo.

Reforçando a hipótese do estado de ativação do omento, foi evidenciada maior densidade de fibras reticulares nos camundongos *mdx* com 12 e 24 semanas. Essas fibras, compostas de colágeno tipo III e proteoglicanas, componentes da matriz extracelular são importantes na sustentação do arcabouço tecidual (Junqueira, 2004) especialmente nos órgãos linfomielóides que precisam se adaptar rapidamente a alterações de volume e dinâmica de migração celular (Van Marion, Thiele *et al.*, 2006).

A resposta inflamatória e imunológica além de ajudar na eliminação dos restos celulares (debris) é essencial para iniciar o reparo tecidual, inclusive

favorecendo o transplante de mioblastos, influenciando a regeneração e fibrose (Sicard, 2002; Henry e Garner, 2003; Prisk e Huard, 2003). O omento de camundongos *mdx* com 24 semanas apresentou um aumento de células CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B, que se organizaram numa topografia típica de órgãos linfóides com áreas ocupadas por linfócitos T e B. Dados prévios da literatura mostram que em situações de inflamação, o omento apresenta uma organização folicular de linfócitos B (Kremlí e Mamontov, 1990). Ao analisar a proliferação celular com imunomarcacão para PCNA observamos que essa expansão se deve, ao menos em parte, a um aumento de proliferaçao local. Curiosamente também encontramos no omento de camundongos *mdx*, algumas regiões com predomínio de células B220⁺PCNA⁺ sugerindo uma possível organizaçao folicular com formaçao de centro germinativo semelhante aos dados obtidos no linfonodo braquial de camundongo *mdx* (Lagrotta-Candido, Vasconcellos *et al.*, 2002). Recentemente algumas lacunas com relaçaõ à estrutura linfóide do omento foram preenchidas com a identificaçao da formaçao de folículos atípicos com presença células dendriticas extrafoliculares, mas não em rede. Essas estruturas suportam hipermutaçaõ somática, além do estabelecimento de resposta imune T-dependente com apresentaçaõ local e com recirculaçaõ de linfócitos T efetores de linfonodos periféricos (Carlow, Gold *et al.*, 2009; Rangel-Moreno, Moyron-Quiroz *et al.*, 2009).

Dados sobre os efeitos de hormônios sexuais na resposta inflamatória são muitas vezes contraditórios, porém a presença de sítios responsivos a estrógeno na região promotora do gene do *INF-γ* (Fox, Bond *et al.*, 1991; Siracusa, Overstreet *et al.*, 2008) indica que este hormônio pode influenciar na ativaçao do sistema imune. Em doses contraceptivas (não fisiológicas), o estradiol apresenta em modelos murinos de inflamaçaõ peritoneal, efeitos antiinflamatórios, restringindo a ativaçao de

linfócitos, macrófagos, e inibindo a própria indução de INF- γ (Salem, Hossain *et al.*, 2000; Salem, Matsuzaki *et al.*, 2000). Estradiol também inibe a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 como visto na diferente cinética de lesão muscular induzida entre machos e fêmeas (St Pierre Schneider, Correia *et al.*, 1999). Já o hormônio sexual masculino testosterona, inibe a produção de TNF- α , IL1- β e IL-6 em culturas de macrófagos ativados por INF- γ , enquanto estradiol apresenta efeito inverso (Capellino, Villaggio *et al.*, 2005).

Nos experimentos de citometria de fluxo as comparações entre gêneros apenas foram realizadas nos animais de 24 semanas onde, como descrito pelo grupo, ocorre um aumento na ativação de células satélites no diafragma (Bani, Lagrota-Candido *et al.*, 2008).

Como o omento do *mdx* apresenta uma grande expansão celular nas idades analisadas os valores absolutos tenderam na maior parte dos casos a ser muito maiores que o dos controles pareados. Além disso, os omentos de camundongos *mdx* fêmeas apresentaram aumento porcentual de linfócitos T CD4⁺ talvez pela ativação do promotor do gene *INF- γ* por estradiol, que favorece ativação de células com perfil Th1. O porcentual de linfócitos T CD4⁺ na cavidade peritoneal de animais com 12 semanas foi maior que nos animais com 24 semanas. Especula-se um efeito do envelhecimento, porém em relação ao controle não distrófico, camundongos *mdx* machos e fêmeas com 24 semanas, apresentaram muito mais linfócitos T CD4⁺ no lavado peritoneal. Dependendo do microambiente e das citocinas produzidas localmente, células T CD4⁺ podem se diferenciar de linfócito T virgem (*naïve*) para efetor (Chen e O'shea, 2008). Linfócitos T CD4⁺T-bet⁺Stat4⁺(Th1) estão envolvidos na ativação de mecanismos de imunidade celular, secretam dentre outras citocinas o INF- γ (Chen e O'shea, 2008), citocina que induz ativação de MMPs, promovendo

remodelagem tecidual e regeneração mais eficiente em diversos modelos de injúria (Shi, Wakil *et al.*, 1997; Wynn, 2004) inclusive do músculo esquelético (Foster, Li *et al.*, 2003). Recentemente foi mostrado que IFN- γ é produzido constitutivamente pelo músculo, sendo importante para proliferação, fusão e diferenciação de miotubos (Cheng, Nguyen *et al.*, 2008). Linfócitos T CD4⁺GATA-3⁺Stat-6⁺(Th2) desempenham um papel mais relevante na indução de fibrose, pela expressão de citocinas profibrogênicas como TGF- β , IL-4 e IL-13 (Chen e O'shea, 2008; Essakalli, Brick *et al.*, 2009). Essas citocinas estimulam fibroblastos, aumentam a expressão em fibroblastos da α -actina de células musculares lisas, um pré-requisito para a contração e entrelaçamento de fibras colágenas, da integrina $\alpha 2\beta 1$ necessária para adesão de fibroblastos (Kondo, Kagami *et al.*, 2004; Lakos, Takagawa *et al.*, 2004; Kopp, Preis *et al.*, 2005; Campaner, Ferreira *et al.*, 2006; Ramos, Montano *et al.*, 2006), e induzem a produção local de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) reduzindo assim a remodelagem tecidual (Wynn, 2004; Abraham, Shapiro *et al.*, 2005; Oviedo-Orta, Bermudez-Fajardo *et al.*, 2008).

Linfócitos TCD4⁺CD25⁺Stat5⁺FOXP3⁺ apresentam atividade supressora tanto pela secreção de citocinas (p. ex. IL10) como por mecanismos de contado direto relacionados à expressão de citocinas aderidas a membrana (TGF- β) e receptores como CTLA-4 (Tran, Ramsey *et al.*, 2007; Chen e O'shea, 2008; Vandembark e Offner, 2008). Neste contexto, camundongos *mdx* macho com 12 e 24 semanas apresentaram em relação ao controle não distrófico aumento de linfócitos TCD4⁺CD25⁺, porém as fêmeas *mdx* pareadas (24 semanas) apresentaram um aumento ainda maior dessa subpopulação. Estes dados sugerem uma maior ativação linfocitária, porém o infiltrado inflamatório na maioria dos músculos dos animais com 24 semanas é muito reduzido e no diafragma, a atividade da MMP-9,

intimamente associada com o influxo de células inflamatórias, é muito baixa especialmente nas fêmeas *mdx*. Isto sugere que talvez as células $CD4^+CD25^+$ sejam linfócitos T ativados apresentando característica regulatória. No modelo experimental da encefalomielite autoimune experimental (EAE), linfócitos T de camundongos machos secretam preferencialmente IL-10 enquanto que nas fêmeas os linfócitos T secretam INF- γ e apresentam fenótipo da doença mais grave (Bebo, Schuster *et al.*, 1999). Porém, o tratamento de camundongos fêmeas e de esplenócitos em cultura com estradiol causa uma expansão de linfócitos com fenótipo $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (Polanczyk, Carson *et al.*, 2004; Siracusa, Overstreet *et al.*, 2008). Um outro ponto importante é que a citocina IL-10 é anti-fibrogênica. Em conjunto esses dados indicam a importância de relacionar flutuações hormonais com a fisiopatologia da miopatia no *mdx* macho e fêmea além de analisar a participação de células expressando o marcador FOXP3.

Linfócitos T com fenótipo $CD4^+Stat3^+RoR\gamma^+$ (Th17) são induzidos pela estimulação simultânea com citocinas tradicionalmente classificadas em anti e pró inflamatórias como a IL1- β , TGF- β , e IL-6 (Stockinger, Veldhoen *et al.*, 2007; Chen e O'shea, 2008; Essakalli, Brick *et al.*, 2009). Essas células recentemente foram associadas a uma menor deposição de colágeno no modelo de fibrose pulmonar (Simonian, Roark *et al.*, 2009). Os Diafragmas de camundongos *mdx* apresentam altos níveis de RNAm da citocina TGF- β principalmente nas fases iniciais da doença com a maior atividade inflamatória (Gosselin, Williams *et al.*, 2004), sugerindo uma possível ativação desse subtipo de linfócitos in loco.

No peritônio, observamos aumento no percentual de linfócitos TCD8⁺ em todos os grupos de camundongos *mdx* (de forma mais discreta nas fêmeas com 24 semanas), porém no omento, o percentual estava aumentado de modo consistente

apenas nos camundongos *mdx* machos com 12 semanas e nas fêmeas com 24 semanas. Tendo em vista que encontramos esse tipo celular em fases com baixa inflamação, estes dados sugerem que esses linfócitos não estão apenas participando da miopatia através de sua atividade citotóxica e proinflamatória, mas também através de sua atividade regulatória. Dentre as subpopulações de linfócitos T CD8⁺ há subtipos produtores de citocinas distintas. Uma população envolvida no controle da inflamação apresentaria característica regulatória, menor atividade citolítica, capacidade de inibir linfócitos T CD4⁺, a secreção de IFN- γ , e podem secretar IL-10 (Zou, 2006; Lu e Cantor, 2008) e outra com funções mais clássicas deste tipo de linfócito. No camundongo *mdx*, essas células poderiam estar atuando no controle da inflamação. Por outro lado, linfócitos TCD8⁺ estão presentes em diversos músculos no infiltrado inflamatório de camundongos *mdx* na fase de mionecrose (Spencer, Montecino-Rodriguez *et al.*, 2001; Spencer e Tidball, 2001). Alguns relatos sugerem a hipótese de que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ poderiam estar diretamente envolvidos na patogênese da lesão muscular da miopatia (Spencer, Montecino-Rodriguez *et al.*, 2001; Spencer e Tidball, 2001). Além disso, outras evidências apontam para participação de linfócitos T, principalmente CD8⁺, na fibrose e formação de cicatriz hipertrófica (Castagnoli, Trombotto *et al.*, 1997; Morrison, Lu *et al.*, 2000). A menor deposição de colágeno nos camundongos *mdx* nude reforça essa hipótese (Morrison, Lu *et al.*, 2000).

No omento de camundongos *mdx* com 24 semanas foi encontrado um aumento no valor absoluto de células CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ (células duplos negativas). Dados recentes mostram que linfócitos T regulatórios TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ são capazes de inibir a resposta a xenoenxertos, induzir apoptose de linfócitos B e inibir ativação de linfócitos T CD8⁺ e células NK (He, Ma *et al.*, 2007; Ma, He *et al.*, 2008).

Neste contexto, é importante lembrar que o omento e o peritônio podem ser considerados importantes sítios de imunoregulação.

Linfócitos NKT constituem outro grupo de células com funções multifacetadas que basicamente são classificadas em tipo I, com expressão preferencial da cadeia de TCR α invariante (V α 14-J α 18) e tipo II, com maior diversidade de TCRs. Algumas evidências mostram que a maioria das células NKT tipo II não expressam NK1.1 (Terabe e Berzofsky, 2008). Ambas apresentam capacidade ubíqua de expressão de citocinas tanto de perfil Th1 (INF- γ e TNF- α) quanto Th2 (IL-4 e IL-13), sendo que as do tipo I secretam adicionalmente IL-13, IL-17 e IL-21, mas sem nova transcrição, visto que elas estocam RNAm para essas citocinas. O perfil das citocinas secretadas depende dos sinais moleculares e do antígeno (geralmente estrutura glicolípídica) apresentado por moléculas CD1d (Terabe e Berzofsky, 2007; Berzofsky e Terabe, 2008; Terabe e Berzofsky, 2008).

Essas células estão envolvidas em várias patologias bem como na regeneração tecidual em modelos de hepatectomia de forma dependente de TNF e FAS/FAS-L (Swain, 2008). No modelo de lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono, a administração de β -glucosilceramida reduziu o número dessas células além de causar uma menor deposição de colágeno quando administrada no início ou final do processo de indução da fibrose (Safadi, Zigmond *et al.*, 2007). No entanto, o antígeno utilizado apresenta efeitos imunomodulatórios diferentes da α -GalCer, que promove uma rápida expansão com indução concomitante de IL-4 e INF- γ em células NKT, aumentando a plasticidade dessas células e permitindo que elas mudem o perfil de secreção de citocinas dependendo do microambiente e da patologia em questão (Safadi, Zigmond *et al.*, 2007). Visto que essas células são ativadas de forma fásica, com uma expansão rápida e subsequente queda, (Terabe

e Berzofsky, 2007; Swain, 2008) a metodologia usada pode interferir na obtenção de resultados e na avaliação adequada do papel dessas células no balanço entre regeneração e fibrose. Neste contexto é provável que elas tenham uma ação ambígua dependendo dos estímulos que acompanham a lesão tecidual.

O peritônio de camundongos *mdx* macho com 12 e 24 semanas apresentou porcentual significativamente maior de linfócitos NKT. A membrana celular é uma fonte de esfingolípídios, que ao serem liberados no meio extracelular no processo da lesão muscular sofrem hidrólise e os produtos do catabolismo como a ceramida, representam mediadores para ativação, proliferação e diferenciação de células satélites (Bruni e Donati, 2008). A presença desses lipídios no lavado peritoneal poderia estimular a expansão dessa subpopulação de linfócito. A menor atividade de MMP-9 no diafragma de camundongos *mdx* fêmeas com 24 semanas sugere uma menor atividade inflamatória, devido talvez a menor lesão tecidual e menor liberação desses mediadores na cavidade peritoneal. Outra possibilidade seria a atividade supressora de linfócitos T regulatórios sobre essas células (La Cava, Van Kaer *et al.*, 2006; Terabe e Berzofsky, 2008). Vale frisar que recentemente foi identificado que os músculos dos camundongos *mdx* já em 4 semanas apresentam uma infiltração por linfócitos NKT e que um dos mediadores chave desse processo é a osteopontina. A depleção desta citocina causa uma drástica redução na inflamação e na fibrose do coração e do diafragma (Vetrone, Montecino-Rodriguez *et al.*, 2009). Neste contexto seria interessante analisar os efeitos da estimulação crônica de células NKT I e II com antígenos específicos e os efeitos da deleção de CD1d no camundongo *mdx*.

Linfócitos B constituem outra classe de células com função na secreção de diversas classes de imunoglobulinas (Paul, 2003), na apresentação de antígenos

presentes em baixa concentração (Bettelli, Baeten *et al.*, 2006) e na secreção de citocina IL-10 por alguns subtipos (Bouaziz, Yanaba *et al.*, 2008). A depleção dessas células no modelo experimental da esclerose sistêmica, uma doença autoimune caracterizada pela produção de anticorpos anti-fibrilina e intensa deposição de colágeno na pele, altera o perfil de secreção de citocinas para um perfil Th1 (Hasegawa, Hamaguchi *et al.*, 2006). Interessante ressaltar que a partir de 12 semanas, os camundongos *mdx* mostram uma expansão de linfócitos B-2 no linfonodo braquial, um aumento na produção de IgG e acúmulo de plasmócitos secretores de IgA na medula óssea, que é mais evidente nos camundongos idosos (Lagrotta-Candido, Vasconcellos *et al.*, 2002). Quando a fibrose ainda é pouco evidente (12 semanas) o número relativo de linfócitos B no omento do camundongo *mdx* macho estava reduzido, porém nos camundongos *mdx* machos mais idosos (24 semanas) houve um aumento no percentual dessas células enquanto que nos camundongos *mdx* fêmeas esse percentual também estava reduzido. talvez sinalizando para uma menor indução de fibrose, ou uma consequência do perfil de ativação que os hormônios femininos promovem. Um fato interessante é que adipócitos do omento apresentam expressam receptores Fc para diversas classes de imunoglobulina e a estimulação dessas células via FcR γ inibe a secreção de IL-1 β e IL-6 (Palming, Gabrielsson *et al.*, 2006). Como os animais apresentaram expansão de linfócitos B no omento, é possível que a inibição da inflamação esteja relacionada com uma estimulação parácrina e sistêmica envolvendo adipócitos e linfócitos B. A secreção de autoanticorpos é um evento importante na remoção de debris, sendo relevante avaliar o efeito da depleção seletiva de linfócitos B, analisar os subtipos de linfócitos B: (B-1, B-regulatório; B de zona marginal), plasmócitos e a produção de diferentes classes de imunoglobulinas.

Mastócitos possuem funções amplas e diversas no reparo tecidual, como fonte de fatores de crescimento como PDGF FGF-2, NGF e VEGF (Artuc, Hermes *et al.*, 1999; Cao, Boucher *et al.*, 2006; Weller, Foitzik *et al.*, 2006), citocinas, histamina e triptase (Weller, Foitzik *et al.*, 2006). Além disso, estas células participam de todas as fases do reparo tecidual, desde o início com a degranulação de mastócitos residentes e subsequente liberação de mediadores pró-inflamatórios, até a fase de deposição de colágeno e remodelagem tecidual pela secreção de MMP-1 e MMP-9 e ativação de fibroblastos (Di Girolamo e Wakefield, 2000; Baram, Vaday *et al.*, 2001). No músculo esquelético, a inibição da degranulação de mastócitos reduz a mionecrose nos camundongos *mdx* e camundongos deficientes em mastócitos apresentam uma menor mionecrose quando submetidos à lesão muscular isquêmica (Bortolotto, Morrison *et al.*, 2004; Radley e Grounds, 2006).

Os resultados deste trabalho apontam para uma clara diferença no número de mastócitos entre gêneros, com aumento nos camundongos *mdx* machos (com exceção de 48 semanas) e menor presença dessas células no omento de camundongos *mdx* fêmeas ao longo de toda a miopatia. Sabe-se que hormônios femininos apresentam efeitos distintos dependendo da concentração e da célula. Nos mastócitos, o estradiol atua como agente indutor de degranulação e de aumento na liberação de histamina via ativação de um receptor- α membranar não genômico (Zaitzu, Narita *et al.*, 2007). A aparente redução de mastócitos nas fêmeas *mdx*, pode estar relacionada com algum estímulo pró-migratório, ou então por estas células estarem degranulando de forma intensa, dificultando a sua identificação por técnica histológica convencional. Ainda é possível que o omento de camundongo *mdx* macho esteja seletivamente produzindo sinais para maturação e diferenciação deste tipo celular, talvez por causa de mediadores de resposta Th2. Neste contexto,

seria importante analisar a dinâmica dessas células no peritônio, omento e diafragma usando anticorpos específicos para mastócitos e/ou estratégias de tratamento com drogas capazes de depletar especificamente esta população. Outra possibilidade para os resultados encontrados seria a supressão dessas células por linfócitos T regulatórios através da ligação das moléculas CD134L /CD134(Gri, Piconese *et al.*, 2008) nos camundongos fêmeas, uma vez que linfócitos TCD4⁺CD25⁺ estão aumentados no omento das fêmeas.

Outro ponto interessante é que linfócitos de camundongos machos apresentam o dobro do conteúdo do hormônio adrenocorticotrófico em relação aos linfócitos das fêmeas (Csaba e Pallinger, 2009). Este hormônio é induzido pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) descrito como um potente estimulador da ativação de mastócitos na pele, que expressam o receptor e também secretam o hormônio (Cao, Boucher *et al.*, 2006; O'kane, Murphy *et al.*, 2006; Rao e Brown, 2008; Wallon, Yang *et al.*, 2008). Neste contexto é possível especular que o aumento no número de mastócitos no omento de camundongos *mdx* machos seja fruto dessa alça hormonal que claramente insere essas células no eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal.

O omento de camundongos *mdx* está aparentemente ativado pelo processo patológico que ocorre nos músculos, o que sugere uma participação importante de progenitores e fatores de crescimento como FGF-2 na fisiopatologia da lesão.

Os fatores de crescimento de fibroblastos correspondem a uma classe de pelo menos nove fatores de crescimento diferentes que se ligam a três classes de moléculas: receptores tirosina quinase (FGR1-4), receptores ricos em cisteína (CRFs) e a glicosaminoglicana heparan sulfato (Olwin e Rapraeger, 1992). Esses fatores influenciam diferentes programas de diferenciação celular (Ito, Sawada *et al.*,

2008; Quarto e Longaker, 2008), de ativação da proliferação de progenitores musculares (Olwin e Rapraeger, 1992) e eventualmente na dediferenciação de células adultas para um fenótipo embrionário (Durcova-Hills, Tang *et al.*, 2008). Moléculas dessa classe de fatores de crescimento são importantes para a regeneração muscular (Nachtsheim, Dudley *et al.*, 2006), neste contexto a sua secreção pelo mesotélio peritoneal e pelo omento poderiam influenciar na regeneração do músculo diafragma. De fato, nossos experimentos de imunohistoquímica para expressão de FGF-2 no omento mostraram que omento de camundongos *mdx* apresentava muitos aglomerados de células fortemente marcadas para FGF a partir de 12 semanas, sendo ainda maior a área de marcação no omento de camundongos machos e fêmeas com 24 semanas. Como heparanases e metaloproteinases podem liberar o FGF-2 associado a componentes (proteoglicanos) da matriz extracelular (Olwin, Arthur *et al.*, 1994; Levi, Fridman *et al.*, 1996) é possível associarmos o aumento na atividade das MMPs com a produção de FGF no microambiente da cavidade peritoneal e a remodelagem do músculo diafragma dos camundongos *mdx*.

Sca-1 é uma molécula presente em progenitores de medula óssea e algumas classes de progenitores com potencial miogênico (Ito, Li *et al.*, 2003; Gilner, Walton *et al.*, 2007; Luth, Jun *et al.*, 2008), sendo também encontrada em progenitores de linfócitos T duplo negativos, células Mac-1⁺ produtoras de óxido nítrico, fibroblastos e células epiteliais do rim (Johnson, Hanke *et al.*, 1998; Ito, Li *et al.*, 2003; Kumar, Zhu *et al.*, 2005). Algumas patologias com grande ativação de linfócitos T e B também apresentam um aumento na expressão de Sca-1 (Johnson, Hanke *et al.*, 1998; Kumar, Zhu *et al.*, 2005). Neste trabalho mostramos numerosas células Sca-1 positivas nas regiões de *milk spots* do omento de camundongos *mdx*.

Com intuito de caracterizar células tronco de forma mais precisa foram realizados experimentos de citometria de fluxo com o perfil de expressão de Sca-1, ckit e B220 para exclusão de macrófagos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos. O omento de camundongos *mdx* com 12 semanas mostrou aumento significativo no percentual e número de células $\text{Sca-1}^{\text{hi}}\text{B220}^+\text{ckit}^-$ em relação ao camundongo controle não distrófico pareado e em relação ao camundongo *mdx* macho. Também foi observado aumento discreto desse tipo celular no peritônio e um aumento nos percentuais de células $\text{Sca-1}^{\text{int}}\text{B220}^+\text{ckit}^-$ no omento e peritônio do camundongo macho *mdx* com 12 semanas em relação ao camundongo *mdx* macho com 24 semanas. Esse tipo celular tem fenótipo compatível com o grupo de célula tronco definida como *side population* encontrada no músculo esquelético e em especial na medula óssea. Nesse contexto é possível que estas células estejam influenciando diretamente a regeneração muscular no *mdx* (Meeson, Hawke *et al.*, 2004; Liadaki, Kho *et al.*, 2005; Luth, Jun *et al.*, 2008). A utilização do corante Hoechst 33342 que poucos tipos celulares transportam ativamente para fora da célula por transportadores específicos, seria uma estratégia eficiente para caracterizar o grau de indiferenciação desse tipo celular (Scharenberg, Harkey *et al.*, 2002; Liadaki, Kho *et al.*, 2005; Tsuchiya, Heike *et al.*, 2007). O fato de não se ter encontrado diferenças em nenhuma das classes de células ckit^+ , um marcador clássico de progenitores de medula óssea de topo de cadeia (Liadaki, Kho *et al.*, 2005) pode ser em parte devido à exclusão pelo marcador Mac-1, também expresso em parte dessa subpopulação de progenitores (Pinho Mde, Hurtado *et al.*, 2005). Esta hipótese é factível devido à baixa quantidade dessas células no omento e principalmente no peritônio. As células $\text{Sca-1}^+\text{B220}^-\text{ckit}^-$ apresentam fenótipo característico de vários progenitores miogênicos como mesoangioblastos, pericitos e alguns grupos de SP. As células

Sca-1^{int}B220⁻ckit⁻ estavam presentes em maior porcentual no peritônio de camundongos *mdx* macho com 12 semanas e também nas fêmeas com 24 semanas. Estas apresentam maior porcentual de células com este fenótipo em relação ao camundongo *mdx* macho de 24 semanas independentemente do nível de expressão de Sca-1 (porém essa diferença não foi significativa). O omento apresentou um grande aumento no número absoluto de células Sca-1^{int}B220⁻ckit⁻ apenas nos camundongos *mdx* macho com 24 semanas em relação ao camundongo C57BL/10. Camundongos *mdx* fêmeas apresentaram um valor significativamente maior de células Sca-1^{high}B220⁻ckit⁻ e Sca-1^{int}B220⁻ckit⁻ em relação ao camundongo *mdx* macho com 24 semanas indicando a possibilidade de uma maior participação do omento de camundongos fêmeas na regeneração. Embora vários grupos de progenitores musculares apresentem esse perfil, é necessário utilizar outros marcadores para caracterizar efetivamente estes grupos de célula-tronco.

É possível especular também que essas células poderiam estar sendo atraídas de outros sítios para o omento pelo gradiente favorável de quimiocinas produzidas localmente como SDF1- α . Neste contexto, a alta produção de FGF-2 e outros fatores de crescimento como o LIF e o SCF poderiam estar promovendo a proliferação, diferenciação e até dediferenciação. Não é descartada também a possibilidade de que o omento nativo seja uma rota natural de migração de progenitores.

Além da importância estrutural na manutenção do arcabouço dos tecidos, a matriz extracelular (ECM) também funciona como um ambiente de retenção de fatores tróficos que promovem a proliferação, diferenciação, ativação e migração celular. Através de interações com citocinas e enzimas de degradação, o microambiente da ECM tem um papel especializado em prover sinais intrínsecos

para migração e ativação de células inflamatórias e reparo dos tecidos danificados (Vaday e Lider, 2000). Na regeneração muscular, moléculas da ECM controlam diretamente a migração celular e induzem diferenciação ou influenciam indiretamente, retendo fatores de crescimento (Maley, Davies *et al.*, 1995).

A alta taxa de remodelagem da matriz extracelular durante a degeneração e regeneração do músculo esquelético sugere uma alta regulação da atividade de degradação da matriz durante a regeneração muscular (Carmeli, Moas *et al.*, 2004). Durante o processo inflamatório as MMPs são produzidas por quase todas as populações recrutadas além de estarem aumentadas nas miofibras próximas a uma lesão e em progenitores como as células satélites. As gelatinases A e B constituem as principais metaloproteinases envolvidas na remodelagem do tecido muscular. A MMP-9 (gelatinase A) normalmente está associada com a migração de células inflamatórias e possivelmente a ativação de células satélites, enquanto a MMP-2 (gelatinase B) é constitutiva do tecido muscular, mas está aumentada durante o processo de regeneração muscular pela necessidade de remodelagem de componentes da lamina basal no processo {Kherif, 1999 #384; Szaboa, 2004 #489; Wiendl, 2005 #2}.

O aumento na atividade da MMP-9 no diafragma do camundongo *mdx* com 12 semanas, seguida de baixa na atividade em 24 semanas e uma discreta retomada da atividade em 48 semanas, indica a existência de uma dinâmica de ativação da MMP-9 compatível com dados já publicados pelo grupo (Bani, Lagrota-Candido *et al.*, 2008) e com a literatura (Kherif, Dehaupas *et al.*, 1998). Nas fêmeas *mdx* encontramos uma cinética semelhante embora com menor atividade da MMP-9 em 12, 24 e 48 semanas em relação ao macho sugerindo menor atividade inflamatória.

É importante considerar que existe uma relação de influência mútua entre MMPs e citocinas devido, por exemplo, a presença de sítios de ligação de fatores de transcrição NF- κ B e SP-1 no gene promotor da MMP-9, sugerindo sua ativação gênica em conjunto com a ativação dos genes de citocinas pró-inflamatórias (Madri e Graesser, 2000; Newby, 2006). A citocina TGF- β é secretada na forma latente apresentando um pró-domínio cuja proteólise é induzida por MMPs (Mott e Werb, 2004). Da mesma forma, existe um ciclo de ativação mútuo entre IL-1 e MMP-1, 3 e 9, onde a forma ativa da IL-1 aumenta também a atividade de MMP-9 e a MMP-2 (Mott e Werb, 2004). A citocina TNF- α secretada como uma proteína integral de membrana, quando clivada pela enzima conversora de TNF (TACE) passa à forma ativa. TACE é uma enzima semelhante ao ADAM17 pertencente à família das desintegrinas que também inclui as metaloproteinases. Como a administração de inibidores de metaloproteinases também inibe a atividade da TACE, é provável que ela própria seja uma MMP (Parks, Wilson *et al.*, 2004).

Camundongos machos e fêmeas *mdx* com 24 semanas apresentaram maior atividade da pró-MMP-2 no diafragma. Interessante ressaltar que a baixa atividade da MMP-2 no *mdx* com 5 semanas e o aumento marcante em machos e fêmeas com 12 e 24 semanas indica a existência de remodelagem contínua da lâmina basal provavelmente associada com regeneração muscular durante esse período (Kherif, Lafuma *et al.*, 1999; Bani, Lagrota-Candido *et al.*, 2008). Machos e fêmeas *mdx* com 48 semanas apresentaram uma grande redução da atividade da MMP-2 sugerindo redução no processo de regeneração.

A presença de grupos de células B220 no omento das fêmeas *mdx* com 5 semanas, atividade aumentada da MMP-9 e aparente aumento nas zonas de *milk spot* sugerem uma ativação mais precoce do sistema imune associado à cavidade

peritoneal. Já o lavado de camundongos *mdx* machos com 48 semanas apresentou um discreto aumento da MMP-9 sugerindo talvez, uma retomada no processo inflamatório, mas experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

A clivagem proteolítica de quimiocinas por MMPs pode levar a sua inativação com geração de fragmentos antagonistas: aumentar a atividade biológica e/ou regular a sua biodisponibilidade pela atividade proteolítica de componentes da matriz extracelular (proteoglicanas) responsáveis pela formação de gradientes (Van Den Steen, Wuyts *et al.*, 2003). MMP-9 é capaz de reduzir a atividade da quimiocina SDF-1 α (CXCL12), porém aumenta a atividade da quimiocina CXCL5 de modo semelhante a MMP-2. Dessa forma essas metaloproteinases podem regular diretamente o processo inflamatório e a migração de progenitores mediada por SDF-1 α (Parks, Wilson *et al.*, 2004; Gill e Parks, 2008). Outro fator importante é que a sinalização desencadeada por EGF e HGF é dependente da atividade concomitante da MMP-9, fato que revela uma participação direta das metaloproteinases no reparo tecidual (Gill e Parks, 2008). As MMPs podem agir também de forma regulatória, contendo a ativação de linfócitos T, porque MMP-9 é capaz de clivar a molécula CD25 da membrana de linfócitos. (Sheu, Hsu *et al.*, 2001).

Com relação a diferenças de gênero sabe-se que o estradiol é capaz de induzir uma mobilização de progenitores endoteliais de medula óssea através de uma estimulação da expressão de NOS e MMP-9 em modelos de infarto (Iwakura, Shastry *et al.*, 2006). O estradiol também induz uma maior liberação de NO pela indução de INF- γ (Karpuzoglu, Fenaux *et al.*, 2006). Como oxido nítrico ativa a MMP-9 (Iwakura, Shastry *et al.*, 2006), é possível sugerir que diferenças de gênero podem modular a atividade dessa MMP.

Para melhor elucidar a importância do omento na fisiopatologia do diafragma camundongos *mdx* machos e fêmeas com 5 semanas foram submetidos a omentectomia e sacrificados com 12 semanas, idade em que o omento já apresenta sinais claros de ativação. No diafragma observamos efeitos antagônicos na atividade de pró-MMP-2 e MMP-9 entre machos e fêmeas com uma redução significativa nos machos OTX e discreto aumento nas fêmeas. Machos e fêmeas *mdx* OTX apresentaram redução da MMP-2 ativa. Um fato interessante foi a observação de uma redução também no grupo *sham*, indicando que essa alteração deva-se em grande parte ao efeito de hormônios do estresse. O lavado peritoneal mostrou um discreto aumento da pre-MMP-2 em relação ao diafragma com redução significativa no lavado peritoneal de camundongos machos OTX em relação ao grupo controle, mas um aumento nas fêmeas *mdx* fêmeas em relação ao grupo *sham*.

O músculo gastrocnêmio usado como controle de um músculo distante da cavidade peritoneal mostrou um padrão de atividade da pro-MMP-2 semelhante ao da cavidade peritoneal, mas em relação a MMP-9 foi observado discreto aumento nos camundongos *mdx* machos e fêmeas OTX e na MMP-2 ativa, um aumento nos camundongos machos, mas redução significativa nas fêmeas omentectomizadas e *sham*. Tais resultados indicam que o omento pode estar afetando a inflamação e regeneração de forma local (diafragma e lavado peritoneal) e sistêmica (músculo gastrocnêmio) de forma diferenciada na miopatia entre os gêneros (*mdx* machos e fêmeas).

Dados sobre os efeitos da omentectomia são muito escassos na literatura, no entanto existem evidências que apontam para o fato de que a adesão do omento em outros órgãos é dependente de uma queda temporária na atividade fibrinolítica da cavidade peritoneal. O próprio omento produz ativadores e inibidores do

plasminogênio como t-PA, PAI-1 e PAI-2 (Cerci, Eroglu *et al.*, 2008) e a omentectomia reduz os níveis dos ativadores do plasminogênio tecidual e sérico e aumenta os níveis de PAI-1 favorecendo a deposição de fibrina e a deposição de colágeno que sucede a esse evento (Cerci, Eroglu *et al.*, 2008). Um fato interessante é que tPA induz a ativação de MMP-9 (Wang, Zhang *et al.*, 2007; Adibhatla e Hatcher, 2008), sendo possível relacionar o efeito da omentectomia em machos com a redução na atividade fibrinolítica, porém a fêmea talvez possua mecanismos compensatórios. Outros aspectos envolvidos, como por exemplo, a remoção de prováveis linfócitos regulatórios poderia explicar o efeito inverso na atividade da MMP-9 no diafragma de *mdx* fêmeas omentectomizadas. Por outro lado a remoção de uma fonte de fatores de crescimento e de progenitores juntamente com os hormônios liberados pelo estresse cirúrgico pode ser um fator responsável pela queda na atividade da MMP-2 ativa no diafragma. Neste contexto, seria importante realizar omentectomia para observar se ocorre alguma alteração na presença de componentes da matriz extracelular, em relação à deposição de colágeno e proteoglicanas. Contudo, a omentectomia pode causar em camundongos normais uma redução de 40% no influxo de linfócitos B-2 na cavidade peritoneal (Berberich, Dahne *et al.*, 2008), sendo importante a caracterização fenotípica das células do lavado peritoneal e os efeitos prolongados da omentectomia na cavidade peritoneal.

Dados publicados pelo grupo apontam para uma clara diferença entre gêneros com relação à evolução da miopatia no gastrocnêmio, onde fêmeas até 24 semanas apresentam menor inflamação, maior regeneração e fibrose mais sutil (Salimena, Lagrota-Candido *et al.*, 2004). Com 48 semanas, porém as fêmeas apresentam uma maior deposição de tecido conjuntivo o que provavelmente se relaciona com a baixa produção de hormônios femininos. No entanto o diafragma

apresenta uma cinética diferenciada, visto que dados prévios do grupo mostram que a deposição de colágeno já se inicia em 6 semanas e evolui igualmente entre os gêneros, mas em 48 semanas a deposição de colágeno na fêmea é significativamente menor (Pereira, R. d. S., 2007). Tal fato pode se correlacionar com a ativação diferencial do omento nas fêmeas que é bem expressiva em 48 semanas. Um outro aspecto relevante é o fato que nas *mdx* fêmeas com 24 semanas o peritônio e o omento apresentam maior quantidade de progenitores Sca-1⁺B220⁺ckit⁻ e Sca-1⁺B220⁻ckit⁻. A maior atividade da MMP-9 no diafragma dos camundongos machos até fases tardias da doença aponta para uma maior cronicidade do processo inflamatório, o que é suportado pelo maior porcentual de células NKT no lavado peritoneal dos machos de 24 semanas, que pode ser um indício de maior lesão tecidual.

As células tronco mesenquimais isoladas do omento foram caracterizadas por sua morfologia, marcadores e capacidade de aderir a superfícies de plástico (Chen, Shao *et al.*, 2008; Singh, Patel *et al.*, 2008) e atividade de suprimir a ativação linfocitária (Keyser, Beagles *et al.*, 2007; Keating, 2008). O aumento de células tronco no omento e peritônio do camundongo *mdx* sugere que estes locais possam participar da indução de tolerância e possam ser usados para transplante de progenitores distrofina positivo.

Um alvo promissor é o mesotélio peritoneal cujas células são ativas produtoras de FGF e VEGF (Nachtsheim, Dudley *et al.*, 2006), apresentam capacidade de transdiferenciação em células mesenquimais, num processo mediado por diversos fatores, como a citocina TGF- β o que pode representar a integração dos processos de fibrose, angiogênese e formação de progenitores (Zhang, Oh *et al.*, 2008).

O omento atualmente tem se tornado alvo de protocolos de bioengenharia tecidual com a geração de órgãos e tecidos inteiros a partir do implante de células precursoras (Baumert, Simon *et al.*, 2007; Kim, Gwak *et al.*, 2007; Singh, Gudehithlu *et al.*, 2007; Singh, Pancholi *et al.*, 2009). Assim estudos futuros do grupo visarão explorar o potencial funcional do omento como um bioreator onde serão explorados os diversos aspectos do potencial miogênico de seus progenitores.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados (Figura 48) revelam a possibilidade do omento e o peritônio estarem atuando na miopatia influenciando a inflamação e a regeneração, seja pela expansão seletiva dos progenitores necessários para atuar eficientemente na regeneração, pela proliferação e/ou recirculação de populações linfóides que podem influenciar no perfil de reparo tecidual adotado ou pela secreção de fatores de crescimento, quimiotáticos, hormônios, citocinas etc.

Os experimentos de omentectomia revelam a possibilidade de o omento estar atuando na miopatia de modo sistêmico e diferencial entre os sexos influenciando a inflamação e a regeneração. A omentectomia causou uma queda nos níveis das MMP-2 e 9 no diafragma dos camundongos *mdx* machos e um pequeno aumento da MMP-9 nos camundongos *mdx* fêmeas. No lavado peritoneal observamos uma queda na pró-MMP-2 de camundongos *mdx* machos OTX em relação ao controle e um aumento nos camundongos *mdx* fêmeas em relação ao camundongo controle sham.

No gastrocnêmio pudemos observar que a omentectomia causou um aumento na atividade da MMP-9 e pró-MMP-2 em ambos os sexos quando comparado com os camundongos controle sham. Com relação a MMP-2 ativa foi observado um

aumento nos camundongos *mdx* machos OTX em relação ao grupo sham.

Os dados deste trabalho são relevantes por apontarem para a ativação de diversos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no recrutamento do microambiente peritoneal e recrutamento de um órgão linfohematopoiético primitivo tido como santuário de progenitores durante a miopatia do camundongo *mdx*.

Por fim nossos resultados abrem uma grande porta para elucidação dos mecanismos diferenciais envolvidos no reparo tecidual do diafragma e corroboram com a literatura na geração de diversos caminhos para abordagens terapêuticas na DMD.

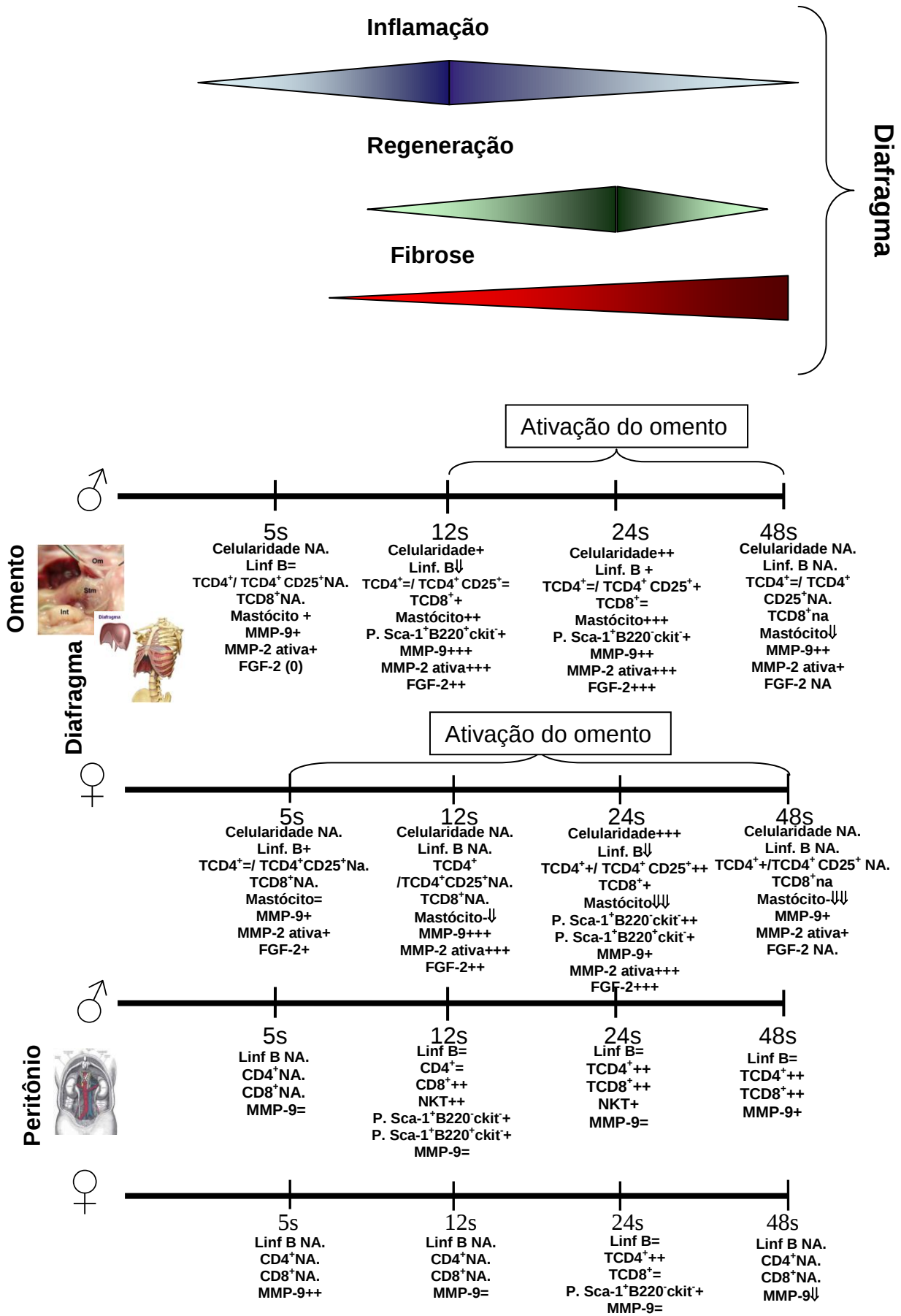


Figura 48 - Sumário das alterações encontradas no omento, diafragma peritônio.

Simbolos de +, ↓ e = se referem ao controle não distrófico de mesma idade e sexo. NA= não analisado. A cinética descrita de regeneração, inflamação e fibrose se referem ao diafragma.

8. REFERÊNCIAS

- Abo, T. Extrathymic pathways of T-cell differentiation: a primitive and fundamental immune system. Microbiol Immunol, v.37, n.4, p.247-58. 1993.
- Abraham, M., S. Shapiro, *et al.* Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. J Neuroimmunol, v.163, n.1-2, Jun, p.157-64. 2005.
- Abu-Hijleh, M. F., O. A. Habbal, *et al.* The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. J Anat, v.186 (Pt 3), Jun, p.453-67. 1995.
- Adibhatla, R. M. e J. F. Hatcher. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. CNS Neurol Disord Drug Targets, v.7, n.3, Jun, p.243-53. 2008.
- Anastasia, L., M. Sampaolesi, *et al.* Reversine-treated fibroblasts acquire myogenic competence in vitro and in regenerating skeletal muscle. Cell Death Differ, v.13, n.12, Dec, p.2042-51. 2006.
- Anderson, C. F., M. Oukka, *et al.* CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. J Exp Med, v.204, n.2, Feb 19, p.285-97. 2007.
- Anderson, J. L., S. I. Head, *et al.* Brain function in Duchenne muscular dystrophy. Brain, v.125, n.Pt 1, Jan, p.4-13. 2002.
- Artuc, M., B. Hermes, *et al.* Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? Exp Dermatol, v.8, n.1, Feb, p.1-16. 1999.
- Aurino, S. e V. Nigro. Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy. Acta Myol, v.25, n.1, Jun, p.5-12. 2006.

Azouz, A., M. S. Razzaque, *et al.* Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. Med Electron Microsc, v.37, n.3, Sep, p.141-8. 2004.

Bani, C., J. Lagrota-Candido, *et al.* Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. Muscle Nerve, v.37, n.5, May, p.583-92. 2008.

Baram, D., G. G. Vaday, *et al.* Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. J Immunol, v.167, n.7, Oct 1, p.4008-16. 2001.

Barbul, A., D. Sisto, *et al.* Thymic inhibition of wound healing: abrogation by adult thymectomy. J Surg Res, v.32, n.4, Apr, p.338-42. 1982.

Barton-Davis, E. R., L. Cordier, *et al.* Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. J Clin Invest, v.104, n.4, Aug, p.375-81. 1999.

Baumert, H., P. Simon, *et al.* Development of a seeded scaffold in the great omentum: feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. Eur Urol, v.52, n.3, Sep, p.884-90. 2007.

Bebo, B. F., Jr., J. C. Schuster, *et al.* Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. J Immunol, v.162, n.1, Jan 1, p.35-40. 1999.

Beray-Berthat, V., N. Croci, *et al.* Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia-reperfusion in rats. Brain Res, v.987, n.1, Oct 10, p.32-8. 2003.

Berberich, S., S. Dahne, *et al.* Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. J Immunol, v.180, n.4, Feb 15, p.2196-203. 2008.

Berland, R. e H. H. Wortis. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. Annu Rev Immunol, v.20, p.253-300. 2002.

Bernardi, P. e P. Bonaldo. Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. Ann N Y Acad Sci, v.1147, Dec, p.303-11. 2008.

Berzofsky, J. A. e M. Terabe. A novel immunoregulatory axis of NKT cell subsets regulating tumor immunity. Cancer Immunol Immunother, v.57, n.11, Nov, p.1679-83. 2008.

Bettelli, E., D. Baeten, *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. J Clin Invest, v.116, n.9, Sep, p.2393-402. 2006.

Bigliardi-Qi, M., C. Gaveriaux-Ruff, *et al.* Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. Differentiation, v.74, n.4, Apr, p.174-85. 2006.

Blake, D. J., A. Weir, *et al.* Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiol Rev, v.82, n.2, Apr, p.291-329. 2002.

Bortolotto, S. K., W. A. Morrison, *et al.* The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles. J Inflamm (Lond), v.1, n.1, Sep 27, p.2. 2004.

Bouaziz, J. D., K. Yanaba, *et al.* Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. Immunol Rev, v.224, Aug, p.201-14. 2008.

Brunelli, S. e P. Rovere-Querini. The immune system and the repair of skeletal muscle. Pharmacol Res, v.58, n.2, Aug, p.117-21. 2008.

Bruni, P. e C. Donati. Pleiotropic effects of sphingolipids in skeletal muscle. Cell Mol Life Sci, v.65, n.23, Nov, p.3725-36. 2008.

Buckingham, M. e D. Montarras. Skeletal muscle stem cells. Curr Opin Genet Dev, v.18, n.4, Aug, p.330-6. 2008.

Bulfield, G., W. G. Siller, *et al.* X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.4, Feb, p.1189-92. 1984.

Campaner, A. B., L. M. Ferreira, *et al.* Upregulation of TGF-beta1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. J Invest Dermatol, v.126, n.5, May, p.1168-76. 2006.

Cao, J., W. Boucher, *et al.* Acute stress and intravesical corticotropin-releasing hormone induces mast cell dependent vascular endothelial growth factor release from mouse bladder explants. J Urol, v.176, n.3, Sep, p.1208-13. 2006.

Capellino, S., V. Villaggio, *et al.* [17beta-Estradiol and testosterone influence the mRNA expression and the time course of inflammatory cytokines in activated human monocytic cell line (THP-1)]. Reumatismo, v.57, n.3, Jul-Sep, p.193-6. 2005.

Cardasis, C. A. e G. W. Cooper. An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: a satellite cell-muscle fiber growth unit. J Exp Zool, v.191, n.3, Mar, p.347-58. 1975.

Carlow, D. A., M. R. Gold, *et al.* Lymphocytes in the peritoneum home to the omentum and are activated by resident dendritic cells. J Immunol, v.183, n.2, Jul 15, p.1155-65. 2009.

Carmeli, E., M. Moas, *et al.* Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. Muscle Nerve, v.29, n.2, Feb, p.191-7. 2004.

Castagnoli, C., C. Trombotto, *et al.* Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. Burns, v.23, n.7-8, Nov-Dec, p.565-72. 1997.

Cerci, C., E. Eroglu, *et al.* Effects of omentectomy on the peritoneal fibrinolytic system. Surg Today, v.38, n.8, p.711-5. 2008.

Charge, S. B. e M. A. Rudnicki. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev, v.84, n.1, Jan, p.209-38. 2004.

Chen, J. C. e D. J. Goldhamer. Skeletal muscle stem cells. Reprod Biol Endocrinol, v.1, Nov 13, p.101. 2003.

Chen, Y., J. Z. Shao, *et al.* Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. Int J Biochem Cell Biol, v.40, n.5, p.815-20. 2008.

Chen, Z. e J. J. O'shea. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. Immunol Res, v.41, n.2, p.87-102. 2008.

Cheng, M., M. H. Nguyen, *et al.* Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. Am J Physiol Cell Physiol, v.294, n.5, May, p.C1183-91. 2008.

Christophe, D. The control of thyroid-specific gene expression: what exactly have we learned as yet? Mol Cell Endocrinol, v.223, n.1-2, Aug 31, p.1-4. 2004.

Claycombe, K., L. E. King, *et al.* A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.6, Feb 12, p.2017-21. 2008.

Collins, C. A. e J. E. Morgan. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. Int J Exp Pathol, v.84, n.4, Aug, p.165-72. 2003.

Contreras-Shannon, V., O. Ochoa, *et al.* Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2^{-/-} mice following ischemic injury. Am J Physiol Cell Physiol, v.292, n.2, Feb, p.C953-67. 2007.

Cowin, A. J., M. P. Brosnan, *et al.* Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. Dev Dyn, v.212, n.3, Jul, p.385-93. 1998.

Csaba, G. e E. Pallinger. Gender dependence in the hormone content of the immune cells. Acta Physiol Hung, v.96, n.1, Mar, p.45-50. 2009.

Cullen, M. J. e F. L. Mastaglia. Morphological changes in dystrophic muscle. Br Med Bull, v.36, n.2, May, p.145-22. 1980.

Dalakas, M. C. The role of high-dose immune globulin intravenous in the treatment of dermatomyositis. Int Immunopharmacol, v.6, n.4, Apr, p.550-6. 2006.

David Randall, W. B., Kathleen French Fisiologia Animal Mecanismos e Adaptacoes v.1. 2000

De Luca, A., B. Nico, *et al.* Gentamicin treatment in exercised mdx mice: Identification of dystrophin-sensitive pathways and evaluation of efficacy in work-loaded dystrophic muscle. Neurobiol Dis, v.32, n.2, Nov, p.243-53. 2008.

Dellavalle, A., M. Sampaolesi, *et al.* Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. Nat Cell Biol, v.9, n.3, Mar, p.255-67. 2007.

Demoule, A., M. Divangahi, *et al.* Expression and regulation of CC class chemokines in the dystrophic (mdx) diaphragm. Am J Respir Cell Mol Biol, v.33, n.2, Aug, p.178-85. 2005.

Di Girolamo, N. e D. Wakefield. In vitro and in vivo expression of interstitial collagenase/MMP-1 by human mast cells. Dev Immunol, v.7, n.2-4, p.131-42. 2000.

Di Rocco, G., M. G. Iachininoto, *et al.* Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. J Cell Sci, v.119, n.Pt 14, Jul 15, p.2945-52. 2006.

Donn, R. P. e D. W. Ray. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. J Endocrinol, v.182, n.1, Jul, p.1-9. 2004.

Duan, B. e L. Morel. Role of B-1a cells in autoimmunity. Autoimmun Rev, v.5, n.6, Jul, p.403-8. 2006.

Dumitriu, I. E., P. Baruah, *et al.* HMGB1: guiding immunity from within. Trends Immunol, v.26, n.7, Jul, p.381-7. 2005.

Durcova-Hills, G., F. Tang, *et al.* Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. PLoS ONE, v.3, n.10, p.e3531. 2008.

Ehmsen, J., E. Poon, *et al.* The dystrophin-associated protein complex. J Cell Sci, v.115, n.Pt 14, Jul 15, p.2801-3. 2002.

El Fahime, E., Y. Torrente, *et al.* In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. Exp Cell Res, v.258, n.2, Aug 1, p.279-87. 2000.

Essakalli, M., C. Brick, *et al.* [The latest TH17 lymphocyte in the family of T CD4+ lymphocytes.]. Pathol Biol (Paris), Mar 17. 2009.

Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science, v.279, n.5356, Mar 6, p.1528-30. 1998.

Foster, W., Y. Li, *et al.* Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. J Orthop Res, v.21, n.5, Sep, p.798-804. 2003.

Fox, H. S., B. L. Bond, *et al.* Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. J Immunol, v.146, n.12, Jun 15, p.4362-7. 1991.

Gabrielsson, B. G., J. M. Johansson, *et al.* Depot-specific expression of fibroblast growth factors in human adipose tissue. Obes Res, v.10, n.7, Jul, p.608-16. 2002.

Gawronska-Kozak, B., M. Bogacki, *et al.* Scarless skin repair in immunodeficient mice. Wound Repair Regen, v.14, n.3, May-Jun, p.265-76. 2006.

Gayraud-Morel, B., F. Chretien, *et al.* A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. Dev Biol, v.312, n.1, Dec 1, p.13-28. 2007.

Gill, S. E. e W. C. Parks. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. Int J Biochem Cell Biol, v.40, n.6-7, p.1334-47. 2008.

Gilner, J. B., W. G. Walton, *et al.* Antibodies to stem cell marker antigens reduce engraftment of hematopoietic stem cells. Stem Cells, v.25, n.2, Feb, p.279-88. 2007.

Goldman, S. e E. Shalev. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.111, n.2, Dec 10, p.109-21. 2003.

Goldsmith, H. S. The evolution of omentum transposition: from lymphedema to spinal cord, stroke and Alzheimer's disease. Neurol Res, v.26, n.5, Jul, p.586-93. 2004.

Goldsmith, H. S., A. Fonseca, Jr., *et al.* Spinal cord separation: MRI evidence of healing after omentum-collagen reconstruction. Neurol Res, v.27, n.2, Mar, p.115-23. 2005.

Goldsmith, H. S., W. Wu, *et al.* Omental transposition to the brain as a surgical method for treating Alzheimer's disease. Neurol Res, v.25, n.6, Sep, p.625-34. 2003.

Gosselin, L. E., J. E. Williams, *et al.* Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. Muscle Nerve, v.30, n.5, Nov, p.645-53. 2004.

Grewal, P. K. e J. E. Hewitt. Glycosylation defects: a new mechanism for muscular dystrophy? Hum Mol Genet, v.12 Spec No 2, Oct 15, p.R259-64. 2003.

Gri, G., S. Piconese, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. Immunity, v.29, n.5, Nov, p.771-81. 2008.

Grounds, M. D. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. Cell Mol Life Sci, v.65, n.11, Jun, p.1621-5. 2008.

Grounds, M. D., H. G. Radley, *et al.* Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Neurobiol Dis, v.31, n.1, Jul, p.1-19. 2008.

Gu, Z., M. Kaul, *et al.* S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. Science, v.297, n.5584, Aug 16, p.1186-90. 2002.

Habib, M., O. Caspi, *et al.* Human embryonic stem cells for cardiomyogenesis. J Mol Cell Cardiol, v.45, n.4, Oct, p.462-74. 2008.

Hardman, M. J., A. Waite, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor: a central regulator of wound healing. Am J Pathol, v.167, n.6, Dec, p.1561-74. 2005.

Hasegawa, M., Y. Hamaguchi, *et al.* B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. Am J Pathol, v.169, n.3, Sep, p.954-66. 2006.

Haslett, J. N., P. B. Kang, *et al.* The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. Mamm Genome, v.16, n.10, Oct, p.739-48. 2005.

Hawke, T. J. e D. J. Garry. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J Appl Physiol, v.91, n.2, Aug, p.534-51. 2001.

He, K. M., Y. Ma, *et al.* Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. Eur J Immunol, v.37, n.12, Dec, p.3455-66. 2007.

Hemann, S., J. Graf, *et al.* Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. J Hepatol, v.46, n.5, May, p.955-75. 2007.

Henry, G. e W. L. Garner. Inflammatory mediators in wound healing. Surg Clin North Am, v.83, n.3, Jun, p.483-507. 2003.

Hernandez-Deviez, D. J., S. Martin, *et al.* Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. Hum Mol Genet, v.15, n.1, Jan 1, p.129-42. 2006.

Hesse, M., M. Modolell, *et al.* 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, v.167, n.11, Dec 1, p.6533-44. 2001.

Hirai, K., N. Takemori, *et al.* Erythropoiesis in mouse omental milky spots induced by erythropoietin: light and electron microscopic study. Int J Exp Pathol, v.75, n.5, Oct, p.375-83. 1994.

Hoffman, E. P. Clinical and histopathological features of abnormalities of the dystrophin-based membrane cytoskeleton. Brain Pathol, v.6, n.1, Jan, p.49-61. 1996.

Holterman, C. E. e M. A. Rudnicki. Molecular regulation of satellite cell function. Semin Cell Dev Biol, v.16, n.4-5, Aug-Oct, p.575-84. 2005.

Howell, J. M. Is there a future for gene therapy? Neuromuscul Disord, v.9, n.2, Mar, p.102-7. 1999.

Ishizaki, M., T. Suga, *et al.* Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. Neuromuscul Disord, v.18, n.4, Apr, p.342-8. 2008.

Ito, C. Y., C. Y. Li, *et al.* Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. Blood, v.101, n.2, Jan 15, p.517-23. 2003.

Ito, T., R. Sawada, *et al.* FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. Cytotechnology, v.56, n.1, Jan, p.1-7. 2008.

Iwakura, A., S. Shastry, *et al.* Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. Circulation, v.113, n.12, Mar 28, p.1605-14. 2006.

Jarvinen, T. A., T. L. Jarvinen, *et al.* Muscle injuries: biology and treatment. Am J Sports Med, v.33, n.5, May, p.745-64. 2005.

Jejurikar, S. S. e W. M. Kuzon, Jr. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. Apoptosis, v.8, n.6, Dec, p.573-8. 2003.

Johnson, B. D., C. A. Hanke, *et al.* Sca1(+)/Mac1(+) nitric oxide-producing cells in the spleens of recipients early following bone marrow transplant suppress T cell responses in vitro. Cell Immunol, v.189, n.2, Nov 1, p.149-59. 1998.

Junqueira, L. C. A. J. C. Histologia Básica. 2004

Kapsa, R., A. J. Kornberg, *et al.* Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. Lancet Neurol, v.2, n.5, May, p.299-310. 2003.

Karpuzoglu, E., J. B. Fenaux, *et al.* Estrogen up-regulates inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, and cyclooxygenase-2 in splenocytes activated with T cell stimulants: role of interferon-gamma. Endocrinology, v.147, n.2, Feb, p.662-71. 2006.

Kassar-Duchossoy, L., E. Giacomini, *et al.* Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. Genes Dev, v.19, n.12, Jun 15, p.1426-31. 2005.

Keating, A. How do mesenchymal stromal cells suppress T cells? Cell Stem Cell, v.2, n.2, Feb 7, p.106-8. 2008.

Keyser, K. A., K. E. Beagles, *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. Cell Transplant, v.16, n.5, p.555-62. 2007.

Kherif, S., M. Dehaupas, *et al.* Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. Neuropathol Appl Neurobiol, v.24, n.4, Aug, p.309-19. 1998.

Kherif, S., C. Lafuma, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. Dev Biol, v.205, n.1, Jan 1, p.158-70. 1999.

Kim, M., Y. S. Choi, *et al.* Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. Biochem Biophys Res Commun, v.348, n.2, Sep 22, p.386-92. 2006.

Kim, S. S., S. J. Gwak, *et al.* Kidney tissue reconstruction by fetal kidney cell transplantation: effect of gestation stage of fetal kidney cells. Stem Cells, v.25, n.6, Jun, p.1393-401. 2007.

Kondo, S., S. Kagami, *et al.* Transforming growth factor-beta1 stimulates collagen matrix remodeling through increased adhesive and contractive potential by human renal fibroblasts. Biochim Biophys Acta, v.1693, n.2, Aug 23, p.91-100. 2004.

Kopp, J., E. Preis, *et al.* Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts. J Biol Chem, v.280, n.22, Jun 3, p.21570-6. 2005.

Kovacs, E. J. e L. A. Dipietro. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. FASEB J, v.8, n.11, Aug, p.854-61. 1994.

Kozmik, Z. Pax genes in eye development and evolution. Curr Opin Genet Dev, v.15, n.4, Aug, p.430-8. 2005.

Kremli, S. M. e S. G. Mamontov. [Morphological features of milky spots of the rat omentum in inflammation]. Biull Eksp Biol Med, v.109, n.6, Jun, p.616-9. 1990.

Krist, L. F., H. Koenen, *et al.* Ontogeny of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical study. Anat Rec, v.249, n.3, Nov, p.399-404. 1997.

Kroemer, G., E. Cuende, *et al.* Compartmentalization of the peripheral immune system. Adv Immunol, v.53, p.157-216. 1993.

Kumar, K. R., J. Zhu, *et al.* Enhanced expression of stem cell antigen-1 (Ly-6A/E) in lymphocytes from lupus prone mice correlates with disease severity. J Autoimmun, v.25, n.3, Nov, p.215-22. 2005.

Kuo, T. H., L. Zhu, *et al.* Altered Ca²⁺ homeostasis and impaired mitochondrial function in cardiomyopathy. Mol Cell Biochem, v.238, n.1-2, Sep, p.119-27. 2002.

La Cava, A., L. Van Kaer, *et al.* CD4⁺CD25⁺ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. Trends Immunol, v.27, n.7, Jul, p.322-7. 2006.

Lafreniere, J. F., P. Mills, *et al.* Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. Exp Cell Res, v.312, n.7, Apr 15, p.1127-41. 2006.

Lagrotta-Candido, J., R. Vasconcellos, *et al.* Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. Int J Exp Pathol, v.83, n.3, Jun, p.121-32. 2002.

Lakos, G., S. Takagawa, *et al.* Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. Am J Pathol, v.165, n.1, Jul, p.203-17. 2004.

Lavasani, M., A. Lu, *et al.* Nerve growth factor improves the muscle regeneration capacity of muscle stem cells in dystrophic muscle. Hum Gene Ther, v.17, n.2, Feb, p.180-92. 2006.

Lefaucheur, J. P., C. Pastoret, *et al.* Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. Anat Rec, v.242, n.1, May, p.70-6. 1995.

Lescaudron, L., E. Peltekian, *et al.* Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. Neuromuscul Disord, v.9, n.2, Mar, p.72-80. 1999.

Levi, E., R. Fridman, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.14, Jul 9, p.7069-74. 1996.

Li, H. e J. Li. Development of the peritoneal lymphatic stomata and lymphatic vessels of the diaphragm in mice. Ann Anat, v.185, n.5, Oct, p.411-8. 2003.

Li, Y., W. Foster, *et al.* 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, v.164, n.3, Mar, p.1007-19. 2004.

Li, Y. Y. e J. C. Li. Cell signal transduction mechanism for nitric oxide regulating lymphatic stomata and its draining capability. Anat Rec (Hoboken), v.291, n.2, Feb, p.216-23. 2008.

Liadaki, K., A. T. Kho, *et al.* Side population cells isolated from different tissues share transcriptome signatures and express tissue-specific markers. Exp Cell Res, v.303, n.2, Feb 15, p.360-74. 2005.

Litbarg, N. O., K. P. Gudehithlu, *et al.* Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. Cell Tissue Res, v.328, n.3, Jun, p.487-97. 2007.

Liu, G., X. P. Xia, *et al.* The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages. J Cell Physiol, v.209, n.2, Nov, p.341-52. 2006.

Liu, Y., X. Yan, *et al.* Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. Stem Cells Dev, v.16, n.5, Oct, p.695-706. 2007.

Lluri, G. e D. M. Jaworski. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. Muscle Nerve, v.32, n.4, Oct, p.492-9. 2005.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Lu, L. e H. Cantor. Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. Cell Mol Immunol, v.5, n.6, Dec, p.401-6. 2008.

Luth, E. S., S. J. Jun, *et al.* Bone marrow side population cells are enriched for progenitors capable of myogenic differentiation. J Cell Sci, v.121, n.Pt 9, May 1, p.1426-34. 2008.

Ma, Y., K. M. He, *et al.* Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. Xenotransplantation, v.15, n.1, Feb, p.56-63. 2008.

Madri, J. A. e D. Graesser. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. Dev Immunol, v.7, n.2-4, p.103-16. 2000.

Maley, M. A., M. J. Davies, *et al.* Extracellular matrix, growth factors, genetics: their influence on cell proliferation and myotube formation in primary cultures of adult mouse skeletal muscle. Exp Cell Res, v.219, n.1, Jul, p.169-79. 1995.

Manceau, M., J. Gros, *et al.* Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. Genes Dev, v.22, n.5, Mar 1, p.668-81. 2008.

Mannello, F., G. A. Tonti, *et al.* Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. Stem Cells, v.24, n.3, Mar, p.475-81. 2006.

Marques, M. J. e H. S. Neto. Ciliary neurotrophic factor stimulates in vivo myotube formation in mice. Neurosci Lett, v.234, n.1, Sep 26, p.43-6. 1997.

Matecki, S., G. H. Guibinga, *et al.* Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.287, n.4, Oct, p.R961-8. 2004.

Mcdouall, R. M., M. J. Dunn, *et al.* Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci, v.99, n.2-3, Nov, p.199-217. 1990.

Meeson, A. P., T. J. Hawke, *et al.* Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. Stem Cells, v.22, n.7, p.1305-20. 2004.

Mescher, A. L. e A. W. Neff. Regenerative capacity and the developing immune system. Adv Biochem Eng Biotechnol, v.93, p.39-66. 2005.

Michailova, K. N. Postinflammatory changes of the diaphragmatic stomata. Ann Anat, v.183, n.4, Jul, p.309-17. 2001.

Michele, D. E. e K. P. Campbell. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. J Biol Chem, v.278, n.18, May 2, p.15457-60. 2003.

Montecino-Rodriguez, E. e K. Dorshkind. New perspectives in B-1 B cell development and function. Trends Immunol, v.27, n.9, Sep, p.428-33. 2006.

Moore, K. L. P. T. N. V. Embriologia Clinica. 2000

Morrison, J., Q. L. Lu, *et al.* T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. Lab Invest, v.80, n.6, Jun, p.881-91. 2000.

Mott, J. D. e Z. Werb. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Curr Opin Cell Biol, v.16, n.5, Oct, p.558-64. 2004.

Muntoni, F., S. Torelli, *et al.* Muscular dystrophies due to glycosylation defects. Neurotherapeutics, v.5, n.4, Oct, p.627-32. 2008.

Nachtsheim, R., B. Dudley, *et al.* The peritoneal cavity is a distinct compartment of angiogenic molecular mediators. J Surg Res, v.134, n.1, Jul, p.28-35. 2006.

Nagano, K., Y. Yoshida, *et al.* Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. Proteomics, v.8, n.19, Oct, p.4025-35. 2008.

Newby, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. Cardiovasc Res, v.69, n.3, Feb 15, p.614-24. 2006.

Nimmerjahn, F. e J. V. Ravetch. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. J Exp Med, v.204, n.1, Jan 22, p.11-5. 2007.

Nonaka, I. [Pathophysiology in muscle fiber necrosis and regeneration with a particular reference to regenerating process]. Rinsho Shinkeigaku, v.38, n.12, Dec, p.997-1000. 1998.

Nowak, K. J. e K. E. Davies. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. EMBO Rep, v.5, n.9, Sep, p.872-6. 2004.

O'kane, M., E. P. Murphy, *et al.* The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. Exp Dermatol, v.15, n.3, Mar, p.143-53. 2006.

Oben, J. A., T. Roskams, *et al.* Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. Gut, v.53, n.3, Mar, p.438-45. 2004.

Ohtake, Y., H. Tojo, *et al.* Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. J Cell Sci, v.119, n.Pt 18, Sep 15, p.3822-32. 2006.

Oliveira, V. R., M. C. El-Cheikh, *et al.* Schistosoma mansoni egg-induced hepatic granulomas in mice deficient for the interferon-gamma receptor have altered populations of macrophages, lymphocytes and connective tissue cells. Microbes Infect, v.2, n.15, Dec, p.1817-26. 2000.

Olwin, B. B., K. Arthur, *et al.* Role of FGFs in skeletal muscle and limb development. Mol Reprod Dev, v.39, n.1, Sep, p.90-100; discussion 100-1. 1994.

Olwin, B. B. e A. Rapraeger. Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. J Cell Biol, v.118, n.3, Aug, p.631-9. 1992.

Oviedo-Orta, E., A. Bermudez-Fajardo, *et al.* Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. Immunology, v.124, n.1, May, p.42-50. 2008.

Pagel, C. N., J. E. Morgan, *et al.* Thymic myoid cells as a source of cells for myoblast transfer. Cell Transplant, v.9, n.4, Jul-Aug, p.531-8. 2000.

Palming, J., B. G. Gabrielsson, *et al.* Plasma cells and Fc receptors in human adipose tissue--lipogenic and anti-inflammatory effects of immunoglobulins on adipocytes. Biochem Biophys Res Commun, v.343, n.1, Apr 28, p.43-8. 2006.

Parks, W. C., C. L. Wilson, *et al.* Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol, v.4, n.8, Aug, p.617-29. 2004.

Paul, W. E. Fundamental Immunology. 2003

Peault, B., M. Rudnicki, *et al.* Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. Mol Ther, v.15, n.5, May, p.867-77. 2007.

Pelosi, L., C. Giacinti, *et al.* Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. Faseb J, v.21, n.7, May, p.1393-402. 2007.

Peng, H. e J. Huard. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. Transpl Immunol, v.12, n.3-4, Apr, p.311-9. 2004.

Percival, J. M. e S. C. Froehner. Golgi complex organization in skeletal muscle: a role for Golgi-mediated glycosylation in muscular dystrophies? Traffic, v.8, n.3, Mar, p.184-94. 2007.

Pinho Mde, F., S. P. Hurtado, *et al.* Haemopoietic progenitors in the adult mouse omentum: permanent production of B lymphocytes and monocytes. Cell Tissue Res, v.319, n.1, Jan, p.91-102. 2005.

_____. Myelopoiesis in the omentum of normal mice and during abdominal inflammatory processes. Cell Tissue Res, v.308, n.1, Apr, p.87-96. 2002.

Polanczyk, M. J., B. D. Carson, *et al.* Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. J Immunol, v.173, n.4, Aug 15, p.2227-30. 2004.

Politano, L., G. Nigro, *et al.* Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. Acta Myol, v.22, n.1, May, p.15-21. 2003.

Prisk, V. e J. Huard. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. Histol Histopathol, v.18, n.4, Oct, p.1243-56. 2003.

Quarto, N. e M. T. Longaker. Differential expression of specific FGF ligands and receptor isoforms during osteogenic differentiation of mouse Adipose-derived Stem Cells (mASCs) recapitulates the in vivo osteogenic pattern. Gene, v.424, n.1-2, Nov 15, p.130-40. 2008.

Radley, H. G. e M. D. Grounds. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. Neurobiol Dis, v.23, n.2, Aug, p.387-97. 2006.

Ramos, C., M. Montano, *et al.* Acidic fibroblast growth factor decreases alpha-smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.291, n.5, Nov, p.L871-9. 2006.

Rangel-Moreno, J., J. E. Moyron-Quiroz, *et al.* Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. Immunity, v.30, n.5, May, p.731-43. 2009.

Rao, K. N. e M. A. Brown. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. Ann N Y Acad Sci, v.1143, Nov, p.83-104. 2008.

Relaix, F., D. Montarras, *et al.* Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. J Cell Biol, v.172, n.1, Jan 2, p.91-102. 2006.

Rescan, P. Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.130, n.1, Aug, p.1-12. 2001.

Revoltella, R. P. Natural and therapeutically-induced antibodies to cytokines. Biotherapy, v.10, n.4, p.321-31. 1998.

Roach, D. M., R. A. Fitridge, *et al.* 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, v.23, n.3, Mar, p.260-9. 2002.

Rodriguez, L. V., Z. Alfonso, *et al.* Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.32, Aug 8, p.12167-72. 2006.

Roma, J., F. Munell, *et al.* Evolution of pathological changes in the gastrocnemius of the mdx mice correlate with utrophin and beta-dystroglycan expression. Acta Neuropathol (Berl), v.108, n.5, Nov, p.443-52. 2004.

Rooney, J. E., J. V. Welser, *et al.* Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin. J Cell Sci, v.119, n.Pt 11, Jun 1, p.2185-95. 2006.

Sabourin, L. A. e M. A. Rudnicki. The molecular regulation of myogenesis. Clin Genet, v.57, n.1, Jan, p.16-25. 2000.

Safadi, R., E. Zigmond, *et al.* Amelioration of hepatic fibrosis via beta-glucosylceramide-mediated immune modulation is associated with altered CD8 and NKT lymphocyte distribution. Int Immunol, v.19, n.8, Aug, p.1021-9. 2007.

Salem, M. L., M. S. Hossain, *et al.* Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF-alpha and IFN-gamma. Int Arch Allergy Immunol, v.121, n.3, Mar, p.235-45. 2000.

Salem, M. L., G. Matsuzaki, *et al.* beta-estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction. Int Arch Allergy Immunol, v.121, n.2, Feb, p.161-9. 2000.

Salimena, M. C., J. Lagrota-Candido, *et al.* Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and regeneration of muscular tissue in mdx dystrophic mice. Histochem Cell Biol, v.122, n.5, Nov, p.435-44. 2004.

Sandler, N. G., M. M. Mentink-Kane, *et al.* Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. J Immunol, v.171, n.7, Oct 1, p.3655-67. 2003.

Schaffer, M. e A. Barbul. Lymphocyte function in wound healing and following injury. Br J Surg, v.85, n.4, Apr, p.444-60. 1998.

Scharenberg, C. W., M. A. Harkey, *et al.* The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. Blood, v.99, n.2, Jan 15, p.507-12. 2002.

Scott, W., J. Stevens, *et al.* Human skeletal muscle fiber type classifications. Phys Ther, v.81, n.11, Nov, p.1810-6. 2001.

Sheu, B. C., S. M. Hsu, *et al.* A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. Cancer Res, v.61, n.1, Jan 1, p.237-42. 2001.

Shi, X. e D. J. Garry. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. Genes Dev, v.20, n.13, Jul 1, p.1692-708. 2006.

Shi, Z., A. E. Wakil, *et al.* Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.20, Sep 30, p.10663-8. 1997.

Sicard, R. E. Differential inflammatory and immunological responses in tissue regeneration and repair. Ann N Y Acad Sci, v.961, Jun, p.368-71. 2002.

Sicinski, P., Y. Geng, *et al.* The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science, v.244, n.4912, Jun 30, p.1578-80. 1989.

Sime, P. J. e K. M. O'reilly. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. Clin Immunol, v.99, n.3, Jun, p.308-19. 2001.

Simonian, P. L., C. L. Roark, *et al.* Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. J Immunol, v.182, n.1, Jan 1, p.657-65. 2009.

Singh, A. K., K. P. Gudehithlu, *et al.* Transplanting fragments of diabetic pancreas into activated omentum gives rise to new insulin producing cells. Biochem Biophys Res Commun, v.355, n.1, Mar 30, p.258-62. 2007.

Singh, A. K., N. Pancholi, *et al.* Omentum facilitates liver regeneration. World J Gastroenterol, v.15, n.9, Mar 7, p.1057-64. 2009.

Singh, A. K., J. Patel, *et al.* Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. Cell Tissue Res, v.332, n.1, Apr, p.81-8. 2008.

Singh, H., J. M. Pongubala, *et al.* Gene regulatory networks that orchestrate the development of B lymphocyte precursors. Adv Exp Med Biol, v.596, p.57-62. 2007.

Siracusa, M. C., M. G. Overstreet, *et al.* 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. J Immunol, v.180, n.3, Feb 1, p.1423-31. 2008.

Skuk, D., J. T. Vilquin, *et al.* Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies. Curr Opin Neurol, v.15, n.5, Oct, p.563-9. 2002.

Smith, J. e P. N. Schofield. The effects of fibroblast growth factors in long-term primary culture of dystrophic (mdx) mouse muscle myoblasts. Exp Cell Res, v.210, n.1, Jan, p.86-93. 1994.

Spencer, M. J., E. Montecino-Rodriguez, *et al.* Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. Clin Immunol, v.98, n.2, Feb, p.235-43. 2001.

Spencer, M. J. e J. G. Tidball. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? Neuromuscul Disord, v.11, n.6-7, Sep, p.556-64. 2001.

Spencer, M. J., C. M. Walsh, *et al.* Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. J Clin Invest, v.99, n.11, Jun 1, p.2745-51. 1997.

St Pierre Schneider, B., L. A. Correia, *et al.* Sex differences in leukocyte invasion in injured murine skeletal muscle. Res Nurs Health, v.22, n.3, Jun, p.243-50. 1999.

Stahle-Backdahl, M., M. Inoue, *et al.* 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. J Clin Invest, v.93, n.5, May, p.2022-30. 1994.

Stockinger, B., M. Veldhoen, *et al.* Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. Semin Immunol, v.19, n.6, Dec, p.353-61. 2007.

Swain, M. G. Hepatic NKT cells: friend or foe? Clin Sci (Lond), v.114, n.7, Apr, p.457-66. 2008.

Talhok, R. S., J. R. Chin, *et al.* Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture. Development, v.112, n.2, Jun, p.439-49. 1991.

Taylor, J. A., Q. Zhu, *et al.* Null mutation in macrophage migration inhibitory factor prevents muscle cell loss and fibrosis in partial bladder outlet obstruction. Am J Physiol Renal Physiol, v.291, n.6, Dec, p.F1343-53. 2006.

Terabe, M. e J. A. Berzofsky. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. Trends Immunol, v.28, n.11, Nov, p.491-6. 2007.

_____. The role of NKT cells in tumor immunity. Adv Cancer Res, v.101, p.277-348. 2008.

Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.288, n.2, Feb, p.R345-53. 2005.

Tidball, J. G. e M. Wehling-Henricks. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. J Physiol, v.578, n.Pt 1, Jan 1, p.327-36. 2007a.

_____. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. J Appl Physiol, v.102, n.4, Apr, p.1677-86. 2007b.

Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.49, Dec 4, p.19446-51. 2007.

Tilg, H. e A. R. Moschen. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol, v.6, n.10, Oct, p.772-83. 2006.

Torrente, Y., G. Camirand, *et al.* Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. J Cell Biol, v.162, n.3, Aug 4, p.511-20. 2003.

Tortora, G. J. Corpo Humano (Fundamentos de Anatomia e Fisiologia) 2005

Tran, D. Q., H. Ramsey, *et al.* Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. Blood, v.110, n.8, Oct 15, p.2983-90. 2007.

Tsuchiya, A., T. Heike, *et al.* Long-term culture of postnatal mouse hepatic stem/progenitor cells and their relative developmental hierarchy. Stem Cells, v.25, n.4, Apr, p.895-902. 2007.

Tung, J. W. e L. A. Herzenberg. Unraveling B-1 progenitors. Curr Opin Immunol, v.19, n.2, Apr, p.150-5. 2007.

Turgeman, T., Y. Hagai, *et al.* Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. Neuromuscul Disord, v.18, n.11, Nov, p.857-68. 2008.

Vachon, P. H., F. Loechel, *et al.* Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. J Cell Biol, v.134, n.6, Sep, p.1483-97. 1996.

Vaday, G. G. e O. Lider. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. J Leukoc Biol, v.67, n.2, Feb, p.149-59. 2000.

Van Den Steen, P. E., A. Wuyts, *et al.* Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. Eur J Biochem, v.270, n.18, Sep, p.3739-49. 2003.

Van Marion, A. M., J. Thiele, *et al.* Morphology of the bone marrow after stem cell transplantation. Histopathology, v.48, n.4, Mar, p.329-42. 2006.

Vandenbark, A. A. e H. Offner. Critical evaluation of regulatory T cells in autoimmunity: are the most potent regulatory specificities being ignored? Immunology, v.125, n.1, Sep, p.1-13. 2008.

Vetrone, S. A., E. Montecino-Rodriguez, *et al.* Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. J Clin Invest, v.119, n.6, Jun, p.1583-94. 2009.

Vitiello, L., N. Bassi, *et al.* In vivo delivery of naked antisense oligos in aged mdx mice: analysis of dystrophin restoration in skeletal and cardiac muscle. Neuromuscul Disord, v.18, n.8, Aug, p.597-605. 2008.

Wadman, M. Scar prevention: the healing touch. Nature, v.436, n.7054, Aug 25, p.1079-80. 2005.

Wagner, K. R. Approaching a new age in Duchenne muscular dystrophy treatment. Neurotherapeutics, v.5, n.4, Oct, p.583-91. 2008.

Wagner, K. R., S. Hamed, *et al.* Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. Ann Neurol, v.49, n.6, Jun, p.706-11. 2001.

Wagner, K. R., N. Lechtzin, *et al.* Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. Biochim Biophys Acta, v.1772, n.2, Feb, p.229-37. 2007.

Wallace, G. Q. e E. M. McNally. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. Annu Rev Physiol, Sep 22. 2008.

Wallon, C., P. C. Yang, *et al.* Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. Gut, v.57, n.1, Jan, p.50-8. 2008.

Wang, H., Y. Zhang, *et al.* PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. FEBS Lett, v.581, n.16, Jun 26, p.3098-104. 2007.

Weber, K. T. A neuroendocrine-immune interface. The immunostimulatory state of aldosteronism. Herz, v.28, n.8, Dec, p.692-701. 2003.

Wehling-Henricks, M., S. Sokolow, *et al.* Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. Hum Mol Genet, v.17, n.15, Aug 1, p.2280-92. 2008.

Weller, K., K. Foitzik, *et al.* Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. Faseb J, v.20, n.13, Nov, p.2366-8. 2006.

- Witkowicz, J. Mesothelial cell transplantation. Pol Arch Med Wewn, v.118, n.5, May, p.307-13. 2008.
- Witte, M. B. e A. Barbul. Role of nitric oxide in wound repair. Am J Surg, v.183, n.4, Apr, p.406-12. 2002.
- Wong, S. H., K. N. Lowes, *et al.* Evaluation of Sca-1 and c-Kit as selective markers for muscle remodelling by nonhemopoietic bone marrow cells. Stem Cells, v.25, n.6, Jun, p.1364-74. 2007.
- Wynn, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nat Rev Immunol, v.4, n.8, Aug, p.583-94. 2004.
- Yamada, S. e I. Maruyama. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. Clin Chim Acta, v.375, n.1-2, Jan, p.36-42. 2007.
- Yan, Z., S. Choi, *et al.* Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. J Biol Chem, v.278, n.10, Mar 7, p.8826-36. 2003.
- Yang, A. H., S. W. Huang, *et al.* Leptin augments myofibroblastic conversion and fibrogenic activity of human peritoneal mesothelial cells: a functional implication for peritoneal fibrosis. Nephrol Dial Transplant, v.22, n.3, Mar, p.756-62. 2007.
- Zaitzu, M., S. Narita, *et al.* Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. Mol Immunol, v.44, n.8, Mar, p.1977-85. 2007.
- Zammit, P. S., T. A. Partridge, *et al.* The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. J Histochem Cytochem, v.54, n.11, Nov, p.1177-91. 2006.
- Zhang, J., K. H. Oh, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in peritoneal mesothelial cells undergoing transdifferentiation. Perit Dial Int, v.28, n.5, Sep-Oct, p.497-504. 2008.
- Zhang, X., H. M. Wang, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide. Placenta, v.25, n.4, Apr, p.243-52. 2004.
- Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol, v.6, n.4, Apr, p.295-307. 2006.

9. ANEXO

Artigo publicado pelo grupo na revista *Muscle and Nerve* que serviu de base para elaboração desta dissertação:

Título e autores:

PATTERN OF METALLOPROTEASE ACTIVITY AND MYOFIBER REGENERATION IN SKELETAL MUSCLES OF *mdx* MICE

CRISTIANE BANI, MSc,¹ JUSSARA LAGROTA-CANDIDO, PhD,² DOUGLAS FLORINDO PINHEIRO, BSc,¹ PAULO EMIÍLIO CORREA LEITE, MSc,¹ MARIA CRISTINA SALIMENA, MSc,² ANDREA HENRIQUES-PONS, PhD,³ and THEREZA QUIRICO-SANTOS, PhD¹

¹- Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

²- Departamento de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

³- Departamento de Ultraestrutura, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Resumo:

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são moléculas chave que regulam a formação, remodelagem e degradação de componentes de matriz extracelular, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. Os músculos esqueléticos do camundongo *mdx* apresentam padrões distintos de inflamação e regeneração, sugerindo que fatores inerentes ao microambiente influenciam as respostas dos músculos predominantemente compostos de fibras de contração rápida ou lenta. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de atividade de MMPs nos músculos gastrocnêmio, solear e diafragma e estabelecer uma correlação com a capacidade de regeneração nos estágios distintos da miopatia dos camundongos *mdx*. A presença de uma marcante mionecrose e inflamação se associou a um aumento de atividade de MMP-9 e produção de TNF- α (Fator de necrose tumoral-alfa), enquanto a regeneração muscular evidenciada pela expressão de N-CAM (molécula de adesão neural) e atividade de MMP-2 variou nos diferentes estágios da doença. O solear mostrou alta porcentagem de fibras em regeneração em estágio precoce da doença (2 semanas), no entanto elas apareceram no gastrocnêmio em 12 semanas e no diafragma em 24 semanas. A alta atividade da MMP-2 no diafragma em todas as fases da doença sugerem uma importante remodelagem tecidual, a qual provavelmente se relaciona com inflamação persistente. Os resultados sugerem que o microambiente de músculos esqueléticos distintos pode influenciar uma cinética distinta de atividade de MMPs, consequentemente favorecendo uma inflamação persistente e regeneração de miofibras em diferentes estágios da miopatia de camundongos *mdx*.

ABSTRACT: Matrix metalloproteases (MMPs) are key regulatory molecules in the formation, remodeling, and degradation of extracellular matrix components in both physiological and pathological processes. Skeletal muscles of *mdx* dystrophic mice show distinct patterns of inflammation and regeneration, suggesting that factors within the microenvironment influence the adaptive responses of muscles with predominantly slow-twitch or fast-twitch fibers. This study aimed to verify the pattern of MMP activity in gastrocnemius, soleus, and diaphragm muscles and correlate it with the regenerative capability at distinct stages of the *mdx* myopathy. Marked inflammation and myonecrosis was associated with increased MMP-9 activity and TNF- α (tumor necrosis factor- α) production, whereas muscle regeneration, evidenced by NCAM (neural cell adhesion molecule) expression and MMP-2 activity, varied at different stages of the disease. Soleus muscles showed a high percentage of NCAM-positive myofibers in the early stages (2 weeks) of the disease, but they appeared in the gastrocnemius muscles at 12 weeks and in the diaphragm at 24 weeks. Increased MMP-2 activity in the diaphragm throughout all stages of the disease suggests important tissue remodeling, which is probably associated with persistent inflammation. The results indicate that the microenvironment of distinct skeletal muscle may influence a particular kinetic pattern of MMP activity, which ultimately favors persistent inflammation and myofiber regeneration at different stages of the myopathy in *mdx* mice.

Muscle Nerve 37: 583–592, 2008

PATTERN OF METALLOPROTEASE ACTIVITY AND MYOFIBER REGENERATION IN SKELETAL MUSCLES OF *mdx* MICE

CRISTIANE BANI, MSc,¹ JUSSARA LAGROTA-CANDIDO, PhD,²
DOUGLAS FLORINDO PINHEIRO, BSc,¹ PAULO EMÍLIO CORREA LEITE, MSc,¹
MARIA CRISTINA SALIMENA, MSc,² ANDREA HENRIQUES-PONS, PhD,³
and THEREZA QUIRICO-SANTOS, PhD¹

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biology Federal Fluminense University, Niterói, RJ 24210-150, Brazil

² Department of Immunobiology, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

³ Department of Ultrastructure, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

Accepted 5 December 2007

Muscular dystrophy in the dystrophin-deficient *mdx* mouse, an animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD), is characterized by progressive muscle wasting, which is usually associated with reactive fibrosis and increased deposition of connective tissue.²² Dystrophin, a 427-kDa protein found in the inner sarcolemma as part of an inte-

gral protein complex, is important for membrane stability, flexibility, and force during contraction.¹¹ Lack of dystrophin results in a weakened cell membrane that renders muscle fibers fragile and susceptible to injury and necrosis.² The relationship between lack of dystrophin and muscle fiber pathology is still not understood. The disease varies markedly among different skeletal muscles of the *mdx* mouse. In contrast to the relatively mild pathology in limb muscles, the diaphragm presents extensive myonecrosis with progressive structural and functional deterioration similar to that in DMD.^{3,37} Such a difference may be partly attributed to diversity in muscle-fiber-type expression due to levels of metabolic enzymes and the pattern of contractile and regulatory protein isoforms in the myofibril (16, 41).

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; DMD, Duchenne muscular dystrophy; MMP, metalloprotease; NCAM, neural cell adhesion molecule; PBS, phosphate-buffered saline; PVDF, polyvinylidene fluoride; Sca, stem cell antigen; SP, side population; TACE, TNF- α -converting enzyme; TNF- α , tumor necrosis factor- α

Key words: metalloprotease; muscle regeneration; muscular dystrophy; myofiber type

Correspondence to: T. Quirico-Santos; e-mail: tquirico@vm.uff.br

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 20 February 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/mus.20970

Satellite cells are undifferentiated myogenic precursors involved in the maintenance of normal muscle function.²⁵ Following injury, muscle satellite cells become activated and start to proliferate in order to repair the damaged area.^{13,32} Muscle satellite cells sustain the process of muscular regeneration observed in *mdx* mice. However, repeated cycles of degeneration exhaust the regenerative capacity of satellite cells so much that contractile muscle tissue is replaced by collagenous connective tissue.⁸ Myogenic satellite cells reside beneath the basal lamina of adult skeletal muscles closely juxtaposed to skeletal muscle fibers and account for 2%–5% of sublamellar nuclei in adult muscle. Satellite cells express specific genes (M-cadherin, Pax7) and, following activation, give rise to a large number of daughter myoblasts in addition to repopulating the satellite cell pool.^{1,33} Recent studies, however, have suggested that additional stem/progenitor cell populations may be recruited to participate in muscle regeneration and form functional myotubes.³⁴ Muscle stem cells expressing the Sca-1 cell marker, located outside the basal lamina, possess the ability to differentiate into hematopoietic cells and have the potential to give rise, both in vitro and in vivo, to myogenic cells via a myocyte-mediated inductive interaction.^{1,10}

Extracellular matrix (ECM) components and matrix metalloproteases (MMPs) play an important role in the homeostasis and maintenance of myofiber functional integrity.⁴ MMPs influence cell motility, cell–cell–matrix interactions, matrix degradation, and the release of bioactive signaling molecules.⁴⁰ The ECM surrounding myofibers differs, with slow-twitch muscles of rats containing more collagen than fast-twitch muscles. Moreover, adaptive responses of muscles with predominantly slow-twitch fibers also differ from those of fast-twitch fibers and this may be reflected by changes in MMP gene expression and collagen metabolism.^{5,12} The aim of this study was to analyze the pattern of metalloprotease activity and regenerative capability of different skeletal muscles at distinct stages of *mdx* myopathy.

METHODS

Animals. The study protocol and handling of animals followed Brazilian institutional ethics guidelines for animal studies. The *mdx* dystrophic and age-matched C57BL/10J (C57) control non-dystrophic mice were maintained in animal housing at Fluminense Federal University. They were kept at constant temperature (20°C) with a light:dark cycle of 12:12 h and received acidified water and a com-

mercial rodent diet ad libitum. Male *mdx* mice were selected at ages 6, 12, 24, and 48 weeks.

Histochemistry. Gastrocnemius, soleus, and diaphragm muscles from *mdx* and control mice at different stages of development were excised and frozen in liquid nitrogen. Frozen sections (10 µm thick) were placed on poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, Missouri) pre-coated slides and allowed to dry at room temperature for 4 h before staining. Fast green–Sirius red staining was used to analyze total collagen expression.¹⁹ Myosin–ATPase fiber typing at pH 9.4 was performed according to the method of Round et al.²⁹

Immunohistochemistry. Cross-sections (5 µm) were mounted on poly-L-lysine pre-coated slides and blocked for endogenous peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min. Sections were then rinsed for 20 min in PBS and incubated for 20 min with diluted normal blocking goat serum (Vector, Burlingame, California). Regenerating myofibers were visualized using the optimal concentration of monoclonal rat IgG anti-CD56 (Clone 12F11; BD-Pharmingen Biosciences, San Diego, California). Anti-CD56 recognizes the neural cell adhesion molecule (NCAM), a glycoprotein expressed during the early stages of myogenesis and in satellite cells. Stem cells were visualized using the optimal dilution of a monoclonal rat IgG-specific anti-Sca-1 (Clone E13-161.7; BD-Pharmingen Biosciences, San Diego, California). Sections were then incubated in a moist chamber for 60 min at room temperature with specific primary antibody diluted in PBS with 1% bovine serum albumin fraction V (Sigma, St. Louis, Missouri). Slides were washed in PBS for 15 min and incubated for 40 min with peroxidase anti-rat secondary antibody (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama). Peroxidase activity was revealed with aminoethylcarbazole (Sigma, St. Louis, Missouri) in the presence of H₂O₂. Sections were then rinsed and counterstained with Mayer's hematoxylin. Myonuclei stained blue and cells brown.

Morphometric Analysis. Images from entire cross-sections of muscles from at least five mice at each time-point were acquired with a microdigital camera mounted on an Axioplan microscope (Zeiss; Oberkochen, Germany). For quantification of NCAM⁺ cells, 400 myofibers were counted from two individual sections (at least 200 myofibers per section) and results expressed as the percentage of

positive cells. The number of Sca-1⁺ cells/mm² in the lesion area was determined by image-analysis software (Scion Image; National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

Tissue Extract Preparation. Muscles from *mdx* and control muscles were immediately frozen and preserved in liquid nitrogen (−165°C). Muscles were weighed and homogenized (1/10 w/v) in extraction buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7.6), 200 mM NaCl, 100 mM CaCl₂, and 1% Triton X-100] at 4°C. After centrifugation (15,000 g, 10°C, 10 min), the protein concentration in supernatant aliquots was determined by the method of Lowry et al.,²⁴ and equal amounts of total protein loaded for zymography (60 µg/lane).

Gelatin Zymography. Zymogram gels consisted of 7.5% (w/v) polyacrylamide impregnated with 2 mg/ml type A gelatin from porcine skin (Sigma, St. Louis, Missouri) and 5% (w/v) polyacrylamide for stacking gels. Gels were further washed twice for 30 min in 2.5% Triton X-100 solution at room temperature, then incubated at 37°C for 24 h in substrate buffer [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), with CaCl₂ 5 mM and ZnCl₂ 1 µM]. Thereafter, gels were stained with 30% methanol/10% acetic acid containing 0.5% (w/v) brilliant blue R-250. Gelatinase activity was visualized as unstained bands on a blue background, representing areas of proteolysis of the substrate protein.

Metalloproteinases are secreted in a latent form and require cleavage of amino-terminal peptide for activation. The exposure of pro-enzymes of the tissue extracts to sodium dodecylsulfate during the gel separation procedure leads to activation without proteolytic cleavage.³⁸ Four bands can easily be seen corresponding to 100 kDa (MMP-9), 66 kDa (pre-pro MMP-2), 60 kDa (pro MMP-2), and 55 kDa (active MMP-2).²¹ Semi-quantitative analysis was performed using image-analysis software (Scion Image; NIH, Bethesda, Maryland).

Western Blot. For the western blot assay, *mdx* and control C57 skeletal muscles were homogenized in a protease inhibitor solution (Sigma, St. Louis, Missouri) and protein concentrations determined by the Bradford method. After establishing the same concentration of proteins for all samples, a 3× sample buffer, pH 6.8 (0.173 M Tris, 30% glycerol, 3% sodium dodecylsulfate S, 3% β-mercaptoethanol, and 1 mg bromophenol blue), was added, and samples denatured by boiling for 5 min.

Protein (20 µg per well) was loaded on 12.5% polyacrylamide gel for detection of tumor necrosis factor-α (TNF-α). Samples were electrophoresed at 90 V for 120 min (Power Pac 200; Bio-Rad, Hercules, California). The separated proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Hybond-P; Amersham Biosciences, Fairfield, Connecticut) and further blocked with 5% non-fat dry milk, 1% bovine serum albumin, and 1% normal goat serum (Sigma, St. Louis, Missouri) in Tris-buffered saline 0.05% Tween-20 (TBST), pH 7.4, for 2 h at room temperature on a rocking platform. Membranes were then incubated with anti-TNF-α polyclonal antibody (Sigma) in TBST at 4°C overnight. After washing three times for 10 min with TBST, blots were incubated with goat anti-rat peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma, St. Louis, Missouri) at 1:10,000 dilution for 2 h at room temperature. Finally, membranes were washed in TBST. Bands were identified using ECL Plus (Amersham Biosciences, Fairfield, Connecticut) for chemiluminescence detection and subsequent film exposure for 5 min. The presence of TNF-α protein was verified by comparing protein bands to the Molecular Rainbow Weight Marker (Amersham Biosciences, Fairfield, Connecticut). As negative controls, samples were incubated without primary antibodies. Equal loading of protein was assessed on stripped blots by immunodetection of actin with a horseradish peroxidase-conjugated goat polyclonal antibody diluted at 1:1500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California).

Statistical Analysis. Excel software (Microsoft, Seattle, Washington) was used to calculate means and standard deviations. Unpaired Student's *t*-test was applied to assess the level of statistical significance.

RESULTS

Histological Alterations in *mdx* Skeletal Muscles.

Compared with gastrocnemius and diaphragm, soleus skeletal muscle of *mdx* mice showed limited inflammation and necrosis at all stages of disease. Gastrocnemius muscles of *mdx* mice at 6 weeks showed scattered foci of intense inflammatory infiltrate, whereas regenerating myofibers predominated at 12 weeks. In contrast, intense inflammatory infiltrates were observed consistently in the diaphragm of *mdx* mice at 6 and 12 weeks (Fig. 1). Collagen deposition, evidenced by Sirius red stain, was often associated with areas of inflammation and nearby regenerating myoblasts in all muscles.

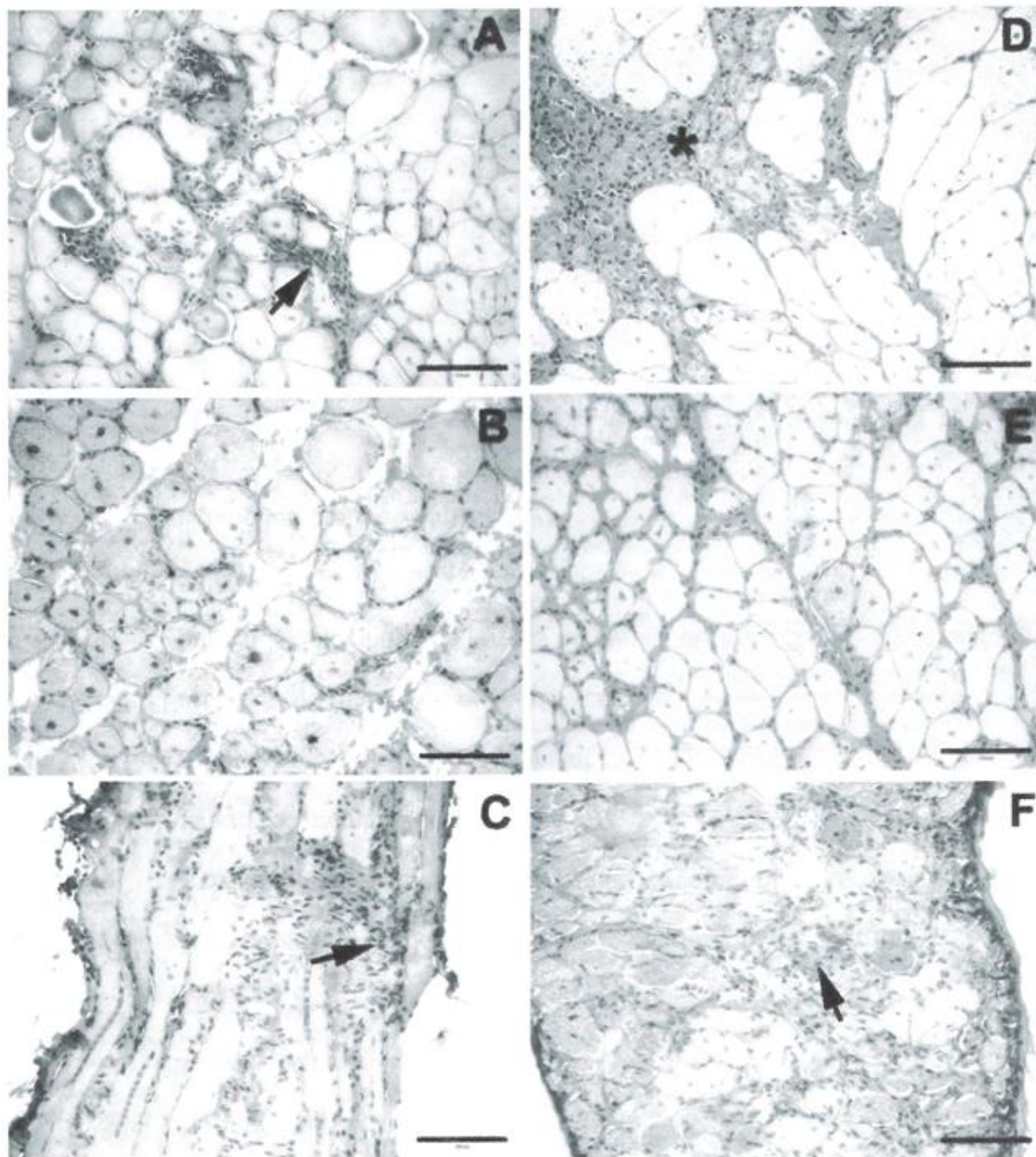


FIGURE 1. Histological analysis of Sirius red-stained cross-sections of gastrocnemius (A, D), soleus (B, E), and diaphragm (C, F) muscles from *mdx* dystrophic mice at 6 (A–C) and 12 (D–F) weeks. Numerous regenerating fibers with centrally located nuclei and basophilic cytoplasm (asterisk) were evident in *mdx* gastrocnemius at 12 weeks, and inflammatory foci (arrow) were evident in diaphragm at 6 and 12 weeks. Bar = 100 μ m.

Muscle-Fiber-Type Quantification. The *mdx* mice showed a distinct muscle-fiber-type expression that varied among skeletal muscles and depended on the stage of the disease. Gastrocnemius muscles of *mdx*

mice had a high percentage of type IIA fibers at most ages (2 weeks: $100 \pm 0\%$; 6 weeks: $100 \pm 0\%$; 24 weeks: $94.7 \pm 4.2\%$; 48 weeks: $95.1 \pm 2.6\%$) compared to age-matched controls, with a slight reduc-

tion at 12 weeks ($76.9 \pm 14.17\%$). At 2 weeks, C57 and *mdx* mice showed a similar pattern of type IIA fibers in the soleus (C57: $31.8 \pm 4.5\%$; *mdx*: $27.6 \pm 0.27\%$) and diaphragm (C57: $35.6 \pm 2.7\%$; *mdx*: $30.0 \pm 5.5\%$) muscles. However, a marked increase in type IIA fibers was observed at 6 weeks (soleus: $100 \pm 0\%$; diaphragm: $86.5 \pm 7.1\%$) in relation to C57 (soleus: $31.8 \pm 4.5\%$; diaphragm: $35.6 \pm 2.7\%$). Despite the muscle analyzed, clusters of type IIB myofibers predominated, especially in areas with regenerating myofibers. High percentages ($P < 0.0001$) of type IIB fibers were observed in the soleus ($70.3 \pm 0.5\%$) and diaphragm ($55.2 \pm 15.8\%$) of *mdx* mice at 2 weeks. At the height of myonecrosis (6 weeks), type IIB myofibers were not observed in any muscle of *mdx* mice, but at 12 weeks gastrocnemius muscles ($23.1 \pm 14.2\%$) showed a higher percentage than soleus ($8.16 \pm 4.9\%$) and diaphragm ($6.8 \pm 2.4\%$). Yet, only *mdx* diaphragm muscles presented type IIB fibers at ages corresponding to fibrosis (24 weeks: $68.8 \pm 3.1\%$; 48 weeks: $46.2 \pm 14.6\%$).

Detection of Regenerating Muscle Fibers. Regenerating fibers were identified by both central nucleation and expression of NCAM, which is associated with initiation of muscle precursor cell fusion.^{15,42} In a previous study, adult skeletal muscles of C57 mice showed few NCAM⁺ cells,³¹ whereas numerous niches of NCAM⁺ cells with morphology of regenerating myoblasts were observed in skeletal muscles of our *mdx* mice (Fig. 2). Morphometric analysis showed a distinct pattern of NCAM expression that varied in different muscles and at distinct ages of *mdx* mice (Fig. 3). A high percentage of NCAM⁺ was evident in the soleus at 2 weeks, with a consistent decline until 24 weeks. Gastrocnemius muscle showed increased numbers of NCAM⁺ cells at 6 and 12 weeks, but low numbers thereafter until 48 weeks. Regeneration in the diaphragm of *mdx* mice was evident after 12 weeks, with the highest percentage at 24 weeks, but low numbers thereafter.

Analysis of Sca-1⁺ Cells in Skeletal Muscle. Positive cells present at nearby vessels were not included in the analysis. Adult C57 mice showed similar numbers of Sca-1⁺ cells in the diaphragm, gastrocnemius, and soleus (Fig. 4), but at 2 weeks they presented uncountable numbers scattered among normal myofibers.

The *mdx* mice presented groups of Sca-1⁺ cells mainly associated with the inflammatory infiltrate and nearby myonecrosis in the gastrocnemius and soleus muscles. Moreover, in the diaphragm (Fig. 2), Sca-1⁺ cells were distributed throughout the muscle.

Morphometric analysis showed a characteristic pattern of Sca-1⁺ cell distribution at different ages and muscles of *mdx* mice (Fig. 4).

Regardless the stage of the disease, *mdx* soleus muscles showed fewer Sca-1⁺ cells than any other muscle. At 6 weeks, *mdx* diaphragm presented higher numbers of Sca-1⁺ cells per inflamed area than soleus and gastrocnemius. At 12 weeks, gastrocnemius and diaphragm showed countless Sca-1⁺ cells per area (Fig. 2A, C). Later, at the age (24 weeks) corresponding to the period of fibrosis,²³ few Sca-1⁺ cells were observed in the gastrocnemius and soleus muscles, but none could be detected in the diaphragm.

Western Blot of TNF- α in Skeletal Muscles. In order to analyze ongoing inflammation in distinct muscle at various phases of *mdx* muscular dystrophy we carried out western blots with an anti-TNF- α antibody that identifies the 27-kDa membrane domain corresponding to the non-cleavage form.

Adult C57 mice showed similar expression of membrane TNF- α at 8 and 24 weeks (Fig. 5), but at 2 weeks there was a marked ($P < 0.05$) decrease of membrane TNF- α in the gastrocnemius (47%) and diaphragm (87%).

C57 and *mdx* mice had a similar TNF- α membrane content in gastrocnemius and diaphragm muscles at 2 weeks. At 8 weeks, *mdx* mice showed a marked decrease in TNF- α content in the gastrocnemius and diaphragm, but at 24 weeks *mdx* diaphragm showed an increased amount of the 27-kDa non-cleavage form as compared with findings at 8 weeks. The difference between *mdx* and C57 control mice was still significant at 24 weeks. Further experiments (data not shown) showed increased content of the 17-kDa domain corresponding to the soluble form released after proteolytic cleavage in *mdx* gastrocnemius muscle at 8 and 24 weeks.

Metalloprotease Activity in *mdx* Skeletal Muscles. In order to determine whether the regenerative capability of distinct skeletal muscle correlated with increased MMP activity, we carried out gelatin zymography. Skeletal muscles from C57 mice showed (Fig. 6A) active MMP-2 (gastrocnemius: 1300; diaphragm: 3600) and MMP-9 (gastrocnemius: 1392; diaphragm: 3002) only at 2 weeks of age. In contrast, *mdx* mice presented levels of MMPs that varied with age, phase of the disease, and skeletal muscle. Zymograms revealed high levels of active MMP-2 in the gastrocnemius, soleus, and diaphragm muscles of *mdx* mice at 2 weeks,

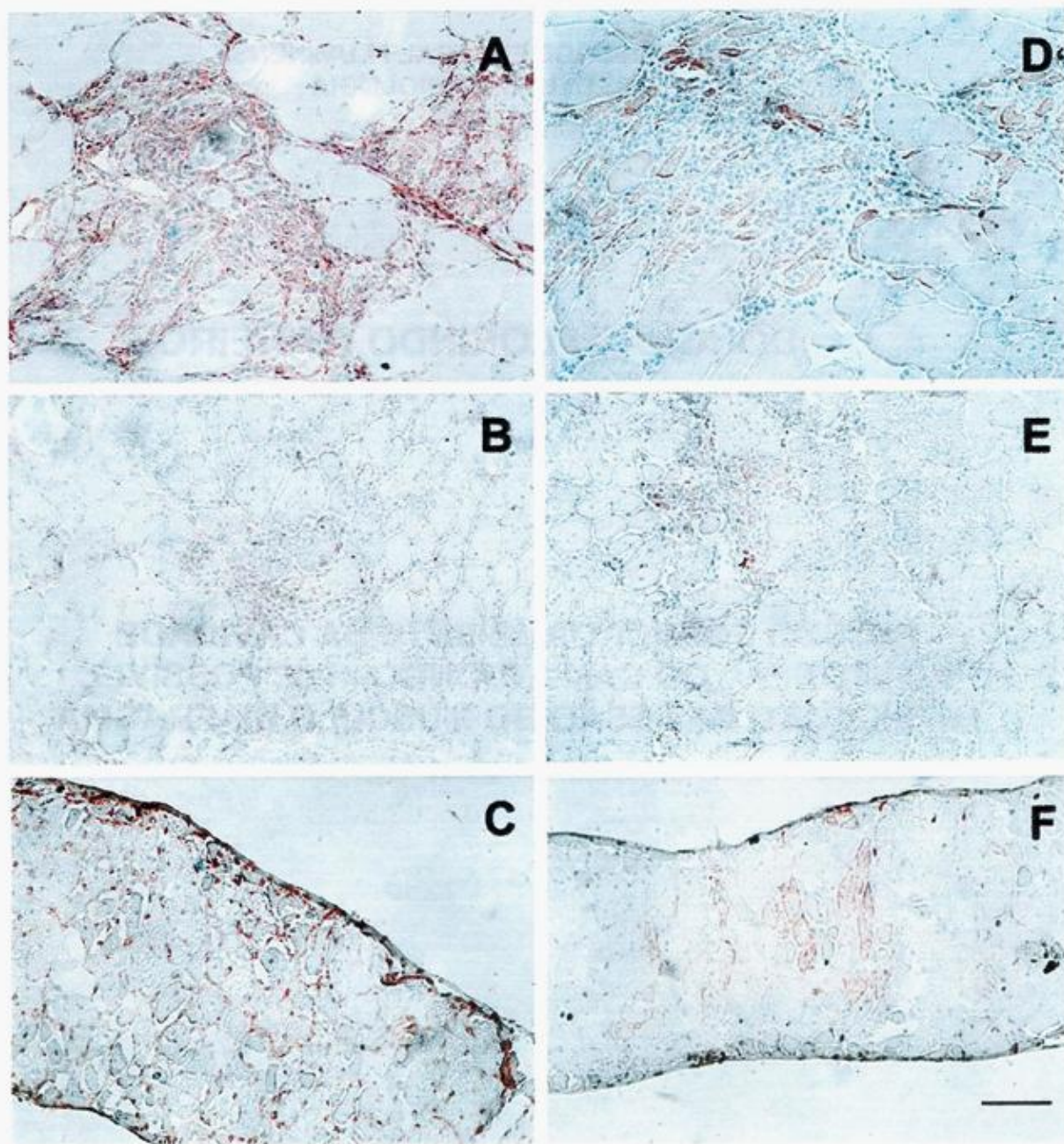


FIGURE 2. Presence of Sca-1 and NCAM⁺ cells in cross-sections of *mdx* muscles. Immunolabeling for Sca-1 (A–C) and NCAM (D–F) in gastrocnemius (A, D), soleus (B, E), and diaphragm (C, F) muscles at 12 weeks of age. Bar = 100 μ m.

but a marked decrease of active MMP-2 in older *mdx* muscles (Fig. 6C). Diaphragm had increased MMP-2 activity at 8 and 24 weeks. MMP-9 activity in *mdx* muscles was low at 2 weeks but a sharp increase was observed at 8 weeks, followed by a decrease at 24 weeks in all muscles (Fig. 6B).

DISCUSSION

There is considerable variation in the extent of collagen metabolism and histopathology of different skeletal muscles in the *mdx* mouse.¹² Our data suggest that such features cannot be attributed entirely to fiber-type proportions and may be related in part

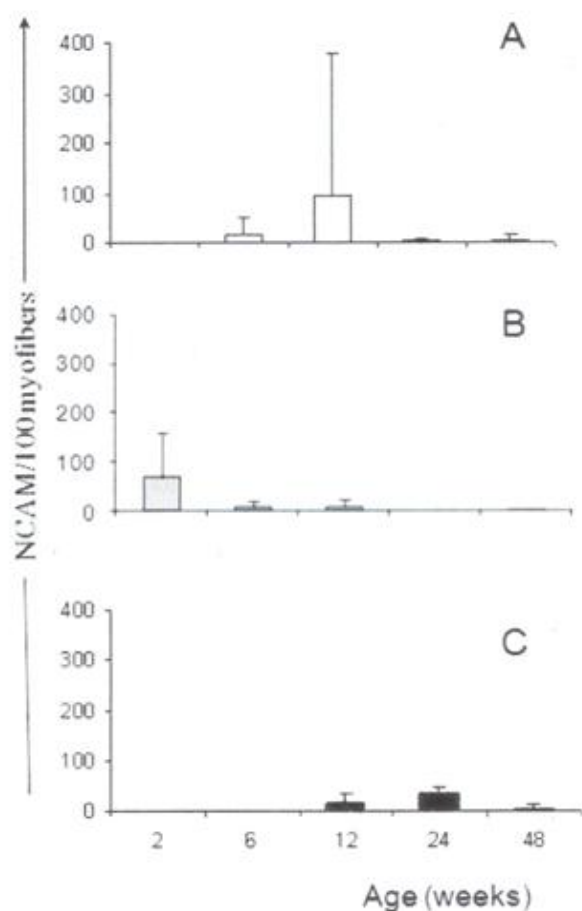


FIGURE 3. Quantitative image analysis of NCAM⁺ cells in *mdx* muscles. Results are expressed as mean ($\pm$ SD) of percentage of NCAM⁺ cells in gastrocnemius (A), soleus (B), and diaphragm (C). The analysis was based on three animals per group.

to characteristic properties of the muscle-fiber microenvironment. The ability to generate force and mechanical power, the time course of contractile response, and resistance to fatigue differ markedly among myofibers. As reported previously,^{3,9,14,28} *mdx* gastrocnemius and diaphragm muscles exhibit substantial inflammatory response and fibrosis during the entire lifespan, whereas soleus muscle is not as greatly affected by the disease. Despite different fiber composition, regeneration as evidenced by NCAM expression was present at different periods of the disease in all three muscles. Such results support data showing that satellite cell frequency is not influenced by fiber-type composition.²⁰ Expression of NCAM is important for interactions of muscle cells during myogenesis and regeneration.³⁰ Soleus muscles had a high percentage of NCAM⁺ cells during early stages of the disease (2 and 6 weeks), whereas

gastrocnemius muscles had it at 12 weeks and diaphragm at 24 weeks. Regeneration always correlated with an increased percentage of type IIB myofiber expression in all muscles.

Although differentiated skeletal muscle fibers are post-mitotic, they still have a remarkable capacity for regeneration, largely derived from quiescent satellite cells located under the basal lamina.⁶ Other stem cells also have the ability to convert into myogenic lineage and contribute to muscle regeneration.⁴³ Side population (SP) cells, present in most adult muscles, have a distinct molecular phenotype (Sca-1⁺) and participate in muscle regeneration follow-

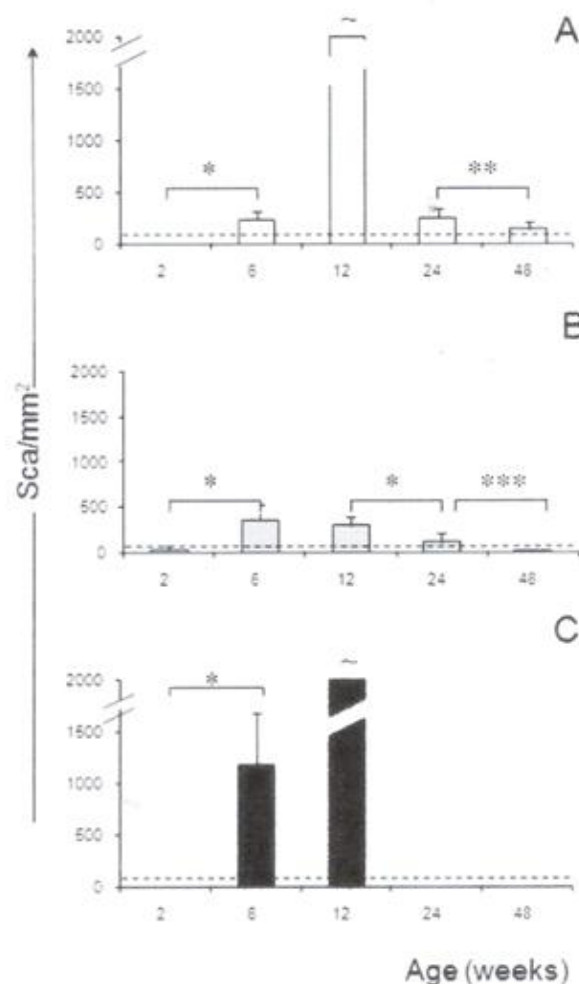


FIGURE 4. Quantitative image analysis of Sca-1-positive cells in *mdx* skeletal muscles at different ages. Results are expressed as mean ($\pm$ SD) of positive cells per mm² in the lesion area with monoclonal anti-Sca-1 in gastrocnemius (A), soleus (B), and diaphragm (C). The analysis was based on three animals per group. * $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.03$; ~countless positive cells.

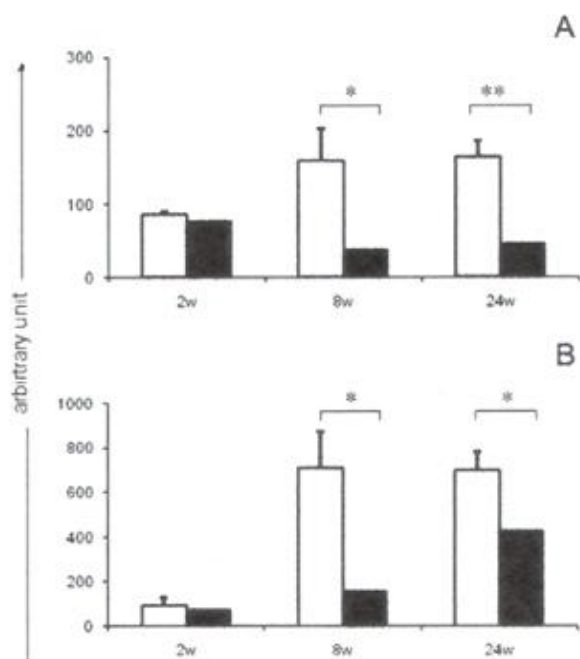


FIGURE 5. Presence of 27-kDa TNF- α in *mdx* skeletal muscles at different ages. Results are expressed as mean ($\pm$ SD) in gastrocnemius (A) and diaphragm (B) of three animals per group. Open bars: C57BL/10; filled bars: *mdx* mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$.

ing injury.^{1,26} In the present work, we showed a marked increase of Sca-1⁺ cells within areas of inflammation and muscular regeneration, mainly in *mdx* gastrocnemius and diaphragm muscles.

Recent evidence from a *p55*^{-/-}*p75*^{-/-} TNF-receptor double-knockout model indicates that TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK intracellular signaling.⁷ TNF- α is described as a soluble pro-inflammatory cytokine, which, depending on the type and developmental stage of target cells, induces activation, proliferation, differentiation, or apoptosis.³⁹ The protein exists as a 27-kDa membrane-bound precursor that can be processed by a TNF- α -converting enzyme (TACE) and MMP to generate 17-kDa, mature TNF- α .^{21,27} The *mdx* diaphragm and gastrocnemius muscles showed decreased membrane TNF- α , suggesting intense inflammation and the release of soluble TNF- α pro-inflammatory cytokine at 8 and 24 weeks. The similar content of 27-kDa TNF- α at 2 weeks in both *mdx* and C57 support data showing that this cytokine plays an important role in skeletal muscle growth.

Skeletal muscle ECM needs to adapt continually to changing environmental demands. During skeletal muscle degeneration and regeneration, ECM re-

modeling suggests a tight regulation of matrix-degrading activity of MMPs and tissue inhibitors.⁴ MMP-9, produced mainly by inflammatory and activated satellite cells, influences stem-cell migration and homing of SP cells, especially on inflamed L-selectin-positive vessels of *mdx* muscles.^{21,36}

High MMP-9 activity, concomitant with increased numbers of Sca-1⁺ cells and TNF- α cleaved form in different muscles of *mdx* mice in the regeneration phase indicates an important role for MMPs in tissue remodeling. In this context, it is conceivable that MMPs favor migration and activation of myogenic precursors. The increased MMP-2 activity often associated with numerous NCAM⁺ cells in *mdx* diaphragm at 8 and 24 weeks also indicates a role in

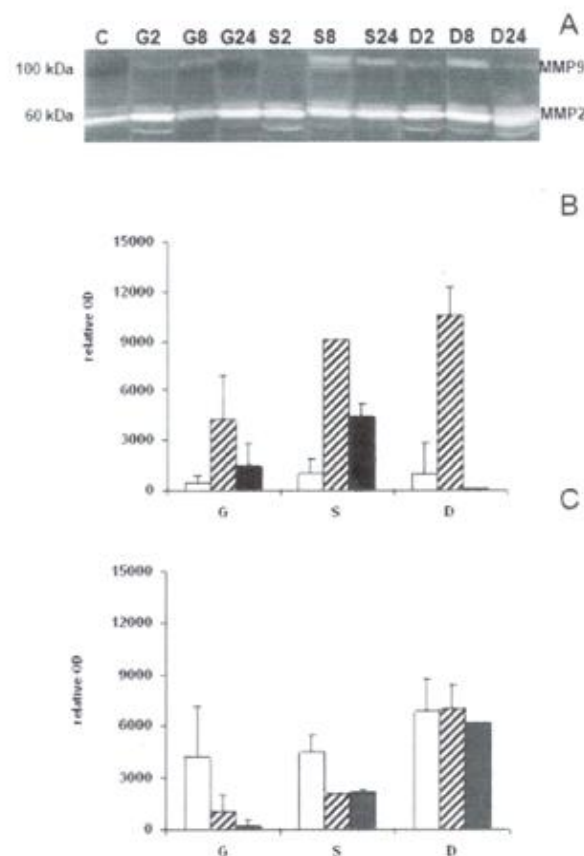


FIGURE 6. Expression of MMP-9 and active MMP-2 in *mdx* skeletal muscles. (A) Illustrative zymogram. Gastrocnemius (G), soleus (S), and diaphragm (D) at 2, 8, and 24 weeks. (C) Control C57BL/10 gastrocnemius muscle. Clear area refers to protein lyse bands on a blue background. (B) Semi-quantitative analysis of MMP-9 (B) and MMP-2 (C) activities were quantified by Scion software. Results are expressed as mean ($\pm$ SD). Open columns: 2 weeks; cross-hatched columns: 8 weeks; filled columns: 24 weeks.

myofiber regeneration.²¹ During normal muscle growth and myoblast fusion, MMP-2 is considered important for degradation of type IV collagen and other basement membrane components such as entactin.³⁵ MMPs are responsible for the processing of β -DG₄₃ into β -DG₃₀ (β -dystroglycan), which leads to the disruption of the α -DG/ β -DG interaction.¹⁷ Indeed, our data support the recent suggestion that increased MMP-2 activity may also reflect the extent of pathological injury in *mdx* muscles, especially in the diaphragm. Taken together, the findings suggest that the microenvironment of different skeletal muscles may influence a particular kinetic pattern of MMP activity, which ultimately favors persistent inflammation, membrane fragility, or myofiber regeneration at different stages of the dystrophic pathology.

This study was supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro). The authors thank Marcella d'Alincourt Salazar (Health Science Campus, University of Toledo, Toledo, Ohio) and Rosângela Lawrence (Washenaw Community College, Ann Arbor, Michigan) for English revision of the manuscript.

REFERENCES

- Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;159:123–134.
- Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Khurana TS. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *J Mol Med* 2004;82:102–115.
- Boland B, Himpen B, Deneff JF, Gillis JM. Site-dependent pathological differences in smooth muscles and skeletal muscles of the adult *mdx* mouse. *Muscle Nerve* 1995;18:649–657.
- Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004;29:191–197.
- Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol* 2005;90:613–619.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209–238.
- Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1660–C1671.
- Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol* 2003;84:165–172.
- Connolly AM, Keeling RM, Mehta S, Pestronk A, Sanes JR. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin α 2-deficient mice. *Neuromuscul Dis* 2001;11:703–712.
- Dellavalle A, Sampaioles M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:255–267.
- Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 2002;115:2801–2803.
- Gosselin LE, Williams JE, Personius K, Farkas GA. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (*mdx*) mice: impact of pirfenidone. *Muscle Nerve* 2007;35:208–216.
- Grounds MD. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann NY Acad Sci* 1998;854:78–91.
- Haslett JN, Kang PB, Han M, Kho AT, Sanoudou D, Volinski JM, et al. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. *Mamm Genome* 2005;16:739–748.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001;91:534–551.
- Hitomi Y, Kizaki T, Watanabe S, Matsumura G, Fujioka Y, Haga S, et al. Seven skeletal muscles rich in slow muscle fibers may function to sustain neutral position in the rodent hindlimb. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2005;140:45–50.
- Hnia K, Hugon G, Rivier F, Masmoudi A, Mercier J, Mornet D. Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophin-deficient *Mdx* mice. *Am J Pathol* 2007;170:633–643.
- Ibebunjo C. Type, diameter and distribution of fibres in some respiratory and abdominal muscles of the goat. *Vet Res Commun* 1993;17:171–182.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–455.
- Kadi F, Charifi N, Henriksson J. The number of satellite cells in slow and fast fibres from human vastus lateralis muscle. *Histochem Cell Biol* 2006;126:83–87.
- Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdier-Sahuque M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and *mdx* muscles. *Dev Biol* 1999;205:158–170.
- Lagrotta-Candido J, Canella I, Savino W, Quirico-Santos T. Expression of extracellular matrix ligands and receptors in the muscular tissue and draining lymph nodes of *mdx* dystrophic mice. *Clin Immunol* 1999;93:143–151.
- Lagrotta-Candido J, Vasconcellos R, Cavalcanti M, Bozza M, Savino WQ, Quirico-Santos T. Resolution of skeletal muscle inflammation in *mdx* dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon- γ production. *Int J Exp Pathol* 2002;83:121–132.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:493–495.
- Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, et al. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells* 2004;22:1305–1320.
- Mullberg J, Althoff K, Jostock T, Rose-John S. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:27–38.
- Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Feuerman J, Cheng G, et al. Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (*mdx*) mouse diaphragm identifies conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2004;13:257–269.
- Round JM, Matthews Y, Jones DA. A quick, simple and reliable histochemical method for ATPase in human muscle preparations. *Histochem J* 1980;12:707–710.
- Salarieh A, Soler AP, Axiotis CA. Overexpression of neural cell adhesion molecule in regenerative muscle fibers in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor-induced rhabdomyolysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:234–239.
- Salimena MC, Lagrotta-Candido J, Quirico-Santos T. Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and

- regeneration of muscular tissue in mdx dystrophic mice. *Histochem Cell Biol* 2004;122:435–444.
32. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000;218:115–124.
 33. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000;102:777–786.
 34. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 2006;20:1692–1708.
 35. Sires UI, Griffin GL, Broekelmann TJ, Mecham RP, Murphy G, Chung AE, et al. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 1993;268:2069–2074.
 36. Stahle-Backdahl M, Inoue M, Guidice GJ, Parks WC. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994;93:2022–2030.
 37. Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panetier RA, Petrof B, et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1991;352:536–539.
 38. Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992;118:1271–1282.
 39. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 2007;117:289–296.
 40. VanSaun MN, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006;78:69–79.
 41. Wang LC, Kernell D. Fibre type regionalisation in lower hind-limb muscles of rabbit, rat and mouse: a comparative study. *J Anat* 2001;199:631–643.
 42. Warren GL, Hulderman T, Mishra D, Gao X, Millecchia L, O'Farrell L, et al. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB J* 2005;19:413–415.
 43. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 2006;54:1177–1191.

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](#)