

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**Estudo fenotípico da infiltração inflamatória e do microambiente muscular esquelético e cardíaco na fisiopatologia da lesão de camundongos *mdx/mdx* com distrofia muscular do tipo Duchenne**

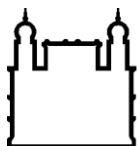
**Cristiane Bani Corrêa**

**Rio de Janeiro  
Setembro de 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Cristiane Bani Corrêa*

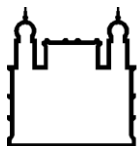
**Estudo fenotípico da infiltração inflamatória e do microambiente muscular esquelético e cardíaco na fisiopatologia da lesão de camundongos mdx com distrofia muscular do tipo Duchenne**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientadora:** Dra. Andrea Henriques Pons

**RIO DE JANEIRO**

Setembro de 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Cristiane Bani Corrêa**

**Estudo fenotípico da infiltração inflamatória e do microambiente muscular esquelético e cardíaco na fisiopatologia da lesão de camundongos mdx com distrofia muscular do tipo Duchenne**

**ORIENTADORA: Dra. Andrea Henriques Pons**

**Aprovada em: 17/09/2009**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Vinícius Cotta de Almeida  
**Prof. Dr.** Jussara Machado Lagrota Candido  
**Prof. Dr.** Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni  
**Prof. Dr.** Katia da Silva Calabrese

Rio de Janeiro, 17 de setembro de 2009

*"Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis."*  
**Bertolt Brecht.**

**Dedico essa tese**

A minha linda filha Isabel, por existir, por tornar a minha vida mais doce, por ter sido tranqüila enquanto mamãe escrevia a tese. Amor da minha vida!



## **Agradecimentos**

A Deus por ter me dado tudo que tenho, por ter me dado forças para realizar este trabalho, e pelo seu amor.

A minha orientadora Andréa Henriques por ter me aceitado como sua aluna de doutorado, por ter acreditado no meu trabalho, por toda paciência e toda dedicação na minha formação. Obrigada por todos os sábados, domingos e horas extras no laboratório que você dedicou visando o aperfeiçoamento da minha carreira científica. Obrigada pela orientação de cada resumo de congressos, projetos, relatórios e trabalho de bancada ao longo desses quatro anos. Quando eu crescer que ser igual a você! Te adoro!

Ao meu querido esposo Delcio que me apoair, me aturar, me ensinar, me incentivar, enfim, por ser a pessoa mais maravilhosa desse mundo! Te amo!

A minha querida mãe que sempre trabalhou muito para que eu pudesse hoje estar aqui. Que me apoiou e me ensinou a ser o que sou. Obrigada mãe por toda luta, todo sacrifício! Amo você!

Ao meu querido pai por todo esforço e dedicação na minha criação. Por ter sido um exemplo para mim. Te amo!

A minha sogra Fátima, por ter se mostrado uma verdadeira mãe, por ter tomado conta da Bebel enquanto eu escrevia minha tese, pelos valiosos conselhos e pela força. Te amo sogrinha!

A minha amada irmã Cristina que ao passar a fase de nossa adolescência se tornou a minha melhor amiga. Por ter passado suas férias cuidando da sua sobrinha enquanto eu me dedicava neste trabalho. Obrigada por tudo de bom que trouxe a minha vida. Te amo demais!

As minhas irmãs Crizeli e Crislaine, por estarem comigo em momentos maravilhosos e em momentos difíceis. Sempre estiveram comigo! Amo vocês!

A amiga Cynthia que esteve comigo em todo o meu doutorado, rindo, chorando e trabalhando é claro! A dupla dinâmica sempre vai existir amiga! Espero trabalhar com você ainda por muito tempo!

A amiga e aluna Aline por toda ajuda na realização dos experimentos, pela amizade, pelo apoio. Uma ótima aluna!

Ao amigo Marcelo Meuser, pela colaboração na bancada, por todo incentivo e companheirismo.

A todos do antigo DUBC por proporcionar um ambiente muito agradável e divertido de trabalho.

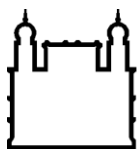
A todos os amigos do LBC e LITEB por todo esse tempo de convivência agradável, pela amizade e alegria de todos vocês.

A Dra Tereza Quirico que me apresentou a Distrofia Muscular, que acreditou e investiu na minha formação. Obrigada por ter me orientado no mestrado e por toda orientação durante o doutorado. Você é um exemplo para mim!

Dra Jussara Lagrota pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho e pelas colaborações.

Aos meus queridos amigos da UFF pela ajuda durante o mestrado e pelo carinho e amizade que temos até hoje.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

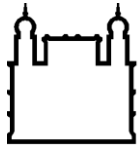
Fundação Oswaldo Cruz

## RESUMO

### TESE DE DOUTORADO

**Cristiane Bani Corrêa**

A distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD) é uma miopatia inflamatória fatal ligada ao cromossomo X causada pela não expressão ou expressão truncada da distrofina em células musculares esqueléticas e outros tipos celulares. Os primeiros sinais de deficiência motora aparecem logo na primeira infância e a morte dos pacientes é em torno da segunda década de vida por insuficiência cardiorespiratória. O camundongo *mdx/mdx*, um modelo da DMD, mostra, assim como humanos, padrões distintos de inflamação, regeneração e fibrose entre os músculos esqueléticos e o cardíaco por razões ainda pouco conhecidas. Assim, buscamos avaliar as alterações na infiltração inflamatória por células mielóides e linfóides, migração de células progenitoras e os microambientes esquelético e cardíaco como um todo, tentando relacionar com a progressão da doença em camundongos *mdx/mdx*. A infiltração inflamatória em todos os tecidos foi principalmente composta de macrófagos, porém, apenas nos infiltrados cardíacos estas células apresentam um padrão de morte semelhante à necrose que pode afetar a progressão das lesões no tecido. A avaliação de mastócitos revelou que apenas o aumento numérico destas células na distrofinopatia não justifica maior lesão e que o fenótipo de sub populações também deve ser avaliado. Observamos poucas células T nos tecidos mas há sub populações peculiares em diferentes idades e tipos de músculos. Há um enriquecimento precoce de células CD4 e CD8 no coração (6 semanas de idade) que diminui de forma concomitante ao aumento de um pico único de linfócitos T  $\gamma\delta$  (12 semanas). Já no tecido esquelético observamos uma população CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD4 e CD8 duplo negativa com função ainda desconhecida. Encontramos uma população de células progenitoras Sca1<sup>+</sup>/Mac1<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> no coração e a análise fenotípica desta população com relação à expressão de B220 e CD117 mostrou picos distintos de células B220<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>; B220<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> e B220<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup> nas idades 6, 12 e 24/48 semanas, respectivamente. Por outro lado, nos músculos esqueléticos observamos uma única população de células Sca-1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> em 6 e 12 semanas. A análise da regeneração de fibras jovens pela expressão de NCAM mostrou um aumento de células NCAM<sup>+</sup> no músculo solear de 2 semanas, no gastrocnêmio em 12 semanas e no diafragma com 24 semanas. Sugerindo um processo de regeneração mais precoce para o músculo menos afetado e mais tardio para mais acometido. Além disso, metaloproteases (MMPs) têm sido descritas como importantes na migração de células tronco para os pontos de dano e remodelamento na regeneração. Na verdade observamos que a atividade de MMP2, que é constitutiva dos músculos, é alta em animais ainda com muito poucos sinais da doença, mas há uma alteração e animais de 8 semanas com mionecrose/inflamação passam a ter mais atividade MMP9. O diafragma mais uma vez se mostrou diferente, e em todas as idades teve alta expressão de MMP2, podendo correlacionar também com a maior lesão. Houve ainda um aumento de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos músculos esqueléticos e sangue no período de 6 e 12 semanas, mas não IL-10 por exemplo. Esses resultados ilustram a complexidade da doença e indicam que compreender melhor os microambientes musculares pode levar a alternativas terapêuticas futuras.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## ABSTRACT

### TESE DE DOUTORADO

**Cristiane Bani Corrêa**

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a fatal inflammatory myopathy linked to the X chromosome and is caused by the non-expression or expression of a truncated form of dystrophin in skeletal muscle cells and other cell types. The first signs of motor impairment appear at early childhood and death of patients is around the second decade of life due to cardiorespiratory insufficiency. *Mdx/mdx* mice, a model of DMD, shows, as well as human, distinct patterns of inflammation, fibrosis and regeneration in skeletal muscles and heart for reasons still unknown. Thus, we evaluated alterations in inflammatory infiltration by lymphoid and myeloid cells, migration of progenitor cells and skeletal and cardiac micro environments as a whole, trying to relate with the progression of the disease in *mdx/mdx* mice. The inflammatory infiltration in all tissues was mainly composed of macrophages, however, only in cardiac infiltrates these cells show necrosis-like cell death, what can affect the lesions progression in tissue. The evaluation of mast cells showed that only the increased number of these cells in the dystrophinopathy does not justify the increased damage, and phenotypic sub populations must also be assessed. We observed few T cells in the tissues but peculiar sub populations at different ages and muscles. There is an early enrichment of CD4 and CD8 cells in the heart (6 weeks old) that decreases with the concomitant increase of a single peak of  $\gamma\delta$  T lymphocytes (12 weeks). In skeletal tissues we observed a population CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD4 and CD8 double negative with yet unknown functions. We also found a population of Sca1<sup>+</sup>/Mac1<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> progenitor cells in the heart and phenotypic analysis of this population with respect to the expression of B220 and CD117 showed distinct peaks of B220<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> and B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> cells at ages 6, 12 and 24/48 weeks, respectively. Moreover, in skeletal muscles we observed a single cell population of Sca1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> at 6 and 12 weeks. Analysis of young fiber regeneration by the expression of NCAM showed an increase in NCAM<sup>+</sup> cells in solear muscle at 2 weeks, in the gastrocnemius at 12 weeks and in the diaphragm at 24 weeks. This suggests a very early process of regeneration in the least affected muscle and a later in the most affected one. Furthermore, metalloproteinases (MMPs) have been described as important in the migration of stem cells to points of cell damage and extracellular matrix remodeling in regeneration. However, we observed that MMP2 activity, which is constituent in muscles, is high in animals with very few signs of the disease, but there is a shift and MMP9 activity increases in 8 weeks old mice with myonecrosis/inflammation. Again, the diaphragm appeared different in all ages showing a high expression of MMP2, what may also correlate with the higher damage. There was an increase of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in skeletal muscles and blood in 6 and 12 weeks old mice, but not IL-10 for example. These results illustrate the complexity of the disease and indicate that a better understanding of the muscle environment may lead to future therapeutic alternatives.

## Lista de abreviaturas

APC.....	Célula apresentadora de antígeno
BMD.....	Distrofia muscular do tipo Becker
CMD.....	Distrofia muscular congênita
CK.....	Creatina quinase
CS.....	Células satélites
CTL.....	Linfócito T citotóxico
CTMC.....	Mastócito de tecido conjuntivo
CT.....	Células tronco
CVB.....	Vírus <i>Coxsackie</i> do tipo B
DGC.....	Complexo de glicoproteínas associadas à distrofina
DMD.....	Distrofia muscular do tipo Duchenne
ECM.....	Matriz Extracelular
ESL-1.....	Ligante de E-selectina
FLIP.....	Proteína inibidora tipo FLICE
GlyCAM-1.....	Molécula de adesão celular dependente de glicosilação
HEV.....	Vênula endotelial alta
IAP.....	Proteína inibidora de apoptose
ICAM.....	Molécula de adesão intercelular
ICOS.....	Molécula co-estimulatória induzida
ICOSL.....	Ligante da molécula co-estimulatória induzida
IFN- $\gamma$ .....	Interferon- $\gamma$
JAM.....	Molécula de adesão juncional
LFA.....	Antígeno associado à função de linfócitos
LGMD.....	Distrofia muscular de membros e cinturas
LPS.....	Lipopolissacarídeo

MAdCAM-1.....	Molécula de adesão celular a adressinas de mucosa
MDSC.....	Célula tronco derivada de músculo
MHC.....	Complexo de histocompatibilidade principal
MMC.....	Mastócito mucoso
MMP.....	Metaloprotease
NCAM.....	Molécula de adesão celular neural
nNOS.....	Óxido nítrico sintase neuronal
NO.....	Óxido nítrico
PAF.....	Fator de ativação de plaquetas
PCLP.....	Proteína semelhante à podocalixina
PECAM-1.....	Molécula de adesão celular de plaquetas/endotélio do tipo 1
PSGL-1.....	Glicoproteína ligante de P-selectina do tipo 1
ROS.....	Espécies reativas de oxigênio
Sca-1.....	Antígeno 1 de células tronco
SP.....	<i>Side Population</i>
TCR.....	Receptor de célula T
TGF- $\beta$ .....	Fator de transformação do crescimento do tipo $\beta$
TNF- $\alpha$ .....	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
VCAM.....	Molécula de adesão celular vascular
VLA-4.....	Antígeno de expressão tardia-4
XLDC.....	Cardiomiopatia dilatada ligada ao X

## Sumário

1.Introdução.....	1
1.1 Características gerais da distrofia muscular do tipo Duchenne.....	1
1.2 Características gerais do tecido muscular esquelético e cardíaco.....	2
1.2.1 Músculo esquelético.....	2
1.2.2 Músculo cardíaco.....	4
1.3 Contração muscular e tipos de miofibras.....	6
1.4 Complexo distrofina e importância do microambiente muscular.....	8
1.5 Camundongos <i>mdx/mdx</i> .....	10
1.6 Diferenciação e regeneração do tecido muscular.....	11
1.7 Resposta inflamatória – características gerais.....	12
1.7.1 Interação com o endotélio e migração celular .....	13
1.7.2 Envolvimento de células inflamatórias na DMD.....	16
1.7.3 Regulação da inflamação celular.....	19
1.8 Cardiomiopatia nas distrofinopatias.....	21
2. Objetivos.....	23
3. Resultados.....	24
4. Discussão.....	26
5. Conclusões.....	36
6. Referências.....	37
Anexo 1.....	52
Material e Métodos.....	52
Resultados e Discussão.....	55
Perspectivas.....	63
Anexo 2.....	64
Material e Métodos.....	64
Resultados e Discussão.....	69
Perspectivas.....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais da distrofia muscular do tipo Duchenne

A distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD) é uma miopatia inflamatória recessiva ligada ao cromossomo X que afeta 1 a cada 3500 meninos nascidos vivos [1], A clonagem completa do gene *dmd* mostra que mais de 50% das mutações em humanos envolve ampla deleção no locus Xp21[2], o que determina alteração na expressão da isoforma de 427kDa da proteína distrofina nas células musculares esqueléticas estriadas e outros tipos celulares [3-5]. A ausência ou alteração da proteína distrofina resulta na perda de conexão entre o citoesqueleto e a matriz extracelular tornando a fibra muscular mais susceptível à lesão [6].

As alterações clínicas são evidentes ainda na primeira infância, em crianças com quatro a cinco anos de idade. A perda da capacidade de deambular ocorre entre oito a dez anos de idade e a evolução para o óbito em torno da segunda década de vida, geralmente devido à insuficiência cardíaca e/ou respiratória [7].

O músculo esquelético é o mais severamente afetado na doença, com o acometimento cardíaco sendo observado atualmente com maior frequência devido ao aumento da sobrevida dos pacientes pela melhoria de algumas intervenções terapêuticas [8]. A disfunção no músculo liso ainda é controversa, porém, há algumas evidências de alterações também neste tipo muscular. As características histológicas do músculo distrófico no início da doença são os inúmeros focos de mionecrose, levando a altos níveis da enzima creatina quinase no sangue, intenso infiltrado inflamatório e miofibras hipertróficas. Os ciclos repetidos de degeneração esgotam a capacidade regenerativa das células satélites, e mecanismos fibróticos causam a substituição progressiva do tecido muscular contrátil por tecido fibroso [9]. Ainda não existe uma terapia curativa para os portadores da DMD, apenas tratamentos paliativos sintomáticos associados a fisioterapia e/ou cirurgia ortopédica para aliviar a escoliose [10]. O uso de glicocorticóides apenas melhora os sintomas da DMD [11] e estudos recentes indicam como estratégias promissoras as terapias genética, celular e farmacológica [2, 10, 12, 13].

## 1.2 Características gerais do tecido muscular esquelético e cardíaco

### 1.2.1 Músculo esquelético

O tecido muscular esquelético é um tecido complexo formado por muitos tipos celulares e a miofibrila esquelética é a célula cuja função primária é gerar força e induzir movimento voluntário. As miofibrilas são células multinucleadas que se formam a partir da fusão de precursores de mioblastos durante o desenvolvimento embrionário e também após lesões durante a vida adulta. As miofibrilas fazem ainda ligações íntimas com a lâmina basal da matriz extracelular através de um complexo de proteínas no sarcolema que se associa às proteínas do citoesqueleto como actina/miosina e aos filamentos intermediários. Este complexo, do qual a distrofina faz parte (ver ítem 1.4), permite tanto a manutenção da integridade do sarcolema, como a transdução de sinais do ambiente e auxilia na organização das estriações das miofibrilas. As estriações são formadas pela repetição de unidades iguais, os sarcômeros, os quais são formados pela região da miofibrila compreendida entre duas linhas Z sucessivas e uma banda A separando duas semibandas I (Fig 1). Estas são constituídas de filamentos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente. 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 [14, 15].

O sistema de túbulos transversos (sistema T) é responsável pela contração uniforme de cada fibra muscular esquelética. Este sistema é constituído por uma rede de invaginações tubulares da membrana da fibra muscular (sarcolema), cujos ramos envolvem as junções das bandas A e I de cada sarcômero. Em cada lado do túbulo T existe uma expansão do retículo sarcoplasmático e este complexo, formado por um túbulo T e duas expansões do retículo sarcoplasmático, é conhecido como tríade. Na tríade, a despolarização dos túbulos T é transmitida ao retículo sarcoplasmático para liberação de  $\text{Ca}^{++}$  para a contração [16](Fig 1).

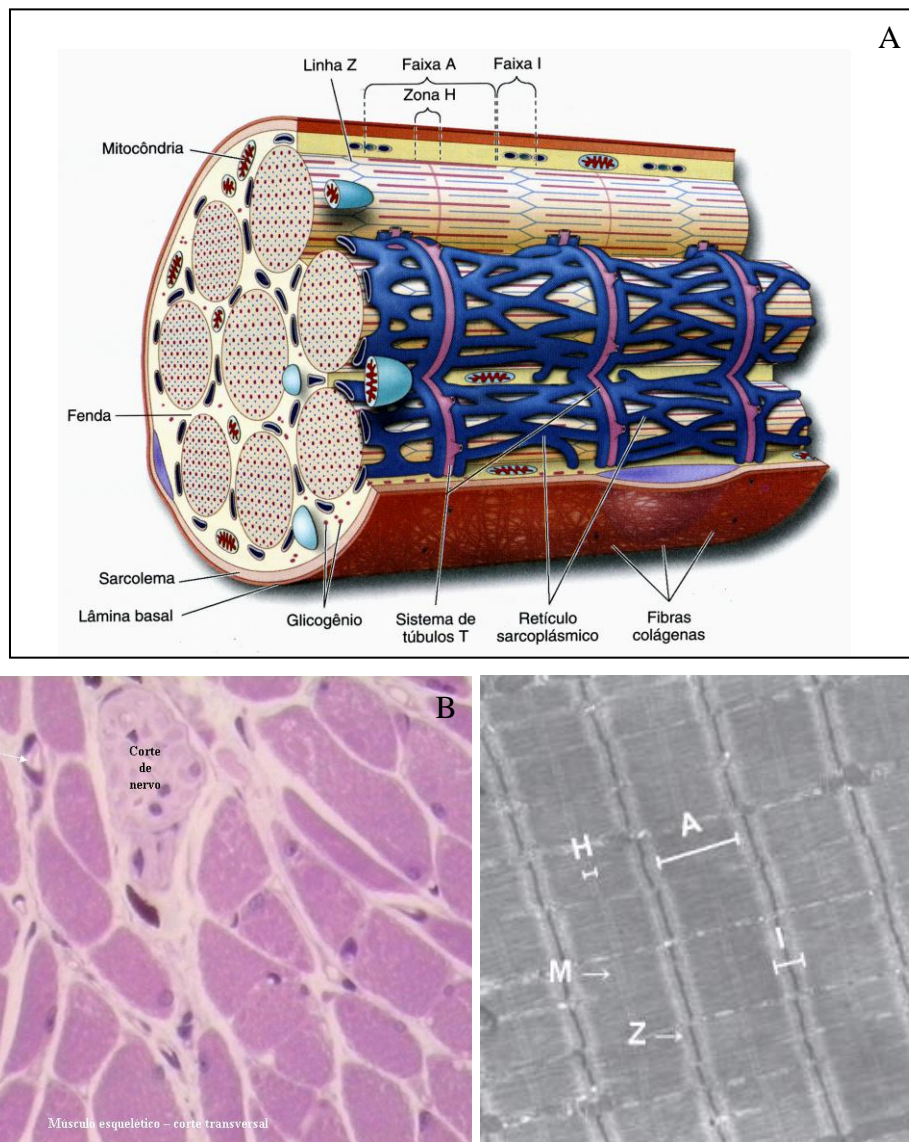


Figura 1: Tecido muscular esquelético. A: Sistema de tubulos T dentro de uma fibra muscular (adaptado de Mcardle, 2003); B: Corte transversal de músculo esquelético visto em microscópio óptico (<http://www.efoa.br/academico/material/CB/Histologia/Musculo%20esquelético%202.jpg>); C: Ultraestrutura da fibra muscular estriada (<http://www.scielo.br/img/revistas/rbz/v36s0/03f2.jpg>).

O tecido conjuntivo presente nos músculos esqueléticos envolve as principais estruturas do tecido, que são: o epimísio, que recobre todo o músculo; o perimísio, recobrindo os fascículos que são feixes de fibras musculares; e o endomísio, que envolve individualmente cada fibra muscular. Essa disposição do tecido conjuntivo mantém as fibras musculares juntas e permite certa liberdade de movimento entre elas. Esses revestimentos se prolongam do músculo até os tendões que são ricos em colágeno, cuja função é fixar o músculo ao osso. O tecido conjuntivo também está presente revestindo os vasos e nervos que irrigam e inervam os músculos (Fig 2).



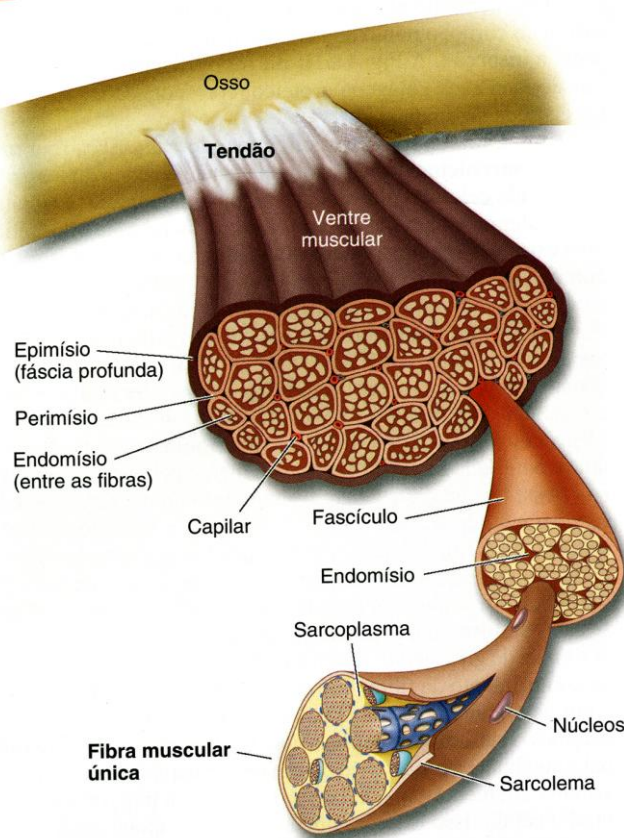
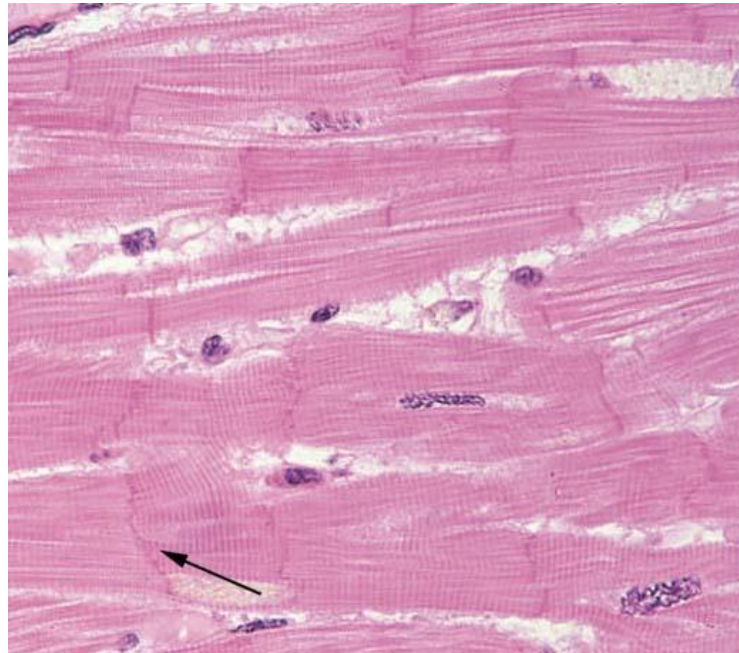


Figura 2: Corte transversal das estruturas do músculo esquelético e arranjo dos seus revestimentos de tecido conjuntivo (adaptado de Mcardle, 2003).

### 1.2.2 Músculo cardíaco

O músculo cardíaco é constituído por células alongadas e intimamente interligadas que apresentam estriações transversais. Porém, ao contrário das fibras esqueléticas, as fibras cardíacas possuem apenas um ou dois núcleos centralmente localizados. As fibras cardíacas também são revestidas por uma bainha de tecido conjuntivo, equivalente ao endomísio do músculo esquelético, que contém uma abundante rede de capilares sanguíneos. Uma característica do músculo cardíaco é a presença de discos intercalares, os quais são complexos juncionais encontrados entre as células musculares (Fig 3). Nos discos intercalares encontram-se três especializações juncionais principais: zônula de adesão, desmossomos e junções comunicantes (*Gap junctions*) que permitem a contração sincronizada do músculo.



*Figura 3: Corte longitudinal de músculo cardíaco corado com hematoxilina e eosina. A seta indica um disco intercalar ([http://cytochemistry.net/Cell-biology/Medical/practice\\_practical\\_muscle.htm](http://cytochemistry.net/Cell-biology/Medical/practice_practical_muscle.htm)).*

O padrão de estriações das fibras musculares estriadas cardíacas é idêntico ao das fibras musculares estriadas esqueléticas, incluindo a alternância entre bandas I e A. Cada sarcômero possui a mesma estrutura básica que seu equivalente na fibra muscular esquelética; conseqüentemente, o modo e o mecanismo de contração são virtualmente idênticos nos dois tipos de tecidos. Entretanto, várias outras diferenças principais devem ser notadas, sobretudo no retículo sarcoplasmático, na organização e quantidade dos túbulos T, no suprimento de  $\text{Ca}^{2+}$  do tecido cardíaco, nos canais de íons no sarcolema e na duração do potencial de ação. No músculo cardíaco o sistema T e o retículo sarcoplasmático são organizados de forma diferente em relação ao esquelético e as tríades não são tão freqüentes nas células cardíacas. Ao contrário das tríades, são observadas díades, constituídas por um túbulo T e uma expansão do retículo sarcoplasmático [17]. Diferente das fibras esqueléticas, onde as tríades estão localizadas nas interfaces entre as bandas A-I, as díades das fibras musculares cardíacas estão localizadas ao nível da linha Z. Além disso, os túbulos T das fibras cardíacas têm um diâmetro quase duas vezes e meia maior do que o diâmetro dos túbulos T do músculo esquelético e são revestidos por uma lâmina externa [17].

O músculo cardíaco mantém seu próprio ritmo através da despolarização e repolarização espontânea de uma pequena região de tecido neuro-muscular especializado denominado nódulo sinoatrial (nódulo SA). Sendo assim, os sinais eletroquímicos se originam normalmente no nódulo SA e se propagam através dos átrios até o nódulo atrioventricular (nódulo AV). Ocorre um retardo de 0,1 segundo depois que o impulso elétrico se propaga através dos átrios,

permitindo que os mesmos se contraíam e impulsionem o sangue para os ventrículos. O nóculo AV dá origem ao feixe de His que, por sua vez, transmite o impulso através dos ventrículos por intermédio do sistema de Purkinje. Cada célula ventricular é estimulada dentro de aproximadamente 0,06 segundo após a penetração do impulso dentro dos ventrículos, permitindo uma contração unificada e simultânea de ambos os ventrículos [18, 19].

Além das diferenças histológicas e fisiológicas já citadas entre o músculo esquelético e o cardíaco, há também um padrão diferenciado de expressão da distrofina em ambos os músculos. No músculo esquelético a distrofina é concentrada na região do costâmero, já no cardíaco ela está uniformemente distribuída ao longo do sarcolema [20]. Essa variação, juntamente com as demais diferenças observadas entre os dois músculos, provavelmente faz com que esses dois tipos musculares sejam diferentemente afetados nas distrofinopatias.

### **1.3 Contração muscular e tipos de miofibras**

A interação entre as moléculas de miosina e actina está associada à hidrólise de ATP. A miosina, como tem um sítio para unir-se ao ATP, comporta-se como uma ATPase e a actina como um ativador. Desta forma, a energia da hidrólise do ATP é convertida em trabalho mecânico para a contração muscular [21, 22].

Os músculos esqueléticos de mamíferos co-expressam diferentes tipos de miosina e somente um tipo de actina, sugerindo que a diversidade entre os tipos de fibras musculares seja pelo menos em parte resultado da diferença dos tipos de miosina.

A molécula de miosina é formada por duas cadeias pesadas e dois pares regulatórios de cadeia leve. A cadeia pesada de miosina (MHC) é uma das principais proteínas sarcoméricas e tem sido usada como um marcador de diferenciação de células musculares, que junto com outras proteínas estruturais forma as primeiras estruturas do sarcômero [23-25]. No músculo esquelético de mamíferos são encontradas sete isoformas de MHC, quatro dessas no músculo esquelético adulto e uma adicional predominando no músculo cardíaco [26].

Os diferentes tipos de fibras musculares funcionam basicamente de modo semelhante. Contudo, os músculos não contêm fibras com as mesmas capacidades metabólicas e funcionais [27]. As fibras musculares esqueléticas são classificadas em dois grupos (Tabela 1): tipo I ou fibras de contração lenta e tipo II ou fibras de contração rápida que se distinguem por propriedades fisiológicas e bioquímicas. Logo, a composição da fibra muscular determina a velocidade de contração e a fadiga de um músculo esquelético em particular [22]. As fibras de contração tipo II se subdividem nos grupos A, B e C, sendo que o subgrupo A é mais oxidativo e o subgrupo B mais glicolítico. O subgrupo C representa um grupo de células indiferenciadas [27-

29] que, dependendo do estímulo (e.g. fatores hormonais, químicos e neurais) [30], pode assumir características dos subtipos A ou B.

Tipos de fibra	Fibras tipo I	Fibras tipo IIA	Fibras tipo IIB
Tempo de contração	Lenta	Rápida	Muito rápida
Tamanho do neurônio motor	Pequeno	Grande	Muito grande
Resistência à fadiga	Alta	Intermediária	Pequena
Produção de força	Lenta	Alta	Muito alta
Densidade de mitocôndria	Alta	Alta	Pequena
Densidade de capilares	Alta	Intermediária	Pequena
Capacidade oxidativa	Alta	Alta	Pequena
Atividade miosina-ATPase	Baixa	Alta	Alta
Capacidade glicolítica	Pequena	Alta	Alta
Estocagem de energia	Triglicerídeos	CK, Glicogênio	CK, Glicogênio

*Tabela 1: Características funcionais das fibras musculares, obtido de:*

<http://www.brianmac.demon.co.uk/muscle.htm>

As fibras vermelhas (isoforma tipo I), assim chamadas pela grande quantidade de mioglobina, têm contração mais lenta. Além disso, possuem uma grande quantidade de mitocôndrias e suprimento capilar, o que permite um perfil favorável ao metabolismo oxidativo (fibras oxidativas), resistência à fadiga e atividades longas e repetitivas. Miofibras com a isoforma tipo IIA em transição apresentam características comuns aos tipos I e IIB. Miofibras brancas (tipo II) possuem menos mioglobina e mais ATPase, o que propicia uma contração mais rápida com utilização de muito mais energia que as vermelhas, devido ao grande estoque de fosfocreatina e glicogênio. Isto permite uma maior adaptação ao metabolismo anaeróbio glicolítico, porém maior propensão à fadiga [31]. Contudo, aparentemente ambos tipos de miofibras apresentam alto índice metabólico oxidativo devido ao conteúdo elevado de mioglobina e mitocôndrias de uma forma geral [27]. Na fase precoce da regeneração, todas as fibras indiferenciadas são do tipo IIC, e podem se diferenciar em fibras do tipo I após 3 semanas ou tipo II após 4 semanas [29].

Os músculos são constituídos por uma mistura de aproximadamente 50% de fibras de contração lenta e 50% de fibras de contração rápida. No entanto existem músculos específicos

que são considerados como predominantemente do tipo I ou II [22]. O músculo solear apresenta de 25 a 40% mais fibras de contração do tipo I, enquanto que o tríceps contém de 10 a 30% a mais de fibras do tipo II. De uma forma geral, os músculos anti-gravitacionais contêm maior proporção de fibras do tipo I.

Em camundongos distróficos, a proporção de tipos de fibras varia entre os músculos e entre os estágios da doença. No músculo gastrocnêmio, por exemplo, a fibra do tipo IIA é a mais abundante durante o curso da doença [32]. No músculo diafragma de cães distróficos, o número de fibras do tipo I aumenta enquanto que as fibras do tipo IIA diminuem em animais com idade acima de seis meses [33].

#### **1.4 Complexo distrofina e importância do microambiente muscular**

A distrofina é a proteína mais abundante da fibra muscular, pertence à superfamília das espectrinas, tem 427 kDa de peso molecular e forma quatro domínios funcionais (Fig 4). O gene da distrofina é o maior descrito em humanos e 99% do gene da distrofina é constituído de introns e a seqüência codificante é composta por 79 exons, incluindo sete promotores [34, 35]. A distrofina possui ainda uma variedade de isoformas codificadas a partir do mesmo gene, como por exemplo, três isoformas completas que possuem o mesmo número de exons, mas são derivadas de três promotores independentes no cérebro, músculo e neurônios cerebelares de Purkinje [4, 36]. Uma isoforma adicional em linfócitos foi também descrita [37], porém, outros estudos sugeriram que este dado pode representar um artefato, tornando seu papel funcional duvidoso [38]. Além dessas isoformas o gene da distrofina produz diversas outras geradas através de processamento alternativo e esses variantes podem se formar pela exclusão de alguns exons do transcrito primário ou pela subversão da ordem dos exons [39, 40].

A distrofina apresenta localização interna no sarcolema, formando uma trama associada a um complexo de glicoproteínas (DGC) constituído pelas distroglicanas, sarcoglicanas, sintrofinas, distrobrevinas, sarcospan e actina [41]. O domínio N-terminal com 336 aminoácidos permite a ligação à actina; um domínio com 24 unidades de repetições longas constituído de segmentos de tripla-hélice com 88 a 126 aminoácidos; um domínio com 135 aminoácidos rico em cisteína que se liga às proteínas do sarcolema e o domínio C-terminal com 320 aminoácidos com sítios de ligação para sintrofina e distrobrevina [42].

Dentre os componentes do DGC está a distroglicana, que é o principal componente do complexo e está envolvida em uma variedade de processos celulares como a estabilização do sarcolema e agrupamento dos receptores de acetilcolina [43]. Além disso, sua expressão está reduzida em camundongos *mdx/mdx* [15]. A distroglicana é um receptor de superfície celular que

possui duas subunidades:  $\alpha$ -dístroglicana, que é extracelular e altamente glicosilada, e a  $\beta$ -dístroglicana, que é transmembranar e se liga ao domínio citoplasmático da dístrofina [15, 43].

As fibras musculares interagem intimamente com a matriz extracelular (ECM), a qual consiste num suporte mecânico para a coordenação da força de contração e fonte de sinais bioquímicos que mantêm as funções celulares normais. Assim, a ECM é constituída por uma variedade de moléculas com propriedades bioquímicas e biofísicas que formam uma rede dinâmica de integração celular e macromolecular.

A ECM participa como estrutura para adesão celular mediada por integrinas, dístroglícanas, proteoglicanas e os receptores de tirosina quinase presentes na superfície celular. A interação entre a ECM e moléculas de adesão leva à sinalização intracelular que culmina com ativação celular e alteração no citoesqueleto. Por exemplo, as proteoglicanas com suas cadeias de glicosaminoglicanas permitem interações prolongadas com fatores de crescimento presentes no microambiente. Além disso, a expressão elevada da integrina  $\alpha 7\beta 1$  em camundongos com dístrofinopatia leva à redução dos sintomas, mostrando a importância da interação da ECM com seus ligantes [44].

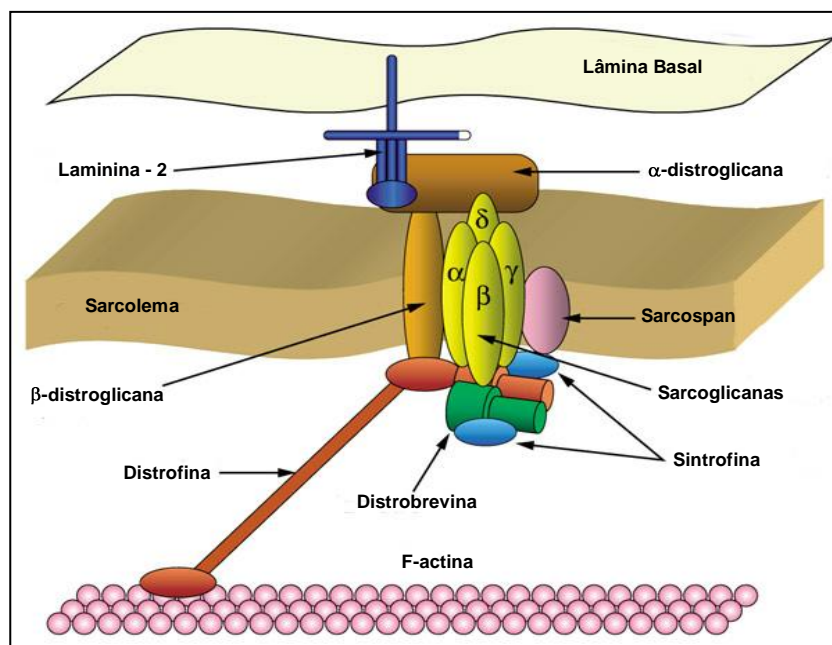


Figura 4: Complexo dístrofina-glicoproteínas.

Referência: <http://genomebiology.com/content/figures/gb-2001-2-4-reviews3006-3.jpg>

A formação do complexo DGC é crucial para a ligação da matriz extracelular com o citoesqueleto [2]. Como dito anteriormente, atualmente acredita-se que todo esse complexo, além do suporte estrutural, participe na transdução de sinais provenientes da interação da fibra

muscular com a matriz extracelular [41]. A organização desse complexo é essencial para a integridade da fibra muscular e estabilidade do sarcolema.

A deficiência de distrofina e de outras proteínas do complexo DGC resulta em diferentes tipos de distrofias musculares em várias espécies animais [5, 45-47]. Mutações no gene promotor da distrofina podem bloquear a transcrição dessa molécula no músculo cardíaco levando à cardiomiopatia ligada ao X [48]. Já mutações em regiões codificantes distintas podem promover distrofia muscular de Duchenne ou distrofia muscular de Becker (Fig 4) [49]. Mutação nos genes que codificam as sarcoglicanas causa as distrofias musculares da cintura e membros (LGMD) enquanto mutação no gene da merosina causa distrofia muscular congênita (CMD) [50]. A perda de distrobrevinas causa distrofia muscular em camundongos e defeitos em outras proteínas incluindo colágeno VI, titina, desmina e caveolina-3 causam miopatias graves em humanos [15].

### 1.5 Camundongos *mdx/mdx*

O camundongo *mdx/mdx*, um mutante da colônia de C57BL/10ScSn, foi identificado pelos altos níveis da enzima creatina quinase no soro e patologia semelhante à DMD humana [46, 51, 52]. O camundongo *mdx/mdx* apresenta uma mutação espontânea no códon terminal do exon 23 no gene da distrofina [53], sendo atualmente considerado o modelo animal mais adequado ao estudo da fisiopatologia da DMD [12].

Os camundongos *mdx/mdx* com 4 e 6 semanas apresentam intensa mionecrose e regeneração evidenciada pela freqüente expressão de fibras com a isoforma da cadeia pesada da miosina fetal e por fibras com nucleação central [54]. Essa fase de degeneração é acompanhada por hipertrofia muscular transitória. Embora ocorra um processo contínuo de degeneração e regeneração em níveis baixos e relativamente constantes ao longo da vida, animais acima de 15 meses de idade tornam-se extremamente fracos, frequentemente morrendo mais cedo do que camundongos do tipo selvagem [55].

No diafragma, onde a patologia é mais acentuada, ocorre grande infiltração inflamatória, perda de fibras musculares e alta deposição de colágeno [56], levando à degeneração progressiva semelhante à que ocorre nos músculos de pacientes com DMD [56, 57].

A doença do camundongo *mdx/mdx* é parcialmente amenizada pela reversão da expressão de distrofina no tecido muscular e pela substituição parcial da distrofina pela proteína homóloga utrofina [58]. Sendo assim, camundongos duplo-deficientes em distrofina e utrofina (*mdx/mdx/utrn*<sup>-/-</sup>) também são utilizados como modelos de estudo [59]. Estes animais apresentam um fenótipo bastante severo da doença, semelhante ao observado em humanos. Ao contrário do

*mdx/mdx*, o camundongo *mdx/mdx/utrn*<sup>-/-</sup> apresenta retardo no crescimento, perda de peso e morte prematura [59].

Apesar dos camundongos apresentarem certas limitações no estudo da DMD pela progressão diferenciada da doença, estes animais são ferramentas importantíssimas na pesquisa, pelo fácil manuseio e pelas semelhanças genéticas e na resposta inflamatória. Um dos aspectos mais relevantes do estudo da DMD é a avaliação de mecanismos de indução e controle da resposta inflamatória crônica, tanto em humanos como em modelos experimentais. Provavelmente, a regulação inflamatória é um evento chave no controle da progressão da doença e na elaboração de futuras propostas terapêuticas.

## 1.6 Diferenciação e regeneração do tecido muscular

A formação ou regeneração do tecido muscular tem início na diferenciação de células precursoras específicas que se formam a partir de células tronco (CT) mais indiferenciadas, embrionárias ou adultas [55]. A medula óssea possui dois tipos distintos de CT: Células do estroma da medula e células tronco hematopoiéticas. As CT pluripotentes derivam do estroma da medula e podem se diferenciar após transplante, em uma variedade de linhagens, incluindo músculo esquelético, neurônios e células hematopoiéticas [44]. As CT hematopoiéticas podem se diferenciar em células hepáticas, músculo cardíaco, endotélio vascular e vários tipos de células epiteliais após transplante [60].

No músculo cardíaco varias CT pluripotentes ou somáticas são capazes de se diferenciar em cardiomiócitos ou neovascularizar o tecido como: células hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>), células mesenquimais (CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>) e progenitores endoteliais (CD133<sup>+</sup>). Além dessas células, o tecido cardíaco também possui uma população residente chamada *side population* (SP) que tem capacidade de proliferar e se diferenciar em cardiomiócitos [61].

O músculo esquelético possui uma notável capacidade de regeneração à injúria. A capacidade regenerativa desse tecido é largamente atribuída a uma população de células miogênicas específicas da musculatura esquelética, as células satélites (CS). Além das CS outras populações de CT podem ser encontradas no músculo como as células SP, CT derivadas de músculo (MDSC), CT associadas a vasos (mesoangioblastos e pericitos) [62].

CS estão geralmente localizadas abaixo da lâmina basal entre as fibras musculares esqueléticas num estado de quiescência. Morfologicamente, as CS quiescentes diferem das ativadas por apresentarem alta relação núcleo/citoplasma, com poucas organelas, núcleo menor quando comparado com os núcleos adjacentes da fibra muscular e aumento da heterocromatina



nuclear comparada à do mionúcleo. Quando ativadas, ocorre redução da heterocromatina, aumento na relação citoplasma/núcleo e aumento no número de organelas intracelulares. Inicialmente elas proliferam originando células filhas precursoras de células miogênicas necessárias para o crescimento pós-natal e regeneração muscular [63-66]. Embora inicialmente consideradas como CT monopotentes capazes de originar somente células miogênicas, experimentos mais recentes *in vitro* mostram que elas podem se diferenciar em adipócitos e osteócitos [66]. Estudos *in vitro* mostraram que as CS e CT são populações distintas [67]. CT musculares são positivas para o marcador hematopoiético de antígeno 1 de célula tronco (Sca-1), mas não expressam nenhum marcador de CS, e estas são negativas para Sca-1 e não dão origem a células hematopoiéticas [66]. Pode-se encontrar células Sca-1 em diversos tecidos como glândula mamária, fígado, coração, próstata, músculo esquelético e o sistema hematopoiético [68]. No músculo esquelético elas se localizam entre as fibras musculares ou associadas com vasos sanguíneos e acredita-se que são progenitores de células satélites ou precursores de célula muscular [66]. As SP aumentam em número após injúria e participam na regeneração, já as MDSC são outra população de células tronco com potencial miogênico isoladas do músculo esquelético adulto expressando os marcadores Sca-1 e CD34 [69].

O músculo esquelético de mamíferos possui capacidade de regeneração rápida e extensa em resposta a estímulos provenientes do tecido lesado, como fibras necróticas por exemplo. Fatores liberados pela lesão muscular ativam células inflamatórias residentes gerando sinais quimiotáticos para migração de macrófagos principalmente, mas também neutrófilos, eosinófilos, linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, raros linfócitos B e células NK [55, 70-72]. Dados referentes à detecção *in situ* de citocinas em pacientes com DMD são bastante controversos, talvez por terem sido realizados em diferentes estágios da doença [73]. Com relação às citocinas que podem participar do processo de regeneração, o TGF- $\beta$  é a melhor caracterizada. Esta citocina é secretada por vários tipos celulares, como leucócitos, plaquetas, osteoblastos/osteoclastos e células endoteliais, promovendo reparo tecidual, inibição da ativação de leucócitos e influenciando na atividade das células endoteliais e do parênquima [74, 75].

### **1.7 Resposta inflamatória – características gerais**

A inflamação é uma complexa reação do organismo através do qual os tecidos respondem à injúria. Quando ocorre de forma controlada, leva ao reparo estrutural e de função dos tecidos e é fundamental para a manutenção da homeostase. A detecção de lesão tecidual ou de agentes

invasores nos tecidos gera uma resposta inicial relativamente circunscrita. A eficiência desta resposta depende das sub populações envolvidas e de suas atividades efetoras, as quais devem controlar a infecção, quando presente, promover a remoção de estruturas e células danificadas e o reparo do tecido. No caso de doenças inflamatórias crônicas, como a DMD, não há finalização do processo inflamatório pela continuada lesão de fibras musculares pela perda da distrofina.

### **1.7.1 Interação com o endotélio e migração celular**

A migração de leucócitos do sangue para locais de lesão extravascular ocorre através de um processo de múltiplas etapas controladas por sinais quimioatrativos e eventos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular [76]. Inicialmente há o rolamento dos leucócitos sobre o endotélio e posteriormente a adesão e a transmigração pelo vaso. Diversas famílias de moléculas participam como fatores de iniciação e manutenção desse processo inflamatório. Citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos possuem papel fundamental na ativação e recrutamento de células inflamatórias [76, 77]. Essas moléculas também atuam sobre o endotélio, tornando-o permissivo à migração dessas células [78]. A ativação de células do sangue periférico bem como a permeabilidade do endotélio depende da participação de selectinas, integrinas, moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e quimiocinas, resultando na quimiotaxia e no aumento da avidéz da interação, permitindo a diapedese [76, 79, 80].

O evento inicial da migração é a expressão de moléculas de adesão no endotélio adjacente ao sítio inflamado, induzida pela liberação de mediadores inflamatórios diversos liberados pelos tecidos danificados [81]. Nas vênulas pós-capilares, e nas vênulas endoteliais altas (HEVs) nos linfonodos, ocorre inicialmente o rolamento ao longo do vaso, permitindo sua interação (adesão fraca a princípio e depois forte) com o endotélio e em seguida a pavimentação, onde os leucócitos margeiam o vaso para a transmigração [82, 83]. Os eventos iniciais de adesão são dependentes das interações reversíveis entre as selectinas e seus ligantes, ambos expressos tanto pelos leucócitos quanto pelas células endoteliais [79]. São descritas três selectinas, incluindo E-selectina, P-selectina e L-selectina, nomeadas de acordo com o tipo celular em que foram descritas (endotélio, plaquetas e leucócitos, respectivamente) [84]. A P-selectina ou CD62P é constitutivamente expressa e estocada em grânulos secretórios e rapidamente mobilizada para a superfície das células endoteliais quando há estímulo por mediadores inflamatórios locais como histamina, trombina, radicais livres de oxigênio, IL-4 e IL-13 [84]. Esta molécula interage primariamente com a glicoproteína ligante de P-selectina do tipo 1 (PSGL-1) expresso pelos leucócitos. A E-selectina ou CD62E é sintetizada e expressa no endotélio pela ação de

mediadores como IL-1, lipopolissacarídeo (LPS) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [79]. Seus principais ligantes são o PSGL-1 e ligante de E-selectina (ESL-1), também expressos na superfície dos leucócitos [85]. A expressão da E-selectina resulta em uma dramática redução na velocidade de rolamento do leucócito, aumentando a capacidade de migração. A L-selectina é expressa em quase todos os leucócitos e participa do direcionamento dessas células para os linfonodos e também medeia o rolamento após estímulo inflamatório, direcionando os leucócitos para o sítio de inflamação [86]. Os ligantes de L-selectina podem ser divididos em três categorias: sialomucinas, proteoglicanas e glicoproteínas. Na categoria da sialomucina podemos encontrar o CD34, a molécula-1 de adesão celular glicosilada (GlyCAM-1), adressina vascular de mucosas (MAdCAM-1) e proteína tipo podocalixina (PCLP)[87].

A adesão firme dos leucócitos ao endotélio envolve a interação de integrinas também expressas pelos leucócitos e pelas células endoteliais. Essas integrinas são incapazes de interagir com seus ligantes em leucócitos não estimulados, um mecanismo que participa do controle da resposta inflamatória. A capacidade de interação requer sinais de ativação que promovem a transição das integrinas para um estágio de alta afinidade [88]. Dentre esses sinais de ativação encontram-se o fator ativador de plaquetas (PAF), TNF- $\alpha$  e LPS [89-91]. Durante o rolamento inicial nas células endoteliais, os sinais de ativação para as integrinas são fornecidos não apenas por moléculas quimioatraentes, mas também pela própria interação anterior das selectinas com seus receptores [79].

As integrinas constituem uma grande família de moléculas de adesão celular importantes na adesão dos leucócitos ao endotélio e na migração de células inflamatórias pela matriz extracelular. São proteínas heterodiméricas compostas de uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$  ligadas não covalentemente [88]. Integrinas como o antígeno associado à função de linfócitos do tipo 1 (LFA-1) e Antígeno de expressão tardia-4 (VLA-4) são expressas na superfície de leucócitos e interagem com moléculas da superfamília das imunoglobulinas nas células endoteliais, molécula de adesão intercelular (ICAM) e molécula de adesão celular vascular (VCAM), respectivamente [88]. A expressão de ICAM é constitutiva, porém aumentada pela ação de citocinas como IL-4, IL-1 e TNF- $\alpha$ , já o VCAM não é constitutivamente expresso, porém é induzido por TNF- $\alpha$  e IL-1 [78, 92]. Por exemplo, terapias baseadas em anticorpos monoclonais contra moléculas de adesão estão sendo testadas para impedir a migração de células inflamatórias e principalmente linfócitos T auto-reativos em doenças auto-imunes. O bloqueio da ação da molécula LFA-1 por anticorpos contra os seus ligantes ICAM-1 e ICAM-3 ou contra ela própria, por exemplo, tem se mostrado bastante promissor no controle da psoríase [93]. Outros estudos indicam a eficácia

desses bloqueadores em pacientes que passaram por transplante renal [93]. Além do LFA-1, terapias baseadas no bloqueio por anticorpos da molécula VLA-4 também estão sendo desenvolvidas e excelentes respostas clínicas estão sendo obtidas em pacientes com doença de Crohn e esclerose múltipla [93].

Após a adesão firme dos leucócitos ao endotélio, ocorre o evento de migração transendotelial dessas células. Essa transmigração ocorre nas bordas das células endoteliais, onde junções do tipo *tight* são observadas [81]. Há ainda modificações nas junções aderentes entre as células endoteliais, havendo uma desorganização dos componentes juncionais caderina,  $\beta$ -catenina e placoglobulina em áreas próximas às regiões de adesão dos leucócitos [94].

Duas moléculas de adesão pertencentes à superfamília das imunoglobulinas estão envolvidas na transmigração de leucócitos: molécula de adesão celular de plaquetas/endotélio do tipo 1 (PECAM-1) e molécula de adesão juncional (JAM). PECAM-1 é expressa na junção celular endotelial e na superfície de monócitos e neutrófilos, mediando o extravasamento de leucócitos [95]. A molécula JAM é seletivamente concentrada nas junções endoteliais, mas não está presente nos leucócitos [78]. A importância de JAM no extravasamento de leucócitos foi demonstrada em experimentos onde este processo foi inibido pela utilização de anticorpos contra esta molécula [96]. Uma vez no tecido-alvo, a migração de células inflamatórias ocorre através da interação de moléculas de adesão e receptores expressos na superfície celular com quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e componentes da matriz extracelular, permitindo que essas células se posicionem corretamente no sítio inflamatório [76]. A migração de leucócitos pela matriz extracelular é mediada pelos receptores de laminina, fibronectina e vitronectina, tais como CD49d e CD49e, que são rapidamente expressos pelos leucócitos após estimulação por fatores quimioatraentes e durante a migração transendotelial [97, 98]. Sendo assim, diversas etapas são necessárias para a migração e chegada dos leucócitos ao foco inflamatório, através de um processo que requer uma rede complexa de interações entre diversas moléculas solúveis e de membrana.

Uma vez no foco inflamatório, uma série de outras moléculas atuam permitindo que as células inflamatórias exerçam seus papéis funcionais. O co-receptor CD2, por exemplo, é uma molécula de grande importância na ativação de linfócitos T, amplificando o sinal primário de ativação fornecido pela interação TCR-peptídeo-MHC, além de atuar como uma molécula de adesão, aumentando o tempo de interação entre o linfócito e as células apresentadoras de antígeno (APCs) ou alvo [99, 100]. O CD2 é uma proteína monomérica de membrana expressa principalmente em linfócitos T e timócitos e que interage com o LFA-3 expresso pelas APCs [100]. Uma série de terapias envolvendo anticorpos monoclonais contra CD2 também está sendo

desenvolvida e têm se mostrado bastante eficientes em patologias como artrite e psoríase [100]. Além do CD2, o CD44 também participa na ativação de linfócitos, além de promover interações célula-célula e célula matriz extracelular, interagindo com ácido hialurônico, colágeno, metaloproteases (MMPs) e também com E - e P-selectinas [101, 102].

### **1.7.2 Envolvimento de células inflamatórias na DMD**

Diversos estudos mostram que os infiltrados inflamatórios apresentam papel central na DMD humana e no modelo animal *mdx/mdx*, fornecendo evidências de que as interações das células inflamatórias com o músculo deficiente em distrofina podem contribuir tanto para a morte celular nas distrofinopatias quanto para a regeneração muscular [103-105].

A inflamação na DMD é caracterizada por altas concentrações de células mielóides no músculo esquelético, incluindo neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e principalmente macrófagos e fibroblastos [103, 104, 106, 107]. Wehling e colaboradores mostraram em ensaios *in vitro* que a co-incubação de macrófagos isolados de camundongos *mdx/mdx* de 4 semanas com miotubos levou à lise de 40% desses miotubos em 16 horas, indicando que esses macrófagos apresentam capacidade citolítica [105]. Este estudo mostrou ainda que a depleção de macrófagos em camundongos *mdx/mdx* previne grande parte da lise de células musculares confirmando que, além da lesão muscular mecânica pela falta da distrofina, há atividade citolítica dependente de macrófagos. Porém, ainda não está claro através de quais vias citotóxicas há essa indução de morte celular. Estudos utilizando camundongos *mdx/mdx* transgênicos para a enzima óxido nítrico sintase (NOS), com aumento na produção da enzima, mostraram uma redução na concentração de macrófagos e fibras danificadas tanto no músculo esquelético quanto no cardíaco, promovendo uma melhora na patologia [105, 108]. Embora o NO em altos níveis seja capaz de induzir morte celular, estes resultados protetivos no animal transgênico podem refletir os altos níveis do radical desde o nascimento. Por outro lado, trabalhos mais antigos mostram que o óxido nítrico apresenta capacidade de inibir a diapedese, ativação e longevidade de algumas populações de células mielóides [109, 110]. A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é uma das diversas proteínas que interagem com a distrofina na superfície da célula muscular [111]. Sendo assim, na ausência da distrofina, a concentração de nNOS no sarcolema e no citoplasma cai, possivelmente afetando a chegada de células mielóides no músculo lesado.

Os mastócitos, aparentemente são um tipo celular importante na patologia na DMD [103]. Esta célula é frequentemente encontrada próxima a superfícies epiteliais na pele, sistema respiratório e mucosa gastrointestinal onde estão estrategicamente localizados para exercerem suas funções de defesa [112]. Diversos fatores podem promover a ativação de mastócitos, como

temperatura, agentes químicos, trauma mecânico, radiação UV, dentre outros [112]. Além de células efectoras de reações anafiláticas, este tipo celular exerce um papel de grande importância no reparo tecidual e em respostas imunológicas contra agentes infecciosos [113]. Mastócitos são capazes de secretar uma série de citocinas que contribuem nas reações imunológicas, afetando assim o recrutamento e função de linfócitos, por exemplo, tais como IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-16, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  [114]. Este tipo celular está presente de forma constitutiva no tecido conjuntivo do músculo, servindo como uma fonte de citocinas e outros mediadores inflamatórios [115]. Alguns trabalhos mostraram que camundongos *mdx/mdx*, assim como pacientes DMD, apresentam elevadas concentrações de mastócitos no músculo [116]. Ainda que alguns artigos reportem a localização de mastócitos em áreas de necrose muscular [117], trabalhos mais recentes associam essas células principalmente a infiltrados inflamatórios e áreas fibróticas [103].

Experimentos utilizando injeção intramuscular de grânulos de mastócitos purificados induziram ampla necrose no músculo esquelético do camundongo *mdx/mdx*, em contraste a camundongos controle não distróficos [116]. Estes dados sugerem que as miofibras do camundongo *mdx/mdx* sejam mais vulneráveis a mediadores provenientes destas células. Uma análise comparativa entre a quantidade de mastócitos nos diferentes músculos do camundongo *mdx/mdx* e a extensão ocupada por necrose de cada um mostrou que os músculos menos afetados pela ausência da distrofina são também aqueles com menor quantidade de mastócitos, correlacionando indiretamente este tipo celular com dano muscular [116]. Além disso, estudos utilizando cromolin (cromoglicato de sódio), um estabilizador de mastócitos que inibe a sua desgranulação, mostraram uma redução da extensão da necrose muscular em camundongos *mdx/mdx*, assim como redução na necrose de miofibras induzida por exercício no quadríceps desses animais [115].

O eosinófilo é outra célula mielóide descrita como presente nos músculos esqueléticos do camundongo *mdx/mdx* [104]. Estas células podem cruzar a membrana basal das células musculares alvo e formar sítios de interação muito próximos com as fibras musculares, induzindo sua lise através da liberação do conteúdo de seus grânulos como, por exemplo, a proteína básica principal. Entretanto, a maior parte dos trabalhos que estuda a resposta inflamatória na DMD não faz referência a neutrófilos como uma célula frequentemente encontrada, exceto por um grupo [104].

Além do papel de células mielóides, diversos artigos descrevem a importância de linfócitos na patologia da DMD e no camundongo *mdx/mdx*. Muitos pacientes com DMD expressam um peptídeo altamente conservado no domínio hipervariável do TCR de linfócitos T citotóxicos (CTLs), o que indica que uma resposta imune específica a um antígeno comum ocorre em muitos

pacientes [118]. Ainda que a participação de CTLs na patologia da DMD continue indeterminada, a depleção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em camundongos *mdx/mdx* promoveu redução nas lesões musculares em um estágio onde há grande infiltração inflamatória [73]. Além disso, a importância da perforina neste processo foi avaliada utilizando camundongos duplamente deficientes para distrofina e perforina, onde foi observada uma redução na necrose no músculo distrófico, sugerindo mais uma vez que linfócitos T citotóxicos atuem na DMD [119]. A perforina é uma proteína formadora de poros produzida principalmente por linfócitos T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  e células NK e estocada em grânulos citolíticos. Após a interação do linfócito com a célula alvo, ocorre a fusão desses grânulos com a membrana plasmática e liberação do seu conteúdo (perforina e granzimas) [120].

A expressão de moléculas co-estimulatórias necessárias para a expansão clonal e atividade de células T também foi demonstrada. A molécula ICOSL, um membro da família B7 de moléculas co-estimulatórias, pode promover a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> pela interação com o seu receptor ICOS presente na superfície do linfócito. Estudos mostraram um aumento da expressão de ICOS e ICOSL no tecido muscular de pacientes com DMD, o que favoreceria a ativação de linfócitos T citotóxicos [121]. Este trabalho relaciona ainda a expressão de ICOS/ICOSL com o tamanho dos infiltrados inflamatórios, onde foi observado que os maiores infiltrados inflamatórios eram encontrados nos pacientes com maior expressão dessas moléculas, sugerindo que a interação ICOS/ICOSL seria importante para a invasão do músculo por células inflamatórias [121].

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são descritos ainda como capazes de promover a patologia nos camundongos *mdx/mdx* por mecanismos indiretos como recrutamento de outras células inflamatórias, uma vez que a depleção dessas células reduziu a concentração de outras células inflamatórias como os eosinófilos [104].

A participação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na DMD também foi avaliada através da depleção desse tipo celular em camundongos *mdx/mdx* e essa depleção reduziu em torno de 60% o dano muscular [73]. O cruzamento de camundongos *mdx/mdx* com camundongos *nude* (deficientes em células T) contribuiu também para a avaliação do papel de linfócitos na distrofia, onde se observou fibrose muscular reduzida, sugerindo a participação de linfócitos também neste processo [122]. Este efeito pode ser direto pela liberação de fatores que propiciam a deposição de matriz extracelular, como TGF- $\beta$ , ou pelo recrutamento de outras células que atuem na formação da fibrose. Além disso, a transferência de esplenócitos de camundongos *mdx/mdx* para camundongos selvagens aumentou o dano muscular nos camundongos recipientes, sugerindo que

células inflamatórias do camundongo *mdx/mdx* possam transferir a doença para animais controle [104].

Muitos estudos em terapias para a distrofia muscular do tipo Duchenne baseiam-se na utilização de corticóides e os benefícios observados são devidos à imunossupressão. O tratamento com prednisolona decresceu significativamente as concentrações de células inflamatórias nos músculos esqueléticos deficientes em distrofina [11, 123]. Além disso, camundongos *mdx/mdx* tratados apresentam uma redução na expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos e células endoteliais, sugerindo que o efeito desse fármaco também se deve ao menor extravasamento de células inflamatórias para os músculos [123]. Há também trabalhos utilizando a ciclosporina como agente imunossupressor, onde se observa uma diminuição na fibrose e no dano muscular induzido por exercício nos camundongos *mdx/mdx* [124]. A melhora de pacientes com DMD e camundongos *mdx/mdx* induzida pela utilização de drogas imunossupressoras corrobora ainda mais a participação de células inflamatórias nas distrofinopatias.

### 1.7.3 Inflamação celular

Há diversos tipos celulares com importante atividade em diversas patologias, mas que ainda não foram avaliados nos tecidos musculares de pacientes com DMD ou em outros modelos da doença. Dentre estes tipos celulares podemos destacar as células T  $\gamma\delta$ , NKT e reguladoras CD4/CD25.

Os linfócitos T  $\gamma\delta$ , mais do que uma população especializada de linfócitos antígeno-específicos, formam uma população funcionalmente diferenciada de linfócitos  $\alpha\beta$ . Essa população pode ser dividida em três grupos. O primeiro é representado pelas células T  $\gamma\delta$  epidérmicas, onde todas as células desta subpopulação expressam o mesmo ou quase o mesmo TCR, que provavelmente reconhece moléculas próprias [125, 126]. O segundo grupo é representado por linfócitos T  $\gamma\delta$  presentes em pequenos números em alguns tecidos, incluindo o trato reprodutivo e os pulmões [127]. Esta subpopulação também apresenta um TCR invariante e durante a gravidez ou infecções aumentam bastante, formando uma população transitória [128]. O terceiro grupo envolve uma subpopulação expressando TCRs variáveis. Estas células estão presentes na circulação e em vários tecidos, formando uma população celular mista, porém pequena se comparada à de linfócitos T  $\alpha\beta$ . O número de células desta subpopulação varia com a idade e durante infecções [129].

Algumas funções já foram descritas para os linfócitos T  $\gamma\delta$  e estudos em modelos animais mostraram que mesmo uma pequena população destas células pode exercer grandes efeitos



biológicos reguladores. Estudos recentes demonstraram que este tipo celular é capaz de induzir maturação de células dendríticas via TCR-CD1 e interações Fas-FasL [130, 131]. Outros trabalhos indicam uma preferência de interação entre linfócitos T  $\gamma\delta$  e macrófagos, ainda que o mecanismo molecular desta interação seja desconhecido [132]. A participação desta população celular em diversas doenças infecciosas também já foi descrita. Na infecção por *L. monocytogenes* as células T  $\gamma\delta$  são responsáveis por regular a resposta inflamatória. Quando elas estão ausentes, o infiltrado inflamatório persiste e as lesões teciduais são mais severas [133]. Outros trabalhos mostram ainda uma atividade citotóxica dessa população sobre macrófagos peritoneais infectados com *Listeria*, os quais promovem a morte desses macrófagos após ativação [134], aparentemente através da interação Fas-FasL [134]. Huber e colaboradores iniciaram uma série de publicações utilizando o modelo murino de miocardite aguda induzida pela infecção pelo vírus *Coxsackie* do tipo B (CVB) e mostraram que a indução da patogenia depende de células T CD4<sup>+</sup> Th1 (IFN- $\gamma$ ), enquanto que as respostas com perfil de células T Th2 (IL-4<sup>+</sup>) estariam associadas a um perfil mais resistente à infecção. A modulação entre qual tipo celular seria prevalente requer a interação direta célula-célula e é mediada por atividade citotóxica dependente de Fas/Fas-L em células T  $\gamma\delta$  [135]. O grupo aprofunda suas pesquisas e propõe que estas células no coração possuem elevados níveis de Fas-L na sua superfície, promovendo a lise de células T CD4<sup>+</sup> Th2 específicas para o vírus. Desta maneira, com a morte desta população, haveria o predomínio da população de células T CD4<sup>+</sup> Th1 patogênica [135]. Sendo assim, os linfócitos T  $\gamma\delta$  representam uma população celular muito importante, podendo exercer função citotóxica ou reguladora, dependendo da subpopulação envolvida e de fatores como a secreção de moléculas solúveis e interações moleculares com outros tipos celulares.

As metaloproteases (MMPs) são um grupo de endopeptidases zinco-dependentes que possuem um papel central na modulação das funções da ECM e regulação inflamatória [136, 137]. As MMPs são responsáveis pela degradação da ECM durante o desenvolvimento embrionário, migração celular e remodelagem tecidual [68] e no processo de degeneração e regeneração do músculo esquelético ocorre extensa remodelagem da ECM. A expressão e atividade das MMPs são reguladas tanto ao nível de transcrição, por citocinas e fatores de crescimento, como ao nível pós-traducional, pela secreção dessas enzimas em formas latentes (pré-pró-MMP) e ativação de zimogênios (pró-MMP) por integrinas e proteases presentes tanto no meio extracelular como as associadas à membrana plasmática. Existe um balanço delicado entre a produção endógena de inibidores teciduais chamados TIMPs (inibidores de MMP no tecido) e a produção de MMP no microambiente, determinando a remodelamento fisiológico ou destruição patológica do tecido [138].

As MMP-9 (gelatinase A) e MMP-2 (gelatinase B) constituem as principais metaloproteases envolvidas no reparo do tecido muscular [138, 139]. A MMP-9 está associada com a migração de células inflamatórias incluindo polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e possivelmente à ativação de células satélites. Já a MMP-2 é constitutiva do tecido muscular, mas está aumentada durante o processo de regeneração do tecido [139]. Além disso, as MMP-2 e MMP-9 parecem estar envolvidas na progressão da doença em músculos esqueléticos de cães distróficos. A MMP-9 está envolvida predominantemente no processo inflamatório durante a degeneração muscular. Em contrapartida, a MMP-2, ativada no endomísio de grupos de fibras em regeneração, parece estar associada na remodelação da matriz durante a regeneração muscular e crescimento da fibra [137].

## **1.8 Cardiomiopatia nas distrofinopatias**

A cardiomiopatia gerada pela deficiência total ou parcial da distrofina refere-se às manifestações cardíacas de três doenças intimamente relacionadas, incluindo a DMD, distrofia muscular de Becker (BMD) e cardiomiopatia dilatada ligada ao X (XLDC). Diferentemente da DMD, onde não há expressão de distrofina funcional, a BMD se deve à expressão de uma proteína parcialmente funcional [140]. Já XLDC é causada pela perda seletiva da distrofina no coração [141]. Aproximadamente 1/3 dos pacientes com DMD mostram sinais de disfunção cardíaca a partir dos 10 anos de idade e praticamente todos os pacientes desenvolvem algum nível de dano cardíaco por volta dos 18 anos [48]. Com a melhora do suporte ventilatório, houve um aumento da sobrevivência dos pacientes com DMD, o que permitiu que os danos cardíacos fossem mais evidenciados [142]. Estudos mostram que 10-40% dos pacientes com DMD morrem por falência cardíaca e é estimado que a cardiomiopatia pode diminuir a expectativa de vida desses pacientes em até dois anos [143]. O envolvimento cardíaco é ainda mais prevalente em pacientes com BMD, onde a partir dos 40 anos mais de 90% desses pacientes desenvolvem sinais mais graves de dano cardíaco [144]. Esta alta incidência na BMD é considerada uma consequência natural do maior tempo de vida desses pacientes, permitindo que os sinais clínicos se desenvolvam [145]. Além do transplante cardíaco, tratamentos paliativos são os únicos disponíveis até agora [143, 146].

As alterações fisiológicas no coração de pacientes com DMD foram avaliadas em diversos artigos e estudos ecocardiográficos mostraram uma função sistólica normal dos ventrículos em pacientes com menos de seis anos [147]. Em pacientes mais velhos há um aumento na incidência de cardiopatia dilatada e em torno dos 18 anos, 98% apresentam alguma disfunção contrátil. O padrão dilatado é observado em 72% dos pacientes e o padrão hipertrófico em 26% [147].

Com relação ao camundongo *mdx/mdx*, poucos estudos foram feitos para avaliar os danos cardíacos causados pela ausência funcional da distrofina. Alguns trabalhos mostram que camundongos com idade inferior a 12 semanas apresentam pequenos e poucos focos degenerativos com inflamação limitada [148, 149]. A partir de 24 semanas de idade, o coração do *mdx/mdx* começa a mostrar necrose e fibrose moderadas e a patologia cardíaca mais relevante aparece em torno de 43 semanas [150, 151]. Outros estudos mostram ainda uma redução na força de contração a partir de 32 semanas, porém, aparentemente esta redução não é suficiente para alterar a função hemodinâmica do coração [151, 152]. Os sintomas de cardiopatia dilatada podem ser mais facilmente detectados em camundongos mais velhos, pois foram descritas alterações ecocardiográficas em camundongos com 40 semanas de idade, mostrando o coração hipertrofiado, com menor força de contração e menor frequência [151]. Este trabalho mostrou ainda que a fibrose afeta todas as regiões do ventrículo esquerdo e direito da mesma forma. Em experimentos com animais mais novos (16 semanas), Nakamura e colaboradores mostraram ainda um aumento na patologia do ventrículo direito induzida por exercício [153].

Os danos cardíacos são aparentemente mais extensos em pacientes DMD do que em camundongos *mdx/mdx*. Isso se deve provavelmente à fibrose cardíaca mais extensa nos pacientes quando comparada à fibrose no *mdx/mdx*. Estudos em autópsia de pacientes com DMD mostraram que 50 % ou mais do miocárdio foi substituído por fibrose ou tecido adiposo. Mesmo nos camundongos *mdx/mdx* mais velhos estudados (68 semanas) apenas 9% do músculo cardíaco foi ocupado por fibrose [154].

Desta forma, fica como um todo evidenciado que a resposta imune e infiltração inflamatória nos músculos esqueléticos e cardíaco são componentes muito importantes do desenvolvimento da doença, além do bloqueio funcional primário da distrofina. Neste trabalho buscamos então estudar aspectos inflamatórios relevantes da DMD que possam afetar a progressão da patologia, tais como as sub-populações de células inflamatórias e possíveis progenitoras que migram para os músculos em diferentes estágios da doença, produção de citocinas, atividade de MMPs e morte celular.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Analisar a possível participação de subpopulações celulares e fatores presentes no microambiente do músculo cardíaco e músculos esqueléticos na fisiopatologia da lesão do camundongo *mdx/mdx*.

### Objetivos específicos:

1. Quantificar da área dos tecidos ocupada por infiltrado inflamatório/fibrose no músculo cardíaco e músculos esqueléticos gastrocnêmio, solear e diafragma e quantificação de células inflamatórias e em regeneração;
2. Estudar as populações celulares inflamatórias presentes no músculo cardíaco e músculos esqueléticos gastrocnêmio, solear e diafragma em decorrência da progressão da doença:
  - 2.1 Analisar por citometria de fluxo as células inflamatórias linfóides e progenitoras presentes no tecido, tais como: linfócitos T $\alpha\beta$  CD4 e CD8, T  $\gamma\delta$ , plasmócitos, células NK, NKT, células progenitoras hematopoéticas e T reguladoras (CD25/CD4);
  - 2.2 Contagem, avaliação de subpopulações e da localização de mastócitos por coloração específica;
  - 2.3 Avaliar as células musculares em regeneração (NCAM<sup>+</sup>) e células progenitoras (Sca-1<sup>+</sup>) por imunohistoquímica nos músculos esqueléticos;
3. Analisar a atividade de metaloproteases nos músculos esqueléticos, relacionando com a expressão de miosina ATPase e produção de citocinas;
4. Estudar o padrão de morte celular através de fibras musculares e células inflamatórias no músculo cardíaco e músculos esqueléticos.

### 3 RESULTADOS

Título e autores:

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

Cristiane Bani, Msc,<sup>1</sup> Jussara Lagrota-Candido, Phd,<sup>2</sup> Douglas Florindo Pinheiro, Bsc,<sup>1</sup> Paulo Emilio Correa Leite, Msc,<sup>1</sup> Maria Cristina Salimena, Msc,<sup>2</sup> Andrea Henriques-Pons, Phd,<sup>3</sup> And Thereza Quirico-Santos, Phd<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ 24210-150, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

<sup>3</sup> Departamento e Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Metaloproteases de matriz (MMPs) são as principais moléculas reguladoras na formação, remodelamento e degradação dos componentes da matriz extracelular em ambos os processos fisiológicos e patológicos. Os músculos esqueléticos de camundongos distróficos *mdx/mdx* apresentaram padrões distintos de inflamação e regeneração, sugerindo que fatores do microambiente influenciam nas respostas adaptativas dos músculos com predomínio de fibras de contração rápida ou lenta. Este estudo teve como objetivo verificar o padrão de atividade das MMP nos músculos gastrocnêmio, solear e diafragma, correlacionando com a capacidade regenerativa em fases distintas da miopatia no camundongo *mdx/mdx*. O aumento de inflamação e mionecrose foi associado com um aumento da atividade de MMP-9 e produção de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa), enquanto a regeneração muscular, evidenciada pela expressão de NCAM (molécula de adesão celular neural) e atividade MMP-2, variou nas diferentes fases da doença. O músculo solear apresentou um alto percentual de miofibras NCAM-positivas na fase inicial da doença (2 semanas), enquanto que no músculo gastrocnêmio elas apareceram em 12 semanas e no diafragma em 24 semanas. O aumento da atividade MMP-2 no diafragma em todas as fases da doença sugere uma importante remodelação tecidual, o que provavelmente está associado com uma inflamação persistente. Os resultados indicam que os microambientes dos diferentes músculos esqueléticos podem influenciar no padrão particular de cinética da atividade de MMP, que em última instância favorece a inflamação persistente e regeneração de miofibras em diferentes fases da miopatia em camundongos *mdx/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- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha) 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,<sup>1</sup> JUSSARA LAGROTA-CANDIDO, PhD,<sup>2</sup>  
DOUGLAS FLORINDO PINHEIRO, BSc,<sup>1</sup> PAULO EMÍLIO CORREA LEITE, MSc,<sup>1</sup>  
MARIA CRISTINA SALIMENA, MSc,<sup>2</sup> ANDREA HENRIQUES-PONS, PhD,<sup>3</sup>  
and THERESA QUIRICO-SANTOS, PhD<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Immunobiology, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

<sup>3</sup> Department of Ultrastructure, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

Accepted 5 December 2007

**M**uscular 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.<sup>22</sup> 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.<sup>11</sup> Lack of dystrophin results in a weakened cell membrane that renders muscle fibers fragile and susceptible to injury and necrosis.<sup>2</sup> 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.<sup>3,37</sup> 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- $\alpha$ -converting enzyme; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha

**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.<sup>25</sup> Following injury, muscle satellite cells become activated and start to proliferate in order to repair the damaged area.<sup>13,32</sup> 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.<sup>8</sup> Myogenic satellite cells reside beneath the basal lamina of adult skeletal muscles closely juxtaposed to skeletal muscle fibers and account for 2%–5% of sublaminal 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.<sup>1,33</sup> Recent studies, however, have suggested that additional stem/progenitor cell populations may be recruited to participate in muscle regeneration and form functional myotubes.<sup>34</sup> 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.<sup>1,10</sup>

Extracellular matrix (ECM) components and matrix metalloproteases (MMPs) play an important role in the homeostasis and maintenance of myofiber functional integrity.<sup>4</sup> MMPs influence cell motility, cell–cell–matrix interactions, matrix degradation, and the release of bioactive signaling molecules.<sup>40</sup> 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.<sup>5,12</sup> 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  $\mu$ m 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.<sup>19</sup> Myosin–ATPase fiber typing at pH 9.4 was performed according to the method of Round et al.<sup>29</sup>

**Immunohistochemistry.** Cross-sections (5  $\mu$ m) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> 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 CaCl<sub>2</sub>, 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.,<sup>24</sup> 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 CaCl<sub>2</sub> 5 mM and ZnCl<sub>2</sub> 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.

Metalloproteases 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.<sup>38</sup> 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).<sup>21</sup> 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-alpha (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).

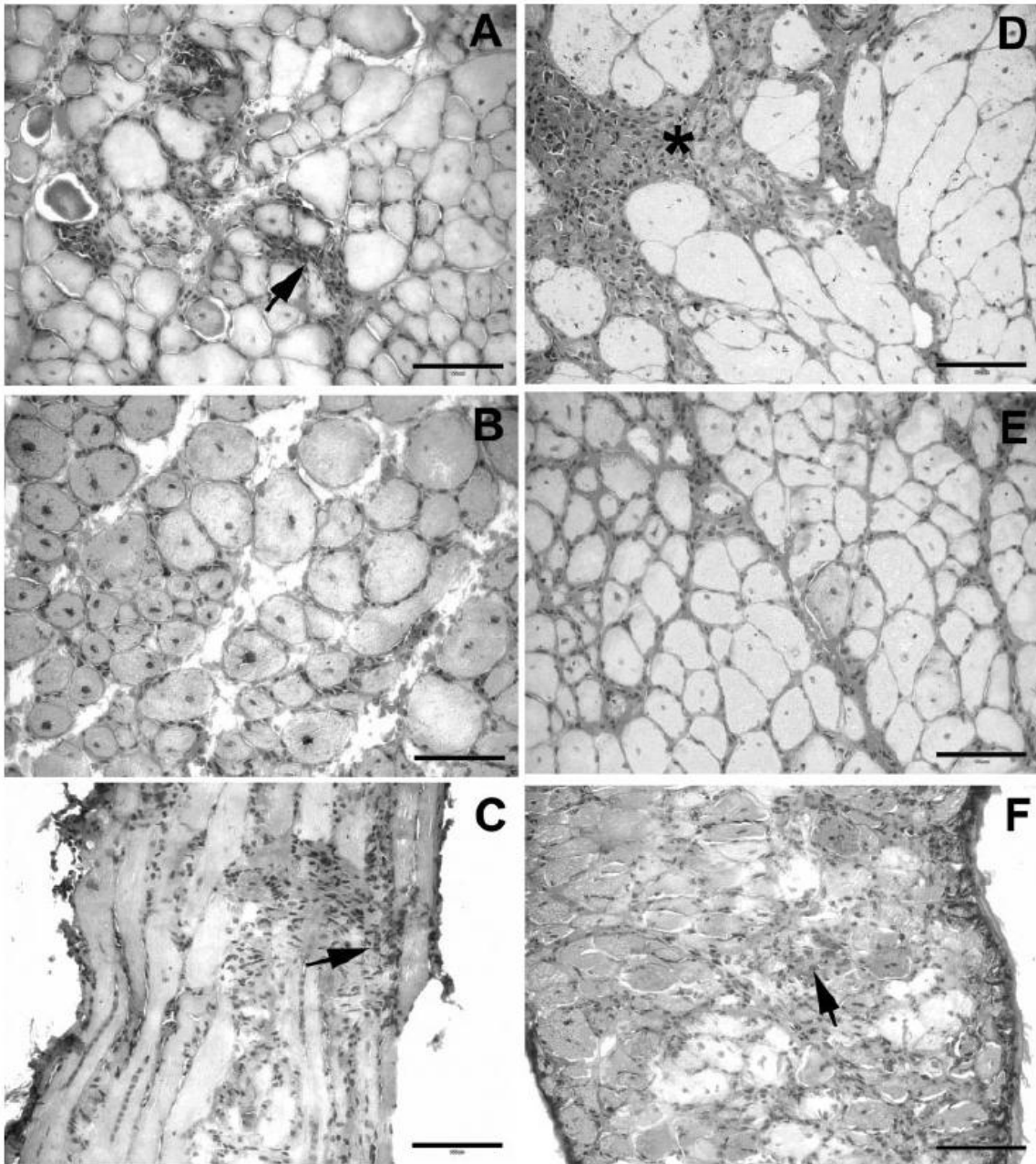
**Statistical Analysis.** Excel software (Microsoft, Seattle, Washington) was used to calculate means and standard deviations. Unpaired Student's *t*-test was applied to assess the level of statistical significance.

## 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  $\mu$ 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.<sup>15,42</sup> In a previous study, adult skeletal muscles of C57 mice showed few NCAM<sup>+</sup> cells,<sup>31</sup> whereas numerous niches of NCAM<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> was evident in the soleus at 2 weeks, with a consistent decline until 24 weeks. Gastrocnemius muscle showed increased numbers of NCAM<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells mainly associated with the inflammatory infiltrate and nearby myonecrosis in the gastrocnemius and soleus muscles. Moreover, in the diaphragm (Fig. 2), Sca-1<sup>+</sup> cells were distributed throughout the muscle.

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

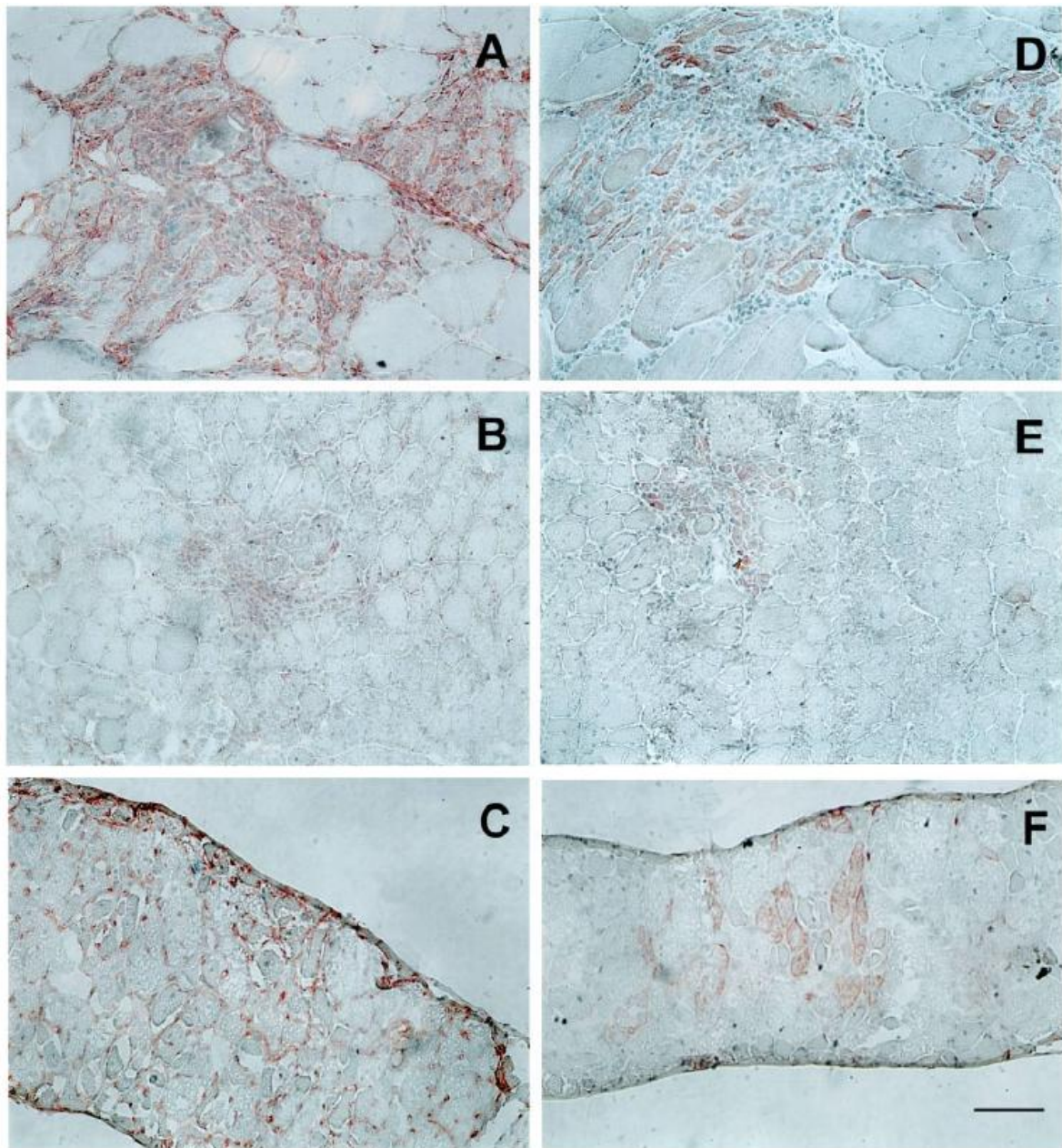
Regardless the stage of the disease, *mdx* soleus muscles showed fewer Sca-1<sup>+</sup> cells than any other muscle. At 6 weeks, *mdx* diaphragm presented higher numbers of Sca-1<sup>+</sup> cells per inflamed area than soleus and gastrocnemius. At 12 weeks, gastrocnemius and diaphragm showed countless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

**Western Blot of TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  antibody that identifies the 27-kDa membrane domain corresponding to the non-cleavage form.

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

C57 and *mdx* mice had a similar TNF- $\alpha$  membrane content in gastrocnemius and diaphragm muscles at 2 weeks. At 8 weeks, *mdx* mice showed a marked decrease in TNF- $\alpha$  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,

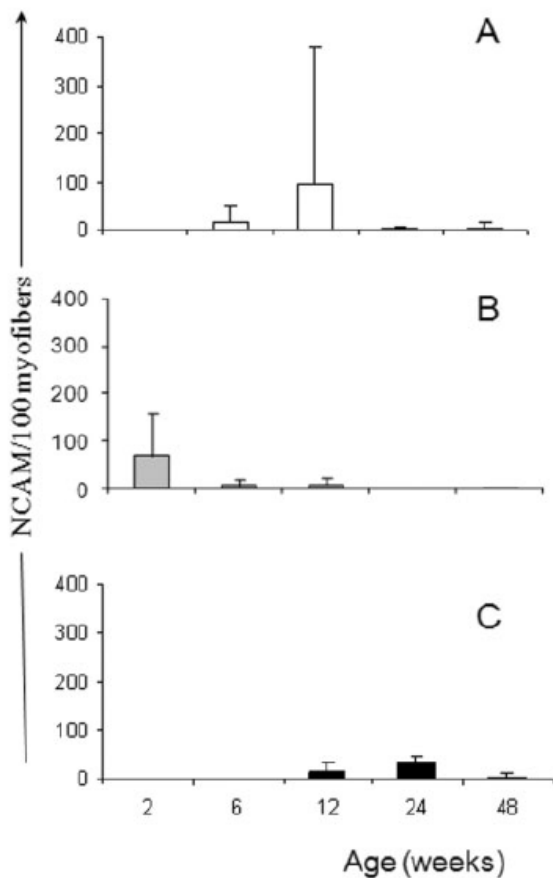


**FIGURE 2.** Presence of Sca-1 and NCAM<sup>+</sup> cells in cross-sections of *mdx* muscles. Immunolabeling for Sca-1 (A–C) and NCAM (D–F) in gastrocnemius (A, D), soleus (B, E), and diaphragm (C, F) muscles at 12 weeks of age. Bar = 100  $\mu$ m.

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.<sup>12</sup> Our data suggest that such features cannot be attributed entirely to fiber-type proportions and may be related in part

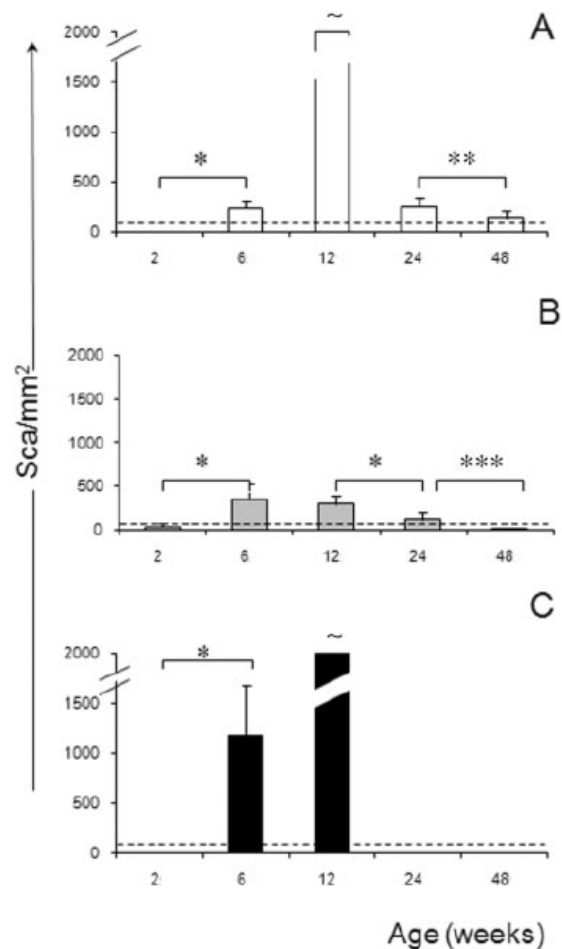


**FIGURE 3.** Quantitative image analysis of NCAM<sup>+</sup> cells in *mdx* muscles. Results are expressed as mean ( $\pm$  SD) of percentage of NCAM<sup>+</sup> cells in gastrocnemius (A), soleus (B), and diaphragm (C). The analysis was based on three animals per group.

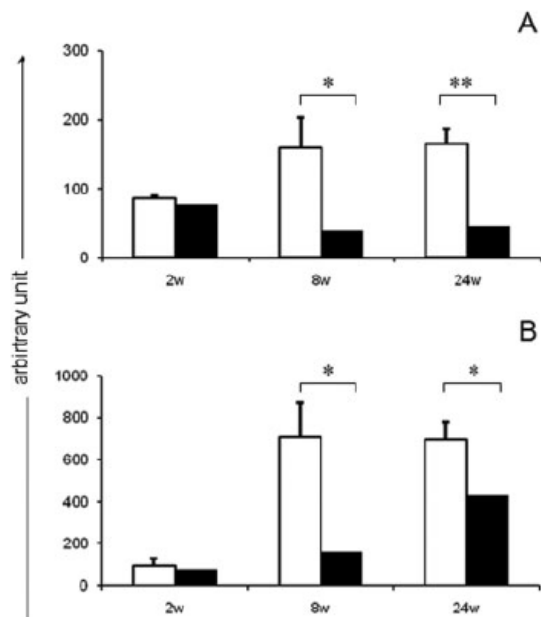
to characteristic properties of the muscle-fiber microenvironment. The ability to generate force and mechanical power, the time course of contractile response, and resistance to fatigue differ markedly among myofibers. As reported previously,<sup>3,9,14,28</sup> *mdx* gastrocnemius and diaphragm muscles 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.<sup>20</sup> Expression of NCAM is important for interactions of muscle cells during myogenesis and regeneration.<sup>30</sup> Soleus muscles had a high percentage of NCAM<sup>+</sup> 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.<sup>6</sup> Other stem cells also have the ability to convert into myogenic lineage and contribute to muscle regeneration.<sup>48</sup> Side population (SP) cells, present in most adult muscles, have a distinct molecular phenotype (Sca-1<sup>+</sup>) 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 mm<sup>2</sup> 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- $\alpha$  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. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ .

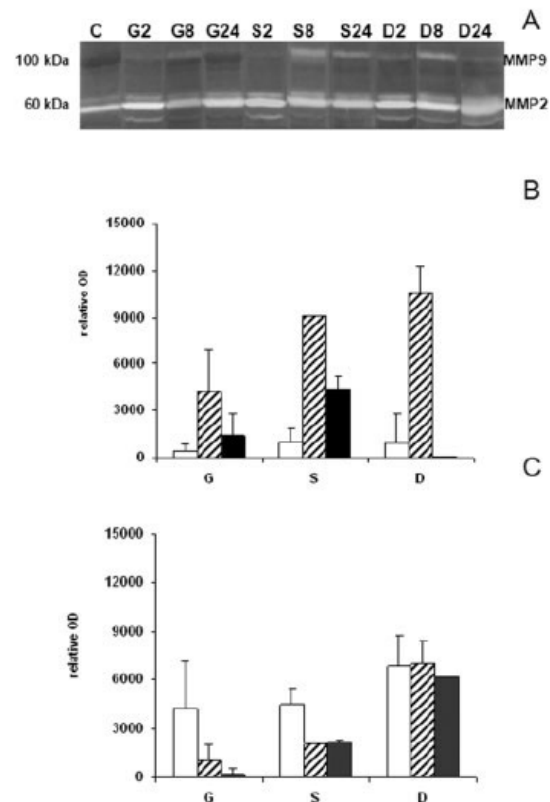
ing injury.<sup>126</sup> In the present work, we showed a marked increase of Sca-1<sup>+</sup> cells within areas of inflammation and muscular regeneration, mainly in *mdx* gastrocnemius and diaphragm muscles.

Recent evidence from a *p55*<sup>-/-</sup>*p75*<sup>-/-</sup> TNF-receptor double-knockout model indicates that TNF- $\alpha$  regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK intracellular signaling.<sup>7</sup> TNF- $\alpha$  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.<sup>39</sup> The protein exists as a 27-kDa membrane-bound precursor that can be processed by a TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) and MMP to generate 17-kDa, mature TNF- $\alpha$ .<sup>21,27</sup> The *mdx* diaphragm and gastrocnemius muscles showed decreased membrane TNF- $\alpha$ , suggesting intense inflammation and the release of soluble TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokine at 8 and 24 weeks. The similar content of 27-kDa TNF- $\alpha$  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.<sup>4</sup> MMP-9, produced mainly by inflammatory and activated satellite cells, influences stem-cell migration and homing of SP cells, especially on inflamed I-selectin-positive vessels of *mdx* muscles.<sup>21,36</sup>

High MMP-9 activity, concomitant with increased numbers of Sca-1<sup>+</sup> cells and TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> 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.<sup>21</sup> 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.<sup>35</sup> MMPs are responsible for the processing of  $\beta$ -DG<sub>43</sub> into  $\beta$ -DG<sub>30</sub> ( $\beta$ -dystroglycan), which leads to the disruption of the  $\alpha$ -DG/ $\beta$ -DG interaction.<sup>17</sup> 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 a Pesquisa do Rio de Janeiro). The authors thank Marcella d'Alincourt Salazar (Health Science Campus, University of Toledo, Toledo, Ohio) and Rosangela Lawrence (Washtenaw 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, Himpens 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- $\alpha$  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  $\alpha$ 2-deficient mice. *Neuromusc Dis* 2001;11:703-712.
- Dellavalle A, Sampaolesi 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, Charif 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-gamma 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 C, 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, Axiouis 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 C, 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.

Título e autores:

## MYOCARDITIS AND CARDIAC CELL DEATH IN *MDX/MDX* MICE

Bani C<sup>1</sup>, Cascabulho CM<sup>1</sup>, Côrte-Real SF<sup>2</sup>, Camila Guerra<sup>2</sup>, Quírico-Santos T<sup>3</sup>, Nagaraju Kanneboyina<sup>4</sup>, Hae Jae<sup>4</sup>, Beryl Arpong<sup>4</sup>, Henriques-Pons A<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos and <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Estrutural, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil, <sup>3</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói (RJ), Brasil; <sup>4</sup>Children's National Medical Center, Dpt. Of Genetic Medicine, Washington DC, USA.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia inflamatória ligada ao cromossomo X com degeneração muscular progressiva causada por mutações no gene da distrofina que levam à perda de função da molécula. Embora os músculos esqueléticos sejam mais severamente afetados pela doença e também mais estudados, o miocárdio também é afetado, embora mais tardiamente, e a insuficiência cardíaca leva à morte de 10-40% dos pacientes. Neste trabalho foram utilizados camundongos *mdx/mdx* (um modelo para a DMD) e avaliamos a resposta cardíaca inflamatória e seu efeito sobre a lesão tecidual. Nós observamos no tecido cardíaco populações celulares inflamatórias descritas anteriormente com atividade citotóxica, como os macrófagos, que principalmente compõem os focos inflamatórios, células T CD8<sup>+</sup>, células T  $\gamma\delta$  e mastócitos. No entanto, as células linfóides foram somente observadas em camundongos jovens (6 - 12 semanas de idade), muito antes do aparecimento da disfunção cardíaca. Além disso, células progenitoras hematopoéticas Sca-1<sup>+</sup> (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>/MAC-1<sup>-</sup>) também foram observadas principalmente em animais jovens. Curiosamente, encontramos em camundongos mais velhos (24 e 48 semanas) muitas células inflamatórias semelhantes a macrófagos que estão aparentemente mortos, por uma via necrótica. Para melhor avaliar a relevância inflamatória para o dano cardíaco, foram utilizados camundongos *mdx/mdx* deficiente em Myd88, uma molécula adaptadora que desempenha funções pró-inflamatórias importante na transdução de sinal desencadeada pela maioria dos receptores do tipo Toll, IL-1 e IL-18. No entanto, estes animais ainda apresentavam miocardite e características gerais do tecido semelhantes a camundongos *mdx/mdx*. Estes dados indicam que existe uma cinética inicial e bem definida no recrutamento e morte celular do tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx*, muito antes do aparecimento da disfunção cardíaca que pode afetar a patologia no coração.



## MYOCARDITIS AND CARDIAC CELL DEATH IN *MDX/MDX* MICE

Bani C<sup>1</sup>, Cascabulho CM<sup>1</sup>, Côrte-Real SF<sup>2</sup>, Camila Guerra<sup>2</sup>, Quírico-Santos T<sup>3</sup>, Nagaraju Kanneboyina<sup>4</sup>, Hae Jae<sup>4</sup>, Beryl Arpong<sup>4</sup>, Henriques-Pons A<sup>1#</sup>,

<sup>1</sup>Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos and <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Estrutural, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói (RJ), Brasil; <sup>4</sup>Children's National Medical Center, Dpt. Of Genetic Medicine, Washington DC, USA.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, inflammation, myocarditis, and cell death.

### AKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Mr. Generval Luciano for excellent technical assistance and Mr. Luis Lopes Carvalho for invaluable assistance in the pathological analysis.

# To whom correspondence should be addressed:

Andréa Henriques-Pons

Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz

Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos,

Rio de Janeiro (RJ); Brasil

Av. Brasil 4365, Manguinhos

21045-900

Tel: 055 21 2562 1319;

FAX: 055 21 2598 4577

e-mail: [andrea@ioc.fiocruz.br](mailto:andrea@ioc.fiocruz.br)

## ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked inflammatory myopathy with progressive muscle degeneration caused by loss of function mutations in the dystrophin gene. Although skeletal muscles are more severely damaged and studied, myocardium is ultimately affected and cardiac failure leads to the death of 10-40% of patients. In this work we used *mdx/mdx* mice (a model for DMD) and evaluated the cardiac inflammatory response and its effect on tissue damage. We observed that inflammatory cellular populations with previously described cytotoxic activity, such as macrophages, that mostly compose inflammatory foci, CD8<sup>+</sup> T cells,  $\gamma\delta$  T cells and mast cells are found in the heart. However, lymphoid cells were only observed in young mice (6 - 12 week old (wko)), long before the onset of cardiac dysfunction. Moreover, Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>/MAC-1<sup>-</sup>) were also mostly observed at early ages. Interestingly, we found in older mice (24 and 48 wko) that many macrophage-like inflammatory leukocytes were dead, apparently through a necrotic pathway. To further evaluate the inflammatory relevance for cardiac damage, we used *mdx/mdx* mice deficient in Myd88, an adaptor molecule that plays important pro-inflammatory roles in the signal transduction triggered by most Toll like receptors, IL-1 and IL-18. However, these mice still presented myocarditis and general tissue characteristics of *mdx/mdx* mice. These data indicate that there is a well defined and early kinetic of cellular recruitment and death in the cardiac tissue of *mdx/mdx* mice, long before the onset of cardiac dysfunction that may affect the cardiac pathology.

## INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive disease caused by mutations in the dystrophin gene, a key component of the subsarcolemmal glycoprotein complex of muscle cells that provides structural support to plasma membranes. *Mdx/mdx* mice, a widely used model for DMD, also develop the dystrophinopathy, with genetic and biochemical characteristics similar to human disease. However, *mdx/mdx* mice develop a non-fatal phenotype of the pathology, with muscle mechanical function less seriously compromised. The absence of dystrophin renders dystrophic skeletal muscle fibers susceptible to death, leading to secondary inflammation and amplification of damage. It is not clear why in the DMD there is a more pronounced skeletal injury, while other functionally less extensive mutations in the same gene affect mostly the cardiac muscle, such as Becker muscular dystrophy and X-linked dilated cardiomyopathy. The difference in the progression of DMD pathology in both muscles may be at least partially due to structural differences in the T tubules, sarcoplasmic reticulum, triad and diad organization, and mechanical susceptibility to distress. Moreover, in the cardiac tissue, dystrophin is not restricted to costamers, unlike skeletal muscles, but it is distributed in the sarcolemma (Stevenson et al. 1997).

The primary cause of the dystrophinopathy is the death of muscle fibers in both skeletal and cardiac muscles, either by the disruption of the sarcolemma or by secondary damage induced by the chronic inflammatory reaction. Inflammatory foci in skeletal muscles of patients and *mdx/mdx* mice are described as mostly composed by macrophages, although  $\alpha\beta$  T cells (Spencer et al. 2000) and granulocytes have also been observed (Cai et al. 2000, Granchelli et al. 1994). All these sub populations have already been described as cytotoxic cells in DMD. To date,  $CD8^+$ /perforin<sup>+</sup> T lymphocytes are enriched at the onset of histologically detectable skeletal muscle pathology and ICOS/ICOS-L are increased in perymysial and connective tissue in DMD. Moreover, antibody-dependent depletion of

macrophages and functional blockage of mast cells with sodium cromoglycate prevented muscle membrane injury *in vivo*. On the other hand, it is not known which cytotoxic cellular populations and molecular pathways induce cardiomyocytes death. It is generally accepted that necrosis is the main pathway that leads to skeletal muscle fibers death, however this is not well defined in the cardiac tissue.

The damage in skeletal muscle fibers leads to tissue regeneration, which is mostly based on satellite cells, hematopoietic stem/progenitor cells and pericyte. Conversely, it was published that the cardiac muscle also has a resident population of regenerative cells (side population) (Clamuleau et al. 2009), although less understood.

This work aimed to identify cardiac inflammatory leukocytes with potential cytotoxic activity and death of cardiac cells. The data presented herein indicate that there is a particular kinetic of myeloid and lymphoid cells recruitment, and death, to the cardiac tissue in response to initial cardiomyocytes damage.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals:*

Male *mdx/mdx* and age-matched male C57BL/10 control non-dystrophic mice were purchased from Breeding Laboratory Animal Center at Fundação Oswaldo Cruz and *mdx/mdx/Myd88<sup>-/-</sup>* were bred and maintained at the animal facility of Children's National Medical Center, Washington DC, USA. Mice were kept under environmental factors and sanitation conform to guide for the Care and Use of Laboratory Animals (DHEW publication No. [NIH] 80-23). This project was approved by Fiocruz Committee of Ethics in Research (0308/06), according to resolution 196/96 of the National Health Council of Brazilian Ministry of Health. Mice were studied at ages: 2, 6, 12, 24 and 48 week old (wko), as indicated.

### *Histopathological analysis:*

Mice were euthanized using a CO<sub>2</sub> chamber and both ventricular and atrial regions of the hearts were collected. OCT-embedded (Sakura, Torrance Ca) cardiac samples were then frozen and further processed in cryostat sections, as follows: 1) 10 µm thick for hematoxylin-eosin (H&E) staining or 2) 18 µm thick for mast cells identification. To evaluate the extension of myocardial damage (inflammation/fibrosis), the percentage of injured areas was measured by delimiting the edges of affected regions in relation to the whole tissue in each microscopic field (at least 100 campi/time point) using the software Scion Program (National Institutes of Health Image Program, USA). For mast cells evaluation, all samples were stained using a solution of alcyan blue 0.36% (Sigma Chem. Co, Missouri, USA), safranin 0.02% and toluidine blue 0.01% (Sigma), pH 1.42. According to this procedure, mast cells can be classified as alcyan blue (AB) positive cells (mucosal mast cells (MMC) identified in blue and rich in chondroitin sulfate) or safranin (S) and toluidine blue (TB) positive mast cells (connective tissue mast cells (CTMC) identified in brown with S and purple with TB and rich in heparin) . Combinations of these colors are referred as hybrid mast cells. The quantification is representative of three slices collected from each of at least three individual mice/time point and is indicated as the number of mast cells/slice.

### *Structural and ultrastructural analysis:*

1-2 mm fragments of cardiac tissue were fixed for 1 h at 4°C with 2.5% glutaraldehyde 0.01 M (Sigma) in cacodylate buffer, pH 7.2, and rinsed with the same buffer. The fragments were then post-fixed for 30 minutes in a solution containing 1% OsO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany), 0.8% potassium ferricyanide (Sigma), and 5mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1M cacodylate buffer (Sigma), dehydrated in acetone, and embedded in epon (Merck). Semi-thin

sections (400µm) were collected on slides, stained with Toluidin blue solution (1%), mounted using Permount (Sigma) and observed using a light microscope Axioplan 2 (Zeiss, Germany). Ultra-thin sections (70 nm) were collected on copper grids, stained with 2% aqueous uranyl acetate, and observed under a Zeiss EM-10 (Zeiss) transmission electron microscope.

*Immunohistochemistry (IHC):*

Muscle cross sections 10 µm thick were mounted on poly-L-lysine pre-coated glass slides and air-dried. Thus endogenous peroxidase activity was blocked with a solution of 3% hydrogen peroxide in phosphate buffered saline (PBS) (Sigma) for 5 minutes. Sections were then rinsed for 20 min in PBS and incubated for 20 min with diluted normal inactivated goat serum to block Fcγ receptors. Mac-1<sup>+</sup> cells were visualized using optimal concentration of monoclonal rat IgG anti-CD11b mAb (Southern, Birmingham, AL) after incubation for 60 min at room temperature in a moist chamber. Slides were then washed in PBS for 15 min and incubated for 40 min with peroxidase-conjugated anti-rat secondary antibody (Dako Cytomation, Denmark). Peroxidase activity was revealed with 3, 3'-diaminobenzidine in chromogen solution (Dako Cytomation) and sections were rinsed with PBS and counterstained with Mayer's hematoxylin for 1 min.

*Inflammatory cells harvesting:*

Hearts from *mdx/mdx* mice were collected, cut in fragments of 1-2 mm in ice cold PBS and extensively washed to avoid contamination with blood cells. Fragments were then transferred to a solution of collagenase type IA 0.2% (Sigma, Lot 035K8636, 277 units/mg solid) and submitted to 4-5 cycles of enzymatic digestion in soft agitation for 20 minutes at 37°C. Isolated cells were centrifuged and immediately transferred to cold RPMI (Sigma) plus 10% of fetal calf serum (FCS) (Sigma) and maintained in ice. Cellular debris were removed by

FCS centrifugation at 25 xg/5 min and, before phenotypic labeling, the cells were incubated for 20 min at 4°C with 10% solution of inactivated normal sheep serum.

To control the possible contamination of cardiac cells with blood cells during enzymatic dissociation, we labeled all samples with anti CD62-L (Southern) and discarded the cells when CD62-L<sup>high</sup> were more than 5% of events in flow cytometry.

*Flow cytometry:*

For phenotypic analysis by flow cytometry, we investigated the following cellular populations: NK and NKT cells, CD3-PE/NK1.1-FITC; T cells, CD4-PerCP/CD25-PE/CD8-FITC;  $\alpha\beta$  T cells, CD3-FITC/CD8-CyChrome/CD4-PE;  $\gamma\delta$  T cells, CD4-PerCP/ $\gamma\delta$ -PE (Southern)/CD8-FITC; hemotopoietic progenitor cells, Sca-1-PE/CD4-PerCP/CD8-FITC/MAC-1-FITC and Sca-1-PE/CD117-FITC/CD45R-TC (Caltag, Carlsbad, CA). All antibodies were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA), except when indicated. Incubations were carried out in ice cold RPMI medium (Gibco, Eugene Oregon) supplemented with 10% FCS (Sigma) in ice for 30 minutes. Samples were then washed twice and fixed with formaldehyde 2% in PBS until acquisition in a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data analysis was performed using CellQuest software version 3.2 (Becton Dickinson) and was always performed in the morphological gate excluding cellular debris and aggregates (R1). To avoid errors generated by the gating steps in Fig. 7C, we considered R1 as 100% of events and opened a dot plot of CD4/CD8 (both in FL-3) x MAC-1 (FL-1) in R1 to select triple negative events (R2), since T cells and some myeloid mature cells can be Sca-1<sup>+</sup>. Finally, we opened a histogram of Sca-1 labeling in R2, delimited positive events with a marker and used the formula:

$$\% \text{ Sca-1}^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^-/\text{MAC-1}^- \text{ in R1} = \% \text{ Sca-1}^+ \text{ in R2} \times \% \text{ of triple negative in R2}/100.$$

For example: among 10000 events saved, only 30% were individual/viable cells in R1  $\Rightarrow$  (dot plot in R1) 61.5% were triple negative cells in R2  $\Rightarrow$  (histogram in R2) 27.4% of cells Sca-1<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>/MAC-1<sup>-</sup>, but 27.4% of 61.5% = 16.9%.

*Statistical analysis:*

Using the Software SPSS version 8.0, Students t test was used to compare two sets of data and p values are indicated in figure legends.



## RESULTS

In the cardiac H&E staining of *mdx/mdx* mice we observed very few inflammatory foci and fibrotic areas, even in older mice, never exceeding 7% of the whole tissue (data not shown). The cells composing inflammatory foci were mostly macrophage-like cells and there were some apparently lymphoid cells throughout the tissue, not necessarily grouped with other cells. We therefore decided to isolate these leukocytes from the cardiac tissue and analyze the lymphoid populations by flow cytometry. We observed no relevant numbers of NK, NKT, CD4/CD25 or CD8/CD25 regulatory T cells or plasma cells in the myocardium (less than 0.1%). However, we observed predominantly CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> over CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells mostly in 6wko mice, decaying to basal levels with the development of the pathology (Fig. 1A). Moreover, there was a single peak of  $\gamma\delta$  CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> double negative T cells that was found only in 12 wko mice (12%), concomitant with the reduction of  $\alpha\beta$  T cells (Fig. 1B). Regarding general hematopoietic progenitor cells Sca1<sup>+</sup>/MAC-1<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, we also observed an enrichment in 6 wko mice (30%) that decreased to 24% in 12 wko mice (Fig. 1C). Further investigation of the phenotype of these cells showed a peak of B220<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup> cells in 6 wko mice (36% of Sca-1<sup>+</sup> cells), followed by a peak of B220<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> cells in 12 wko mice (58%) and B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> cells in 24 and 48 wko mice (56.8% and 32.8% , respectively) (Fig. 1D).

As mast cells were previously described as important myeloid cells in DMD, we also evaluated these cells using a staining procedure that discriminates different phenotypes of mast cells (Meuser-Batista et al. 2008). Qualitative analysis of mast cells revealed peculiar fluctuations in general number, phenotypic stages and localization according to the mice age (Table 1). C57Bl/10 mice showed mostly pericardial MMC and some CTMC in endocardium/perivascular areas at all time points. In 2 wko *mdx/mdx* mice we also found predominantly MMC in pericardium, although 6wko mice had predominantly CTMC in

endocardium/perivascular areas (Fig. 2A and Table 1). This could be the result of pericardial MMC migration toward internal areas of the tissue, while acquiring CTMC phenotype, or the chemotaxis of distinct populations to the heart. In 12 wko mice we found a reduced number of mast cells distributed in different cardiac regions and stages (Fig. 2B and Table 1) and in 24 and 48 wko mice we found again predominantly MMC in pericardium (Table 1). Apparently there was another wave of phenotypic alteration to endocardial regions in 48 wko, increasing from 0.5 CTMC/slice in 24 wko to 3.3 in 48 wko mice (Table 1).

For macrophages evaluation we labeled cardiac tissue slices with anti Mac-1 (Fig. 2C and 2D) and F4/80 (data not shown) and observed many macrophages composing the few inflammatory foci observed, specially in 6 and 12 wko mice (Fig. 2C and 2D). However, a very weak labeling was consistently observed in all tissue samples from 24 and 48 wko mice (data not shown). This observation prompted us to evaluate in more details the general structure of the tissue and specially the morphology of inflammatory cells regarding characteristics of cell death. We observed in the tissue a progressive accumulation of extracellular matrix within inflammatory foci, perivascular edema, death of cardiomyocytes and fibrosis (Fig. 3A-D). Importantly, we observed some inflammatory cells with apparently fragmented and/or uncoiled chromatin with no identifiable cytoplasmic structures or plasma membrane (Fig. 3C, 3C insert, and 3D). Conversely, the death of muscle fibers was evaluated through the release of creatine kinase to blood, using skeletal (Fig. 3E) and cardiac (Fig 3F) isotopes of the enzyme, as a marker of sarcolemmal disruption. These data confirm that at least part of the cardiomyocytes also die by necrosis.

To further evaluate the indications of inflammatory cells death, we used electron microscopy and observed normal non muscular cells in the endomysium with direct cell-cell contact with cardiomyocytes in 6 wko *mdx/mdx* mice (Fig. 4A). Some of the muscle fibers exhibited cytoplasm edema (Fig. 4B and insert) and mitochondria apparently damaged in 12

wko mice. Most importantly, in 24 wko mice, there were many inflammatory cells with peculiar nuclei, showing chromatin degraded and/or with micro regions that seemed hypercoiled (Fig. 4C and 4D), although usually with nucleolus. We were frequently unable to identify intact organelles or they appeared to assume altered characteristics, as nuclear edema (Fig. 4E), suggesting non functional structures. Mostly in 24 and 48 wko *mdx/mdx* mice, we observed many inflammatory cells with lipid bodies (lipofuscin) distributed throughout the cytoplasm (Fig. 4F and 4G). These structures were apparently fusing with each other and occupying extensive portions of the cell. Plasma membranes were also frequently disrupted, with non apoptotic characteristics, such as apoptotic bodies or peculiar chromatin condensation, for example (Fig. 4H and 4I).

To evaluate the inflammatory relevance for cardiac damage, we used *mdx/mdx* mice deficient in Myd88, an adaptor molecule that plays important pro-inflammatory roles in the signal transduction triggered by most Toll like receptors, IL-1 and IL-18. However, we observed general tissue characteristics similar to *mdx/mdx* mice and, most importantly, still inflammatory infiltration. This result limited the main goal of these experiments but revealed that Myd88-dependent inflammatory pathways do not seem to play important roles in the myocarditis of *mdx/mdx* mice.

## DISCUSSION

Different from myocarditis of other etiologies (Henrique-Pons et al 2002, Huber et al., 2002, Jane-Wit et al 2006) many inflammatory aspects are not clear in DMD, such as the relevance of the inflammatory response to muscle damage and why the cardiac pathology is milder than the skeletal disease. In this work we aimed to study general cardiac leukocyte populations and morphological alterations in the tissue that could indicate the pathways of cardiomyocytes death. However, we observed that inflammatory cells also die through necrotic-like pathways and we are still investigating what molecular pathways might lead to this death and whether it is implicated in the aggravation or not of the cardiac function.

Very recent data from the literature show the involvement of inflammasome activation in the pyronecrosis, a cell death pathway observed in macrophages that is independent of pro-apoptotic caspases and with morphological characteristics of necrosis. Inflammasomes are multiproteic complexes activated by endogenous or exogenous danger signals that are composed by different protein families. Pyronecrosis is known to be dependent on NLRP3 (cryopyrin), ASC, Cathepsin B, and others and is frequently observed in monocytes from patients with CAPS (*CIAS1-associated periodic syndrome*), for example. These patients have mutations in the coding gene for NLRP3 (*NLRP3/CIAS1*). However, at this point we can only speculate whether pyronecrosis or regular necrosis are the main pathways of cardiac inflammatory cells death.

If there is activation of inflammasomes in the myocardium, this leads to the release of IL-1 and IL-18 and we used *mdx/mdx/Myd88<sup>-/-</sup>* mice to evaluate whether these cytokines would affect the myocarditis. Myd88 is an adaptor molecule that participates in the signal transduction pathway of both IL-1 and IL-18, but also most Toll like receptors. However, these mice also had cardiac inflammatory infiltration, although with cells apparently damaged composing inflammatory foci. Additional experiments are necessary to clarify the role of

possible nucleosome activation in cardiac inflammatory cells death and the relevance of IL-1 and IL-18 in this regulation.

Another possibility for inflammatory cells death could be the production of reactive oxygen species (ROS), since we observed in electron microscopy an accumulation of lipofuscin in cardiac inflammatory cells, as observed in skeletal muscle by others (ref). Moreover, macrophages are documented as great producers of ROS. Lipofuscin is normally produced by the oxidative degradation of macromolecules by ROS and redox-active metal ions and is usually associated to ageing in normal humans and mice. In chronic inflammation, locally produced NO<sup>•</sup> levels can be very high, resulting in the availability of large amounts for further reaction with oxygen or superoxide radical to generate additionally highly reactive species. Besides, NO<sup>•</sup>, peroxynitrite, and others can induce damage to mitochondria, loss of cell membrane integrity, cellular death, inhibition of DNA synthesis. As long as NO<sup>•</sup> can freely traverse cell membranes, it may also affect cardiac cells in the vicinity of inflammatory foci as recently observed. On the other hand, increased levels of NO observed in nNOs transgenic *mdx/mdx* mice prevented fibrosis and myocarditis (Wehling-Henricks et al, 2005). This could be the result of higher amounts of NO since birth, different from the natural progression of myocarditis in non transgenic *mdx/mdx* mice.

Regarding lymphoid populations and Sca-1<sup>+</sup> progenitor cells in the heart, we observed that αβ T lymphocytes and hematopoietic progenitor cells were mostly observed in 6 wko *mdx/mdx* mice and decreased thereafter, however, γδ T cells were only found in 12 wko mice. This coordinated initial kinetic of lymphoid cells migration may affect the next generation of cardiac inflammatory leukocytes and even the natural response of cardiomyocytes facing the local inflammation. Lymphocytes play important roles in chemotaxis, cytotoxicity, secretion of cytokines and chemokines and therefore potentially exert immune regulation. To date, in coxsackievirus B3-induced lethal myocarditis, the heart is enriched in pathogenic CD4<sup>+</sup> Th1

over Th2 cells in BALB/c. However, using *gld/gld* (Fas-L<sup>-/-</sup>) infected mice, the authors concluded that inflammatory  $\gamma\delta$  T cells were cytotoxic against those protective Th2 cells through Fas/Fas-L interaction, since Fas-L<sup>-/-</sup> mice had a milder infection enriched in Th2 cells. This illustrates the importance to discern cell types in acute or chronic diseases, trying to correlate to their possible roles in the development of the pathology. We are now isolating the leukocytes found in the cardiac tissue for in vitro cytotoxic assays against cardiomyocytes in culture.

Regarding Sca-1<sup>+</sup> progenitor cells, we observed three waves of cells with distinct CD45R and CD117 phenotypes, and it is necessary to perform adoptive transfer of these purified sub populations and trace these cells to evaluate if they are committed to regeneration and to which cell types.

We therefore consider that the evaluation of molecular and cellular pathways involved in cellular recruitment in DMD myocarditis may reveal important immunoregulatory vias with therapeutic relevance.

## **FINANCIAL SUPPORT**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz

## LEGENDS

Figure 1: *Flow cytometry analysis of cardiac lymphoid and progenitor cells*: Hearts were collected from C57Bl/10 (white symbols) or *mdx/mdx* mice (black symbols) and dissociated using collagenase for identification of CD3/CD4 and CD3/CD8 T cells (A),  $\gamma\delta$  T cells (B) or progenitor hematopoietic Sca-1<sup>+</sup>/MAC-1<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> cells (C). Sca-1<sup>+</sup> cells were discerned according to the expression of B220 (CD45R) and CD117 (c-Kit) (D) on indicated time points. (A) When comparing: CD4 cells (24 wko with 12 wko) - # means P<0,05 and (24 wko with 6 wko) - \* means P<0,01; CD8 cells (24 wko with 6 wko) - @ means P< 0,05. (B and D) # Means P<0,05 and \* means P<0,01 when comparing with previous age or as indicated (C). Results are representative of at least three mice per time point.

Figure 2: *Cardiac mast cells and macrophages identification*: Cardiac slices from 6 (A) and 12 (B) wko *mdx/mdx* mice were stained with alcyan blue/safranin/toluidin blue solution to identify mucosal (MMC) (blue), hybrid (blue/brown) or connective tissue mast cells (CTMC) (brown). Cardiac samples from 6 (C) and 12 (D) wko *mdx/mdx* mice were also incubated with anti MAC-1. Results are representative of at least three mice per time point. Magnification 200x.

Figure 3: *General architecture and cellular composition of inflammatory foci*: Cardiac fragments were collected from 6 (A), 12 (B), 24 (C) and 48 wko (D) *mdx/mdx* mice, embedded in Epon, and further processed for light microscopy analysis after toluidin blue staining. General characteristics as: edema (e) and dead cells (double-line arrow) (insert) were identified in at least three mice per time point. Bar = 20 $\mu$ M. Creatine kinase activity was evaluated in serum for the skeletal (E) and cardiac (F) isotypes.

Figure 4: *Ultrastructural analysis of cardiac tissue*: Cardiac fragments were collected from 6 (A), 12 (B) 24 (C – G) and 48 wko (H and I) *mdx/mdx* mice and processed for electron microscopy analysis. The following markers were used: thin arrows – muscle cell edema; arrowheads – nuclei with micro regions of hyper coiled chromatin; asterisk – nuclear edema; large arrows – lipofuscin accumulation and # - lipofuscin granules fusion. Results are representative of at least three mice per time point. Bar = 5 $\mu$ M

Figure 5: *Histopathological analysis of mdx/mdx/Myd88<sup>-/-</sup> mice*: 2 (A), 4 (C) and 8 (E) month old *mdx/mdx* and *mdx/mdx/Myd88<sup>-/-</sup>* 2 (B), 4 (D) and 8 (F) mice were euthanized and the hearts collected for hematoxylin-eosin staining. Results are representative of at least three mice per time point. Magnification 200x.



## REFERENCES

- Boland, B., Himpens, B., Deneff, J.F., Gillis, J.M., 1995. Site-dependent pathological differences in smooth muscles and skeletal muscles of the adult mdx mouse. *Muscle Nerve* 18, 649-657.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 424, 37-49.
- Burney, S., Tamir, S., Gal, A., Tannenbaum, S.R., 1997. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. *Nitric Oxide* 1, 130-144.
- Cai, B., Spencer, M.J., Nakamura, G., Tseng-Ong, L., Tidball, J.G., 2000. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am J Pathol* 156, 1789-1796.
- Chamuleau SA, Vrijisen KR, Rokosh DG, Tang XL, Piek JJ, Bolli R. 2009 Cell therapy for ischaemic heart disease: focus on the role of resident cardiac stem cells. *Neth Heart J*. May;17(5):199-207.
- Connolly, A.M., Keeling, R.M., Mehta, S., Pestronk, A., Sanes, J.R., 2001. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin alpha2-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 11, 703-712.
- De Luca, A., Nico, B., Liantonio, A., Didonna, M.P., Fraysse, B., Pierno, S., Burdi, R., Mangieri, D., Rolland, J.F., Camerino, C., Zallone, A., Confalonieri, P., Andreetta, F., Arnoldi, E., Courdier-Fruh, I., Magyar, J.P., Frigeri, A., Pisoni, M., Svelto, M., Conte Camerino, D., 2005. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol* 166, 477-489.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., Li, S., Belicchi, M., Peretti, G., Chamberlain, J.S., Wright, W.E., Torrente, Y., Ferrari, S., Bianco, P., Cossu, G., 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9, 255-267.
- Granchelli, J.A., Avosso, D.L., Hudecki, M.S., Pollina, C., 1996. Cromolyn increases strength in exercised mdx mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 91, 287-296.
- Henriques-Pons, A., Oliveira, G.M., Paiva, M.M., Correa, A.F., Batista, M.M., Bisaggio, R.C., Liu, C.C., Cotta-De-Almeida, V., Coutinho, C.M., Persechini, P.M., Araujo-Jorge, T.C., 2002. Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol* 83, 67-79.
- Huber, S., Shi, C., Budd, R.C., 2002. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *J Virol* 76, 6487-6494.

- Jane-wit, D., Tuohy, V.K., 2006. Autoimmune cardiac-specific T cell responses in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 112, 2-6.
- Kamogawa, Y., Biro, S., Maeda, M., Setoguchi, M., Hirakawa, T., Yoshida, H., Tei, C., 2001. Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload in vivo. *Cardiovasc Res* 50, 509-515.
- Lattin, J., Zidar, D.A., Schroder, K., Kellie, S., Hume, D.A., Sweet, M.J., 2007. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol*.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.
- Meuser-Batista M, Correa JR, Soares MJ, Henriques-Pons A. 2008 Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue & Cell*,40(5):309-16
- Morrison, J., Palmer, D.B., Cobbold, S., Partridge, T., Bou-Gharios, G., 2005. Effects of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the mdx mouse. *Am J Pathol* 166, 1701-1710.
- Nakae, Y., Stoward, P.J., Kashiyama, T., Shono, M., Akagi, A., Matsuzaki, T., Nonaka, I., 2004. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J Mol Histol* 35, 489-499.
- Nakamura, A., Yoshida, K., Takeda, S., Dohi, N., Ikeda, S., 2002. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett* 520, 18-24.
- Nakano, T., Sonoda, T., Hayashi, C., Yamatodani, A., Kanayama, Y., Yamamura, T., Asai, H., Yonezawa, T., Kitamura, Y., Galli, S.J., 1985. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 162, 1025-1043.
- Ogata, H., Nakatani, S., Ishikawa, Y., Negishi, A., Kobayashi, M., Ishikawa, Y., Minami, R., 2007. Myocardial strain changes in Duchenne muscular dystrophy without overt cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 115, 190-195.
- Radley, H.G., Grounds, M.D., 2006. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol Dis* 23, 387-397.
- Sammels, L.M., Bosio, E., Fragall, C.T., Grounds, M.D., van Rooijen, N., Beilharz, M.W., 2004. Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation* 77, 1790-1797.
- Schmidt, J., Rakocevic, G., Raju, R., Dalakas, M.C., 2004. Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity. *Brain* 127, 1182-1190.

- Sewry, C.A., Taylor, J., Anderson, L.V., Ozawa, E., Pogue, R., Piccolo, F., Bushby, K., Dubowitz, V., Muntoni, F., 1996. Abnormalities in alpha-, beta- and gamma-sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6, 467-474.
- Somersan, S., Bhardwaj, N., 2001. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol* 155, 501-504.
- Spencer, M.J., Marino, M.W., Winckler, W.M., 2000. Altered pathological progression of diaphragm and quadriceps muscle in TNF-deficient, dystrophin-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 10, 612-619.
- Spencer, M.J., Walsh, C.M., Dorshkind, K.A., Rodriguez, E.M., Tidball, J.G., 1997. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest* 99, 2745-2751.
- Stedman, H.H., Sweeney, H.L., Shrager, J.B., Maguire, H.C., Panettieri, R.A., Petrof, B., Narusawa, M., Leferovich, J.M., Sladky, J.T., Kelly, A.M., 1991. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536-539.
- Szabo, C., Ohshima, H., 1997. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1, 373-385.
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J.M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Chen, W., Wahl, S.M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J.J., Paul, W.E., Berzofsky, J.A., 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198, 1741-1752.
- Torrente, Y., Tremblay, J.P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D'Angelo, M.G., Caron, N.J., Constantin, G., Paulin, D., Scarlato, G., Bresolin, N., 2001. Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* 152, 335-348.
- Wehling, M., Spencer, M.J., Tidball, J.G., 2001. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol* 155, 123-131.
- Yilmaz, O., Karaduman, A., Topaloglu, H., 2004. Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur J Neurol* 11, 541-544.

Table 1: Cardiac mast cells quantification

	mdx						C57Bl/10			
	pericardium			endoc/perivasc			pericardium		endoc/perivasc	
	MMC	hybrid	CTMC	MMC	hybrid	CTMC	MMC	CTMC	MMC	CTMC
2 wko	7.5	0.0	0.0	0.3	0.0	0.8	3.5	0.0	0.0	0.5
6 wko	3.0*	0.0	0.0	0.0	0.3	8.2*	5.5	1.0	0.0	1.5
12 wko	2.0	0.0	1.7	0.2	0.2	1.0*	3.5	0.0	0.0	1.0
24 wko	4.5*	0.0	0.0 <sup>#</sup>	0.2	0.0	0.5	3.0	0.0	0.0	0.5
48 wko	5.2	0.0	0.3	0.0	0.2	3.3*	3.5	2.5	0.0	1.0

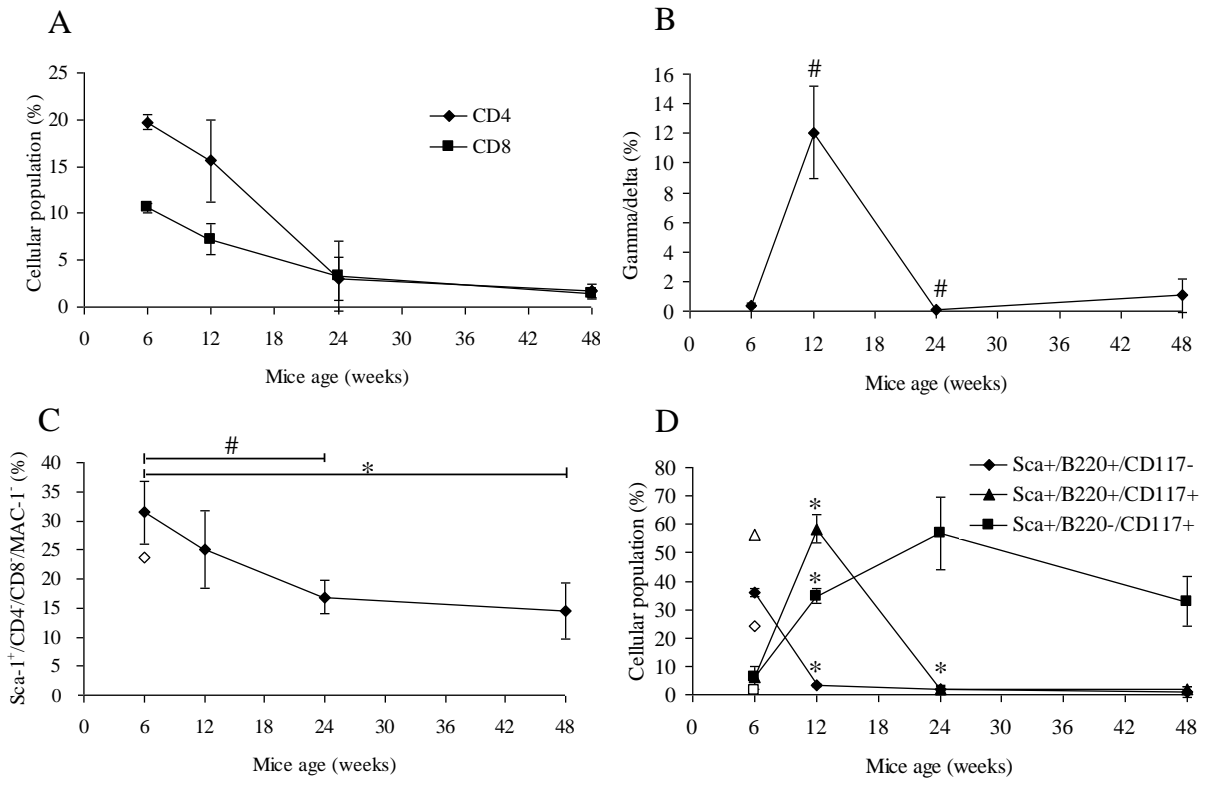
Data shows average number of mast cells/cardiac slice in pericardium, endocardium and perivascular areas

MMC, mucosal mast cell (chondroitin sulfate positive)

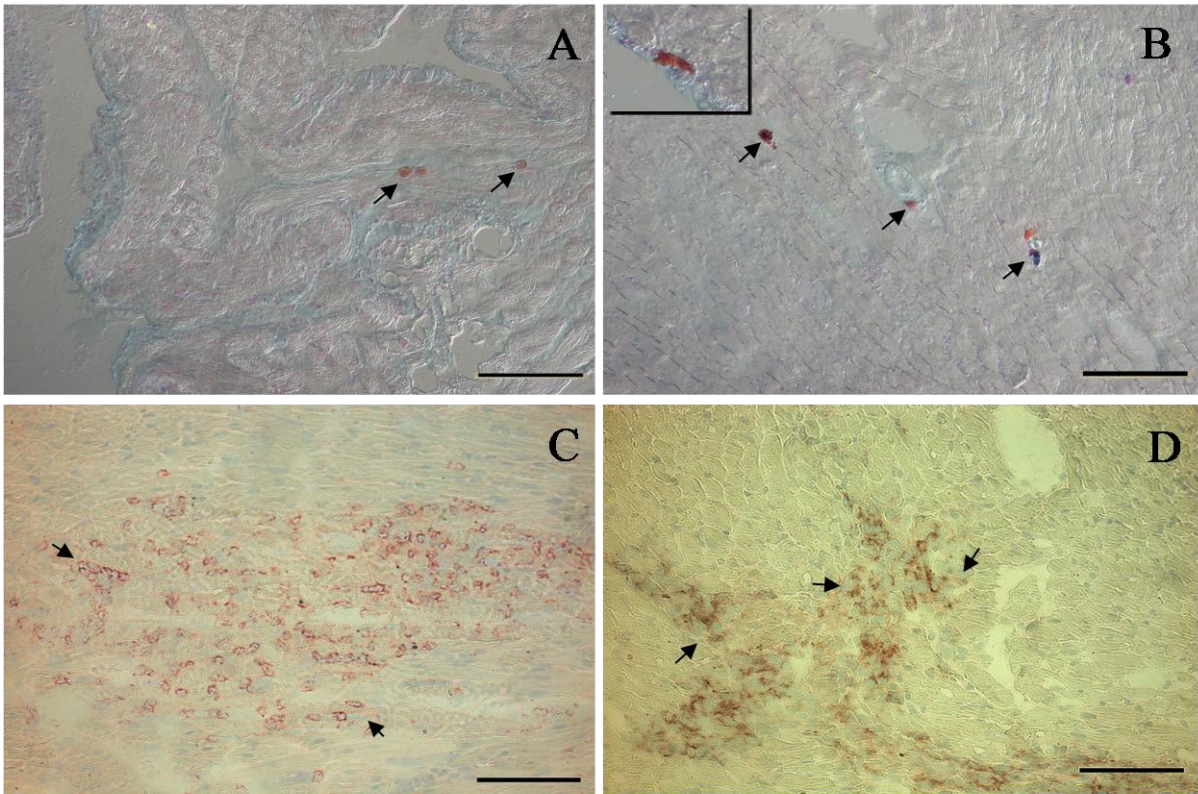
CTMC, connective tissue mast cell (heparin positive)

Hybrid, double positively stained mast cells

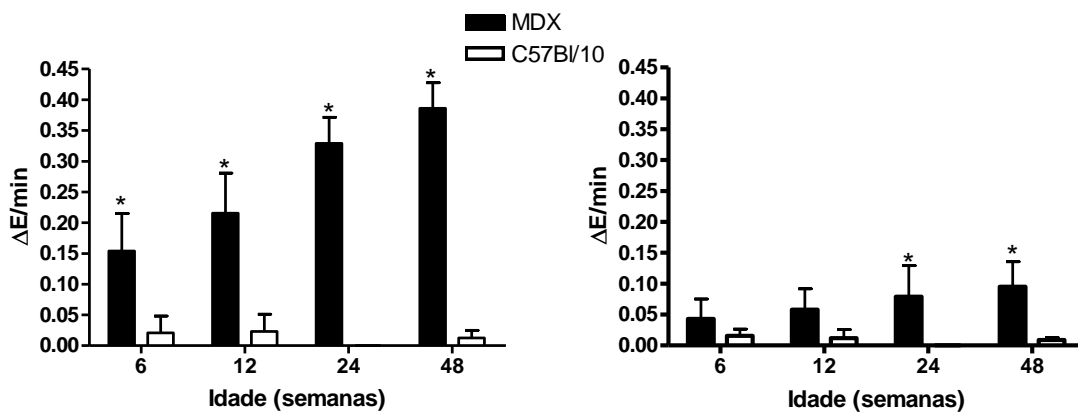
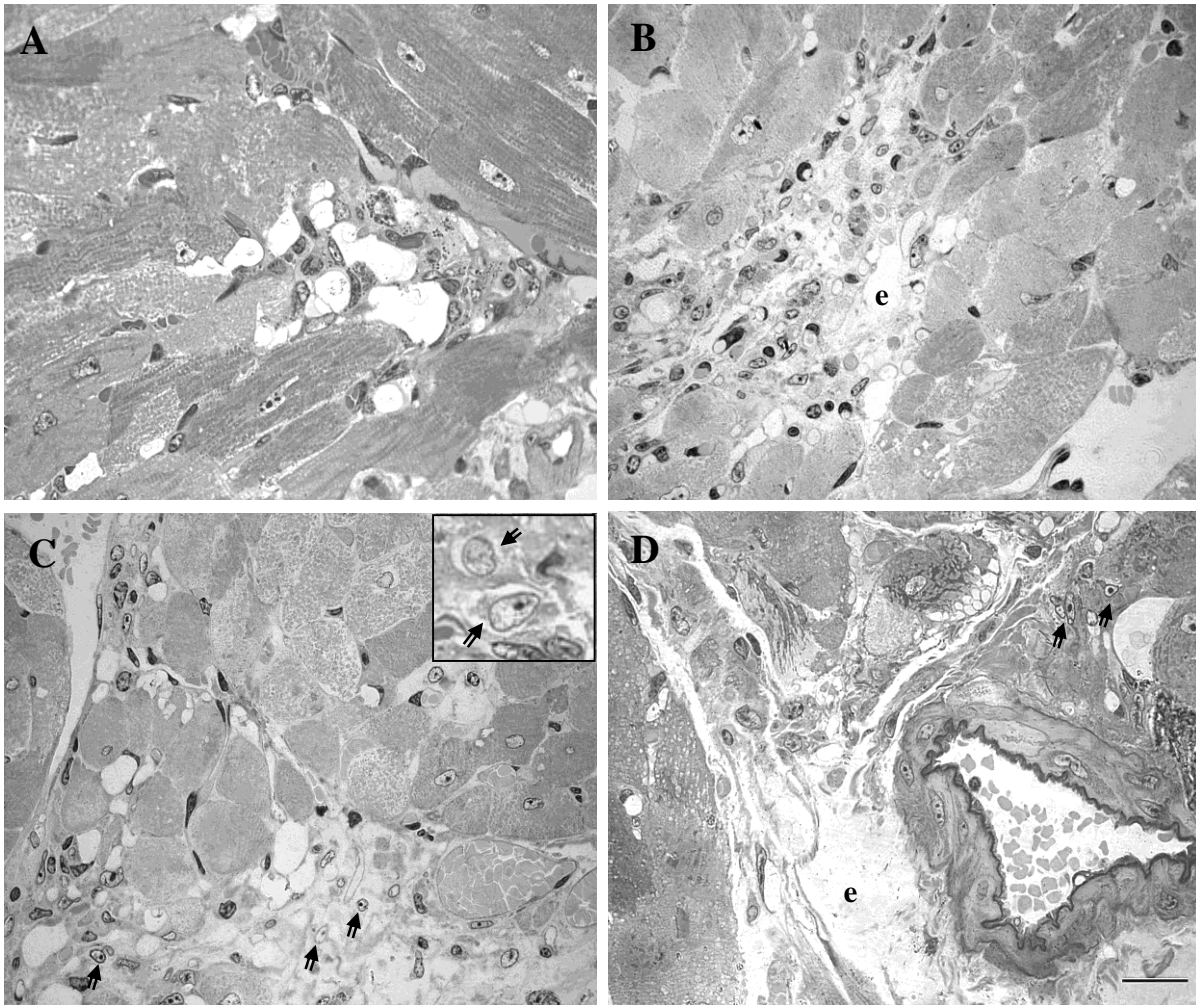
\*  $p < 0,01$  and #  $p < 0,05$  when comparing with previous age



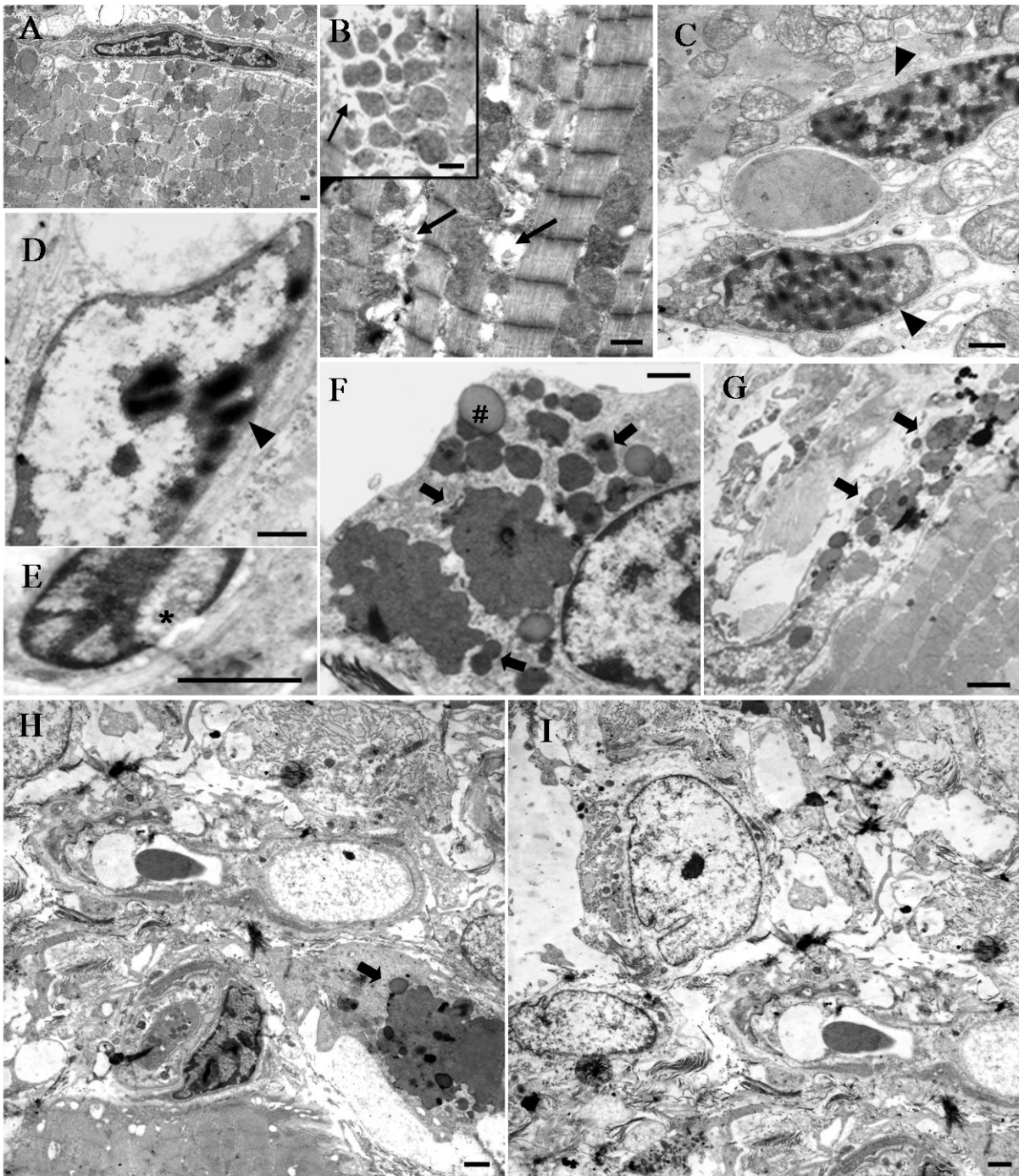
Bani C.C – Fig. 1



Bani C.C – Fig. 2

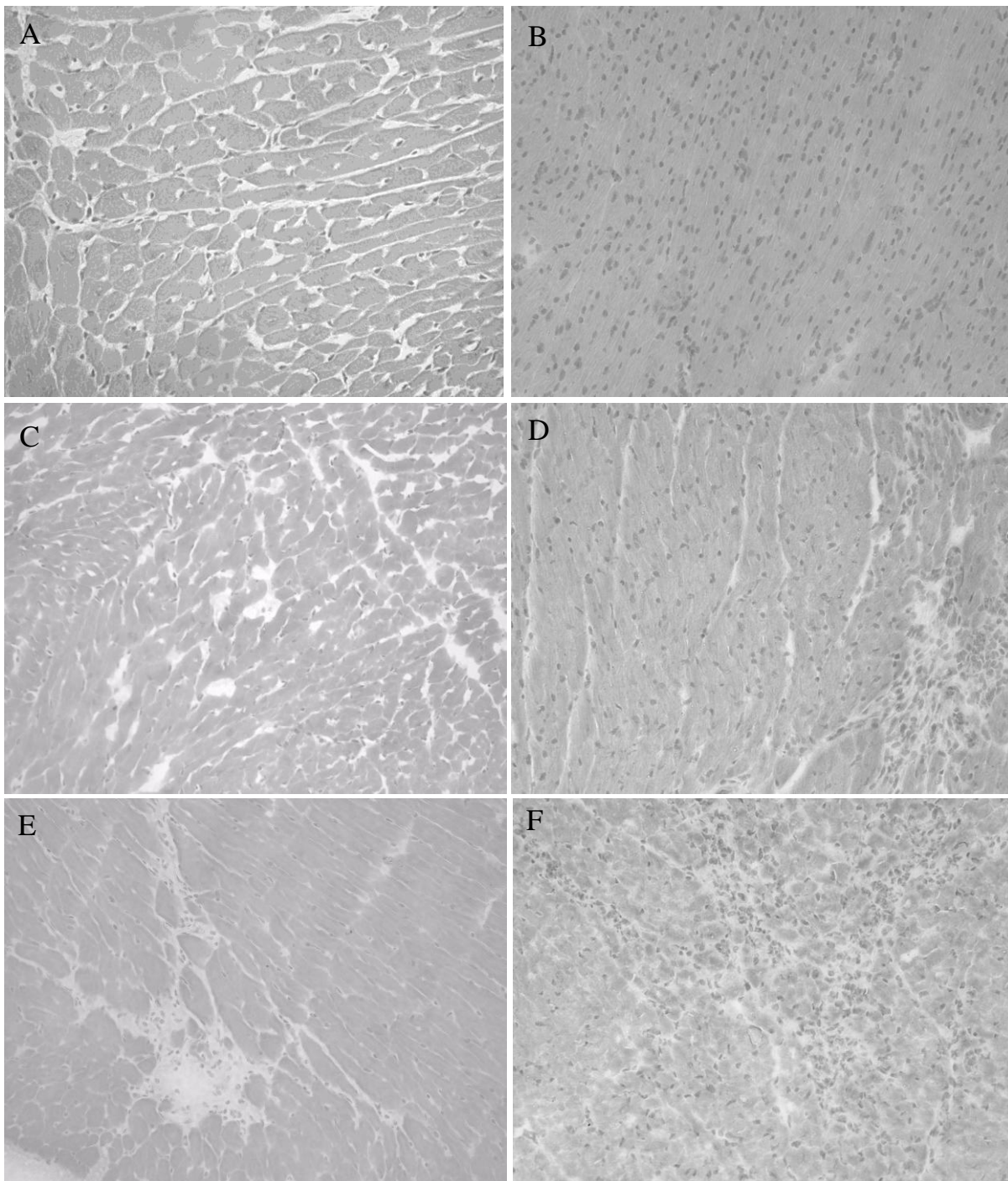


Bani C.C – Fig. 3



Bani C.C – Fig. 4





Bani C.C – Fig. 5

## **RESULTADOS SUPLEMENTARES**

### **Parte I**

#### **1 Material e Métodos**

##### **1.1 Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos *mdx/mdx* e C57BL10/J machos com 6 e 12 semanas de idade fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os camundongos foram recebidos e mantidos em adaptação no setor de experimentação animal do Laboratório de Biologia Celular por 5-7 dias e todos os experimentos foram feitos conforme a resolução 196/96 do Ministério da Saúde, sendo o projeto aprovado (0308/06) pela Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz.

##### **1.2 Análise Histopatológica**

Os camundongos foram eutanaziados com CO<sub>2</sub> e os músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e incluídos em OCT (Sakura, Torrance Ca). Foram feitos cortes de 16µm para identificação de mastócitos usando coloração por azul de toluidina/azul de alcian/safranina como descrito em Meuser-Batista e cols, 2008. Em resumo, as amostras foram coradas com uma solução contendo azul de alcian 0,36% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), safranina 0,02% (Sigma) e azul de toluidina 0,01% (Sigma) pH 1,42 por 5 minutos. De acordo com este procedimento, os mastócitos podem ser classificados como sendo de fenótipo mucoso (MMC) (azuis - corados por azul de alcian) ou de fenótipo de tecido conjuntivo (CTMC) (castanhos ou púrpura- corados por safranina ou por azul de toluidina). Mastócitos corados com uma combinação das três cores foram classificados como mastócitos híbridos. A quantificação é representativa de três cortes de tecido coletados de no mínimo três camundongos individuais por idade estudada e está indicada como número de mastócitos por campo.

##### **1.3 Cortes semi-finos**

Fragmentos de 1-2 mm dos músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 1h a 4°C. Os

fragmentos foram então pós-fixados por 30 minutos à temperatura ambiente em solução contendo  $\text{OsO}_4$  1% (Merck, Darmstadt, Alemanha), ferricianeto de potássio 0,8% (Sigma) e  $\text{CaCl}_2$  5 mM em tampão cacodilato 0,1M (Sigma). Ferricianeto de potássio e cloreto de cálcio foram adicionados para uma melhor visualização e preservação de estruturas membranares. O material foi então desidratado em concentrações crescentes de acetona, incubado por 12 h a 4°C em mistura de acetona 100% e resina Polybed 812 (v:v) (Merck), incubado por mais 4 h em resina pura à temperatura ambiente e incluído em resina Polybed 812. A polimerização da resina ocorreu a 60°C por 3 dias. Os cortes semi-finos (400 nm) foram coletados em lâminas, corados com azul de toluidina (Sigma) e montados para observação em microscópio de luz Axioplan 2 Zeiss (Zeiss, Alemanha).

#### **1.4 Dissociação de tecidos musculares por collagenase**

Os músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram coletados e cortados em fragmentos de 1-2 mm e exaustivamente lavados em PBS a 4°C para evitar contaminação com células de sangue. Os fragmentos foram então transferidos para uma solução de collagenase tipo IA 0,2% (Sigma, Lote 035K8636, 277 units/mg) e submetidos a um ciclo único de digestão enzimática em agitação suave por 40 minutos a 37°C (Fig 1). As células isoladas foram centrifugadas e imediatamente transferidas para meio RPMI 1640 (Sigma) gelado contendo 10% de SFB e mantidas a 4°C até o uso. As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C com meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de soro de carneiro inativado (bloqueio de receptores Fc) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). Em seguida as amostras foram incubadas com as combinações pertinentes de anticorpos monoclonais (item 1.5) para avaliação fenotípica.

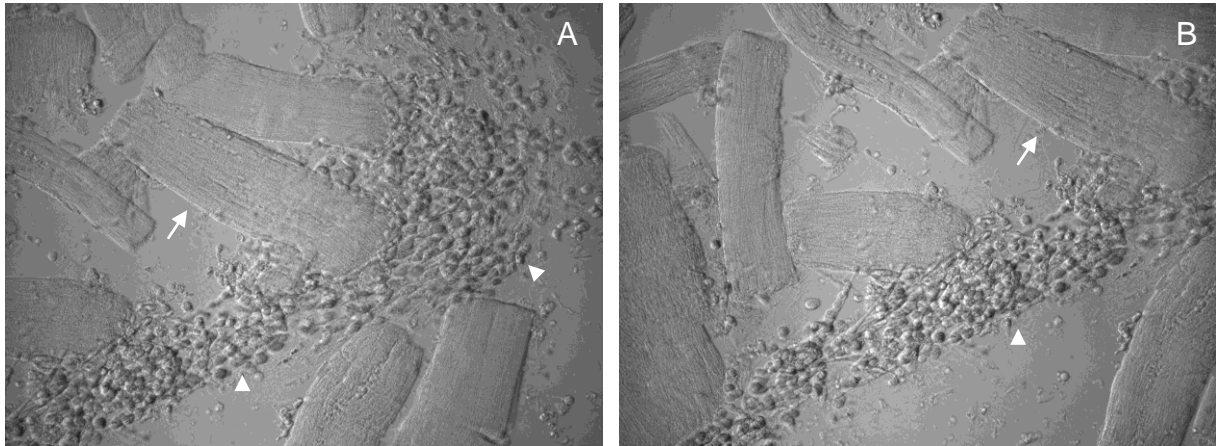


Figura 1: *Dissociação de músculo esquelético por colagenase*: Aspecto geral das fibras musculares (seta) e células inflamatórias (cabeça de seta) isoladas do músculo gastrocnêmio de animal *mdx/mdx* com 6 semanas de idade (A e B). Aumento: 200x.

### 1.5 Citometria de fluxo

Investigamos as seguintes populações para análise da composição de células inflamatórias musculares por citometria de fluxo: células NK e NKT (CD3-PE/NK1.1-FITC), células T reguladoras (CD4-PerCP/CD25-PE/CD8-FITC), linfócitos T  $\alpha\beta$  (CD3-FITC/CD8-Cychrome/CD4-PE), linfócitos T  $\gamma\delta$  (CD4-PerCP/CD8-FITC/TCR $\gamma\delta$ -PE), células progenitoras hematopoiéticas e (Sca1FITC/CD19APC/CD117PECy7/CD45TxRed/CD3PE/Mac-1PE) e uma sub população ainda não descrita que denominamos “T progenitora” (CD3PE/CD117PECy7). Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen. As marcações foram realizadas em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de SFB por 30 minutos a 4°C em 20  $\mu$ l finais (células + anticorpos). Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 (Sigma), fixadas em formaldeído 2% (Merck) e mantidas em geladeira até a leitura quando eram lavadas 2x em PBS. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur e a análise dos dados foi realizada utilizando o software CellQuest versão 3.2 (Becton Dickinson) sempre na região morfológica de células totais (FSC x SSC), excluindo apenas debris celulares e agregados.

### 1.6 Análise estatística

O teste t de Student foi utilizado para comparar dois grupos de dados e os valores de p estão indicados nas legendas das figuras.

## **2 Resultados e Discussão**

Utilizamos cortes semi-finos embebidos em Epon e corados com azul de toluidina para a identificação dos tipos celulares inflamatórios e possíveis alterações gerais na arquitetura do tecido que pudessem ser associadas à patologia. O músculo gastrocnêmio apresentou infiltrados inflamatórios, edema e morte aparente de miofibras tanto em 6 semanas quanto em 12 semanas (Fig 2A e 2B). Já o músculo solear apresentou poucas células inflamatórias dispersas no tecido e pequenas alterações histológicas gerais (Fig 2C e 2D), enquanto que o músculo diafragma apresentou intensos infiltrados inflamatórios com extensa morte de miofibras, edemas e alterações de matriz nas duas idades (Fig 2E e 2F). Podemos observar ainda um predomínio de células mielóides compondo os infiltrados inflamatórios como descrito na literatura. É importante ressaltar que foram observados alguns núcleos de células inflamatórias com cromatina aparentemente degradada (Fig2).

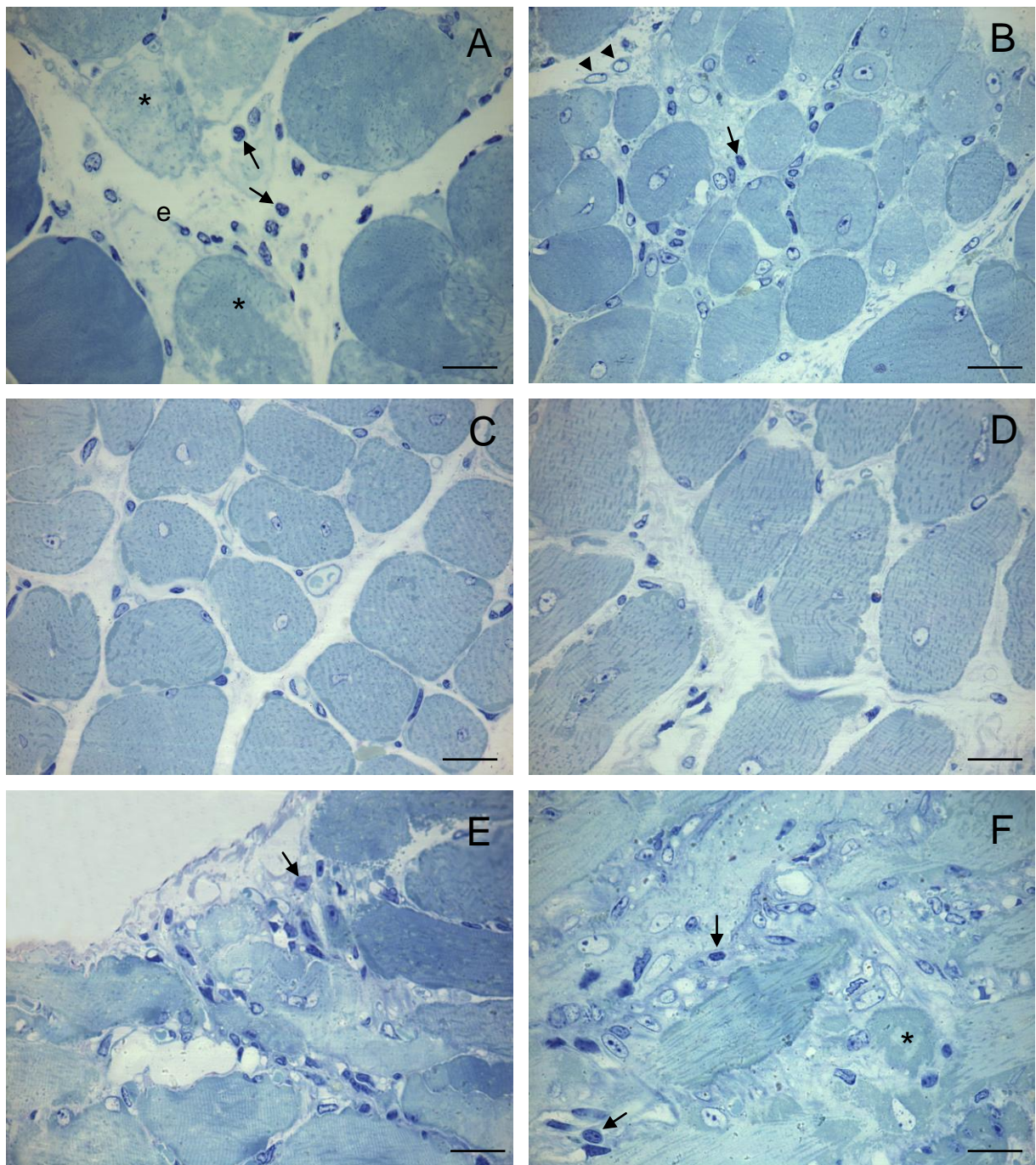


Figura 2: *Arquitetura geral e composição celular do infiltrado inflamatório*: Fragmentos dos músculos gastrocnêmio (A e B), solear (C e D) e diafragma (E e F) de camundongos *mdx/mdx* de 6 (A, C e E) e 12 semanas (B, D e F) foram coletados de camundongos *mdx/mdx* emblocados em Epon e processados para análise em microscopia de luz após coloração com azul de toluidina. Características morfológicas gerais: célula inflamatória com cromatina aparentemente degradada (cabeça de seta), célula inflamatória normal (seta), fibra danificada (asteriscos) e edema (e) foram identificadas em três camundongos por idade. Barra: 20µm.

Os mastócitos compõem uma população mielóide que tem sido extensamente associada à morte celular, inclusive na DMD, onde o tratamento com bloqueadores destas células reduziu a morte de fibras musculares em diversos estudos. Além disso, os mastócitos possuem papel central na regulação inflamatória, induzindo quimiotaxia de leucócitos, ativação de células endoteliais e secreção de mediadores pró-inflamatórios. Trabalhos anteriores fizeram apenas avaliações numéricas gerais destas células e observaram que o aumento de mastócitos correlaciona com o agravamento das lesões musculares. Contudo, há diversas sub populações de mastócitos com componentes pró-inflamatórios distintos em seus grânulos citoplasmáticos com função ainda desconhecida na DMD. Desta forma, decidimos avaliar estas sub populações utilizando colorações especiais que discriminam mastócitos mucosos (CTMC - ricos em heparina) e de tecidos conjuntivo (MMC – ricos em sulfato de condroitina). A análise qualitativa de mastócitos (Fig 3) revelou flutuações peculiares no número geral, subpopulações e de acordo com a idade e tipo muscular. A distribuição dos fenótipos foi difusa em todos os músculos estudados.

Houve o aumento significativo ( $p < 0,02$ ) do número total de mastócitos em alguns músculos esqueléticos considerando a média do número de células por campo. No músculo gastrocnêmio de animais de 6 semanas: C57Bl/10 x *mdx/mdx* = 0,3 x 0,5 e em 12 semanas: C57Bl/10 x *mdx/mdx* = 0,3 x 0,9 (Fig 3A e 3B). No músculo solear de animais de 6 semanas: C57Bl/10 x *mdx/mdx* = 0,5 x 0,9 e em 12 semanas C57Bl/10 x *mdx/mdx* = 0,6 x 1 (Fig 3C e 3D). No músculo diafragma houve uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) nos animais de 6 semanas C57Bl/10 x *mdx/mdx* = 1,3 x 0,5 e uma diferença não significativa em 12 semanas: C57Bl/10 x *mdx/mdx* = 0,3 x 0,6 (Fig 3E e 3F). Interessante observar que houve uma diminuição do número de mastócitos somente no diafragma de 6 semanas, sabendo-se que o músculo diafragma é o mais afetado na doença em camundongos *mdx/mdx*. Estes dados nos sugerem que talvez o simples aumento no número destas células não seja suficiente para contribuir para uma maior lesão muscular, mas também a modulação de uma sub população específica de mastócitos. De fato, utilizando a coloração especial nós observamos que apenas no músculo diafragma de animais de 6 semanas há uma redução significativa ( $p < 0,02$ ) de mastócitos de fenótipo MMC em *mdx/mdx* quando comparamos com animais controles C57Bl/10 (Fig 3E e 3F). No músculo gastrocnêmio observamos um aumento significativo de mastócitos de fenótipo CTMC ( $p < 0,005$ ) em 12 semanas e MMC ( $p < 0,05$ ) em 6 e 12 semanas de animais *mdx/mdx* comparado a animais C57Bl/10 (Fig 3A e 3B). Apesar de o músculo solear apresentar pequenas variações das subpopulações observamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de mastócitos de fenótipo MMC em 6 semanas e CTMC em 12 semanas em camundongos *mdx/mdx* quando comparados aos

animais C57Bl/10 (Fig 3C e 3D). Estes dados indicam uma complexidade adicional na análise destas células e que subpopulações específicas devem ser sempre estudadas em qualquer situação patológica.

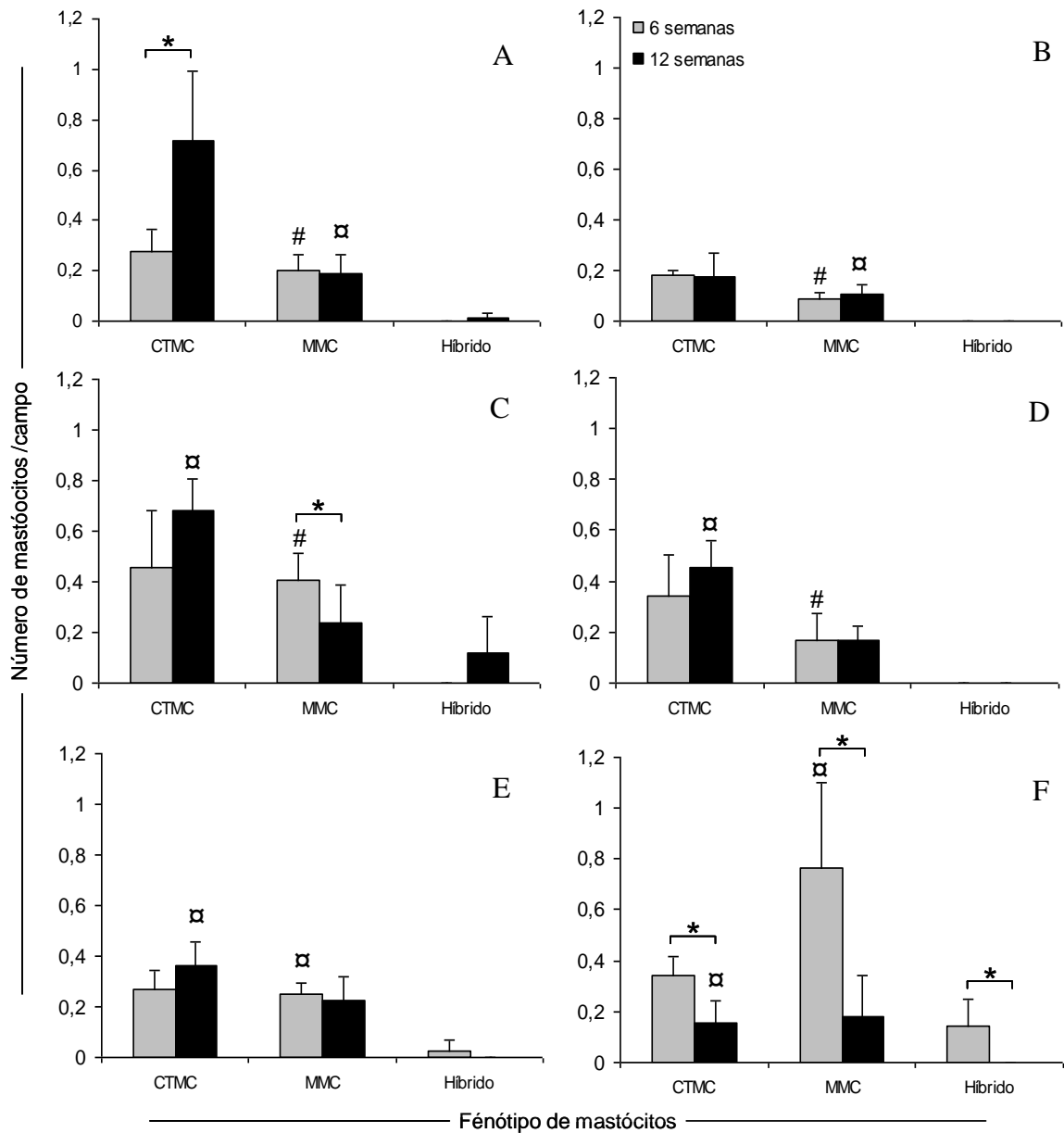


Figura 3: *Quantificação de mastócitos em músculos esqueléticos*: Dados mostram o número médio de diferentes fenótipos de mastócitos por corte de músculo. Mastócitos de fenótipo mucoso (MMC) (azul), de tecido conjuntivo (CTMC) (castanho) ou híbrido (azul/castanho) foram identificados no músculo gastrocnêmio de *mdx/mdx* (A) e C57Bl/10 (B), no músculo solear de *mdx/mdx* (C) e C57Bl/10 (D) e no músculo diafragma de *mdx/mdx* (E) e C57Bl/10 (F). \*  $p < 0,05$  quando comparados *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas em relação a um fenótipo de mastócitos. #  $p < 0,005$  e α  $p < 0,05$  quando camundongos *mdx/mdx* são comparados com C57Bl/10 de mesma idade e mesmo fenótipo de mastócitos.



Embora principalmente células mielóides tenham sido observadas nos infiltrados inflamatórios e distribuídas nos tecidos, células linfóides e progenitoras hematopoiéticas também têm sido descritas como populações celulares importantes em eventos citotóxicos, quimiotaxia e regeneração muscular. Estas células foram então isoladas dos músculos esqueléticos gastrocnêmio, solear e diafragma e analisadas por citometria de fluxo na região de células totais, excluindo apenas debris e grumos (Fig 4). As análises por citometria de animais C57Bl/10 mostraram menos de 1% de todas as células investigadas neste trabalho (dados não mostrados).

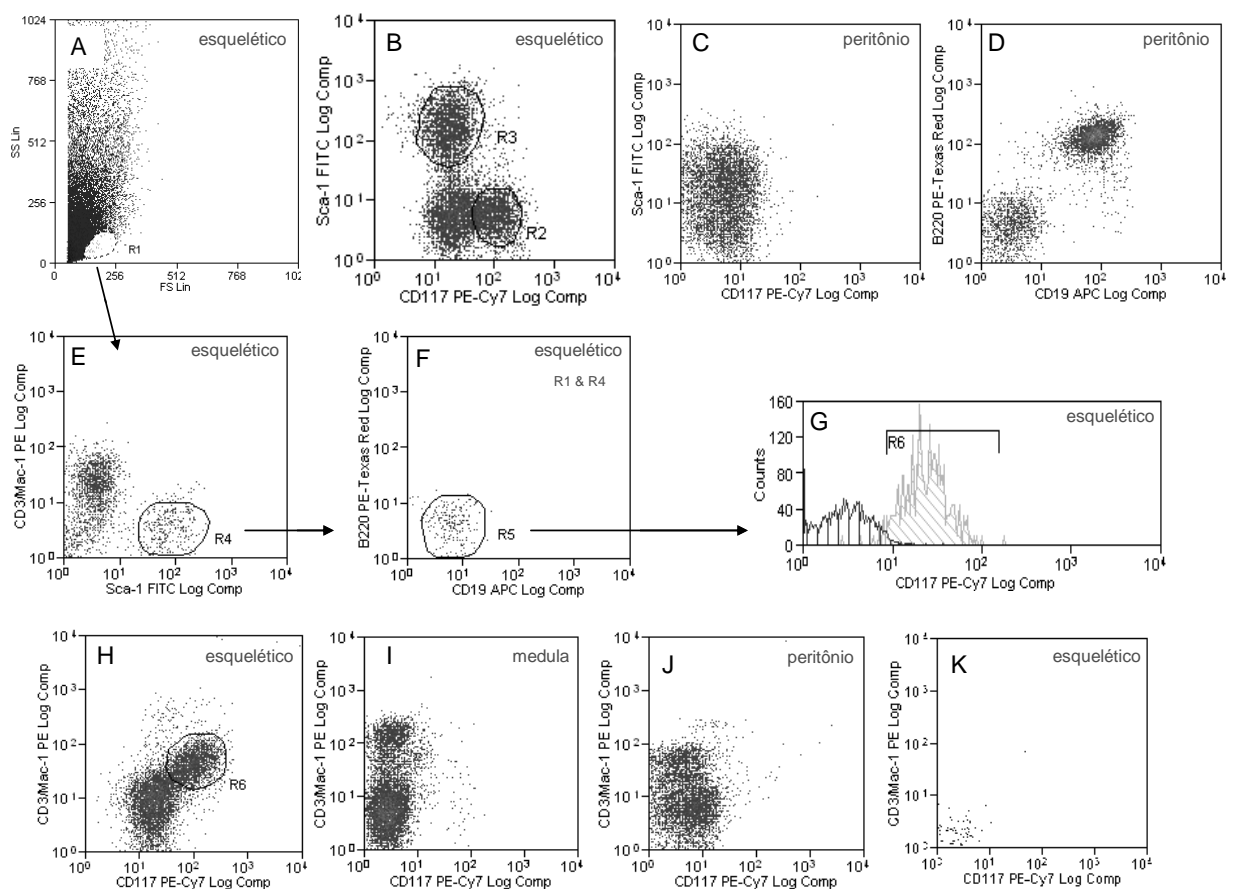


Figura 4: Representação da análise por citometria de fluxo. O padrão morfológico (FSCxSSC) do músculo esquelético é mostrado em A, assim como a região de análise R1. Análise de células Sca-1<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> em músculo esquelético (B) e peritônio (C e D) de camundongos *mdx/mdx*. Análise de células Sca-1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> em camundongos *mdx/mdx*. (E-G) e de células CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> em camundongos *mdx/mdx* (H-J) e em animais C57Bl/10 (K).

Não foi observada migração relevante (menos de 1%) de células NK, NKT, células T reguladoras CD4/CD25 ou CD8/CD25 ou plasmócitos CD19<sup>+</sup> para os músculos

esqueléticos de camundongos *mdx/mdx*. No entanto, observamos pela primeira vez na literatura uma população de células T com um fenótipo inesperado em camundongos *mdx/mdx*:  $CD3^+/CD117^+/CD4^-/CD8^-$ . Estas células estão sendo preliminarmente chamadas de “T progenitoras” pelo fato de expressarem o CD117 que é o receptor de SCF (*stem cell factor*) ou fator de célula tronco. Essas células foram abundantemente encontradas em todas as idades nos músculos esqueléticos estudados, com um percentual superior a 40% dos eventos encontrados na região de células totais (Fig 5). Além disso, camundongos *mdx/mdx* obtidos do Jackson Laboratories nos Estados Unidos também apresentam a mesma população e em níveis igualmente elevados. Nos músculo gastrocnêmio e diafragma observamos um aumento do percentual das células  $CD3^+/CD117^+$  entre 6 e 12 semanas de idade enquanto que no músculo solear observamos uma diminuição do percentual entre as idades. O músculo gastrocnêmio apresentou um percentual de 60,7% em 6 semanas aumentando para 70,2% em 12 semanas. O músculo solear apresentou um percentual 48,9% em 6 semanas diminuindo para 44,6% em 12 semanas. O músculo diafragma apresentou um percentual de 44,4% em 6 semanas aumentando para 55,5% em 12 semanas (Fig 5).

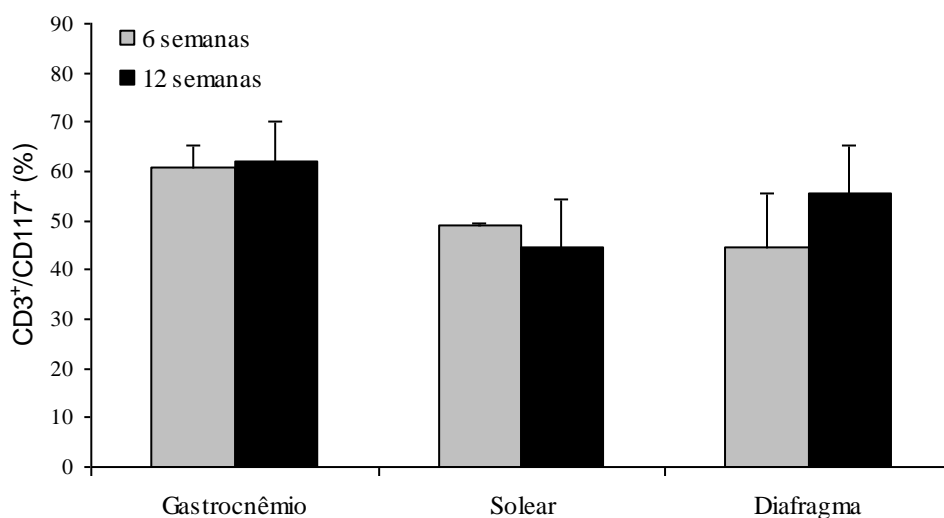


Figura 5: Análise por citometria de fluxo de células T progenitoras  $CD3^+/CD117^+$ : Os músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram coletados de camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas e dissociados por colagenase para obtenção e identificação das células T progenitoras. Não houve diferença significativa entre as idades. O desvio padrão do músculo solear de 6 semanas foi de 0,05.

Talvez esta população com fenótipo distinto seja pelo menos em parte responsável pelas discrepâncias referentes a células T na literatura referente à DMD. Alguns autores sustentam que células T são importantes na geração de lesões musculares na DMD, atuando como células citotóxicas, por exemplo. Porém, células linfóides são raramente observadas

compostos infiltrados inflamatórios e marcação por imunohistoquímica com anti CD4 ou CD8 em geral não indica números relevantes destas células (dados não mostrados). Por outro lado, células linfóides são encontradas dispersas nos músculos e normalmente não associadas a áreas de lesão ou inflamação.

Talvez o alto percentual de células CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> na citometria seja resultado do enriquecimento desta população após a dissociação enzimática, uma vez que o tratamento com colagenase pode levar à morte de outros tipos celulares que talvez estabeleçam interações célula-célula e célula-matriz extracelular mais fortes como fibroblastos, macrófagos, subpopulações de células dendríticas, mastócitos. A dupla marcação destas células no tecido talvez mostre de forma mais definitiva a frequência desta população nos músculos.

Células progenitoras Sca-1<sup>+</sup> estão presentes tanto no coração como nos músculos esqueléticos e são capazes de se diferenciar em células musculares segundo a literatura. Nos músculos esqueléticos estudados observamos por citometria de fluxo uma população de células progenitoras hematopoiéticas: Sca-1<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup> (Fig 6). Comparado aos músculos diafragma e solear, o músculo gastrocnêmio apresentou um baixo percentual dessas células (menos de 7%) nas idades estudadas. Tanto no músculo solear quanto no músculo diafragma observamos uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) entre as idades. O solear apresentou um percentual de 24,6% em 6 semanas diminuindo para 15% em 12 semanas e o músculo diafragma teve 26% em 6 semanas diminuindo para 15% em 12 semanas (Fig 6).

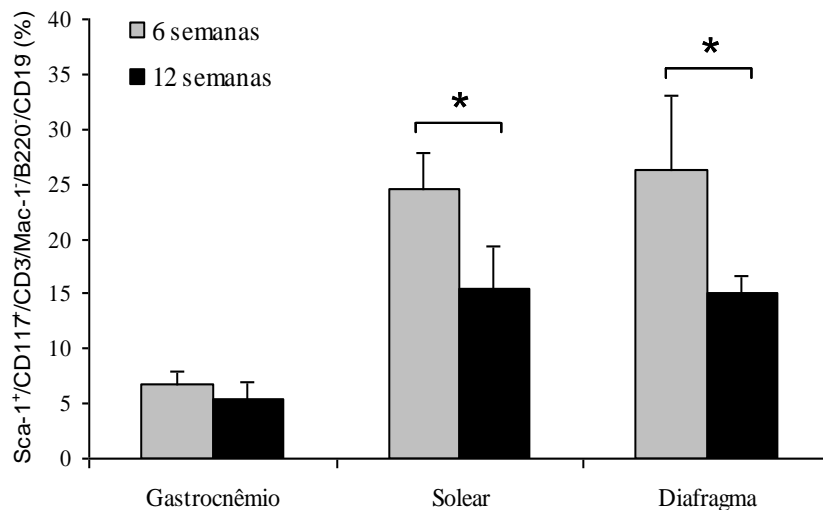


Figura 6: Análise por citometria de fluxo de células progenitoras hematopoiéticas no músculo esquelético: Os músculos gastrocnêmio, solear e diafragma de camundongos *mdx/mdx* foram coletados e dissociados por colagenase para obtenção e identificação celular das células Sca-1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> nas idades de 6 e 12 semanas. \* p<0,05

Embora células Sca-1<sup>+</sup> tenham capacidade regenerativa descrita, ainda não sabemos se essas células identificadas em nossos estudos de fato se diferenciam em fibras musculares, outros tipos celulares ou se apenas liberam fatores que contribuem para o estabelecimento dos processos de inflamação, regeneração ou fibrose. São necessários, por exemplo, experimentos de transferência adotiva dessas células marcadas com traçadores para avaliar se elas estão dando origem a fibras musculares.

Uma melhor compreensão da natureza dos fatores responsáveis pela migração celular para os diferentes músculos e o entendimento da participação de células inflamatórias e progenitoras no processo de evolução da doença será inestimável na tentativa de estabelecer uma terapia capaz de reverter o processo patológico.

### 3 Perspectivas

- 3.1** Aprofundar o estudo de sub populações de mastócitos na DMD através do bloqueio individual *in vivo* dos receptores de histamina H1, H2 e H3;
- 3.2** Estudar o potencial de diferenciação em miofibras das células CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> e progenitoras hematopoiéticas (Sca-1<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>) purificadas *in vitro*;
- 3.3** Avaliar o perfil de citocinas liberadas pelas células CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> e progenitoras hematopoiéticas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2, TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  no sobrenadante de células purificadas), e assim estudar sua possível influência sobre o microambiente muscular;
- 3.4** Analisar a possível migração das células CD3<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> e progenitoras hematopoiéticas para músculos esqueléticos. Para isso, serão necessários alguns experimentos de introdução dessas células em animais distróficos, como por exemplo:
- 3.4.1 Transferência por via intravenosa de células de camundongos machos em fêmeas e busca dessas células em diferentes músculos esqueléticos, cardíaco, fígado e baço pela marcação do cromossomo Y;
- 3.4.2 Avaliação do mesmo objetivo indicado acima, mas usando o modelo de enxerto ectópico de músculos esquelético (de macho) no pavilhão auricular (de fêmea) na tentativa de se manter o microambiente original das células progenitoras, sem dissociação enzimática.

## RESULTADOS SUPLEMENTARES

### Parte II

#### 1. Material e Métodos

##### 1.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos *mdx/mdx* e C57BL10/J machos com 2, 6, 12, 24 e 48 semanas de idade fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os camundongos foram mantidos em adaptação no setor de experimentação animal do Laboratório de Biologia Celular por 5-7 dias e todos os experimentos foram feitos conforme a resolução 196/96 do Ministério da Saúde, sendo o projeto aprovado (0308/06) pela Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz.

##### 1.2 Análise Histológica

Os camundongos foram eutanaziados com CO<sub>2</sub> e os músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e incluídos em OCT (Sakura, Torrance, EUA). Foram feitos cortes de 10µm para coloração por hematoxilina e eosina (HE) para análise quantitativa das áreas de inflamação, regeneração e inflamação/regeneração. A quantificação de cada parâmetro foi feita pela delimitação de cada área identificada em relação à área total do corte. Foram consideradas como: área de inflamação, grupos com mais de dez células inflamatórias agrupadas (Fig 1A); área de regeneração, grupos de miofibras com nucleação central (Fig 1B) e área de inflamação/regeneração grupos de com mais de dez células inflamatórias associadas a miofibras com nucleação central (Fig 1C). A delimitação das áreas foi feita por toda a extensão do corte e a quantificação foi feita com o programa Scion (Scion Program, National Institutes of Health, Image Program).

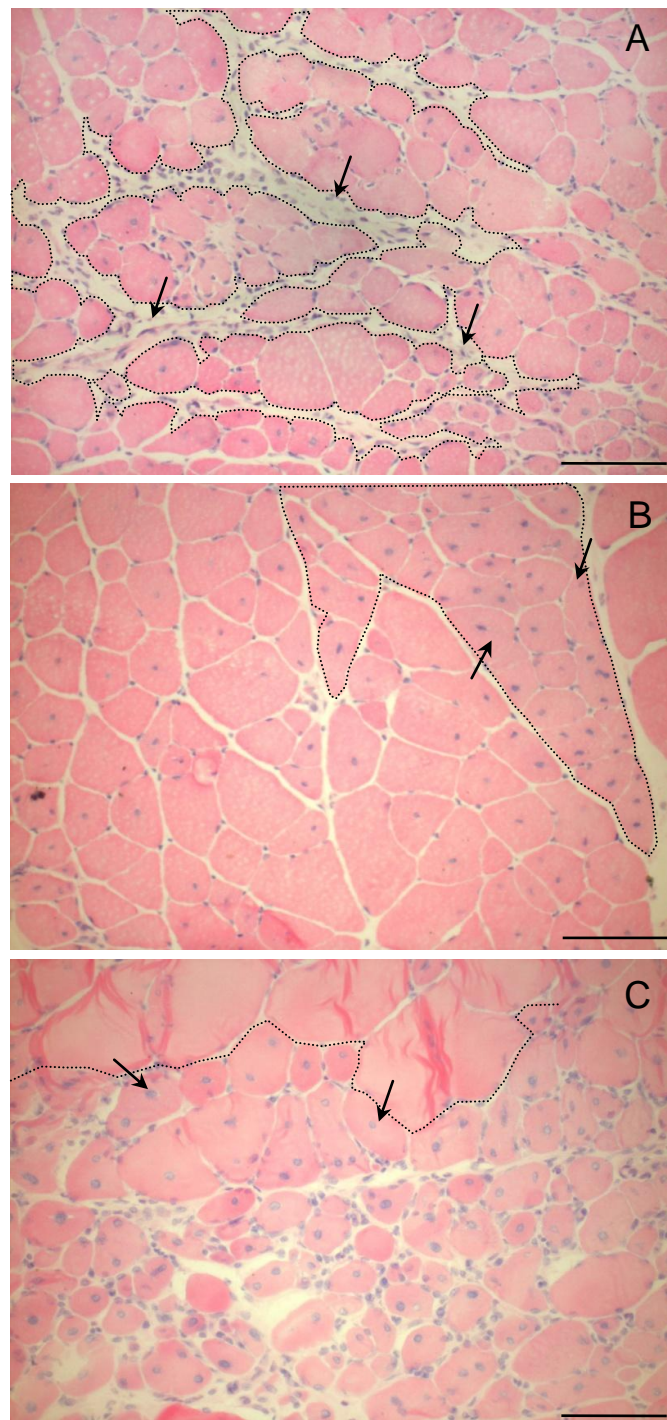


Figura 1: *Representação da análise quantitativa das diferentes áreas do processo inflamatório e regenerativo em músculos esqueléticos: A análise foi feita através da identificação de áreas de inflamação (A), regeneração (B) e inflamação/regeneração (C) em músculo gastrocnêmio. Coloração com hematoxilina-eosina. Barra: 100µm*

### **1.3 Análise de Ultra-estrutura**

Fragmentos de 1-2 mm dos músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 1h a 4°C. Os fragmentos foram então pós-fixados por 30 minutos à temperatura ambiente em solução contendo OsO<sub>4</sub> 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha), ferricianeto de potássio 0,8% (Sigma) e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato 0,1M (Sigma). Ferricianeto de potássio e cloreto de cálcio foram adicionados para uma melhor visualização e preservação de estruturas membranares. O material foi então desidratado em concentrações crescentes de acetona, incubado por 12 h a 4°C em mistura de acetona 100% e resina Polybed 812 (v:v) (Merck), incubado por mais 4 h em resina pura à temperatura ambiente e incluído em resina Polybed 812. A polimerização da resina ocorreu a 60°C por 3 dias. Os cortes ultra-finos (70 nm) foram coletados em grades de cobre, corados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-10C (Zeiss, Alemanha).

### **1.4 Imunomarcção**

Cortes congelados de músculo esquelético de camundongos mdx/mdx e C57Bl/10 com 10µm de espessura foram fixados em acetona e mergulhados em PBS por 5 minutos. A inibição de peroxidase endógena foi feita com solução a 3% peróxido de hidrogênio (Merck do Brasil) por 30 minutos, seguida por lavagem em PBS por 5 minutos e incubação por 30 minutos a 37° C com PBS contendo 2% de albumina bovina (BSA fração V, Sigma Chem. Co., EUA). Em seguida, os cortes foram incubados separadamente com os anticorpos primários anti-iNos e anti-LC3 ambos feito em coelho (Sigma) por 1 hora a 37°C. Após três lavagens sucessivas de 5 minutos com PBS, os cortes foram incubados também em câmara úmida com anticorpos secundários (anti coelho peroxidase (Santa Cruz) para iNos e anti coelho FITC (Sigma) para LC3) diluídos em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. As lâminas incubadas com anti-iNos foram reveladas utilizando DAB (kit Dako Cytomation), contra-corados com hematoxilina de Mayer por 2 minutos, montados em gelatina/glicerina/fenol e visualizadas em microscópio de luz Axioplan 2 Zeiss (Zeiss, Alemanha). As lâminas incubadas com LC3 foram montadas e visualizadas em microscópio Confocal LSM510 Meta Zeiss.



## 1.5 Avaliação de apoptose

Cortes congelados de músculos esqueléticos foram utilizados para a avaliação de apoptose através da visualização de fragmentação da cromatina (kit de TUNEL peroxidase) de acordo com as instruções do fabricante (Roche).

## 1.6 Quantificação de citocinas

Camundongos *mdx/mdx* e C57Bl/10 de 6 e 12 semanas de idade foram extensivamente retroperfundidos pela aorta com PBS e em seguida os músculos gastrocnêmio, solear e diafragma foram retirados. As proteínas totais das amostras foram extraídas em tampão de lise contendo inibidores de proteases (leupeptina, PMSF, pepstatina e aprotinina) e dosadas pela técnica de Lowry. Em seguida, os níveis das citocinas IL-6 (Interleucina-6), IL-10, MCP-1 (Proteína quimioatraente de monócito-1), IFN-g (Interferon-g), TNF (Fator de necrose tumoral) e IL-12p70 foram avaliados por citometria de fluxo utilizando o kit CBA FLEX (inflamação em camundongo) de acordo com o fabricante (BD).

## 1.7 Atividade da creatina quinase sérica (CK-NAC)

Para este ensaio foram utilizados soros de camundongos *mdx/mdx* e C57Bl/10 com 6, 12, 24 e 48 semanas de idade obtidos a partir de punção cardíaca sem heparina. A atividade sérica da enzima creatina quinase (CK) isotipo esquelético (CK-NAC) foi utilizada como indicativo da destruição de fibras esqueléticas. A enzima catalisa a fosforilação da creatina gerando fosfocreatina e ADP além de outros produtos finais como D-ribose-5fosfato, CO<sub>2</sub> e NADPH. O aumento dos níveis de NADPH é determinado fotometricamente e é diretamente proporcional à atividade da enzima. As leituras são feitas com 5 µl de soro + 100 µl do reagente de trabalho fornecido pelo fabricante (LabTest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As amostras são mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente e em seguida são feitas 6 leituras sucessivas com intervalos de 1 minuto em espectrofotômetro de placa a 340 nm (Molecular Device – VERSAmax microplate reader). Estes valores de absorbância referentes à leitura de NADPH são expressos como diferenças de leitura a cada minuto ( $\Delta E/\text{min}$ ).

## **1.8 Análise estatística**

O teste t de Student foi utilizado para comparar dois grupos de dados e os valores de p estão indicados nas legendas das figuras.

## 2 Resultados e Discussão

A coloração por HE foi utilizada com o objetivo de mostrar a morfologia dos músculos esqueléticos de camundongos normais utilizados como controle (C57Bl/10) (Fig 2) e avaliar as principais alterações morfológicas relacionadas com os processos inflamatório e regenerativo em camundongos *mdx/mdx*.

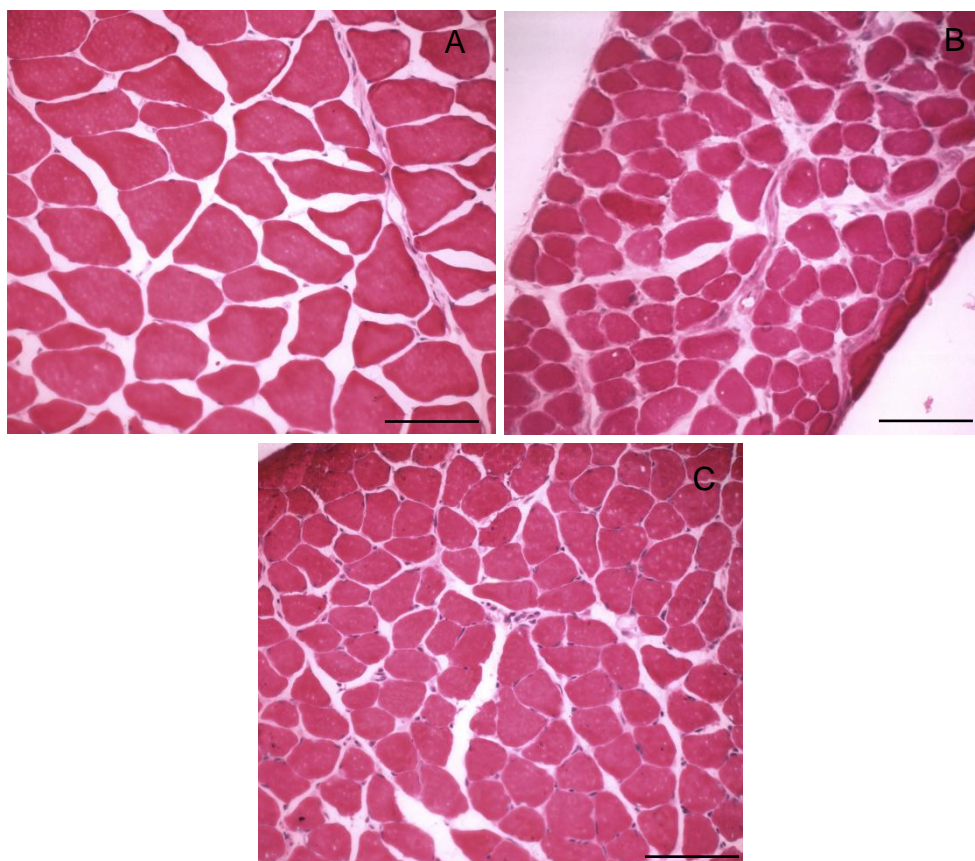


Figura 2: *Histologia do músculo esquelético de camundongos normais*: Os músculos gastrocnêmio (A), solear (B) e diafragma (C) de camundongos C57Bl/10 de 6 semanas, foram coletados, cortados e corados com hematoxilina-eosina. Os resultados são representativos de pelo menos três camundongos por idade. Barra: 100 $\mu$ m

Nos camundongos distróficos, podemos observar que o músculo gastrocnêmio apresenta extensas áreas em regeneração caracterizadas por fibras com nucleação central tanto em 6 (Fig 3A) como em 12 semanas (Fig 3B). Já o músculo solear apesar de apresentar regiões em regeneração em 6 e 12 semanas como o músculo gastrocnêmio, observamos regiões em regeneração esparsas e pequenas (Fig 3C e 3D). O músculo diafragma apresentou regiões com intensa inflamação em 6 semanas (Fig 3E e 3F) e em 12 semanas extensas áreas com inflamação, áreas com grupos de células em regeneração e regiões específicas de células inflamatórias associadas a células em regeneração que denominamos de área de inflamação/regeneração.

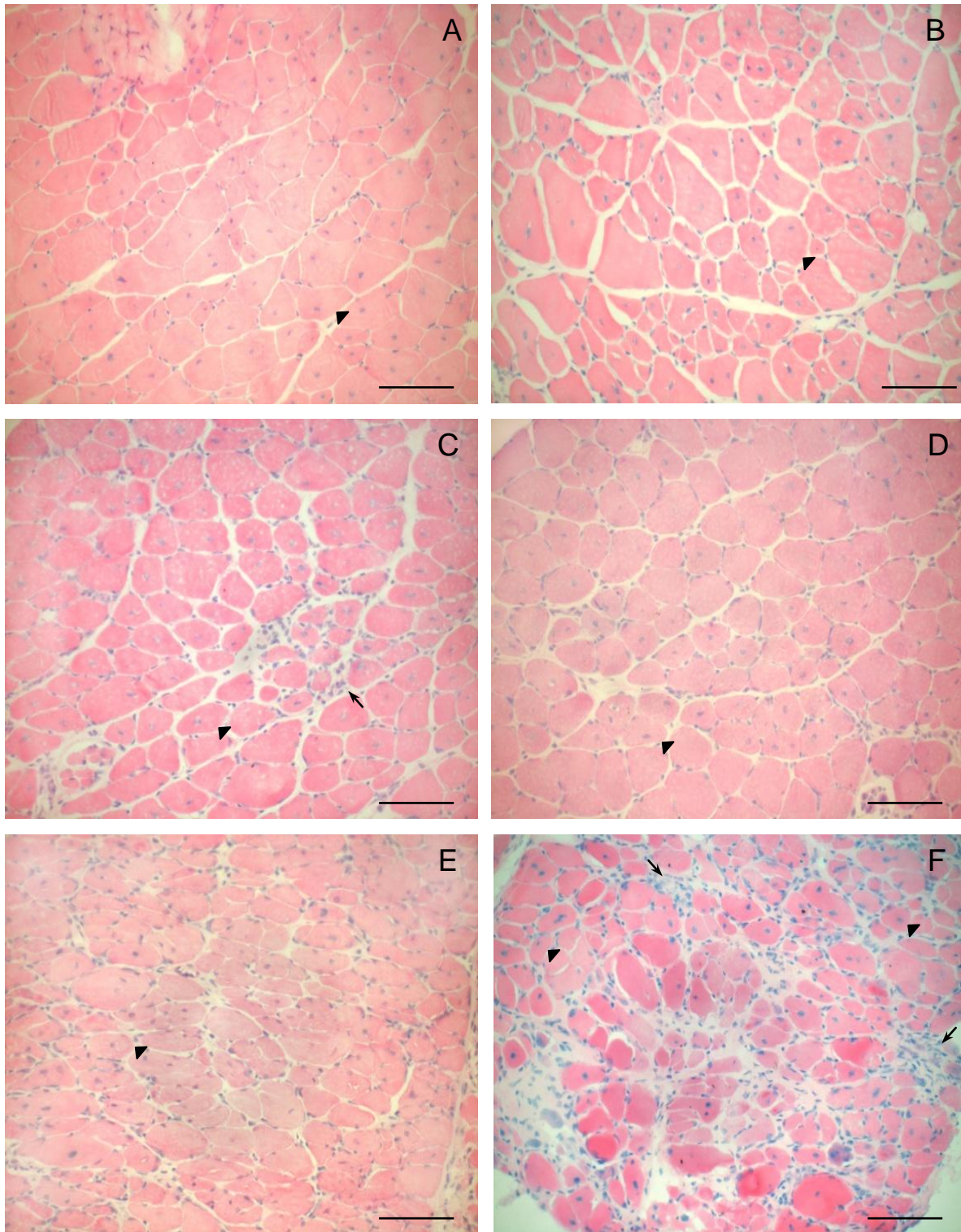


Figura 3: Análise histológica do músculo esquelético: A análise das alterações histológicas dos músculos gastrocnêmio (A e B), solear (C e D) e diafragma (E e F) de camundongos *mdx/mdx* de 6 (A, C e E) e 12 semanas (B, D e F) foi feita por coloração com hematoxilina-eosina. Características morfológicas gerais: infiltrado inflamatório (seta), e célula muscular regenerando (cabeça de seta) foram identificadas em três camundongos por idades. Barra: 100 $\mu$ m.

Apesar da idade de 6 semanas ser considerada como período inflamatório e a idade de 12 semanas como período regenerativo, podemos observar que nessas idades os músculos esqueléticos estudados apresentaram períodos inflamatórios e regenerativos diferenciados. O músculo gastrocnêmio apresentou um percentual de 34,9% de áreas em regeneração em 6 semanas com um aumento significativo de 61% em 12 semanas e baixos percentuais de áreas com inflamação e inflamação/regeneração nas duas idades (menor que 4%)(Fig 4A). O músculo solear apresentou um percentual de áreas em regeneração de 43% diminuindo significativamente para 17% entre as idades de 6 e 12 semanas. Embora o músculo solear apresente baixos percentuais das outras áreas, observamos uma diminuição significativa dos percentuais nos animais mais velhos (áreas com inflamação: 6,8% em 6 semanas para 1,5% em 12 semanas) (áreas inflamação/regeneração: 4,5% em 6 semanas para 0,9% em 12 semanas) (Fig 4B). O músculo diafragma, que é considerado o mais afetado pela doença, apresentou uma alta variação de percentual da áreas nas idades estudadas. Observamos em 6 semanas um percentual de regiões com inflamação de 11,3% e regiões com regeneração de 3%. Em 12 semanas observamos regiões com inflamação (4,2%), regeneração (12,2%) e inflamação/regeneração em 12 semanas (14%) (Fig 4C).

Comparando-se as diferentes áreas caracterizadas neste trabalho, podemos observar que os músculos gastrocnêmio e solear apresentaram altos percentuais de áreas com células em regeneração tanto em 6 como em 12 semanas (Fig 4Ae 4B). Diferente dos outros músculos, o diafragma apresentou baixos percentuais de áreas em regeneração (Fig 4C).

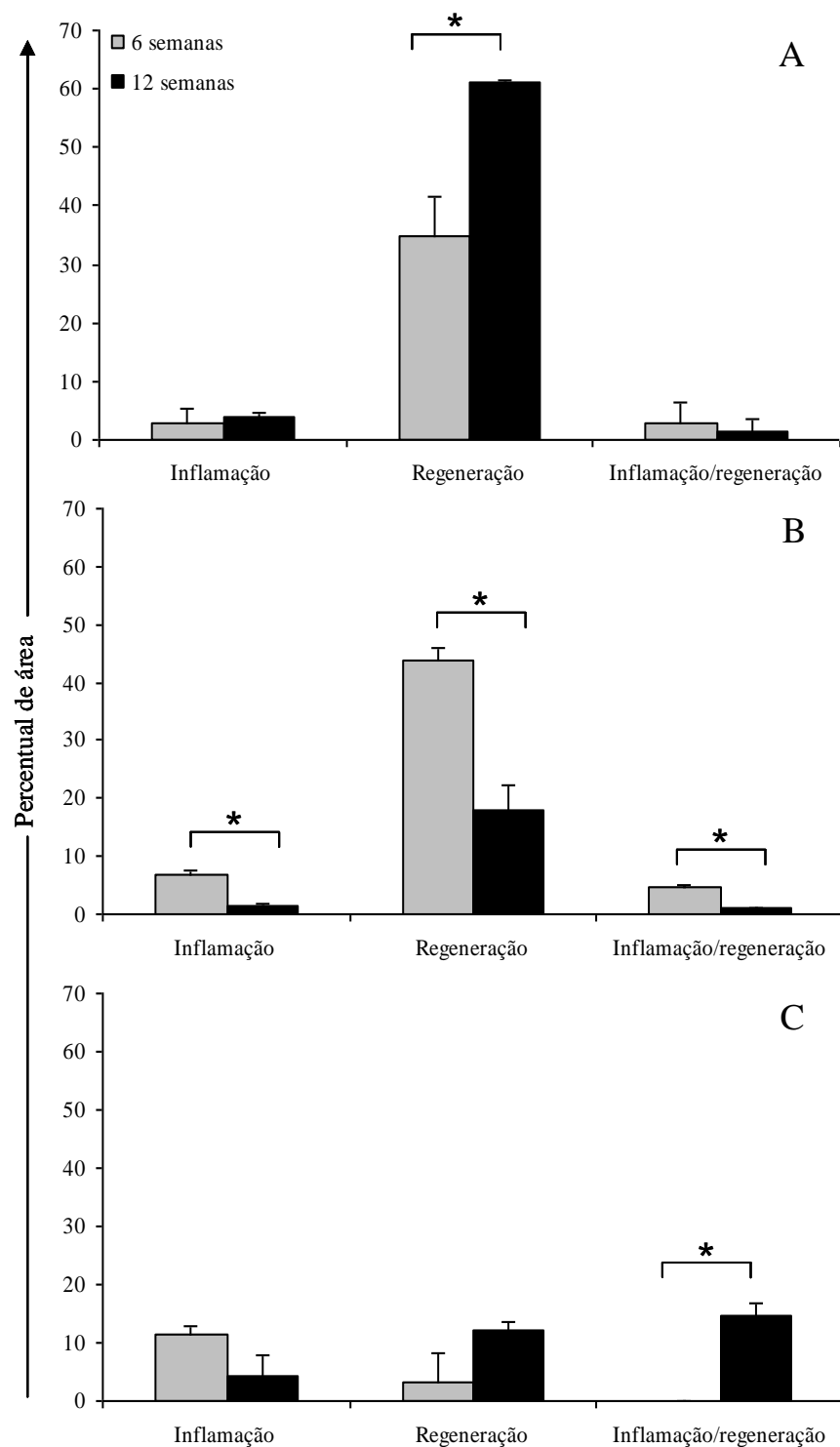


Figura 4: Análise quantitativa das diferentes áreas do processo inflamatório e regenerativo em músculos esqueléticos: Quantificação das áreas de inflamação, regeneração e inflamação/regeneração quantificadas nos músculos gastrocnêmio (A), solear (B) e diafragma (C) em camundongos de 6 e 12 semanas de idade. Cada barra representa a média do percentual da área identificada por corte e foram utilizados pelo menos 3 camundongos por idade. \*  $p < 0,05$

Através da análise histológica dos tecidos, observamos que tanto células inflamatórias quanto fibras em regeneração frequentemente apresentavam aspecto danificado e que poderiam estar em processo de morte. Decidimos então fazer a análise ultraestrutural do músculo diafragma em 6 e 12 semanas de camundongos *mdx/mdx* e observamos um grande número de vacúolos com estruturas membranares internas ou vesículas (Fig 5C e 5F). Como esperado, o músculo diafragma dos camundongos C57Bl/10 não apresentou alterações estruturais, sendo evidenciado pelas estriações e mitocôndrias normais (Fig 5A e 5B)



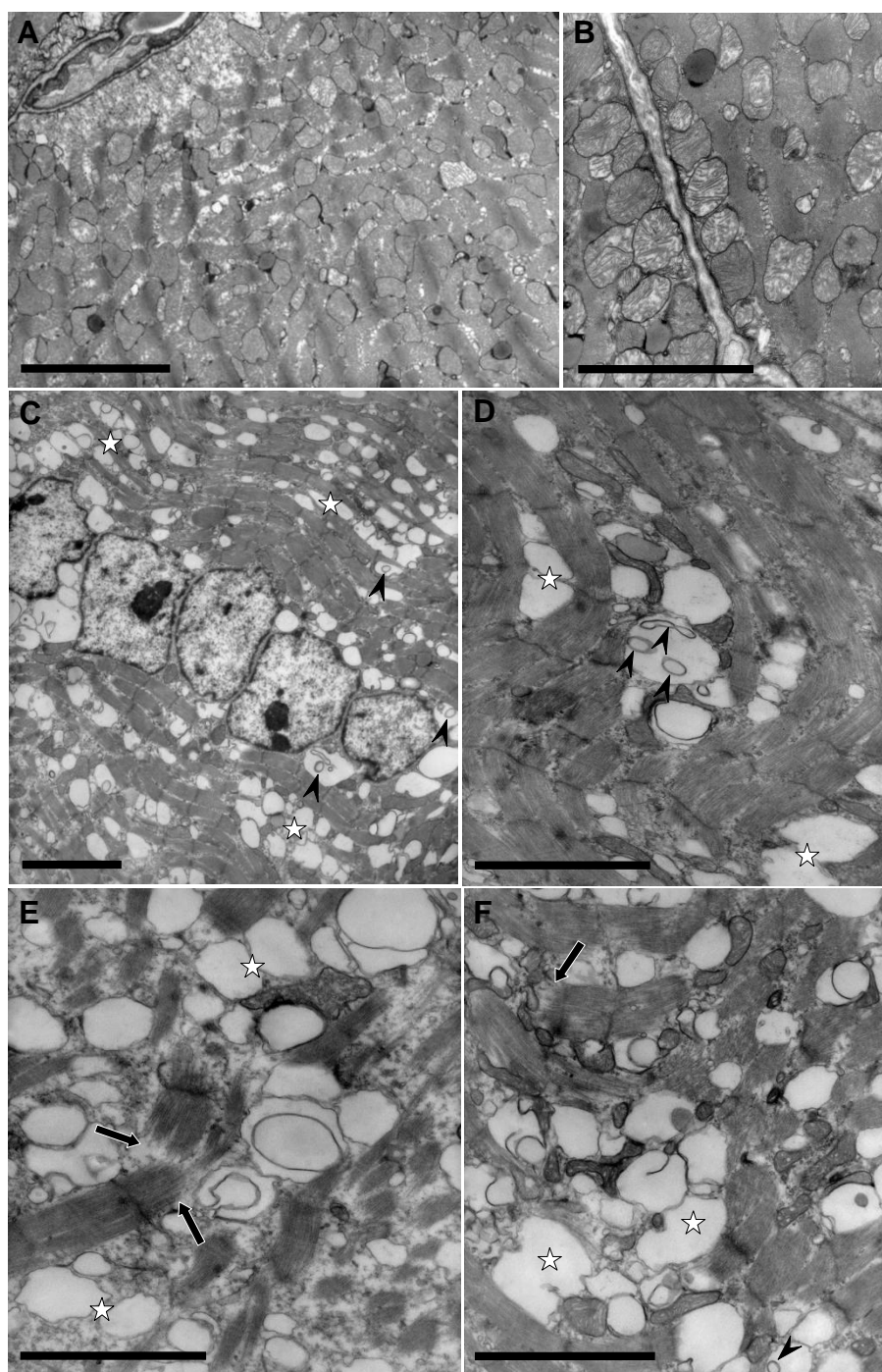


Figura 5: *Análise ultra-estrutural do músculo diafragma*: Fragmentos de músculo diafragma foram coletados de animais de 6 semanas de camundongos C57Bl/10 (A e B) e *mdx/mdx* (C-F) e processados para análise por microscopia eletrônica. Características morfológicas gerais: vacúolos (estrelas); vesículas dentro de vacúolos (cabeça de seta) e degradação de miofibrila (setas) foram identificadas em três camundongos por idade. Barra: 10 $\mu$ m (A e C), 50 $\mu$ m (B, D – F).

Estes dados iniciais indicam alterações morfológicas semelhantes ao padrão de morte por autofagia e nos indicam que as vias de indução de morte das fibras ainda deve ser melhor avaliada. A literatura aponta a morte necrótica como a principal via de morte na DMD e nossos dados de dosagem da atividade da enzima indicadora de morte de fibras esqueléticas (CK-NAC) (Fig 6) no sangue confirmam isso.

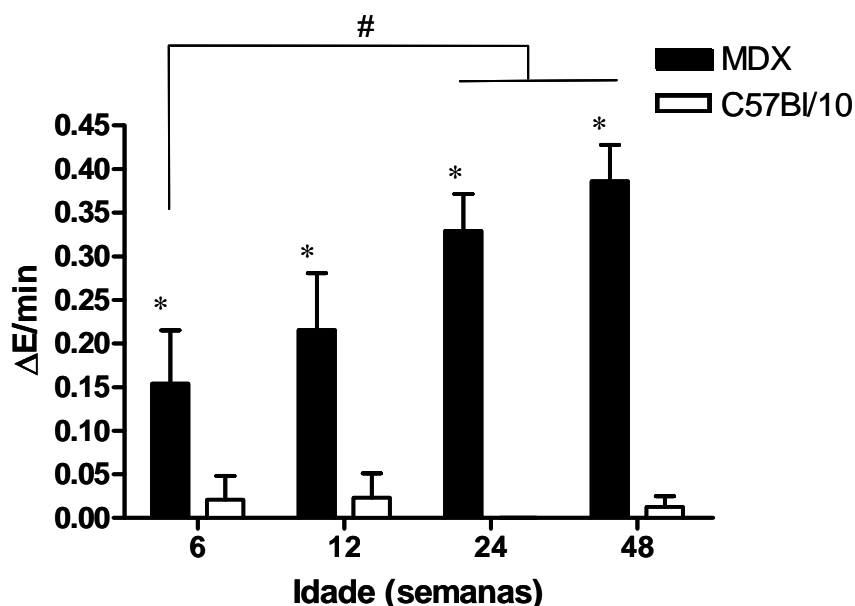


Figura 6: *Quantificação de lesão muscular*: O plasma de 24 camundongos *mdx/mdx* ou C57Bl/10/idade, como indicado, foi coletado e a atividade enzimática de CK-NAC foi quantificada em 6 leituras consecutivas ( $\Delta E/\text{min.}$ ), como indicado pelo fabricante. \*  $p < 0,05$  quando camundongos *mdx/mdx* são comparados com C57Bl/10 de mesma idade e #  $p < 0,05$  quando comparados *mdx/mdx* de idades diferentes.

Certamente uma avaliação sistemática dos diferentes tipos de morte celular que possam ocorrer, ou não, nas fibras pode revelar alternativas de controle de lesões primárias destas células na DMD. Por esse motivo iniciamos o estudo da ocorrência de apoptose (TUNEL) e autofagia (marcação por anti LC3) nas nossas amostras de músculo esquelético. Em miosites, por exemplo, foi demonstrado que não há níveis relevantes de apoptose em fibras musculares e isso ocorre devido a um grande aumento na expressão de moléculas bloqueadoras de apoptose como FLIP e IAP. Da mesma forma, em nossos dados de avaliação de apoptose, não observamos fibras adultas TUNEL<sup>+</sup> nos músculos gastrocnêmio (Fig 7A e 7B), diafragma (Fig 7D e 7E) e solear (dados não

mostrados) em animais de 6 (Fig 7A e 7D) e 12 semanas (Fig 7B e 7E). Observamos algumas marcações pontuais em regiões de células inflamatórias, porém em número apenas um pouco maior no músculo diafragma em 6 semanas (Fig 7D). Como esperado, os animais controle não apresentaram marcação para TUNEL (Fig 7C e 7F).

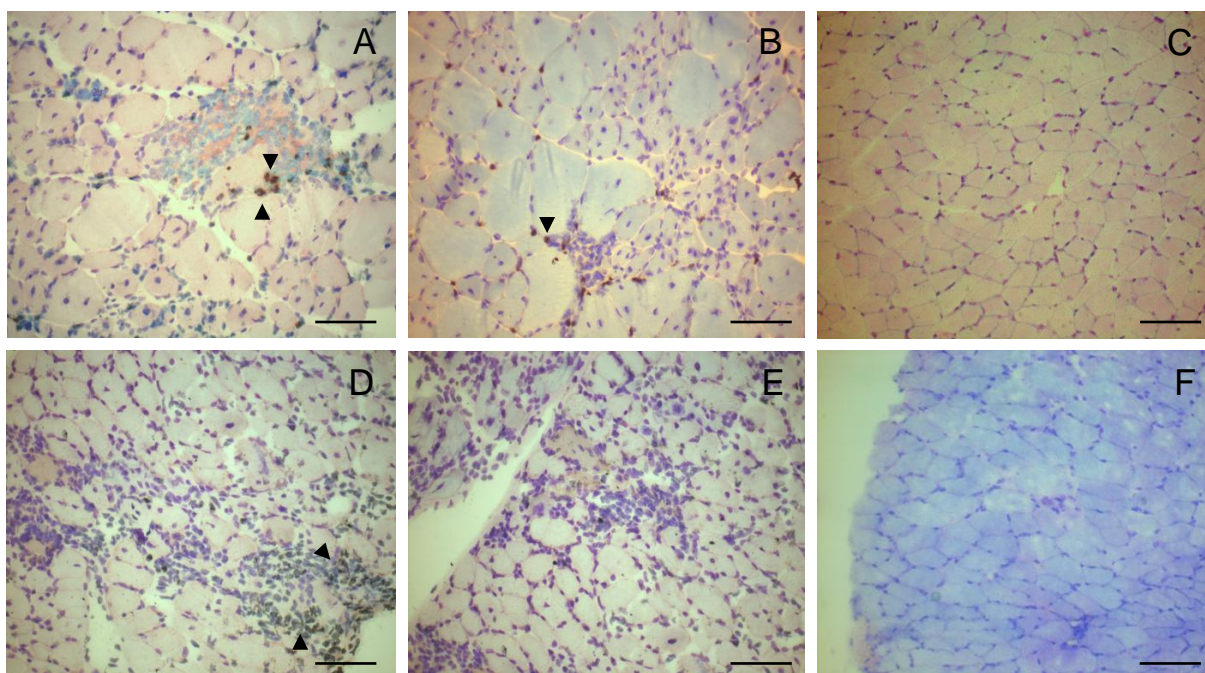


Figura 7: Avaliação de apoptose em músculos esqueléticos: A avaliação de apoptose foi feita pela identificação de células positivas para TUNEL (cabeça de seta) em músculo gastrocnêmio (A e B) e músculo diafragma (D e E) de camundongos *mdx/mdx* de 6 (A e D) e 12 semanas (B e E) e músculo gastrocnêmio (C) e diafragma (F) de animais C57 Bl/10 de 12 semanas. Os resultados são representativos de pelo menos três camundongos por idade. Barra: 100 $\mu$ m.

Apesar de termos observado raras marcações para apoptose em fibras musculares, observamos muita marcação para LC3 em células aparentemente associadas a infiltrados inflamatórios (áreas de inflamação/regeneração) com aspecto de fibras jovens/pequenas, mas também em algumas regiões com fibras adultas em camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas (Fig 8). Como esperado, não observamos marcação de LC3 em animais C57Bl/10 (Fig 8A e 8B). O músculo gastrocnêmio mostrou altos níveis de marcação por anti LC3 em áreas de inflamação/regeneração (Fig 8C) e em fibras adultas (Fig 8D e 8E). No músculo diafragma

também houve marcação associada a áreas de extensas lesões com muita inflamação e fibras em degradação (Fig 8F e 8G). Apesar de nossos dados sugerirem a morte de fibras e células inflamatórias por autofagia, é necessário ter cautela na interpretação destes dados. Por microscopia eletrônica observamos a formação de vacúolos em fibras maduras e morfologia associada sugestiva de morte. Porém, células musculares em diferentes estágios de maturação podem responder de forma diferente ao estímulo autofágico. Por exemplo, este estímulo em mioblastos ativados (precursores de fibras) pode não necessariamente estar associada à morte celular, mas, por exemplo, ao processo de diferenciação. A autofagia é uma via fisiológica que ativa inclusive transcrição gênica e pode, por exemplo, estar associada à ativação de fatores transcricionais da miogênese como MyoD, Pax7 e Myf5, e não à morte. São necessários experimentos adicionais *in vitro*, por exemplo, com estímulos brandos de autofagia em mioblastos e avaliação das repostas celulares.

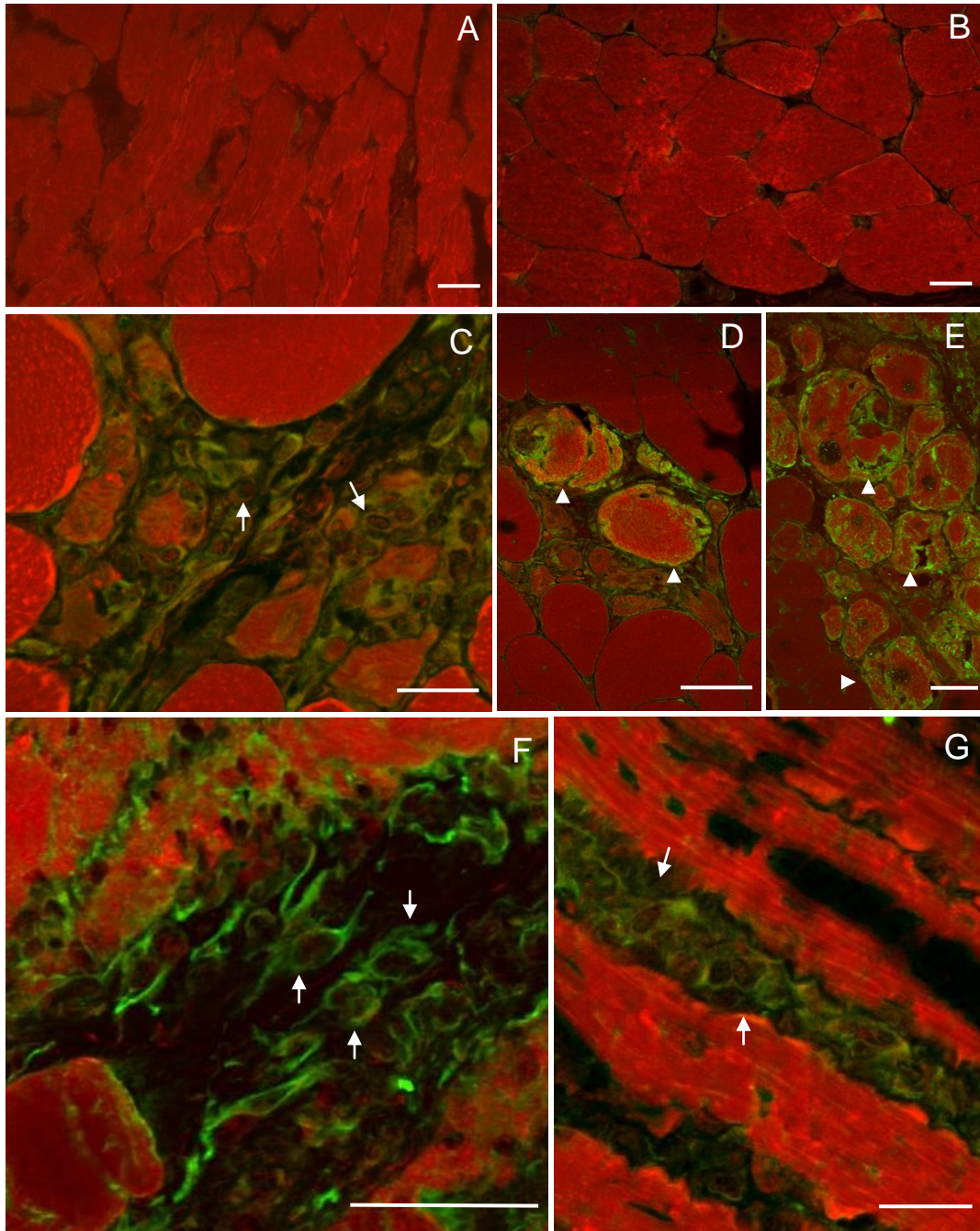


Figura 8: *Avaliação de autofagia em músculos esqueléticos*: A avaliação de autofagia foi feita através da expressão de LC3 no músculo gastrocnêmio (A) e diafragma (B) de animais C57BL10 e no músculo gastrocnêmio (C-E) e diafragma (F e G) de animais *mdx/mdx*. Os resultados são representativos de pelo menos três camundongos de 12 semanas de idade. Barra: 20 $\mu$ m (A-C e G), 50 $\mu$ m (D – F). Marcação de LC3 em células do infiltrado inflamatório (seta) e em fibras adultas (cabeça de seta).

Todos os aspectos de morte celular discutidos no presente trabalho sofrem grande influência dos níveis e perfil de citocinas produzidos no processo inflamatório e regenerativo e este é um aspecto muito importante na avaliação de qualquer doença inflamatória crônica. Comparado a camundongos controle (Fig 9A e 9B), observamos altos níveis de TNF e IFN- $\gamma$  em animais de 6 (Fig 9C) e 12 semanas (Fig 9D) no músculo diafragma ( $p < 0,005$ ) e no sangue de *mdx/mdx* (dados não mostrados). Entre 6 e 12 semanas também houve um aumento significativo ( $p < 0,005$ ) nos níveis de IFN- $\gamma$  no músculo diafragma (Fig 9C e 9D). A quantificação de citocinas também está sendo feita nos músculos gastrocnêmio e solear, mas dados iniciais demonstram altos níveis de IFN- $\gamma$  nesses músculos em animais de 6 semanas. Não temos como precisar pelo ensaio que fizemos qual a origem das citocinas avaliadas, o objetivo era justamente estudar o ambiente muscular como um todo. Por outro lado, é possível que a maior parte das citocinas detectadas esteja sendo produzida pelas células inflamatórias ou mesmo pelas próprias fibras ativadas.

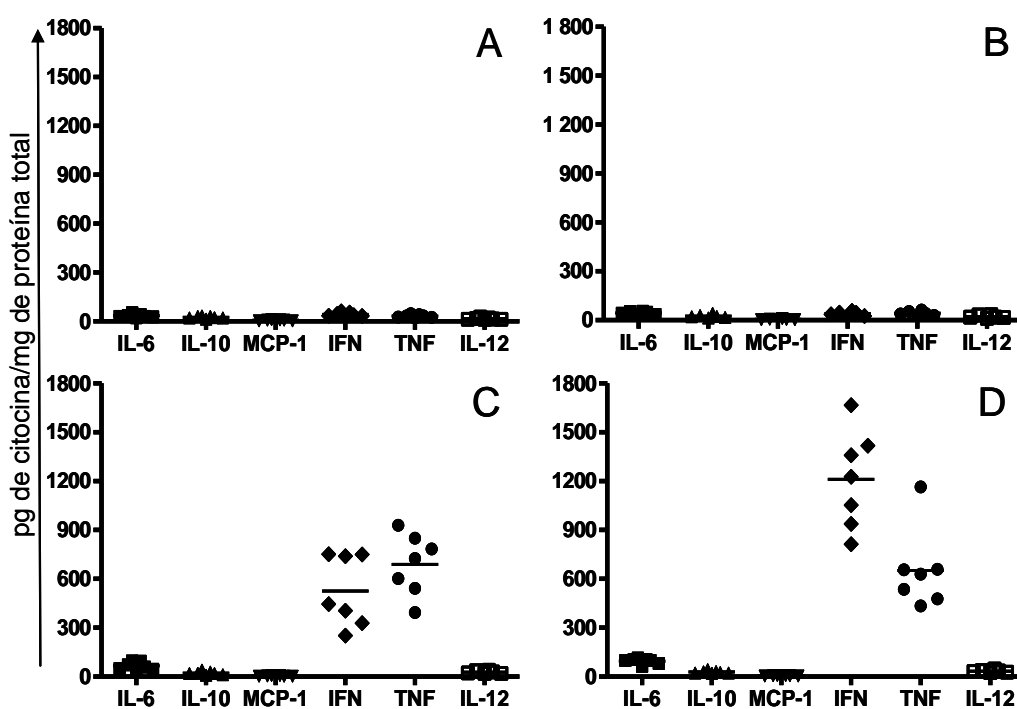


Figura 9: Análise quantitativa de citocinas em músculos esqueléticos: Produção de citocinas no músculo diafragma de camundongos C57Bl/10 de 6 (A) e 12 semanas (B) e *mdx/mdx* de 6 (C) e 12 semanas (D). Os resultados são representativos de pelo menos oito camundongos por idade.  $p < 0,005$  quando comparados os níveis de IFN- $\gamma$  de camundongos *mdx/mdx* entre as idades e  $p < 0,005$  quando comparados os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF entre camundongos *mdx/mdx* e C57Bl/10 de mesma idade.

Dados anteriores da literatura indicam que a exposição ao IFN e TNF, como evidenciado nos músculos (Fig 9), pode estimular a produção de iNOS (Fig 10), o que pode contribuir para a morte das fibras musculares em camundongos distróficos. Devido então ao perfil de citocinas encontrado, decidimos avaliar a expressão de iNOS nos músculos e observamos marcação difusa quase que exclusivamente nas áreas de infiltração inflamatória em quase todas as amostras, com exceção do músculo solear que não apresentou marcação na idade de 12 semanas (Fig 8H). Podemos observar ainda que houve uma aparente diminuição de iNos entre os animais de 6 e 12 semanas de idade nos músculos esqueléticos estudados (Fig 10).

Dentre as células mielóides, os macrófagos, em particular, compõem uma das principais populações inflamatórias na distrofia, os quais podem secretar diversas citocinas e também expressar iNOS. Níveis mais elevados de NO podem levar a reações posteriores com oxigênio e radicais superóxido, gerando ainda espécies altamente reativas adicionais. Além disso, NO, peroxinitrito e outros podem induzir dano mitocondrial, alterações em ácidos nucleicos, perda de integridade de membrana plasmática, morte celular e inibição da síntese de DNA.

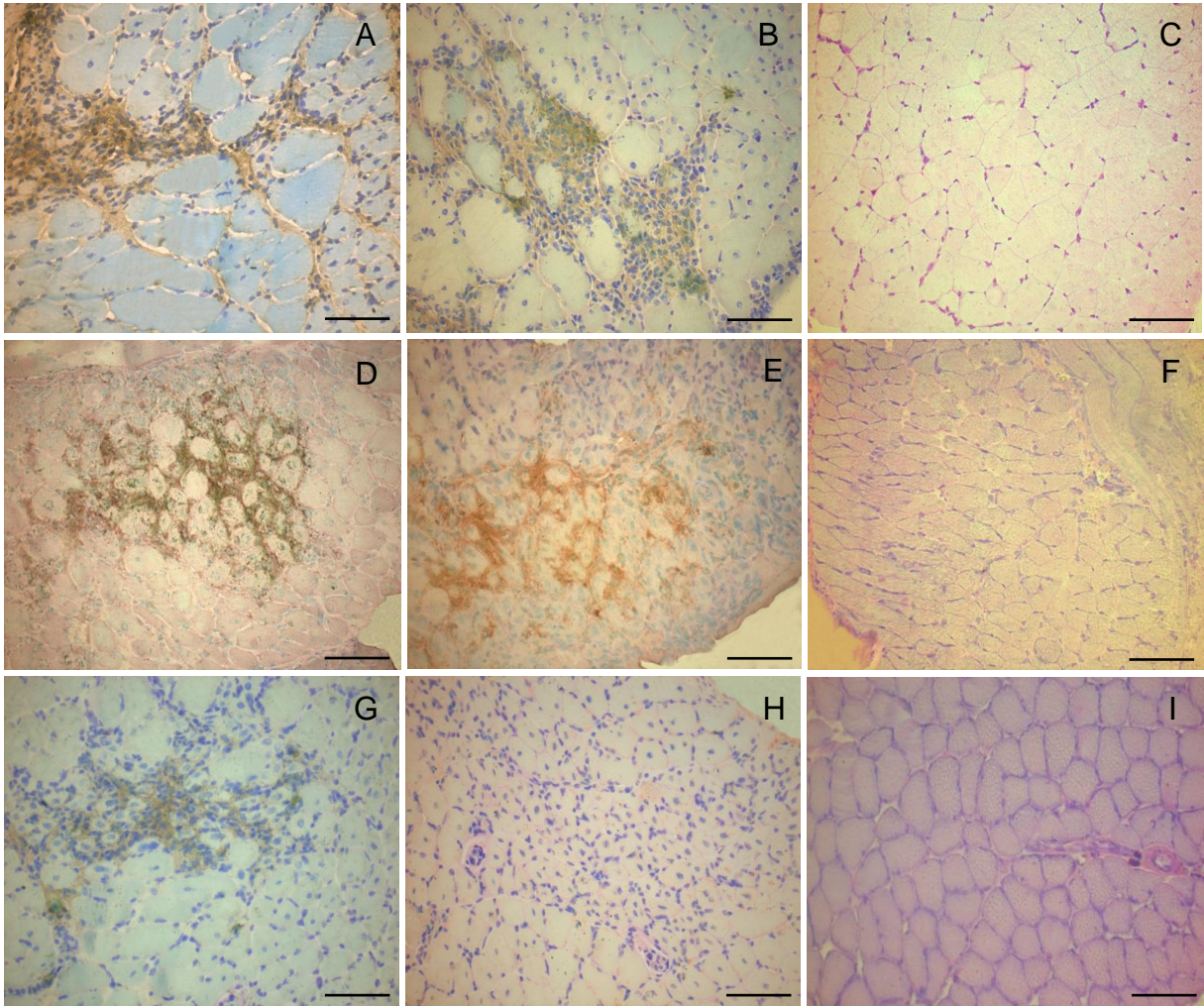


Figura 10: *Expressão de iNOS em músculos esqueléticos*: A presença da enzima iNOS foi avaliada em camundongos *mdx/mdx* nos músculos gastrocnêmio (A e B), diafragma (D e E) e solear em 6 (G, e H) e camundongos C57 Bl/10 de 12 semanas (C,F e I). Os resultados são representativos de pelo menos três camundongos por idade. Barra: 100 $\mu$ m



### **3 Perspectivas**

- 3.1** Avaliar se há níveis elevados de expressão das moléculas FLIP e IAP (inibidores de apoptose) nos músculos que possam justificar a baixa taxa de apoptose;
- 3.2** Avaliar a morte celular por autofagia através de ensaios *in vitro* com estímulos autofágicos brandos e avaliação de resposta celular;
- 3.3** Análisar as amostras de microscopia eletrônica das áreas dos tecidos onde vimos ativação de LC3;
- 3.4** Quantificar citocinas como TNF e IFN nos músculos gastrocnêmio e solear de 12 semanas de idade.

## 4 DISCUSSÃO

A distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD) é uma doença sistêmica que afeta de maneira distinta os diferentes tipos de músculos esqueléticos e o cardíaco. Essa diferença nos músculos se refere à capacidade regenerativa, extensão da resposta inflamatória, destruição tecidual, acometimento funcional e outros fatores, formando um quadro altamente complexo e que ainda tem muito a revelar. Porém, para se desenvolver uma futura terapia efetiva para a DMD, devemos tentar entender as principais diferenças desses microambientes.

Nas idades estudadas no nosso modelo experimental, o coração apresentou lesões inflamatórias de menor gravidade comparadas ao tecido esquelético. Uma comparação da extensão da área ocupada por células inflamatórias/fibrose nos diferentes tecidos mostrou que no coração de animais com até 48 semanas há apenas 8% de acometimento em relação à área total. Por outro lado, nos músculos esqueléticos gastrocnêmio, solear e diafragma essas alterações ultrapassam 50% da área total do músculo nos animais com 12 semanas. Porém, mesmo tendo uma progressão mais lenta, 10 a 40% dos pacientes com DMD morrem de insuficiência cardíaca.

Dentre as diferenças estruturais dos músculos esqueléticos e cardíaco podemos destacar, por exemplo, a estrutura das suas células. Diferente das fibras multinucleadas do músculo esquelético, os cardiomiócitos apresentam um ou dois núcleos e as células são separadas umas das outras por discos intercalares. Em segundo lugar, na ausência de distrofina os cardiomiócitos têm uma relação estiramento-tensão, antes do rompimento, maior que camundongos controle, enquanto que nas fibras esqueléticas de *mdx/mdx* esta relação é menor, mostrando uma maior susceptibilidade destas. Em terceiro lugar, o padrão de expressão da distrofina é distinto nos dois tecidos, pois no músculo esquelético a distrofina está concentrada nos costâmeros e curiosamente no coração do roedor ela é uniformemente distribuída ao longo do sarcolema e não há preferência pelos costâmeros. Outra diferença é a presença de distrofina na membrana dos túbulos T no coração. Embora ainda não esteja clara a implicação destas diferenças estruturais na progressão mais precoce das lesões nos músculos esqueléticos, é provável que pelo menos em parte haja uma correlação.

A perda da distrofina aparentemente leva à uma desestabilização do sarcolema e maior propensão à lesão *per si* em fibras esqueléticas e cardíacas. Entretanto, outros fatores secundários à perda da distrofina podem afetar a suscetibilidade das células ao dano. Embora ainda não tenham sido feitos estudos comparativos entre as fibras, atualmente se sabe que a ausência da distrofina leva a níveis mais elevados de  $Ca^{2+}$  no citoplasma de fibras esqueléticas, o que pode contribuir para a morte celular e maior dano. O aumento do  $Ca^{2+}$  pode ser pelo simples

influxo extracelular por descontinuidades do sarcolema e/ou pela ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  específicos ativados por estiramento [155]. Este influxo pode levar à ativação de proteases como a calpaína e ainda à elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) por disfunções em mitocôndria, por exemplo, também elevando a propensão à morte.

O tipo de morte celular das fibras ainda pode ser mais estudado, embora seja um consenso que a morte necrótica seja a principal via [156], a ocorrência de apoptose ou mesmo autofagia não é clara. Pelo menos em miosites, por exemplo, foi demonstrado que não há níveis relevantes de apoptose em fibras musculares [157, 158] e isso ocorre devido a um grande aumento na expressão de moléculas bloqueadoras de apoptose como FLIP e IAP. Certamente uma avaliação sistemática dos diferentes tipos de morte celular que possam ocorrer, ou não, nas fibras na DMD pode revelar alternativas de controle de lesões primárias destas células. Por esse motivo iniciamos o estudo da ocorrência de apoptose (marcação por TUNEL) e autofagia (marcação de LC3) nas nossas amostras e observamos que raramente há células TUNEL<sup>+</sup> em qualquer músculo ou idade estudada. Por outro lado, observamos muita marcação para LC3, sobretudo em fibras jovens pequenas aparentemente associadas a infiltrados inflamatórios, mas também em algumas fibras adultas. É preciso cautela na interpretação destes dados, pois a ativação da via de autofagia não necessariamente é associada à morte celular, uma vez que é uma via fisiológica que ativa inclusive transcrição gênica e pode, por exemplo, estar associada à diferenciação miogênica e não morte. São necessários experimentos adicionais *in vitro* com estímulos brandos de autofagia em mioblastos e avaliação das repostas celulares, se haverá morte ou diferenciação, por exemplo.

Independente das diferenças dos tecidos musculares e das alterações secundárias à perda da distrofina no processo de morte de fibras musculares, a este processo se segue a infiltração inflamatória que também é diferenciada em termos de extensão e cinética. Embora a resposta inflamatória cardíaca seja mais branda e muito menos estudada que a resposta esquelética, ambas são caracterizadas por altas concentrações de células mielóides, incluindo neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e principalmente macrófagos e fibroblastos, de acordo com nossos dados e a literatura [103, 104, 106, 107, 159].

Dentre as células mielóides, os mastócitos, em particular, compõem uma das principais populações inflamatórias em diversas doenças crônicas, inclusive a DMD. Já foi demonstrado em camundongos *mdx/mdx* que o bloqueio farmacológico funcional destas células com cromoglicato de sódio (um bloqueador de desgranulação) aumenta a força de contração muscular e reduz necrose das fibras [115, 160]. Também já foi descrito que há um aumento numérico [103, 161] e funcional [162] destas células em *mdx/mdx* em relação aos controles C57Bl/10, provavelmente

levando à maior lesão de fibras na distrofinopatia [116]. No presente trabalho, porém, nós mostramos pela primeira vez alterações nas sub populações reveladas pela coloração especial que se baseia nos componentes dos grânulos [113]. Observamos que na verdade há aumento numérico total de mastócitos nos músculos esqueléticos de camundongos *mdx/mdx*. Houve o aumento destas células no gastrocnêmio (média do número de células/campo) (C57Bl/10 x *mdx/mdx* (6 semanas) = 0,3 x 0,5), (C57Bl/10 x *mdx/mdx* (12 semanas) = 0,3 x 0,9), no solear (C57Bl/10 x *mdx/mdx* (6 semanas) = 0,5 x 0,9), (C57Bl/10 x *mdx/mdx* (12 semanas) = 0,6 x 1), e no diafragma (C57Bl/10 x *mdx/mdx* (12 semanas) = 0,3 x 0,6). Há uma redução no diafragma (C57Bl/10 x *mdx/mdx* (6 semanas) = 1,3 x 0,5), justamente a idade e o músculo mais afetado na doença. Estes dados nos sugeriram que talvez o simples aumento no número destas células não seja suficiente para contribuir para uma maior lesão muscular, mas também a modulação de uma sub população específica de mastócitos. De fato, utilizando a coloração especial nós observamos que apenas no diafragma de animais de 6 semanas há uma redução de mastócitos de fenótipo MMC e híbrido quando comparamos com controles C57Bl/10. Estes dados indicam uma complexidade adicional na análise destas células e que sub populações específicas devem ser sempre estudadas em qualquer situação patológica.

Os macrófagos também já foram descritos na DMD como células com potencial citotóxico sobre fibras musculares, sobretudo porque após inativação destas células houve menor destruição de fibras. Embora os mecanismos não sejam claros, é possível que a liberação de níveis mais elevados de ROS e TNF, por exemplo, participem do processo. Além disso, nossos dados sugerem que de fato haja altos níveis de ROS no ambiente muscular, pelo menos cardíaco, uma vez que observamos diversos corpos lipídicos no citoplasma das células que compõem os infiltrados.

Observamos ainda raros polimorfonucleares nos músculos esqueléticos estudados através da análise morfológica e nossos dados estão de acordo com a maior parte da literatura. Exceto os trabalhos que indicam um número mais elevado de neutrófilos em camundongos *mdx/mdx* por citometria de fluxo [163] e por histologia [104], ambos do mesmo grupo. Similar ao descrito para músculos esqueléticos na literatura em geral, observamos principalmente macrófagos e fibroblastos nos infiltrados inflamatórios dos camundongos *mdx/mdx* com papel ainda desconhecido no coração.

Interessantemente, observamos no coração de camundongos *mdx/mdx* por microscopia eletrônica um perfil de morte de células inflamatórias, aparentemente macrófagos, que se assemelha à necrose por haver perda de integridade de membrana plasmática e organelas. Dados

muito recentes da literatura estão esclarecendo o envolvimento do inflamasomo num tipo de morte celular observado em macrófagos chamado pironecrose que é independente de caspases e com perfil morfológico igual ao que observamos. O inflamasomo é um complexo multiproteico que pode ser ativado em diversas situações infecciosas ou não e é considerado um dos resultados da exposição celular a sinais de perigo endógenos e exógenos [164]. Diferentes famílias de proteínas participam deste processo e da família NLP o componente mais conhecido é a NLPR3 (também chamada de criopirina), cuja ativação leva à associação com a proteína adaptadora ASC, a qual se liga à pro-caspase 1 para a sua ativação e produção de IL-1 $\beta$  ativa [164]. Atualmente se sabe que a pironecrose é dependente da atividade de NLPR3, ASC, Catepsina B (uma protease lisosomal) e outros, e que pode ser induzida por exemplo pela infecção com *Klebsiella pneumoniae* [165] e *Neisseria gonorrhoeae* [166]. Também se sabe que a pironecrose é muito observada em monócitos de pacientes com mutações no gene humano que codifica a NLRP3 (*NLRP3/CIAS1*), levando a uma síndrome caracterizada por febre periódica chamada CAPS (*CIAS1-associated periodic syndrome*) [167]. Em todas as situações onde se observa a pironecrose há liberação de HMGB1 (*high mobility group protein B1*). Esta proteína tem várias funções em macrófagos, como organização da cromatina e regulação da transcrição, mas quando liberada após morte celular tem potente ação pró inflamatória possivelmente pela interação com TLRs. Neste momento podemos apenas especular se a morte semelhante à necrose que observamos no miocárdio de *mdx/mdx* é pironecrose ou não, mas independente da via, certamente a perda de integridade de membrana de leucócitos no tecido estimula ainda mais a resposta inflamatória e lesões secundárias nas fibras.

Além das diversas possibilidades de indução de lesão de fibras citadas acima, principalmente baseadas em células mielóides, é possível ainda que células linfóides também exerçam atividade citotóxica. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são descritos como capazes de promover a patologia nos camundongos *mdx/mdx* por mecanismos indiretos, como recrutamento de outras células inflamatórias, uma vez que a depleção dessas células reduziu a concentração de outras células como eosinófilos [104]. Pode haver ainda lesão por mecanismos diretos dependentes de contato físico com a célula alvo e liberação de componentes de grânulos citotóxicos contendo perforina [119]. A perforina é uma molécula lítica que aparentemente permite a liberação de granzimas endocitadas para o citoplasma da célula alvo, levando à ativação de caspases, à própria atividade semelhante à caspase da granzima B e apoptose [120, 168].

A participação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na DMD foi avaliada através da depleção desse tipo celular em camundongos *mdx/mdx* e essa depleção reduziu em torno de 60% o dano muscular [73].

Nossas análises de células linfóides por citometria de fluxo no músculo cardíaco e nos músculos esqueléticos corroboram a idéia de investigar melhor estas sub populações nos diferentes músculos. Nossos resultados usando camundongos *mdx/mdx* de 6 semanas mostraram um enriquecimento precoce de linfócitos T CD4 e CD8 no coração e um baixo percentual dessas células nos músculos esqueléticos estudados. Observamos ainda um pico único de linfócitos T  $\gamma\delta$  em 12 semanas no tecido cardíaco. Ainda é desconhecido o papel das células T  $\gamma\delta$  na distrofia muscular e não há relatos na literatura abordando estas células na DMD. Sabe-se que essas células participam de doenças infecciosas podendo ter papel regulatório como na infecção por *L. monocytogenes* [133] ou atividade citotóxica contra macrófagos peritoneais infectados com *Listeria* [134]. Elas também estão envolvidas em doenças autoimunes como a artrite reumatóide e poliomiosite idiopática [169]. Um artigo recente mostra o primeiro caso de cardiomiopatia dilatada mediada por células T  $\gamma\delta$  e a análise histológica neste trabalho mostrou que a maioria das células presentes no infiltrado eram células T  $\gamma\delta$ . Diferente de outros casos de cardiomiopatia dilatada, a terapia com imunossupressor melhorou significativamente a doença [169]. No modelo de miocardite induzida por vírus Coxsackie B3 a função imunomodulatória de células T  $\gamma\delta$  fica bem ilustrada [135]. Neste trabalho foi mostrado que estas células são capazes de matar células T CD4<sup>+</sup> protetoras (IL-4<sup>+</sup>) mas não CD4<sup>+</sup> consideradas patogênicas (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) através de interação dependente de Fas/Fas-L, enriquecendo o miocárdio na população patogênica e aumentando a miocardite. Embora ainda não tenhamos investigado o papel das células T  $\gamma\delta$  no coração, é plausível sugerir que essas células possam estar influenciando na redução de células  $\alpha\beta$  no tecido, uma vez que a redução das células T  $\alpha\beta$  coincide com o pico das T  $\gamma\delta$ . Esta atividade moduladora poderia ser por atividade citotóxica direta ou por imunoregulação de outra natureza, como por exemplo através da secreção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ .

Há referências na literatura a uma população linfóide muito menos conhecida de células CD3 positivas, mas CD4 e CD8 negativas, chamadas de células T duplo negativas (TDN). Estas células são bastante comuns em baço e sangue de camundongos deficientes em Fas ou Fas-L e também em pacientes com mutações nestas moléculas (síndrome autoimune linfoproliferativa – ALPS). Embora a consequência fisiológica do acúmulo destas células não seja clara, elas parecem ser policlonalmente ativadas e têm pouca capacidade proliferativa *in vitro* [170]. Nosso grupo publicou recentemente a ocorrência de células TDN no tecido cardíaco de camundongos

BALB/c após a infecção com *Trypanosoma cruzi* [171]. Além disso, neste trabalho foi observado que células TDN isoladas do tecido de animais *gld/gld* (deficientes em Fas-L) infectados têm modulação negativa na expressão de diversas moléculas como LFA-1, ICAM, CD2 e CD69 em comparação aos camundongos BALB/c infectados. Embora também ainda não esteja clara a função destas células na infecção, este fenótipo em *gld/gld* não compatível com células ativadas/memória, a maior produção de IL-10 no tecido e a menor miocardite nesses camundongos infectados sugerem um papel patogênico na infecção dependente de Fas/Fas-L. Outros dados da literatura mostram que células TDN ( $\text{TCR}\alpha\beta^+$ ) possuem função regulatória e desempenham um papel importante no desenvolvimento de tolerância após transplantes. Estas células podem suprimir a resposta de células T contra o doador e prolongar a sobrevivência do enxerto em alguns modelos de transplante [172].

Nós observamos um percentual superior a 40% de células TDN na região de linfócitos nas análises por citometria de músculos esqueléticos de camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas e que estas células expressam a molécula CD117. Este achado aumenta ainda mais a complexidade e o perfil curioso destas células, uma vez que este é o receptor do fator de célula tronco (*stem cell factor* – SCF) e não seria esperado que fosse expresso em células T. Embora ainda não tenhamos avaliado a origem destas células em camundongos *mdx/mdx*, a injeção intratímica de FITC em camundongos infectados por *T. cruzi* nos indicou que são de origem tímica (dados não publicados). Muito recentemente foi publicado em camundongos *mdx/mdx* que de uma população de 3% de células T encontradas em músculo esquelético, aproximadamente metade era de células TDN [163]. Foi mostrado ainda que estas células produzem altos níveis de osteopontina, uma citocina capaz de induzir quimiotaxia de células do sistema imune e sobrevivência. Uma das razões para a diferença percentual entre estes e nossos dados pode ser a idade dos camundongos. Embora estas células TDN tenham sido observadas em animais de 4 semanas e nós começamos nossas avaliações em animais de 6 semanas, alguns dos nossos dados mostram que mesmo intervalos pequenos podem levar a diferenças significativas. Uma outra possibilidade pode ser a região de análise dos gráficos de citometria. Nossa análise foi feita considerando apenas a região de linfócitos enquanto que no artigo citado os pesquisadores consideraram toda a região do gráfico onde havia células vivas.

De uma forma geral, ainda é necessário aprimorar o estudo da relevância individual das populações celulares encontradas no coração e nos músculos esqueléticos em diferentes idades. A eventual eficácia de futuros tratamentos, exclusivos ou complementares, baseados na resposta imunológica da DMD pode depender da identificação de cada tipo celular, bem como da compreensão profunda de seus mecanismos funcionais na patologia. Células inflamatórias podem

desempenhar potencialmente diferentes papéis no processo da doença, incluindo: promoção de necrose e fibrose, imunomodulação ou mesmo promoção do reparo muscular [163]. Diversos trabalhos já demonstraram que intervenções experimentais *in vivo* que reduzem ou inibem diferentes tipos de células imunológicas podem reduzir a patologia muscular no camundongo *mdx/mdx* como: depleção de células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e inibição de mastócitos. Estes estudos suportam uma importância muito grande do sistema imune como um fator que pode agravar a distrofia muscular e sugerem que as intervenções que têm por alvo essas células podem fornecer benefícios terapêuticos. Certamente estabelecer um padrão de comparação dos diferentes tipos celulares encontrados em diferentes tipos de músculo pode ser um caminho para se entender por que um músculo pode ser mais afetado do que outro na DMD e como reverter o processo.

Como dito anteriormente, os estágios iniciais da doença são caracterizados por inúmeros focos de mionecrose que progridem para repetidos ciclos de degeneração. Este fato exaure a capacidade regenerativa das CS e afeta o músculo diafragma e o coração de forma irreversível, levando à morte por falência cardiorrespiratória [173]. Desta forma, além de estudar os mecanismos primários de morte de fibras e resposta inflamatória, é necessário estudar também os mecanismos e populações celulares envolvidas na regeneração do tecido.

Células progenitoras Sca-1<sup>+</sup> estão presentes tanto no coração como nos músculos esqueléticos e são capazes de se diferenciar em células musculares [68]. Observamos diferentes populações de células Sca-1<sup>+</sup> nos músculos estudados e variações dos seus percentuais em diferentes tempos da doença. Nos músculos esqueléticos observamos uma população Sca-1<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Mac-1<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> enquanto que no coração encontramos diferentes fenótipos de células Sca-1<sup>+</sup> como: B220<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup> em 6 semanas, B220<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> em 12 semanas e células B220<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup> em 24 e 48 semanas. Embora células Sca-1<sup>+</sup> tenham capacidade regenerativa descrita, ainda não sabemos se essas células identificadas em nossos estudos de fato se diferenciam ou se apenas liberam fatores que contribuem para a regeneração ou fibrose. Além disso, mesmo que se diferenciem é necessário se estabelecer se há diferenciação em fibras musculares. São necessários, por exemplo, experimentos de transferência adotiva dessas células marcadas com traçadores para avaliar se elas estão dando origem a fibras musculares.

Ensaio clínico em doenças cardiovasculares utilizando principalmente células derivadas de medula óssea e mioblastos esqueléticos sugerem que a geração de cardiomiócitos é baixa e os mecanismos de ação predominante dessas células transplantadas envolvem efeitos parácrinos, onde a secreção de fatores produzidos pelas células tronco seria



o principal mecanismo responsável pelos efeitos benéficos [174, 175]. Em modelos animais de infarto do miocárdio ainda não se sabe os mecanismos responsáveis pela regeneração tecidual e melhora funcional com injeção de células tronco [176]. Em 2006, Gnecchi propôs que o efeito resultante da terapia com células tronco ocorre através de um mecanismo de ação de uma proteína chamada AKT-1 que controlaria vias de sinalização que poderiam acarretar em diminuição da morte celular e aumento da proliferação de células progenitoras cardíacas [177]. Por outro lado, a injeção de mioblastos, por exemplo, para regeneração de músculos esqueléticos por via intravenosa ou intraperitoneal normalmente leva ao seu acúmulo em chamados órgãos de filtração como fígado e baço. Contudo, certamente o melhor método para restaurar o músculo esquelético danificado seria através do transplante de células miogênicas, preferencialmente produtoras de distrofina. CS e mioblastos já foram utilizados em ensaios clínicos em DMD, no entanto os resultados desses estudos não têm sido muito encorajadores, pois poucos mioblastos ou CS sobrevivem e proliferam após o transplante [178]. Em contraste com as SC que facilmente podem se diferenciar em miócitos em cultura, células tronco adultas comportam-se de maneira diferente e podem exigir mais sinais para iniciar a cascata de diferenciação miogênica [179]. O transplante de células tronco derivadas de medula óssea ou a linhagem MDSC tiveram uma capacidade regenerativa limitada e os camundongos distróficos não tiveram muita melhora. Isto pode ser explicado também pelo fraco recrutamento dessas células tronco para o músculo distrófico [69]. Uma melhor compreensão da natureza dos fatores responsáveis pela migração celular para os músculos e sua diferenciação será inestimável na tentativa de melhorar a terapia de células tronco para doenças musculares.

Nossos dados de imunohistoquímica também mostram a presença de células progenitoras e CS nos diferentes músculos esqueléticos estudados. Interessante é que o percentual desses dois tipos de células varia de acordo com a idade e com o músculo estudado. Parece haver um perfil de ativação dessas células relacionado com o grau de dano do tecido, uma vez que por exemplo o músculo diafragma é considerado o mais afetado enquanto que o solear é um dos menos afetados. Através de nossos dados pudemos observar que mioblastos ativados marcados com NCAM estão presentes no músculo solear com 2 semanas, enquanto que no diafragma essas células só aparecem com 12 semanas de idade. Com relação às células Sca-1<sup>+</sup> observamos uma quantidade muito maior no músculo diafragma (acima de 2000 células/mm<sup>2</sup>) do que no músculo solear (300 células/mm<sup>2</sup>) na idade de 12 semanas. A idade de 12 semanas é considerada a fase regenerativa da doença, mas nossa análise histológica mostra que os diferentes músculos estudados estão em diferentes estágios neste período. Através da nossa análise do percentual de

área observamos um predomínio de área regenerativa no músculo gastrocnêmio e solear, mas no músculo diafragma o percentual de área inflamatória ainda é muito extenso. É interessante associar a presença de células tronco com o perfil do músculo observado. O diafragma, que apresenta intensa inflamação e fibrose no decorrer da patologia, apresenta um grande número de células Sca-1<sup>+</sup> e ativação de células satélites somente com 12 semanas de idade. Estudos com camundongos Sca-1<sup>-/-</sup> mostraram que esses animais tiveram dificuldade no processo de regeneração muscular, desenvolvendo fibrose logo após a lesão. Neste trabalho, os autores sugerem que a ausência de Sca-1 reduz a atividade de metaloproteases [68]. Esses dados corroboram com nossas observações sobre o aumento de células Sca-1 associado ao aumento da atividade MMP-9 nos diferentes músculos esqueléticos no período de regeneração. Em um modelo de lesão muscular por esmagamento, o músculo solear apresentou uma extensa fibrose comparada com o músculo extensor longo digitiforme, o que foi correlacionado com uma redução da atividade MMP-2 [180]. A redução da atividade das MMPs foi ainda previamente correlacionada com aumento da fibrose no músculo esquelético [68]. Além disso, metaloproteases (MMPs) têm sido descritas como importantes na migração de células tronco para os pontos de dano e remodelamento na regeneração. Na verdade, observamos que a atividade de MMP2, que é constitutiva dos músculos, é alta em animais ainda com muito poucos sinais da doença, mas há uma alteração nesse perfil e animais de 8 semanas com mionecrose/inflamação passam a ter mais atividade MMP9. O diafragma mais uma vez é diferenciado e em todas as idades teve alta expressão de MMP2, podendo correlacionar também com a maior lesão. Um outro possível resultado da ativação de MMPs no músculo seria a clivagem e liberação de fatores de crescimento a partir da proteólise de componentes da ECM. Estes fragmentos são sinais crípticos, os quais são fragmentos normalmente não expostos na molécula íntegra, mas que são liberados após digestão por MMPs. Por exemplo, a clivagem da cadeia  $\gamma$ 2 de laminina expõe um sítio que promove a migração de células epiteliais e fragmentos de colágeno e laminina têm diversas implicações na ativação de células tumorais e migração na formação de metástases através de receptores como de EGF (fator de crescimento epidermal) [181-183].

Todos os aspectos inflamatórios e de regeneração discutidos no presente trabalho sofrem grande influência dos níveis e perfil de citocinas localmente produzidos e este é um aspecto muito importante na avaliação de qualquer doença crônica. Embora estejamos concluindo os experimentos de análise do perfil de citocinas, observamos um aumento de TNF e IFN- $\gamma$  em animais de 6 semanas e principalmente de 12 semanas no músculo diafragma e miocárdio (após

perfusão) e no sangue de *mdx/mdx*. Esse aumento coincide com a grande atividade inflamatória observada e com o aumento da atividade de MMP9, células em regeneração NCAM<sup>+</sup> e células progenitoras Sca-1<sup>+</sup>, por exemplo.

Todos estes resultados demonstram a complexidade da doença e a importância do estudo das diferenças do microambiente e dos diferentes tipos celulares encontrados nos músculos esqueléticos e cardíaco. Estabelecer um padrão de comparação das diferenças observadas, pode ser um bom começo para o estabelecimento de terapias complementares mais eficientes.

## 5 CONCLUSÕES

- 1- O coração apresenta lesões inflamatórias de menor gravidade que o tecido esquelético nas idades estudadas;
- 2- Existe uma cinética específica de migração de células linfóides, mielóides e progenitoras hematopoiéticas para os diferentes tecidos, cujas funções ainda devem ser exploradas;
- 3- O perfil de regeneração evidenciado pela marcação de células satélites/mioblastos ativados com NCAM e Sca-1 nos músculos esqueléticos mostrou um padrão diferenciado entre os diferentes músculos estudados nas diferentes fases da miopatia;
- 4- A avaliação de mastócitos na DMD não deve se restringir à quantificação, mas também levar em conta as sub populações destas células que podem modular de forma diferenciada a progressão da doença;
- 5- Nossos parâmetros inflamatórios baseados na atividade de MMPs, quantificação de citocinas, avaliação de mastócitos e outras células linfóides e mielóides, por exemplo, mostram que a idade de 12 semanas no camundongo *mdx/mdx* é uma fase muito ativa da doença. Esta fase pode ser utilizada como um bom modelo para estudos de possíveis terapias imunomodulatórias;
- 6- Nossos dados indicam que há diferentes padrões de morte de fibras musculares na DMD. Observamos poucas células em apoptose, mas altos níveis de indicadores de necrose e, sobretudo, a ativação de autofagia em mioblastos ativados e fibras maduras.

## 6 REFERÊNCIAS

- [1] Voisin V, de la Porte S. Therapeutic strategies for Duchenne and Becker dystrophies. *International Review of Cytology*. 2004;240:1-30.
- [2] Kapsa R, Kornberg AJ, Byrne E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurology*. 2003 May;2(5):299-310.
- [3] Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *The New England Journal of Medicine*. 1995 Sep 28;333(13):832-8.
- [4] Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research*. 2000 Apr;32(1):277-307.
- [5] Van den Bergh PY, Tome FM, Fardeau M. Etiology and pathogenesis of the muscular dystrophies. *Acta Neurologica Belgica*. 1995;95(3):123-41.
- [6] Stupka N, Schertzer JD, Bassel-Duby R, Olson EN, Lynch GS. Stimulation of calcineurin Aalpha activity attenuates muscle pathophysiology in mdx dystrophic mice. *American Journal of Physiology*. 2008 Mar;294(3):R983-92.
- [7] Jejurikar SS, Kuzon WM, Jr. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*. 2003 Dec;8(6):573-8.
- [8] Finsterer J. Cardiopulmonary support in duchenne muscular dystrophy. *Lung*. 2006 Jul-Aug;184(4):205-15.
- [9] Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *International Journal of Experimental Pathology*. 2003 Aug;84(4):165-72.
- [10] Skuk D, Vilquin JT, Tremblay JP. Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies. *Current Opinion in Neurology*. 2002 Oct;15(5):563-9.
- [11] Golumbek PT, Keeling RM, Connolly AM. Strength and corticosteroid responsiveness of mdx mice is unchanged by RAG2 gene knockout. *Neuromuscul Disord*. 2007 May;17(5):376-84.
- [12] Khurana TS, Davies KE. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nature Reviews*. 2003 May;2(5):379-90.
- [13] Partridge TA. Stem cell route to neuromuscular therapies. *Muscle & Nerve*. 2003 Feb;27(2):133-41.

- [14] Spence HJ, Chen YJ, Winder SJ. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. *Bioessays*. 2002 Jun;24(6):542-52.
- [15] Martin PT. Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology*. 2003 Aug;13(8):55R-66R.
- [16] Fazekas S, Szekessy-Hermann V. [Molecular mechanisms of muscle contraction]. *Orvosi Hetilap*. 1989 Aug 6;130(32):1707-10, 13.
- [17] Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Dec;289(6):H2291-301.
- [18] Deleze J. Cell-to-cell communication in the heart: structure-function correlations. *Experientia*. 1987 Oct 15;43(10):1068-75.
- [19] Rudy Y. Electrotonic cell-cell interactions in cardiac tissue: effects on action potential propagation and repolarization. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005 Jun;1047:308-13.
- [20] Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *The Journal of Cell Biology*. 1991 Oct;115(2):411-21.
- [21] Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews*. 1996 Apr;76(2):371-423.
- [22] 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. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2005 Jan;140(1):45-50.
- [23] Fulton AB, Alftine C. Organization of protein and mRNA for titin and other myofibril components during myofibrillogenesis in cultured chicken skeletal muscle. *Cell Structure and Function*. 1997 Feb;22(1):51-8.
- [24] Rafael JA, Brown SC. Dystrophin and utrophin: genetic analyses of their role in skeletal muscle. *Microscopy Research and Technique*. 2000 Feb 1-15;48(3-4):155-66.
- [25] Muller J, Vayssiere N, Royuela M, Leger ME, Muller A, Bacou F, et al. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2001;22(2):133-9.
- [26] Weiss A, Leinwand LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1996;12:417-39.

- [27] Takemasa T, Sugimoto K, Miyazaki M, Machida M, Ikeda S, Hitomi Y, et al. Simple method for the identification of oxidative fibers in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*. 2004 Mar;91(2-3):357-9.
- [28] Brooke MH, Kaiser KK. Three human myosin ATPase systems and their importance in muscle pathology. *Neurology*. 1970 Apr;20(4):404-5.
- [29] Wakata N, Kawamura Y, Kobayashi M, Kinoshita M. Biochemical and histochemical study of type IIC muscle fiber. *Clinical Neurology*. 1989 Jul;29(7):880-4.
- [30] Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology*. 1997;170:143-223.
- [31] Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J*. 1992 Apr;6(7):2439-49.
- [32] Bani C, Lagrota-Candido J, Pinheiro DF, Leite PE, Salimena MC, Henriques-Pons A, et al. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. *Muscle & Nerve*. 2008 May;37(5):583-92.
- [33] Yuasa K, Nakamura A, Hijikata T, Takeda S. Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC Musculoskeletal disorders*. 2008;9:1.
- [34] Manole E. The dystrophin gene and its product--a view. *Romanian Journal of Neurology and Psychiatry*. 1995 Apr-Jun;33(2):109-19.
- [35] Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet neurology*. 2003 Dec;2(12):731-40.
- [36] Bies RD, Friedman D, Roberts R, Perryman MB, Caskey CT. Expression and localization of dystrophin in human cardiac Purkinje fibers. *Circulation*. 1992 Jul;86(1):147-53.
- [37] Nishio H, Takeshima Y, Narita N, Yanagawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, et al. Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *The Journal of Clinical Investigation*. 1994 Sep;94(3):1037-42.
- [38] Whewey JM, Roberts RG. The dystrophin lymphocyte promoter revisited: 4.5-megabase intron, or artifact? *Neuromuscul Disord*. 2003 Jan;13(1):17-20.
- [39] Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Ikezawa M, Nonaka I, Matsuo M. Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Human Molecular Genetics*. 1999 Mar;8(3):493-500.

- [40] Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. 1975. *Neurology*. 1998 Jul;51(1):1-10
- [41] Watkins SC, Cullen MJ, Hoffman EP, Billington L. Plasma membrane cytoskeleton of muscle: a fine structural analysis. *Microscopy Research and Technique*. 2000 Feb 1-15;48(3-4):131-41.
- [42] Gardner KL, Kearney JA, Edwards JD, Rafael-Fortney JA. Restoration of all dystrophin protein interactions by functional domains in trans does not rescue dystrophy. *Gene Therapy*. 2006 May;13(9):744-51.
- [43] Bozic D, Sciandra F, Lamba D, Brancaccio A. The structure of the N-terminal region of murine skeletal muscle alpha-dystroglycan discloses a modular architecture. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004 Oct 22;279(43):44812-6.
- [44] Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews*. 2004 Apr;84(2):649-98.
- [45] Roberts RG. Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Advances in Genetics*. 1995;33:177-231.
- [46] Nonaka I. Animal models of muscular dystrophies. *Laboratory animal science*. 1998 Feb;48(1):8-17.
- [47] Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circulation Research*. 2004 Apr 30;94(8):1023-31.
- [48] Cox GF, Kunkel LM. Dystrophies and heart disease. *Current Opinion in Cardiology*. 1997 May;12(3):329-43.
- [49] Kunkel LM, Beggs AH, Hoffman EP. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy: emphasis on improved diagnosis. *Clinical Chemistry*. 1989 Jul;35(7 Suppl):B21-4.
- [50] Allamand V, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Human Molecular Genetics*. 2000 Oct;9(16):2459-67.
- [51] Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984 Feb;81(4):1189-92.
- [52] Watchko JF, O'Day TL, Hoffman EP. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol*. 2002 Aug;93(2):407-17.



- [53] Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science (New York, NY)*. 1989 Jun 30;244(4912):1578-80.
- [54] Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*. 2002 Apr;82(2):291-329.
- [55] Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*. 2004 Jan;84(1):209-38.
- [56] Coirault C, Pignol B, Cooper RN, Butler-Browne G, Chabrier PE, Lecarpentier Y. Severe muscle dysfunction precedes collagen tissue proliferation in mdx mouse diaphragm. *J Appl Physiol*. 2003 May;94(5):1744-50.
- [57] Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1991 Aug 8;352(6335):536-9.
- [58] Weir AP, Morgan JE, Davies KE. A-utrophin up-regulation in mdx skeletal muscle is independent of regeneration. *Neuromuscul Disord*. 2004 Jan;14(1):19-23.
- [59] Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):717-27.
- [60] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*. 2000 Nov;6(11):1229-34.
- [61] Chamuleau SA, Vrijisen KR, Rokosh DG, Tang XL, Piek JJ, Bolli R. Cell therapy for ischaemic heart disease: focus on the role of resident cardiac stem cells. *Neth Heart J*. 2009 May;17(5):199-207.
- [62] Figeac N, Daczewska M, Marcelle C, Jagla K. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev Dyn*. 2007 Dec;236(12):3332-42.
- [63] Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999 Sep 23;401(6751):390-4.
- [64] Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The Journal of Cell Biology*. 2000 Dec 11;151(6):1221-34.

- [65] Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Developmental biology*. 2000 Feb 15;218(2):115-24.
- [66] Asakura A. Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003 Apr;13(3):123-8.
- [67] Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*. 2002 Oct 14;159(1):123-34.
- [68] Kafadar KA, Yi L, Ahmad Y, So L, Rossi F, Pavlath GK. Sca-1 expression is required for efficient remodeling of the extracellular matrix during skeletal muscle regeneration. *Developmental Biology*. 2009 Feb 1;326(1):47-59.
- [69] Torrente Y, Camirand G, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Colombo F, et al. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. *The Journal of Cell Biology*. 2003 Aug 4;162(3):511-20.
- [70] Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Annals of Neurology*. 1984 Aug;16(2):193-208.
- [71] McDouall RM, Dunn MJ, Dubowitz V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. 1990 Nov;99(2-3):199-217.
- [72] Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle & Nerve*. 1991 Jun;14(6):515-20.
- [73] Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clinical Immunology (Orlando, Fla)*. 2001 Feb;98(2):235-43.
- [74] Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992 Oct 22;359(6397):693-9.
- [75] Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Jan 15;90(2):770-4.

- [76] Bono MR, Elgueta R, Sauma D, Pino K, Osorio F, Michea P, et al. The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2007 Feb-Apr;18(1-2):33-43.
- [77] Schon MP, Zollner TM, Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2003 Nov;121(5):951-62.
- [78] Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in Immunology*. 2002 Apr;14(2):83-92.
- [79] Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007 Jul;120(1):3-10.
- [80] Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American Journal of Pathology*. 2008 Jan;172(1):1-7.
- [81] Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunological Reviews*. 2007 Aug;218:178-96.
- [82] Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Current Opinion in Hematology*. 2005 Nov;12(6):444-50.
- [83] Simon SI, Hu Y, Vestweber D, Smith CW. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol*. 2000 Apr 15;164(8):4348-58.
- [84] Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2004 May;4(5):325-35.
- [85] Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, Kim R, Nguyen V, Huang W, et al. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Research*. 2005 Jul 1;65(13):5750-60.
- [86] Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual Review of Immunology*. 2004;22:129-56.
- [87] Khan AI, Landis RC, Malhotra R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation*. 2003 Oct;27(5):265-80.
- [88] Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007 Oct;19(5):495-507.
- [89] Issekutz AC, Szejda M. Evidence that platelet activating factor may mediate some acute inflammatory responses. *Studies with the platelet-activating factor*

antagonist, CV3988. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1986 Mar;54(3):275-81.

[90] Ingalls RR, Arnaout MA, Delude RL, Flaherty S, Savedra R, Jr., Golenbock DT. The CD11/CD18 integrins: characterization of three novel LPS signaling receptors. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1998;397:107-17.

[91] Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular Signalling*. 2008 Mar;20(3):557-68.

[92] Norman MU, Van De Velde NC, Timoshanko JR, Issekutz A, Hickey MJ. Overlapping roles of endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 in immune complex-induced leukocyte recruitment in the cremasteric microvasculature. *The American Journal of Pathology*. 2003 Oct;163(4):1491-503.

[93] Aruffo A, Hollenbaugh D. Therapeutic intervention with inhibitors of co-stimulatory pathways in autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*. 2001 Dec;13(6):683-6.

[94] Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, et al. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *The Journal of Cell Biology*. 1996 Oct;135(2):497-510.

[95] Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007 Dec;27(12):2514-23.

[96] Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of Cell Biology*. 1998 Jul 13;142(1):117-27.

[97] Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochemistry and Cell Biology*. 1996;74(6):749-57.

[98] Coito AJ, Korom S, Graser E, Volk HD, Van De Water L, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin in allograft recipients: I. Treatment with connecting segment-1 peptides prevents acute rejection by suppressing

intra-graft mononuclear cell accumulation, endothelial activation, and cytokine expression. *Transplantation*. 1998 Mar 15;65(5):699-706.

[99] Beyers AD, Barclay AN, Law DA, He Q, Williams AF. Activation of T lymphocytes via monoclonal antibodies against rat cell surface antigens with particular reference to CD2 antigen. *Immunological Reviews*. 1989 Oct;111:59-77.

[100] Mrowietz U. Treatment targeted to cell surface epitopes. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2002 Oct;27(7):591-6.

[101] Pure E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 2001 May;7(5):213-21.

[102] Do Y, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 and hyaluronic acid (HA) in activation of alloreactive and antigen-specific T cells by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunother*. 2004 Jan-Feb;27(1):1-12.

[103] Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *Journal of the Neurological Sciences*. 1996 Jan;135(1):10-7.

[104] Cai B, Spencer MJ, Nakamura G, Tseng-Ong L, Tidball JG. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *The American Journal of Pathology*. 2000 May;156(5):1789-96.

[105] Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *The Journal of Cell Biology*. 2001 Oct 1;155(1):123-31.

[106] Karagol U, Gardner-Medwin D, Mastaglia FL. Neutrophil function in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. 1986 Mar;73(1):73-7.

[107] Sun G, Haginoya K, Wu Y, Chiba Y, Nakanishi T, Onuma A, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008 Apr 15;267(1-2):48-56.

[108] Wehling-Henricks M, Jordan MC, Roos KP, Deng B, Tidball JG. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Human Molecular Genetics*. 2005 Jul 15;14(14):1921-33.

[109] Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992 Sep;90(3):1116-21.

- [110] Liu P, Xu B, Hock CE, Nagele R, Sun FF, Wong PY. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. *The American Journal of Physiology*. 1998 Dec;275(6 Pt 2):H2191-8.
- [111] Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1995 Sep 8;82(5):743-52.
- [112] Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Experimental Dermatology*. 2001 Feb;10(1):1-10.
- [113] Meuser-Batista M, Correa JR, Soares MJ, Henriques-Pons A. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue & Cell*. 2008 Oct;40(5):309-16.
- [114] Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2000 Dec;12(6):624-31.
- [115] Radley HG, Grounds MD. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiology of Disease*. 2006 Aug;23(2):387-97.
- [116] Gorospe JR, Tharp M, Demitsu T, Hoffman EP. Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. *Neuromuscul Disord*. 1994 Jul;4(4):325-33.
- [117] Bucciolini-Di Segni MG, Vannelli G, Scardicci E, Calandi C, Adami-Lami C. Mastocytes in the skeletal muscle of normal man and in subjects with Duchenne muscular dystrophy. *Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia*. 1983 Apr-Jun;88(2):137-55.
- [118] Mantegazza R, Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Oksenberg JR, Simoncini O, et al. Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. Restricted V alpha/beta rearrangements may indicate antigen-driven selection. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993 Jun;91(6):2880-6.
- [119] Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997 Jun 1;99(11):2745-51.
- [120] Trapani JA, Sutton VR, Thia KY, Li YQ, Froelich CJ, Jans DA, et al. A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*. 2003 Jan 20;160(2):223-33.

- [121] Schmidt J, Rakocevic G, Raju R, Dalakas MC. Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain*. 2004 May;127(Pt 5):1182-90.
- [122] Morrison J, Lu QL, Pastoret C, Partridge T, Bou-Gharios G. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000 Jun;80(6):881-91.
- [123] Wehling-Henricks M, Lee JJ, Tidball JG. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*. 2004 Sep;14(8-9):483-90.
- [124] De Luca A, Nico B, Liantonio A, Didonna MP, Frayssse B, Pierno S, et al. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *The American Journal of Pathology*. 2005 Feb;166(2):477-89.
- [125] Mallick-Wood CA, Lewis JM, Richie LI, Owen MJ, Tigelaar RE, Hayday AC. Conservation of T cell receptor conformation in epidermal gammadelta cells with disrupted primary Vgamma gene usage. *Science (New York, NY)*. 1998 Mar 13;279(5357):1729-33.
- [126] Jameson JM, Cauvi G, Witherden DA, Havran WL. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J Immunol*. 2004 Mar 15;172(6):3573-9.
- [127] Li S, Kishihara K, Akashi N, Hara H, Yoshikai Y, Maekawa Y, et al. Vdelta1+ T cells are crucial for repertoire formation of gammadelta T cells in the lung. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008 Jan 11;365(2):246-51.
- [128] Meeusen EN, Bischof RJ, Lee CS. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am J Reprod Immunol*. 2001 Aug;46(2):169-79.
- [129] Born WK, Jin N, Aydintug MK, Wands JM, French JD, Roark CL, et al. gammadelta T lymphocytes-selectable cells within the innate system? *Journal of Clinical Immunology*. 2007 Mar;27(2):133-44.
- [130] Collins C, Wolfe J, Roessner K, Shi C, Sigal LH, Budd RC. Lyme arthritis synovial gammadelta T cells instruct dendritic cells via fas ligand. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5656-65.

- [131] Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J, Jacobs N. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008 May;152(2):219-26.
- [132] Wands JM, Roark CL, Aydintug MK, Jin N, Hahn YS, Cook L, et al. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005 Nov;78(5):1086-96.
- [133] O'Brien RL, Yin X, Huber SA, Ikuta K, Born WK. Depletion of a gamma delta T cell subset can increase host resistance to a bacterial infection. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6472-9.
- [134] Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):3660-7.
- [135] Huber SA, Graveline D, Newell MK, Born WK, O'Brien RL. V gamma 1+ T cells suppress and V gamma 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4174-81.
- [136] Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA. 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*. 2002 Mar;23(3):260-9.
- [137] Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, et al. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2007;8:54.
- [138] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 2006 Feb 15;69(3):562-73.
- [139] Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdiere-Sahuque M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Developmental Biology*. 1999 Jan 1;205(1):158-70.
- [140] Voit T, Stuetzgen P, Cremer M, Goebel HH. Dystrophin as a diagnostic marker in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Correlation of immunofluorescence and western blot. *Neuropediatrics*. 1991 Aug;22(3):152-62.
- [141] Bies RD. X-linked dilated cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*. 1994 Feb 3;330(5):368-9; author reply 70.



- [142] Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR, Bullock R, Bushby K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord*. 2002 Dec;12(10):926-9.
- [143] Baxter P. Treatment of the heart in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 2006 Mar;48(3):163.
- [144] Politano L, Nigro V, Nigro G, Petretta VR, Passamano L, Papparella S, et al. Development of cardiomyopathy in female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Jama*. 1996 May 1;275(17):1335-8.
- [145] Melacini P, Fanin M, Danieli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, et al. Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation*. 1996 Dec 15;94(12):3168-75.
- [146] Quinlivan RM, Dubowitz V. Cardiac transplantation in Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1992;2(3):165-7.
- [147] Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *International Journal of Cardiology*. 1990 Mar;26(3):271-7.
- [148] Bridges LR. The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. *Journal of the Neurological sciences*. 1986 Feb;72(2-3):147-57.
- [149] Hainsey TA, Senapati S, Kuhn DE, Rafael JA. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. *Neuromuscul Disord*. 2003 May;13(4):294-302.
- [150] Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *The Anatomical Record*. 1995 May;242(1):70-6.
- [151] Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, Levin LS. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord*. 2004 Sep;14(8-9):491-6.
- [152] Sapp JL, Bobet J, Howlett SE. Contractile properties of myocardium are altered in dystrophin-deficient mdx mice. *Journal of the Neurological Sciences*. 1996 Oct;142(1-2):17-24.
- [153] Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS letters*. 2002 Jun 5;520(1-3):18-24.

- [154] Frankel KA, Rosser RJ. The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: epimyocardial fibrosis. *Human Pathology*. 1976 Jul;7(4):375-86.
- [155] Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2006 Jul;33(7):657-62.
- [156] Cerri DG, Rodrigues LC, Stowell SR, Araujo DD, Coelho MC, Oliveira SR, et al. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. *Glycobiology*. 2008 Nov;18(11):842-50.
- [157] Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, et al. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):5459-65.
- [158] Li M, Dalakas MC. Expression of human IAP-like protein in skeletal muscle: a possible explanation for the rare incidence of muscle fiber apoptosis in T-cell mediated inflammatory myopathies. *Journal of Neuroimmunology*. 2000 Jul 1;106(1-2):1-5.
- [159] Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Gorecki DC. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiology of Disease*. 2004 Mar;15(2):212-20.
- [160] Granchelli JA, Avosso DL, Hudecki MS, Pollina C. Cromolyn increases strength in exercised mdx mice. *Research Communications in Molecular Pathology and pharmacology*. 1996 Mar;91(3):287-96.
- [161] Nahirney PC, Dow PR, Ovalle WK. Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice. *The Anatomical Record*. 1997 Mar;247(3):341-9.
- [162] Granchelli JA, Hudecki MS, Pollina CM. Enhanced sensitivity of mdx mice to intramuscular injection of compound 48/80. *Research Communications in Chemical Pathology and pharmacology*. 1994 Jun;84(3):351-62.
- [163] Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009 Jun;119(6):1583-94.
- [164] Cassel SL, Joly S, Sutterwala FS. The NLRP3 inflammasome: A sensor of immune danger signals. *Seminars in Immunology*. 2009 Jun 4.
- [165] Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, et al. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the

inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host & Microbe*. 2007 Sep 13;2(3):147-59.

[166] Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, et al. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):6460-9.

[167] Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):183-95.

[168] Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000 Oct 27;103(3):491-500.

[169] Takeda N, Seko Y, Oriuchi N, Nagai R. Gamma-delta T-cell-mediated dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*. 2008 Mar 28;125(1):130-2.

[170] Bleesing JJ, Brown MR, Dale JK, Straus SE, Lenardo MJ, Puck JM, et al. TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla)*. 2001 Sep;100(3):314-24.

[171] de Oliveira GM, Diniz RL, Batista W, Batista MM, Bani Correa C, de Araujo-Jorge TC, et al. Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Pathology*. 2007 Jul;171(1):79-86.

[172] Ma Y, He KM, Garcia B, Min W, Jevnikar A, Zhang ZX. 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*. 2008 Feb;15(1):56-63.

[173] Turgeman T, Hagai Y, Huebner K, Jassal DS, Anderson JE, Genin O, et al. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord*. 2008 Nov;18(11):857-68.

[174] Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1151-65.

[175] Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert reviews in molecular medicine*. 2009;11:e20.

- [176] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):664-8.
- [177] Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*. 2006 Apr;20(6):661-9.
- [178] Shao H, Chen B, Tao M. Skeletal myogenesis by human primordial germ cell-derived progenitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009 Jan 23;378(4):750-4.
- [179] Bedada FB, Braun T. Partial induction of the myogenic program in noncommitted adult stem cells. *Cells, Tissues, Organs*. 2008;188(1-2):189-201.
- [180] Zimowska M, Brzoska E, Swierczynska M, Streminska W, Moraczewski J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *The International Journal of Developmental Biology*. 2008;52(2-3):307-14.
- [181] Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2002 Jun;12(3):231-41.
- [182] DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *The American Journal of Pathology*. 2004 Apr;164(4):1131-9.
- [183] Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):422-33.

# 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](#)