

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

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

*CYNTHIA MACHADO CASCABULHO*

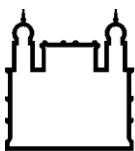
Caracterização do ambiente inflamatório cardíaco e estudo de interações células T/endotélio em camundongo *mdx/mdx*

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

**Orientadores:** Prof. Dra. Andréa Henriques Pons  
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

**RIO DE JANEIRO**

2012



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

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

***AUTOR: CYNTHIA MACHADO CASCABULHO***

**CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE INFLAMATÓRIO CARDÍACO E ESTUDO DE  
INTERAÇÕES CÉLULAS T/ENDOTÉLIO EM CAMUNDONGOS *MDX/MDX***

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Andréa Henriques Pons**  
**Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra.** Daniella Arêas Mendes da Cruz  
**Prof. Dr.** Robson Coutinho Silva  
**Profa. Dra.** Fernanda Pinto Mariz  
**Prof. Dr.** Ingo Riederer  
**Prof. Dr.** Luiz Anastácio Alves

Rio de Janeiro, 13 de julho de 2012

DEDICATÓRIA

À minha avó Doquinha pelo amor incondicional.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Andréa, por ser uma orientadora excepcional, além de grande amiga. Você me ensinou a amar a ciência e é para mim um exemplo de competência. Considero-me uma pessoa muito abençoada, pois tenho a sorte de trabalhar com você. Muito obrigada por todos esses anos de dedicação e por toda confiança que sempre depositou em mim.

Ao meu orientador, Vinícius, que contribuiu muito para o meu crescimento profissional, pelo seu apoio e sua ajuda sempre que estes foram necessários. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por todo carinho com que sempre me tratou.

Ao meu marido, Rafael, por seu amor, paciência e compreensão, sempre me colocando em primeiro lugar. Você abdicou de muitas coisas para que eu pudesse terminar essa tese e eu sou muito grata por isso. Muito obrigada por fazer de mim a mulher mais feliz do mundo! Ao seu lado eu sou uma pessoa melhor. Te amo!

Ao meu pai por dar asas aos meus sonhos. Muito obrigada por todo amor e carinho que sempre me dedicou e por sempre ter me apoiado em tudo. Te amo!

Ao meu irmão por ser meu porto seguro, meu protetor e anjo da guarda. Não saberia nem ser eu mesma sem você. Tenho muito orgulho de ser sua irmã! Te amo!

À minha avó, Doquinha, pelos muitos anos de dedicação integral e por ter sido minha mãe nos últimos dezesseis anos. Você é muito especial. Te amo!

À minha mãe, em memória, pelos anos de amor e dedicação incondicionais que me tornaram a pessoa que sou hoje. Nunca deixo de te amar!

Aos meus avôs, Devanil e Maria, por serem um exemplo de força e superação. Amo vocês!

Aos meus queridos sogros, Maria e Ricardo, por terem me acolhido como uma filha.

Aos queridos amigos Aline Araújo e Marcelo Meuser que participaram dessa jornada desde o início e sempre me ajudaram muito! É muito bom trabalhar com vocês!

À amiga Cristiane Bani por ter me apresentado a Distrofia Muscular Duchenne e por todos os anos de agradável convivência.

A todos os integrantes do LITEB pela troca de experiências diárias dentro do ambiente de trabalho.

Às queridas amigas Luize Lima e Patrícia Redondo por todo apoio neste último ano.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## Lista de abreviaturas

ADP	difosfato de adenosina
APC	célula apresentadora de antígeno
ATP	trifosfato de adenosina
BMD	distrofia muscular de Becker
BSA	albumina bovina
CK	creatina quinase
CTL	linfócito T citotóxico
CVB	vírus coxsackie B
DAPC	complexo proteico associado a distrofina
DMD	Distrofia Muscular Duchenne
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ESL-1	Ligante de E-selectina
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GlyCAM-1	molécula de adesão celular dependente de glicosilação do tipo 1
HE	hematoxilina e eosina
HEV	Venula endotelial alta
ICAM	molécula de adesão intercelular
ICOS	molécula co-estimuladora de célulaT induzida
ICOSL	Ligante da molécula co-estimuladora de célulaT induzida
IFN	interferon
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
JAM	molécula de adesão juncional
LFA-1	antígeno associado à função de linfócitos do tipo 1
LPS	lipopolissacarídeo
LTB4	leucotrieno B4
MAdCAM-1	molécula de adesão celular a adressinas de mucosa do tipo 1
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
MHC	complexo de histocompatibilidade principal

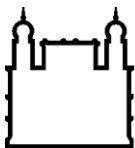
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	salina tamponada com fosfato
PCLP	proteína semelhante à podocalixina
PECAM-1	molécula de adesão celular de plaquetas/endotélio do tipo 1
PGD2	prostaglandina D2
PGE2	prostaglandina E2
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PSGL-1	glicoproteína ligante de P-selectina do tipo 1
ROS	espécies reativas de oxigênio
SFB	soro fetal bovino
TACE	enzima conversora de TNF
TCR	receptor da célula T
TGF	fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM	molécula de adesão celular vascular
VLA-4	antígeno de expressão tardia do tipo 4
XLDC	cardiomiopatia dilatada ligada ao X

# Índice

Resumo-----	IX
Abstract-----	X
1. Introdução-----	1
1.1.Distrofia muscular do tipo Duchenne – características gerais-----	1
1.2. Tecido muscular cardíaco e esquelético-----	2
1.3.Complexo Distrofina-----	5
1.4.Complexo protéico associado à distrofina (DAPC)-----	7
1.5.Modelos animais para distrofinopatias-----	8
1.6.Resposta inflamatória – características gerais-----	9
1.7.Interação com endotélio e migração celular-----	10
1.8.L-selectina-----	14
1.9.Células inflamatórias na DMD e sua importância na morte de fibras musculares e fibrose-----	18
1.10. Cardiomiopatia nas distrofinopatias-----	23
2. Objetivos-----	26
3. Material e métodos-----	27
3.1.Animais-----	27
3.2.Eletrocardiografia-----	27
3.3.Análise histopatológica-----	27
3.4.Análise de estrutura e ultra-estrutura-----	28
3.5.Obtenção de células inflamatórias cardíacas-----	29
3.6. Citometria de fluxo-----	29
3.7. Dot blotting-----	30
3.8.Purificação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de sangue-----	30
3.9.Ensaio de adesão-----	31
3.10. Ensaio de permeabilização por ATP-----	31
3.11. Bloqueio in vitro do receptor P2X7-----	31
3.12. Tratamento com azul brilhante G para bloqueio in vivo do receptor P2X7-----	32
3.13. Western blotting-----	32
3.14. Dosagem de citocinas-----	33
3.15. Atividade da creatina quinase sérica (CK-NAC e CK-MB)-----	33

3.16. Análise da atividade física espontânea-----	33
3.17. Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	34
3.18. Imunohistoquímica-----	34
3.19. Análise estatística-----	34
4. Resultados-----	35
5. Discussão-----	61
6. Conclusões-----	68
7. Referências bibliográficas-----	69
8. Anexo-----	84





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

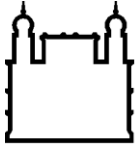
### **CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE INFLAMATÓRIO CARDÍACO E ESTUDO DE INTERAÇÕES CÉLULAS T/ENDOTÉLIO EM CAMUNDONGOS *MDX/MDX***

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Cynthia Machado Cascabulho**

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que afeta 1 a cada 3500 meninos nascidos vivos e é causada por mutações no gene da distrofina. A ausência da distrofina leva à degeneração progressiva dos músculos esqueléticos e cardíaco assim como à inflamação crônica. O camundongo *mdx/mdx* é um dos modelos mais utilizados para estudo da DMD e apresenta muitas características da doença, embora a progressão da patologia seja mais branda e não letal. Este trabalho visa avaliar a migração de células T para o coração de camundongos *mdx/mdx* e possíveis alterações na expressão de moléculas de adesão que possam modular esse processo. Leucócitos sanguíneos, incluindo células T de camundongos *mdx/mdx* de 6 semanas de idade, são CD62L<sup>+</sup>, mas sofrem uma modulação negativa nos animais de 12 semanas, com apenas 40% dos linfócitos T mantendo a expressão dessa molécula. Nossos resultados apontam para uma clivagem de CD62L dependente de P2X7 (com altos níveis de CD62L no soro) que reduz a competência dos linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas aderirem aos vasos sanguíneos cardíacos *in vitro*. *In vivo*, nós observamos que mesmo após a infecção com *Trypanosoma cruzi*, um conhecido indutor de miocardite linfóide, essas células raramente são encontradas no coração. Quando camundongos *mdx/mdx* são tratados com BBG, um bloqueador de P2X7, esses linfócitos sanguíneos mantêm a expressão de CD62L e são capazes de migrar para o coração. Esses resultados fornecem novas informações sobre os mecanismos de infiltração inflamatória e regulação imune na DMD.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE INFLAMATÓRIO CARDÍACO E ESTUDO DE INTERAÇÕES CÉLULAS T/ENDOTÉLIO EM CAMUNDONGOS *MDX/MDX***

#### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Cynthia Machado Cascabulho**

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive disorder that affects 1 in 3,500 males born alive and is caused by mutations in the dystrophin gene. The absence of dystrophin leads to the degeneration of skeletal and cardiac muscles as well as to chronic inflammation. *Mdx/mdx* mice have been widely used to study DMD and present most characteristics of the disease, although the progression of the disease is milder and nonlethal. In this study, we aimed to assess the migration of T cells to the heart of *mdx/mdx* mice and possible alterations in adhesion molecules that could modulate this process. Blood leukocytes, including T cells from 6-week-old *mdx/mdx* mice, are CD62L<sup>+</sup>, but undergo down-modulation by 12 weeks of age, with only about 40 percent of T cells retaining this molecule. Our results point to a P2X7-dependent shedding of CD62L (with high levels of CD62L in the serum) which reduces 12-week-old *mdx/mdx* blood T cell competence to adhere to cardiac vessels *in vitro*. *In vivo*, we observed that even after *Trypanosoma cruzi* infection, a known inducer of lymphoid myocarditis, these cells are rarely found in the heart. When *mdx/mdx* mice are treated with Brilliant Blue G, a P2X7 blocker, these blood lymphocytes retained CD62L and were capable of migrating to the heart. These results provide new insights into the mechanisms of inflammatory infiltration and immune regulation in DMD.

# 1) Introdução

## 1.1) Distrofia muscular do tipo Duchenne – características gerais

A distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD) é uma miopatia ligada ao cromossomo X que afeta 1 a cada 3500 meninos nascidos vivos (Voisin & De la Porte, 2004). A clonagem completa do gene *dmd* mostra que mais de 50% das mutações em humanos envolve ampla deleção no locus Xp21, o que determina a produção de distrofina não-funcional ou a não expressão nas células musculares esqueléticas estriadas e cardíacas (Branco e cols, 2007; Kapsa e cols 2003). Os primeiros sintomas da doença aparecem já na primeira infância, entre três a cinco anos de idade, e por volta dos dez anos há perda da capacidade de deambular (Sugita e cols, 2010). O óbito normalmente ocorre na segunda década de vida devido à insuficiência-cardio-respiratória (Fukunaga e cols, 1991; Birnkrant e cols, 2010). O músculo esquelético é o mais gravemente afetado, com o acometimento cardíaco sendo observado atualmente com maior frequência devido a um aumento da sobrevida dos pacientes pela melhoria de algumas intervenções terapêuticas, principalmente melhora do suporte ventilatório (Finsterer, 2006; Moxley, 2010). A disfunção no músculo liso ainda é controversa, porém, há algumas evidências de alterações também neste tipo muscular (Ito e cols, 2006).

As principais alterações histopatológicas do músculo distrófico no início da doença são a presença de infiltrados inflamatórios, miofibras hipertróficas e lesão muscular, levando a altos níveis da enzima creatina quinase (CK) no soro (Vetrone, 2009; Zhao e cols, 1998). Aparentemente, os repetidos ciclos de regeneração esgotam a capacidade regenerativa das células satélites (células progenitoras musculares que quando ativadas possuem a capacidade de regenerar o músculo danificado), e outros tipos celulares, com substituição progressiva do tecido muscular contrátil por tecido fibroso (Sabatelli, 2012; Bani e cols, 2008, Lagrota-Candido e cols, 2002). Ainda não há terapia curativa para os pacientes da DMD, apenas tratamentos paliativos associados à fisioterapia, cirurgia ortopédica para aliviar a escoliose e ainda administração de corticóides (Kang, 2006; Cheuk e cols, 2007, Moxley e cols, 2010). Terapias celulares, genéticas e farmacológicas estão sendo avaliadas por diversos grupos de estudo como estratégias promissoras no tratamento da DMD (Nishiyama & Takeda, 2012; Bowles cols, 2012; Rafael-Fortney e cols, 2011).

## 1.2) Tecido muscular estriado esquelético e cardíaco

Os músculos estriados esqueléticos são formados por feixes de células muito longas, cilíndricas e multinucleadas, com diâmetro que varia de 10 a 100  $\mu\text{m}$ , chamadas fibras musculares estriadas. Envolvendo individualmente cada fibra muscular encontra-se o endomísio, uma camada de tecido conjuntivo (Fig. 1.1). Envolvendo os feixes de células, há o perimísio, que é formado por septos que se originam da camada mais externa que envolve todo o músculo, chamada epimísio (Fig. 1). Esse tecido conjuntivo mantém as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração voluntária gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo como um todo (Agarkova e cols, 2004).

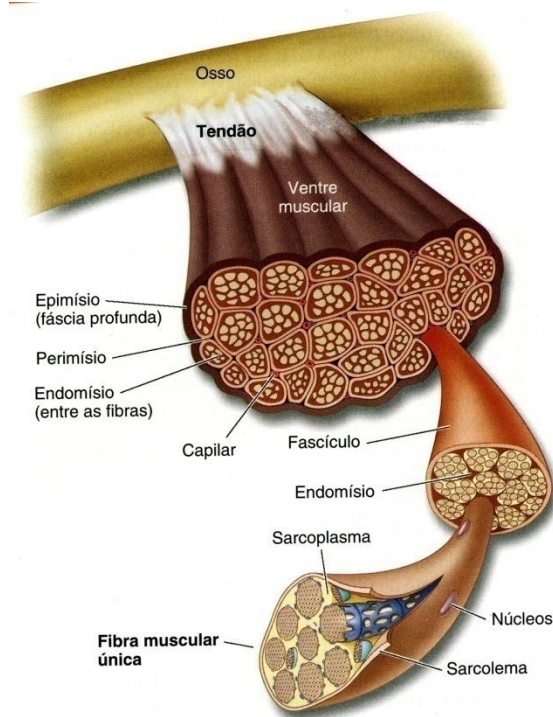


Figura 1.1: Corte transversal das estruturas do músculo esquelético e arranjo dos seus revestimentos de tecido conjuntivo (adaptado de Mcardle, 2003).

O citoplasma da fibra muscular é preenchido pelas miofibrilas que correm longitudinalmente na fibra. As unidades repetitivas das miofibrilas são denominadas sarcômeros (Fig. 2). A distribuição dos filamentos de actina e miosina varia ao longo do sarcômero, formando faixas mais externas e claras chamadas banda I, contendo apenas filamentos de actina. Dentro da banda I existe uma região mais escura denominada disco Z e a faixa central escura é

chamada banda A, com extremidades formadas por filamentos de actina e miosina sobrepostos. Dentro da banda A existe uma região mediana mais clara, a banda H, que contém apenas miosina (Fig 1.2). O sarcômero é a unidade contrátil da fibra muscular e compreende o segmento entre dois discos Z consecutivos (Fazekas & Szekessy-Hermann, 1989).

O sistema de túbulos transversais (sistema T) é responsável pela contração uniforme de cada fibra muscular. 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. Cada túbulo T está ligado a duas expansões do retículo sarcoplasmático. Esse complexo, composto por um túbulo T e expansões do retículo sarcoplasmático, é conhecido como tríade. Na tríade, a despolarização dos túbulos T é transmitida ao retículo sarcoplasmático para liberação de  $Ca^{++}$  para a contração (Fazekas & Szekessy-Hermann, 1989) (Figura 1.2).

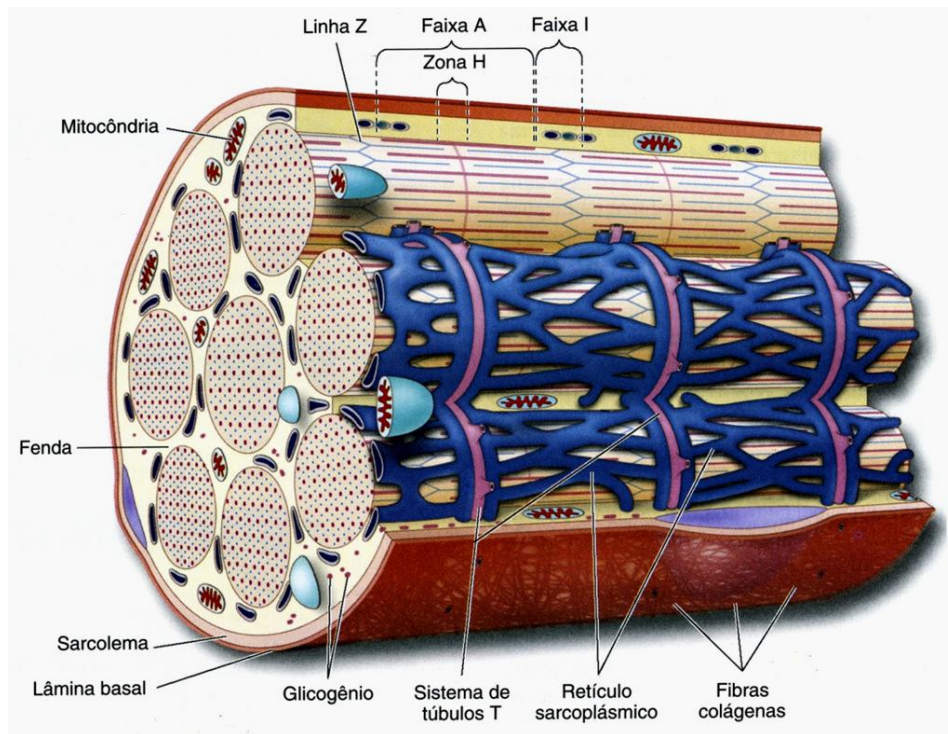


Figura 1.2: Organização das miofibrilas e sistema de tubulos T dentro de uma fibra muscular (adaptado de Mcardle, 2003).

O músculo cardíaco é constituído por células alongadas que se anastomosam irregularmente. Essas células apresentam estriações transversais semelhantes às do músculo esquelético, mas ao contrário das fibras esqueléticas, as fibras cardíacas possuem apenas um ou dois núcleos centralmente localizados. As fibras cardíacas 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 dos discos intercalares que são complexos juncionais encontrados entre as células musculares (Fig 1.3). Nos discos intercalares encontram-se três especializações juncionais principais: zônula de adesão, desmossomos e junções comunicantes (*Gap junctions*) que permitem a contração sincronizada.

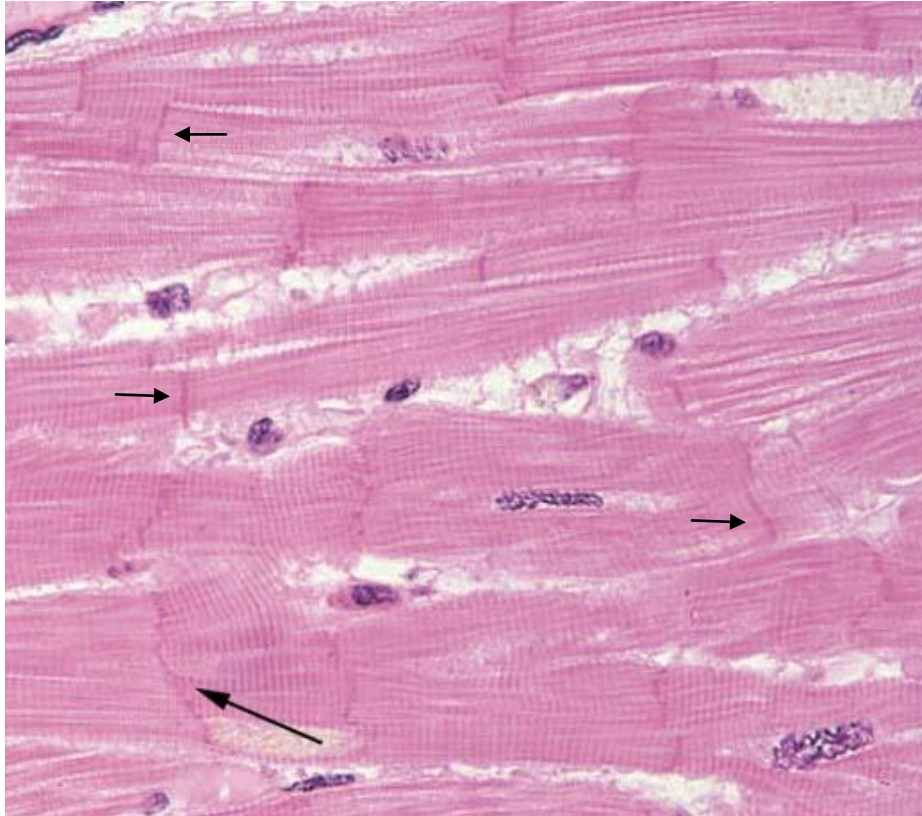


Figura 1.3: Corte longitudinal de músculo cardíaco corado com hematoxilina e eosina. As setas apontam para discos intercalares ([http://cytochemistry.net/Cell-biology/Medical/practice\\_practical\\_muscle.htm](http://cytochemistry.net/Cell-biology/Medical/practice_practical_muscle.htm)).

A estrutura e função das proteínas contráteis musculares cardíacas são praticamente as mesmas descritas para o músculo esquelético. Porém, no músculo cardíaco, o sistema T e o retículo sarcoplasmático não são tão bem organizados como no esquelético. Além disso, as tríades não são tão frequentes nas células cardíacas. Ao contrário das tríades, são observadas díades, constituídas por um túbulo T e uma expansão do retículo sarcoplasmático (Samarel, 2005).

O músculo cardíaco apresenta contração involuntária e mantém seu próprio ritmo. Dentro da parede posterior do átrio direito há uma pequena região de tecido neuro-muscular

especializado denominado nódulo sinoatrial (nódulo SA). Este nódulo despolariza e repolariza espontaneamente de forma a proporcionar o estímulo conjunto para a ação cardíaca. Sendo assim, os sinais eletroquímicos se originam normalmente no nódulo SA e se propagam através dos átrios até o nódulo atrioventricular (nódulo AV). O nódulo AV origina o 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 segundos após a penetração do impulso dentro dos ventrículos, permitindo uma contração unificada e simultânea de ambos os ventrículos (Deleze, 1987).

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 (Byers e cols, 1991). Os costâmeros são encontrados tanto nas fibras musculares cardíacas quanto nas esqueléticas e são responsáveis por ancorar as miofibrilas à membrana plasmática, mantendo sua organização espacial e servindo como local de interação entre o aparato contrátil e a matriz extracelular. A região do costâmero apresenta altas concentrações de vinculina e outras proteínas, como espectrina e desmina. Inicialmente acreditava-se na distribuição homogênea da distrofina ao longo da membrana plasmática das fibras musculares esqueléticas. Porém, estudos utilizando microscopia eletrônica e microscopia confocal mostraram predominância da distrofina na região do costâmero dessas fibras. Em 1991, Byers e colaboradores descreveram a distribuição uniforme da distrofina ao longo da membrana plasmática das fibras cardíacas, similar ao descrito inicialmente para fibras esqueléticas (Byers e cols, 1991). Essa variação na localização da distrofina, juntamente com as demais diferenças observadas entre músculo cardíaco e esquelético, possivelmente fazem com que esses dois tipos musculares sejam diferentemente afetados nas distrofinopatias.

### **1.3) Complexo Distrofina**

O gene da distrofina é o maior descrito em humanos, correspondendo a aproximadamente 1% do genoma total e aproximadamente 5% de todo o cromossomo X. Cerca de 99% do gene da distrofina é constituído de íntrons e a seqüência codificante é composta por 79 exons, incluindo sete promotores (Manole, 1995; Muntoni e cols, 2003). Desta forma, múltiplos transcritos são gerados a partir do gene da distrofina, resultando na formação de muitas isoformas da proteína. Essas isoformas derivam de uma combinação de promotores específicos dos diferentes tecidos e

de processamento alternativo dos exons comuns da distrofina. Como exemplo, podemos citar 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 (Bies e cols, 1992; Mehler, 2000). As variantes geradas através de processamento alternativo podem se formar pela exclusão de alguns exons do transcrito primário ou pela subversão da ordem dos exons (Surono e cols, 1999). Uma isoforma adicional em linfócitos foi também descrita (Nishio e cols, 1994), porém, outros estudos sugeriram que este dado pode representar um artefato, tornando seu papel funcional duvidoso (Wheway & Roberts, 2003).

A isoforma muscular é uma proteína de 427 KDa com grande importância na interação do citoesqueleto com a matriz extracelular, participando da manutenção da integridade do sarcolema (Carmignac & Durbeej, 2012). A associação com o meio extracelular, principalmente com a laminina 2, ocorre através do complexo protéico associado à distrofina (DAPC) composto por sarcoglicanas, distroglicanas, sintrofinas, distrobrevinas, sarcospan, nNOS, caveolina-3 e canais de sódio (Fig. 1.4) (Ehmsen e cols, 2002; Michele & Campbell, 2003). A distrofina é a proteína mais abundante da fibra muscular e apresenta os seguintes domínios funcionais: 1) um domínio amino-terminal que contém de 232 a 240 resíduos de aminoácidos (aa), dependendo da isoforma, e permite a interação com F-actina; 2) um domínio central “rod” que contém aproximadamente 3000 aa; 3) um domínio rico em cisteína com 280 aa; e 4) um domínio carboxi-terminal com 420 aa e com sítios de ligação para sintrofina e distrobrevina (Tinsley e cols, 1993; Sadoulet-Puccio & Kunkel, 1996; Straub & Campbell, 1997). Mutações em diferentes regiões do gene da distrofina levam a doenças distintas. Por exemplo, mutações no promotor podem bloquear a transcrição dessa molécula no músculo cardíaco levando à cardiomiopatia ligada ao X (XLDC) (Cox & Kunkel, 1997). Já mutações em regiões codificantes distintas podem promover distrofia muscular de Duchenne ou distrofia muscular de Becker.



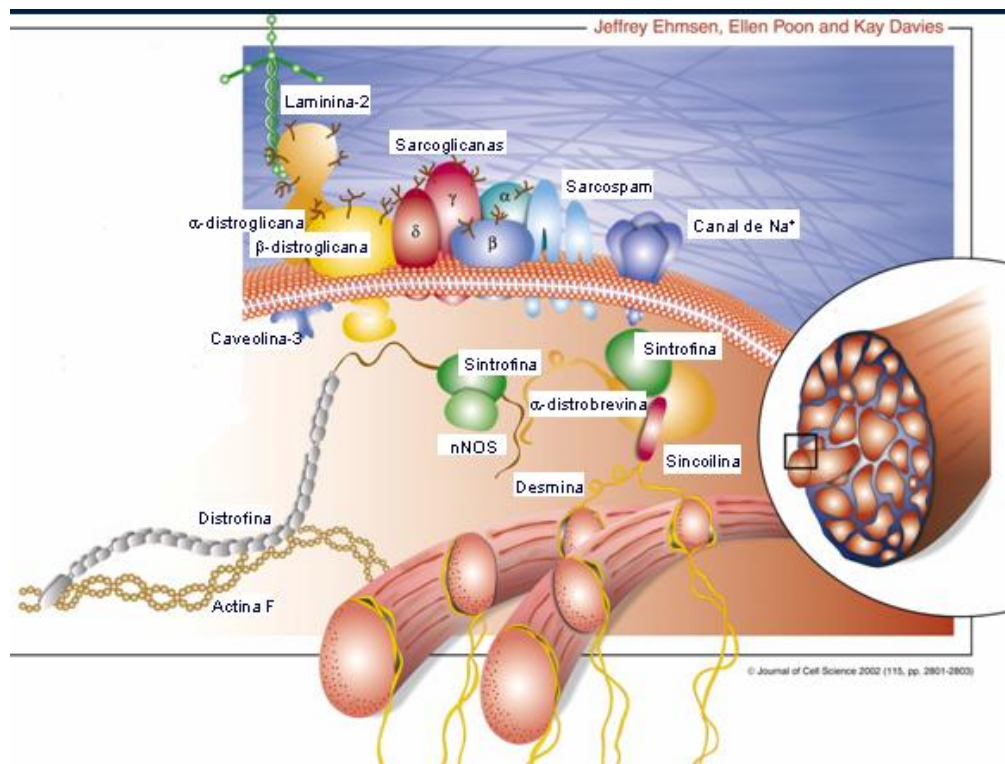


Figura 1.4: Ilustração mostrando a localização da distrofina conectando o citoesqueleto de actina a um complexo proteico associado à distrofina (DAPC) e matriz extracelular (laminina em verde e filamentos em roxo). (Adaptado de Ehmsen e cols, 2002)

#### 1.4) Complexo proteico associado à distrofina (DAPC)

O DAPC tem papel estrutural importante na interação do citoesqueleto com o meio extracelular, estabilizando o sarcolema durante os repetidos ciclos de contração e relaxamento e transmitindo a força gerada no sarcômero para a matriz extracelular (Allikian & McNally, 2007). 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, sinalizando via interação com calmodulina, receptor para fator de crescimento ligado à proteína 2 (Grb2) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Madhavan & Jarrett, 1994; Oak e cols, 2001; Torelli e cols, 2004). A deficiência de outras proteínas do complexo resulta em diferentes tipos de distrofias musculares em várias espécies animais (Nonaka, 1998). Mutações nos genes que codificam as sarcoglicanas causam as distrofias musculares da cintura e membros, enquanto mutações no gene da merosina causam a distrofia muscular congênita (Allamand e Campbell, 2000). Defeitos em outras proteínas, incluindo colágeno IV e a caveolina-3 causam miopatias graves em humanos (van der Kooi e cols, 2007).

## 1.5) Modelos animais para distrofinopatias

Algumas raças de cães, como *Golden Retriever*, *Rottweiler*, *Fox Terrier*, *Pointer Alemão* e *Beagle*, podem apresentar mutações espontâneas no gene da distrofina, resultando em distrofia muscular (Watchko e cols, 2002). Dentre essas raças, a distrofia muscular do *Golden Retriever* é a mais extensivamente estudada e melhor caracterizada (Schatzberg e cols, 1998). A progressão da doença nesse animal é acompanhada pelo enfraquecimento muscular desde os três meses de idade (Schatzberg e cols, 1998). Porém, apesar da semelhança com a DMD, as colônias de cães são de alto custo de manutenção e as espécies não são singênicas. Nos felinos, a deficiência da distrofina resulta na distrofia muscular felina hipertrófica, onde o músculo esquelético também sofre repetidos ciclos de degeneração e regeneração (Watchko e cols, 2002). Porém, não desenvolvem a fibrose característica da DMD e a progressão fatal da doença ocorre pela hipertrofia da língua e parte do diafragma (Watchko e cols, 2002).

O modelo animal mais utilizado para o estudo da DMD é o camundongo C57BL/10ScSn*mdx/mdx* (*mdx/mdx*). Esse camundongo é derivado de um mutante natural que surgiu em uma colônia de C57BL/10, inicialmente identificado pelos altos níveis da enzima creatina quinase no soro (Bulfield e cols, 1984). No *mdx/mdx*, a patologia muscular é moderada e a função mecânica da fibra muscular é menos comprometida, resultando em uma vida quase normal, ainda que o *mdx/mdx* seja um homólogo genético (não expressão de distrofina) e bioquímico da doença em humanos (Bulfield e cols, 1984). A patologia muscular no *mdx/mdx* é mais pronunciada entre 4 e 12 semanas de idade, um período caracterizado por múltiplos focos necróticos, infiltração inflamatória, regeneração de novas fibras e já com altas concentrações de creatina quinase no plasma (Klyen e cols, 2011; Coulton e cols, 1988). A degeneração do tecido muscular gera um processo fibrótico que persiste pela vida do animal e alguns músculos como o diafragma são severamente afetados, como em humanos (Coirault e cols, 2003). O tecido muscular do diafragma aparentemente não é capaz de manter os ciclos de regeneração, levando à extensiva produção de tecido conjuntivo, progressiva perda da função contrátil e consequente enfraquecimento muscular (Coirault e cols, 2003).

A distrofinopatia no *mdx/mdx* é parcialmente amenizada pela reversão da expressão de distrofina no tecido muscular e pela substituição parcial da distrofina pela proteína homóloga utrofina (Weir e cols, 2004; Amenta e cols, 2011). Sendo assim, camundongos duplo-deficientes

em distrofina e utrofina (*mdx/mdx/utrn<sup>-/-</sup>*) também são utilizados como modelos de estudo (Deconinck e cols, 1997). Estes animais apresentam um fenótipo mais agressivo da doença, semelhante ao observado em humanos. Ao contrário do *mdx/mdx*, o camundongo *mdx/mdx/utrn<sup>-/-</sup>* apresenta um retardo no crescimento, perda de peso e morte prematura (Deconinck e cols, 1997). Outro modelo murino utilizado para o estudo da DMD é o camundongo duplo-deficiente em distrofina e MyoD, que é um fator de transcrição chave no processo de regulação da diferenciação muscular. Sendo assim, este animal apresenta graves alterações musculares esqueléticas devido à baixa capacidade de regeneração das células satélites. Além disso, uma grave cardiomiopatia é observada nesses camundongos.

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 eficientes.

## **1.6) Resposta inflamatória – características gerais**

Inflamação é o processo básico através do qual os tecidos respondem à injúria. Esse processo, quando ocorre de forma controlada, leva ao reparo de estrutura e função dos tecidos e é fundamental para a manutenção da homeostase. A detecção da lesão tecidual ou da presença de agentes invasores nos tecidos gera uma resposta relativamente circunscrita. Esta resposta depende das subpopulações envolvidas e do perfil de ativação de células inflamatórias que removem as estruturas e células danificadas, eliminam os invasores e promovem o reparo e substituição das células e matriz extracelular. Porém, se o estímulo inflamatório é muito extenso ou persistente, podem ocorrer danos secundários aos tecidos adjacentes e fibrose, onde há substituição das estruturas danificadas por colágeno. Contudo, essa deposição pode levar à perda de função do tecido, sobretudo de tecidos eletricamente excitáveis como a musculatura (Lawler, 2011). Essa inflamação prolongada e dano é característica de muitas doenças crônicas, tais como a DMD (Porter e cols, 2002). Sendo assim, os eventos chave da inflamação são: sinalização de células inflamatórias sangüíneas, interação com o endotélio, migração para o tecido alvo, remoção de organismos estranhos e *debris* celulares e posterior estímulo de reparo tecidual. Todo esse

processo é orquestrado por mediadores inflamatórios, como quimiocinas, citocinas e mediadores lipídicos. A transmigração de leucócitos para os sítios de inflamação, por exemplo, em geral depende da participação de quimiocinas como CCL25, CCL21, CCL2, CXCL9, CCL19 (Penido e cols, 2008; Unsoeld e cols, 2007). Mediadores lipídicos como o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) exercem atividade quimiotática para polimorfonucleares, eosinófilos e monócitos, e a prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) produzida por mastócitos é um potente agente quimiotático para linfócitos e eosinófilos (Migliorisi e cols, 1987; Mackarel e cols, 2000; Tager e cols, 2000).

A resolução natural da inflamação se deve a três processos principais: remoção do estímulo inicial, diminuição da liberação de moléculas pró-inflamatórias e remoção das células inflamatórias. Nas doenças inflamatórias crônicas há persistência do estímulo inicial, fazendo com que células inflamatórias sejam constantemente ativadas e recrutadas para os tecidos, o que impede a resolução do processo (Henson, 2005).

### **1.7) Interação com endotélio e migração celular**

O recrutamento de leucócitos do sangue para os tecidos ocorre através de um processo de múltiplas etapas controladas por sinais quimioatrativos e eventos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. 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 (Schon e cols, 2003; Scandella e cols, 2002). Essas moléculas também atuam sobre o endotélio, tornando-o permissivo à migração dessas células (Johnston & Butcher, 2002). 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 (Kelly e cols, 2007; Zarbock & Ley, 2008; Hirose, 2011).

A função dos leucócitos na resposta inflamatória e imunidade requer a rápida transição de um estágio circulante não-aderente para um estágio aderente, permitindo a sua saída dos vasos sanguíneos. 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, como citocinas e quimiocinas, pelos tecidos danificados (Vestweber, 2007). Nas vênulas pós-capilares ocorre inicialmente o rolamento ao longo do vaso, permitindo sua interação inicialmente fraca

com o endotélio. Em seguida há um processo chamado de pavimentação, onde os leucócitos margeiam o vaso para a transmigração (Simon e cols, 2000).

Os eventos iniciais de adesão são dependentes das interações reversíveis entre as selectinas e seus receptores, ambos expressos tanto pelos leucócitos quanto pelas células endoteliais (Kelly e cols, 2007) (Fig. 1.5). São descritas três selectinas, que são E-selectina, P-selectina e L-selectina, nomeadas de acordo com o tipo celular em que foram descritas (endotélio, plaquetas e leucócitos, respectivamente) (Ley & Kansas, 2004). 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 e radicais livres de oxigênio (Ley & Kansas, 2004). Esta molécula interage primariamente com a glicoproteína ligante de P-selectina do tipo 1 (PSGL-1) expressa pelos leucócitos e participa do recrutamento inicial dessas células na resposta inflamatória (Sundd e cols, 2011). Algumas citocinas como IL-4 e IL-13 também aumentam a expressão da P-selectina. 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- $\alpha$ ) (Kelly e cols, 2007). Seus principais ligantes são o PSGL-1 e ligante de E-selectina (ESL-1), também expressos na superfície dos leucócitos (Zarbock e cols, 2011). 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 pelos leucócitos sanguíneos e participa do direcionamento dessas células para os linfonodos e também medeia o rolamento após estímulo inflamatório, direcionando os leucócitos para os sítios de inflamação (Wedepohl e cols, 2012).

Finalmente, a adesão firme dos leucócitos ao endotélio envolve a interação de integrinas também expressas pelos leucócitos e pelas células endoteliais (Fig. 1.5). 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 (Arnaout e cols, 2007). Dentre esses sinais de ativação encontram-se o fator ativador de plaquetas (PAF), TNF- $\alpha$ , LPS etc (Issekutz & Szpejda, 1986; Montecucco e cols, 2008; Ingalls e cols, 1998). 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 (Kelly e cols, 2007).

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 (Zhang & Wang, 2012). Integrinas, como o antígeno associado à função de linfócitos do tipo 1 (LFA-1) e o antígeno de expressão tardia-4(VLA-4), são expressas na superfície de leucócitos e interagem com moléculas da superfamília das imunoglobulinas nas células endoteliais, a molécula de adesão intercelular do tipo I (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular do tipo I (VCAM-I), respectivamente (Arnaout e cols, 2007) (Fig. 1.5). A expressão de ICAM é constitutiva, porém aumentada pela ação de citocinas como IL-4, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , já o VCAM não é constitutivamente expresso, porém é induzido por TNF- $\alpha$  e IL-1, (Johnston e cols, 2000). Após a adesão firme dos leucócitos ao endotélio, ocorre o evento de migração transendotelial dessas células. Essa transmigração ocorre principalmente nas bordas das células endoteliais, onde descontinuidades das junções do tipo oclusivas (junções *tight*) são observadas (Vestweber, 2007). Além disso, modificações nas junções aderentes entre as células endoteliais são observadas, havendo uma desorganização dos componentes juncionais caderina,  $\beta$ -catenina e placoglobulina em áreas próximas às regiões de adesão dos leucócitos, facilitando o processo de transmigração para os sítios de inflamação (Del Maschio e cols, 1996).

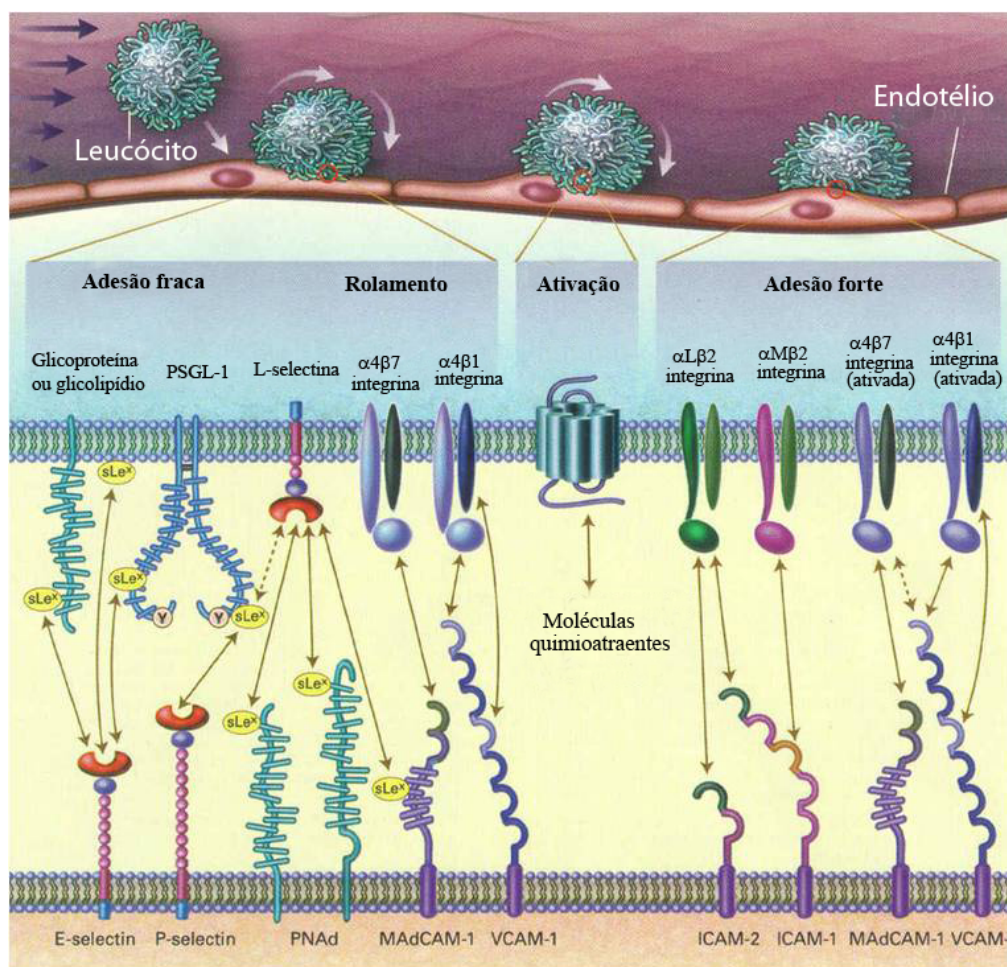


Figura 1.5: Interação dos leucócitos sanguíneos com o endotélio.

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 (Privratsky e cols, 2010). A molécula JAM é seletivamente concentrada nas junções endoteliais, mas não está presente nos leucócitos (Orlova & Chavakis, 2007). A importância de JAM no extravasamento de leucócitos foi demonstrada em experimentos onde este processo foi inibido pela utilização de anticorpos contra esta molécula (Martin-Padura e cols, 1998).

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 (Bono e cols, 2007). A migração de leucócitos pela matriz extracelular é mediada pelos receptores de laminina, fibronectina e vitronectina, tais

como  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$ , respectivamente. (Madri e cols, 1996; Coito e cols, 1998). Sendo assim, diversas etapas são necessárias para a migração e chegada dos leucócitos ao foco inflamatório. Esse processo requer uma rede complexa de interações entre diversas moléculas solúveis e de membrana para que a célula do sangue periférico consiga interagir com o endotélio, transmigrar para o tecido alvo a atingir o seu sítio de ação.

Diversas 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, tem se mostrado bastante promissor no controle da psoríase, por exemplo (Berger & Gottlieb 2007). Outros estudos utilizando anticorpos monoclonais contra ICAM-1 mostraram-se eficazes no controle da inflamação na colite ulcerativa e na doença de Crohn (Ghosh & Panaccione, 2010). Além do LFA-1 e ICAM-1, terapias baseadas no bloqueio por anticorpos da molécula VLA-4 também estão sendo desenvolvidas com excelente resposta clínica em pacientes com esclerose múltipla (Kieseier e cols, 2007). Uma vez que pacientes DMD apresentam um maior número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando VLA4<sup>high</sup> (Pinto-Mariz e cols, 2010), inibidores dessa molécula podem se tornar possíveis agentes terapêuticos nessa doença. Além disso, Guérette e colaboradores verificaram que durante o transplante de mioblastos em camundongos *mdx/mdx*, o bloqueio de LFA-1 através de anticorpos monoclonais reduz o infiltrado inflamatório, prevenindo a morte dos mioblastos transplantados (Guérette e cols, 1997).

Uma série de terapias envolvendo anticorpos monoclonais contra CD2 também estão sendo desenvolvidas, com o objetivo de frear linfócitos T auto-reativos. Este tratamento tem se mostrado bastante eficiente em patologias como artrite e psoríase (Mrowietz, 2002). 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, metaloproteinases e também com E - e P-selectinas (Pure & Cuff, 2001). Porém, o bloqueio dessas moléculas por anticorpos monoclonais ainda não é utilizado em pacientes com DMD, sendo um campo em aberto nesta área.

### **1.8) L-selectina**

A L-selectina ou CD62L é uma glicoproteína de 90 Kda que apresenta um papel essencial nos eventos iniciais da cascata de adesão, envolvendo a captura de leucócitos do fluxo sanguíneo



e o subsequente rolamento ao longo do endotélio vascular. Essa molécula participou do direcionamento dos linfócitos para os linfonodos durante a recirculação dessas células e na migração de leucócitos para os sítios de inflamação (Ley & Kansas, 2004). A recirculação de linfócitos através dos órgãos linfóides é um processo dependente da cascata de adesão endotélio-leucócito e de grande importância para a resposta imune, permitindo uma ação eficiente contra patógenos, por exemplo. Esse processo de adesão ocorre nas HEVs e depende primariamente da participação da molécula CD62L, o que foi demonstrado em experimentos onde o bloqueio dessa molécula por anticorpos monoclonais impediu a entrada de linfócitos nos linfonodos e placa de Peyer (Collett & Munro, 1999; Arbones e cols, 1994). Diversos ligantes para CD62-L já foram descritos nas HEVs. O primeiro identificado foi a molécula de adesão celular dependente de glicosilação (GlyCAM-1) e depois dele outros ligantes como CD34, molécula de adesão celular a adressinas de mucosa (MAdCAM-1) e a proteína semelhante à podocalixina (PCLP) foram descritos (Khan e cols, 2003).

Diversos trabalhos mostram que, além do seu papel fundamental na migração de linfócitos para os linfonodos, o CD62-L atua também na transmigração de leucócitos para os sítios de inflamação, ainda que a participação das outras selectinas seja de maior importância. Nesse processo, ele é uma das primeiras moléculas a atuar, promovendo a diminuição da velocidade dos linfócitos no vaso e seu rolamento sobre o endotélio ativado (Arbones e cols, 1994). A transmigração de linfócitos nas vênulas pós-capilares é um processo semelhante ao observado nas HEVs dos linfonodos. No entanto, nas vênulas pós-capilares a molécula PSGL-1 também pode atuar como um ligante da L-selectina (Kahn e cols, 1994).

A interação da L-selectina com seus ligantes tanto nas HEVs quanto nas vênulas pós-capilares inicia uma cascata de eventos intracelulares nos leucócitos que participará em processos posteriores ao rolamento. Dentre esses eventos, há o aumento do cálcio citosólico, fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e Ras, síntese de espécies reativas de oxigênio, rearranjo do citoesqueleto de actina etc (Brenner e cols, 1996; Waddell e cols, 1994, Laudanna, 1994). Em neutrófilos, a ligação da L-selectina promove ainda síntese de TNF- $\alpha$  e IL-8 (Laudanna e cols, 1994). Além disso, Spertini e colaboradores demonstraram que a ativação de linfócitos utilizando anticorpos contra CD2 ou CD3, bem como o tratamento de granulócitos com G-CSF ou TNF- $\alpha$ , leva a um aumento da capacidade de ligação da L-selectina às HEVs. Esse aumento se deve à fosforilação do domínio citoplasmático do CD62L, que ocorre

constitutivamente em baixos níveis, mas é significativamente aumentado após o estímulo celular (Haribabu e colaboradores, 1997).

Ainda que os leucócitos não sejam células polarizadas, a sua superfície celular apresenta duas áreas distintas: o corpo celular planar (*planar cell body*) e as protusões membranares também conhecidas como *microvilli* (Lin e cols, 1975). Mais de 80% do CD62L está localizado nas *microvilli*, como demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão em neutrófilos, monócitos e linfócitos. Outras moléculas também envolvidas na cascata de adesão leucocitária, como as  $\alpha 4$  integrinas e o PSGL-1 também estão localizadas nesta região. A localização do CD62L no *microvilli* é de extrema importância para o processo inicial de adesão leucócito-endotélio, uma vez que a exclusão do CD62L dessa região resulta em uma redução significativa da capacidade de adesão (von Adrian e cols, 1995).

A interação inicial dos leucócitos com o vaso resulta em uma rápida clivagem endoproteolítica da L-selectina no domínio proximal de membrana, resultando na liberação da forma ativa dessa molécula (Kahn e cols, 1994). A primeira descrição da clivagem de CD62L foi feita em 1989, quando se observou que o tratamento de neutrófilos com acetato de forbol miristato (PMA) ou fatores quimioatraentes (fator C5a do complemento ou LTB<sub>4</sub>) resultava na redução rápida da expressão dessa molécula (5 minutos) e uma incapacidade desses neutrófilos de migrar para os sítios de inflamação (Jutila e cols, 1989). Observou-se ainda que essa expressão reduzida na superfície de neutrófilos era acompanhada de um aumento de L-selectina solúvel no meio (Jutila e cols, 1989).

De forma similar ao que acontece nos neutrófilos, a L-selectina é clivada da superfície de linfócitos em resposta a diversos estímulos. Jung e Dailey, após tratarem linfócitos com PMA, observaram a redução da expressão dessa molécula na superfície de linfócitos e um aumento da L-selectina solúvel no meio (Jung & Dailey, 1990). Essa L-selectina solúvel é 12 KDa menor do que a forma de superfície e é liberada após 30 minutos de tratamento. Uma protease conhecida como enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE) foi identificada em 1998 como capaz de promover essa clivagem de L-selectina em tímócitos após ativação com PMA (Peschon e cols, 1998).

A clivagem da L-selectina também pode ocorrer pela sua ligação com anticorpos *in vitro*. Porém, essa clivagem parece depender de uma protease diferente da TACE, uma vez que a criação de uma L-selectina mutante pela eliminação de nove aminoácidos preveniu sua clivagem pelo PMA, mas não pela ligação com anticorpo (Stoddart e cols, 1996). Walcheck e colaboradores estudaram a clivagem da L-selectina em fibroblastos deficientes e reconstituídos

com TACE. Foi observado que em fibroblastos deficientes na produção dessa enzima ainda há uma liberação significativa de L-selectina, sugerindo que mais de uma protease esteja envolvida nesse processo (Walcheck e cols, 2003).

Além do PMA e da ligação com anticorpos, o receptor P2X<sub>7</sub> também induz a clivagem de L-selectina em linfócitos (Gu e cols, 1998). O receptor P2X<sub>7</sub> é uma molécula pertencente à família dos receptores purinérgicos, cujos principais agonistas são nucleosídeos e nucleotídeos, como o ATP extracelular. Esse receptor tem uma ampla distribuição em células do sistema imune e já foi observado em macrófagos, linfócitos, células dendríticas, mastócitos etc (Di Virgilio, 1995; Collo e cols, 1997; Mutini e cols, 1999; Bulanova e cols, 2005). O receptor P2X<sub>7</sub> apresenta a capacidade de abrir poros seletivos na membrana plasmática quando exposto repetidas vezes ou por tempo prolongado ao agonista (Surprenant e cols, 1996). Este poro permite a passagem de moléculas de até 900 Da em macrófagos e 400 Da em linfócitos (Coutinho-Silva & Persechini, 1997; Wiley e cols, 1998). Muitos estudos apontam para um papel importante desse receptor na resposta inflamatória, onde citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são capazes de modular positivamente a expressão desse receptor, enquanto que a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) apresenta efeito inverso, modulando-o negativamente (Humphreys & Dubyak, 1998). Inúmeras funções têm sido descritas para o P2X<sub>7</sub>, como liberação de IL-1 $\beta$ , indução de morte celular, clivagem de MHC de classe I e CD23, dentre outras (Gu e cols, 1998; Lemaire e cols, 2006; Elliott & Higgins, 2004). A participação do P2X<sub>7</sub> na clivagem do CD62-L foi demonstrada em experimentos utilizando camundongos deficientes na expressão do receptor, onde foi observado que o tratamento com ATP não alterava o nível de expressão de L-selectina na superfície celular onde aproximadamente 90% das células são positivas para esse marcador. Por outro lado, os camundongos selvagens mostraram uma redução de 70% na expressão de CD62-L em linfócitos T de sangue após tratamento com ATP, confirmando a participação do P2X<sub>7</sub> neste processo (Labasi e cols, 2002).

O papel funcional da clivagem de L-selectina vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisa. Walcheck e colaboradores demonstraram que o bloqueio da clivagem dessa molécula em neutrófilos reduziu a velocidade de rolamento dessas células, resultando em um maior acúmulo de neutrófilos nas tonsilas (Walcheck e cols, 1996). Outro estudo mostra ainda a participação da L-selectina na ativação de leucócitos. Neste trabalho, observou-se que a ligação da L-selectina aumenta a ativação da  $\beta_2$  integrina e que a sua clivagem limita a ativação de neutrófilos (Hafezi-Moghadam e cols, 2001). Há ainda trabalhos propondo a L-selectina solúvel

como uma molécula envolvida no controle da inflamação. Foi demonstrado que em uma concentração de 0,9 µg/ml, a L-selectina solúvel reduziu a migração de linfócitos para linfonodos em mais de 30%, indicando que a clivagem dessa molécula pode regular o tráfego de linfócitos e, conseqüentemente, a resposta imune e inflamação (Tu e cols, 2002).

A importância da clivagem da L-selectina foi ainda demonstrada em um trabalho que utilizou camundongos transgênicos expressando uma L-selectina resistente à clivagem (Galkina e cols, 2003). Neste trabalho, a região proximal de membrana do gene da L-selectina (sítio de clivagem) foi substituída por uma região análoga da P-selectina, tornando esta proteína resistente à clivagem. Camundongos transgênicos expressando tanto a proteína modificada quanto a selvagem sob o controle do promotor de CD2 (molécula expressa unicamente em linfócitos T) foram cruzados com um camundongo deficiente na expressão de L-selectina, gerando um grupo de camundongos que expressa a forma resistente à clivagem ( $L\Delta P^{T-cell}$ ) e outro grupo que expressa a forma selvagem ( $WT^{T-cell}$ ), ambos expressando L-selectina apenas nos linfócitos. Foi observado que os níveis de L-selectina no plasma dos camundongos  $WT^{T-cell}$  eram aproximadamente 70% dos níveis observados em camundongos selvagens, indicando que a maioria da L-selectina solúvel é proveniente de linfócitos. Foi observado ainda que as células T dos camundongos  $L\Delta P^{T-cell}$  transmigravam nas HEVs mais lentamente, indicando que a clivagem da L-selectina é importante para uma migração rápida de linfócitos (Galkina e cols, 2003).

### **1.9) Células inflamatórias na DMD e sua importância na morte de fibras musculares e fibrose**

Toda esta complexa rede de células e moléculas da resposta inflamatória ilustra a grande dificuldade no desenvolvimento de novas terapias para doenças genéticas com resposta inflamatória crônica. Diversos estudos mostram que os infiltrados inflamatórios apresentam papel importante 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 (Gorospe e cols, 1996; Cai e cols, 2000; Wehling e cols, 2001).

A inflamação na DMD é caracterizada por altas concentrações de células mielóides no músculo esquelético, incluindo neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e principalmente macrófagos (Karagol e cols, 1986; Cai e cols, 2000; Gorospe e cols, 1996; Yeung e cols, 2004; Sun e cols,

2008). 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 (Wehling e cols, 2001). Este estudo mostrou ainda que a depleção de macrófagos em camundongos *mdx/mdx* previne grande parte da lise de células musculares mostrando que, além da lesão muscular mecânica pela falta da distrofina, há atividade citotóxica dependente de macrófagos. Porém, ainda não está claro através de quais vias há a 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 da inflamação, acompanhada por redução de fibrose nos músculos esqueléticos e completa prevenção da fibrose cardíaca (Wehling e cols, 2001; Wehling-Henricks e cols, 2005). Trabalhos anteriores mostraram que o óxido nítrico apresenta capacidade de inibir a diapedese, ativação e longevidade de algumas populações de células mielóides (Clancy e cols, 1992; Liu e cols, 1998). A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é uma das diversas proteínas que interagem com a distrofina na superfície da célula muscular (Brenman e cols, 1995). Sendo assim, na ausência da distrofina, a concentração de nNOS no sarcolema e no citoplasma cai, possivelmente favorecendo a chegada de células mielóides no músculo lesado.

Trabalhos recentes mostram que os músculos dos camundongos *mdx/mdx* são infiltrados por macrófagos pró-fibróticos M2a (Villalta e cols, 2009). Esses macrófagos expressam altos níveis de arginase que metaboliza a arginina produzindo agentes pró-fibróticos (Shearer e cols, 1997). Durante o estágio inicial da doença no *mdx/mdx*, os músculos são também invadidos por macrófagos M1 que expressam altas concentrações da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). O metabolismo da arginina pela iNOS nesses macrófagos M1 produz níveis tóxicos de NO, promovendo a lise da fibra muscular (Villalta e cols, 2009). Os músculos são, em seguida, invadidos por macrófagos M2c que não expressam iNOS, mas liberam grandes quantidades de IL-10, inativando as células de perfil M1 (Villalta e cols, 2009; Mantovani e cols, 2004). Tanto as populações M1 (pró-inflamatórias) quanto M2a (anti-inflamatórias) estão presentes durante a fase necrótica da doença, onde competem pela arginina, substrato comum da iNOS e arginase. Porém, a desativação do subtipo M1 pelos macrófagos M2c aumenta a disponibilidade do substrato para a arginase (M2a), favorecendo a fibrose (Satriano, 2004). Um estudo mais recente mostrou ainda que a deleção da arginase-2 em camundongos *mdx/mdx*, reduz a fibrose, e que a suplementação nutricional de camundongos *mdx/mdx* com arginina aumenta a fibrose nos músculos esqueléticos e cardíaco (Wehling-Henricks e cols, 2010).

Os mastócitos aparentemente são um tipo celular importante na patologia da DMD (Gorospe e cols, 1996). Esta célula é frequentemente encontrada próxima a superfícies epiteliais na pele, sistema respiratório e mucosa gastrointestinal, uma localização estrategicamente relacionada às suas funções de defesa (Gilfillan & Beaven, 2011). Diversos fatores podem promover a ativação de mastócitos, como temperatura, agentes químicos, trauma mecânico, radiação UV, dentre outros (Henz e cols, 2001). Além de células efetoras de reações anafiláticas, este tipo celular exerce um papel de grande importância no reparo tecidual e em respostas imunológicas contra agentes infecciosos (Meuser-Batista e cols, 2008; Thathiah e cols, 2011). Mastócitos são capazes de secretar uma série de citocinas que contribuem nas reações imunológicas, afetando assim o recrutamento e função de linfócitos, tais como IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-16, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  (Wedemeyer e cols, 2000). Este tipo celular está presente de forma constitutiva no tecido conjuntivo do músculo, servindo como uma fonte de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Radley & Grounds, 2006). Zhang e colaboradores, utilizando camundongos com superexpressão de TNF- $\alpha$  apenas no músculo cardíaco, mostraram uma progressiva fibrose do miocárdio, dependente da interação entre mastócitos e fibroblastos cardíacos. Estas células, quando expostas a uma sinalização inflamatória constante, apresentam capacidade fibrótica aumentada em resposta aos mediadores liberados pelos mastócitos, indicando mais um papel importante desta célula no tecido cardíaco (Zhang e cols, 2011).

Alguns trabalhos mostraram que camundongos *mdx/mdx*, assim como pacientes DMD, apresentam elevadas concentrações de mastócitos no músculo (Gorospe e cols, 1994). Ainda que alguns artigos reportem a localização de mastócitos em áreas de necrose muscular (Bucciolini-Di e cols, 1983), outros trabalhos associam essas células principalmente a infiltrados inflamatórios e áreas fibróticas (Gorospe e cols, 1996).

Experimentos utilizando injeção intramuscular de grânulos de mastócitos purificados induziram ampla necrose no músculo esquelético de camundongos *mdx/mdx*, em contraste a camundongos controle não-distróficos (Gorospe e cols, 1994). Estes dados sugerem que as miofibras do camundongo *mdx/mdx* sejam mais vulneráveis a esses mediadores. Uma análise comparativa entre a quantidade de mastócitos nos diferentes músculos de camundongos *mdx/mdx* e a extensão ocupada por necrose 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 (Gorospe e cols, 1994). Além disso, estudos utilizando cromoglicato de sódio, um agente estabilizador de mastócitos que atua inibindo 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 (Radley e cols, 2006; Marques e cols, 2008).

Os eosinófilos também são células mielóides descritas como presentes nos músculos esqueléticos de camundongos *mdx/mdx* (Cai e cols, 2000). 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. Porém, esse tipo celular foi observado no músculo de camundongos *mdx/mdx* apenas por um grupo de pesquisa (Cai e cols, 2000), sendo estes dados contestados por outros grupos (comunicação pessoal).

Além do papel de células mielóides, diversos artigos descrevem uma resposta imune celular específica na patologia da DMD e nos camundongos *mdx/mdx*, mostrando um papel importante de linfócitos nesse processo. Ainda que a participação de linfócitos T citotóxicos (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 (Spencer e cols, 2001). A importância da perforina neste processo foi avaliada utilizando camundongos duplamente deficientes para distrofina e perforina, onde foi observada uma redução da morte no músculo distrófico, sugerindo mais uma vez que linfócitos T citotóxicos atuem na DMD (Spencer e cols, 1997).

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, atua na 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 esquelético de pacientes DMD, o que pode indicar uma maior ativação de CTLs (Schmidt e cols, 2004). 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 (Schmidt e cols, 2004).

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 (Cai e cols, 2000).

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 (Spencer e cols, 2001). 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 T neste processo (Morrison e cols, 2000). Este efeito pode ser mediado diretamente pela liberação de fatores que propiciam a deposição de matriz extracelular, como TGF- $\beta$ , ou pelo recrutamento de outras células que atuam na formação da fibrose. Farini e colaboradores mostraram ainda uma redução na fibrose dos músculos esqueléticos em camundongos *scid/mdx* (Farini e cols, 2007), que não expressam distrofina e não apresentam linfócitos T e B desde o nascimento. Neste trabalho, foi mostrado ainda que o diafragma dos camundongos *scid/mdx* apresenta menores concentrações da forma ativa do TGF- $\beta$  quando comparado ao *mdx/mdx*, ainda que a concentração de TGF- $\beta$  total seja semelhante entre os dois animais (Farini e cols, 2007). Além disso, um trabalho recente mostrou que nos músculos esqueléticos dos camundongos *mdx/mdx* há uma predominância de células T expressando TCR V $\beta$ 8.1/8.2 (Vetrone e cols, 2009). Aproximadamente 30% das células TCR $\beta$ <sup>+</sup> encontradas nos músculos esqueléticos expressam esse perfil de V $\beta$ . Em comparação, uma concentração muito baixa dessas células foi encontrada no baço desses animais. Isto sugere a presença de uma resposta celular específica nos músculos dos camundongos *mdx/mdx*, além de um possível papel autoreativo desses linfócitos.

A principal terapia para a distrofia muscular do tipo Duchenne baseia-se na utilização de corticóides e os benefícios observados são primariamente atribuídos à imunossupressão. O tratamento com prednisolona decresceu significativamente as concentrações de células inflamatórias nos músculos esqueléticos deficientes em distrofina (Wehling-Henricks e cols, 2004). 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 provoque um menor extravasamento de células inflamatórias para os músculos (Wehling-Henricks e cols, 2004). 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* (De Luca e cols, 2005). 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.



## 1.10) Cardiomiopatia nas distrofinopatias

A cardiomiopatia gerada pela deficiência total ou parcial da distrofina refere-se às manifestações cardíacas de três doenças intimamente relacionadas: a DMD, a distrofia muscular de Becker (BMD) e a XLDC. Diferentemente da DMD, onde não há expressão de distrofina funcional, a BMD se deve à expressão de uma proteína parcialmente funcional (Voit e cols, 1991). Já a XLDC é causada pela perda seletiva da distrofina no coração (Bies, 1994).

A ausência da distrofina no músculo cardíaco faz com que o sarcolema do cardiomiócito se torne mais suscetível ao dano induzido pelas contrações musculares. Estudos sugerem que a ausência da distrofina altera a função dos canais iônicos ativados por força do sarcolema (Woolf e cols, 2006). Aparentemente, esses canais não se abrem apropriadamente nos cardiomiócitos deficientes em distrofina durante o enchimento ventricular. Isso leva a um aumento de influxo de cálcio nessas células (Williams e cols, 2007). O aumento da concentração intracelular de cálcio leva a ativação de proteases ativadas por cálcio, como as calpaínas, que degradam troponina I, comprometendo as contrações das fibras musculares cardíacas (Constantin e cols, 2006). A ativação dessas calpaínas também medeia à destruição de proteínas do sarcolema, o que causa ainda maior dano aos cardiomiócitos. Esse grande influxo de cálcio, juntamente com os danos na membrana plasmática, promovem a morte das fibras cardíacas. Essas fibras serão, então, substituídas progressivamente por colágeno, reduzindo a eficiência de contração do miocárdio. Por razões ainda desconhecidas, a fibrose cardíaca na DMD começa na parede externa do ventrículo esquerdo e se espalha para os átrios (Ameen & Robson, 2010). Essa fibrose caminha de fora para dentro da parede ventricular, começando no epicárdio e progredindo até o endocárdio. Em longo prazo, todo esse dano leva ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada progressiva, a forma de doença cardíaca mais observada nos pacientes com DMD.

Aproximadamente um terço dos pacientes com DMD mostram sinais clínicos de disfunção cardíaca a partir dos 10 anos de idade, e praticamente todos os pacientes desenvolvem danos cardíacos por volta dos 18 anos (Cox & Kunkel, 1997). Porém, um estudo recente mostrou alterações eletrocardiográficas em pacientes com menos de 6 anos de idade, ainda que sem sinais clínicos de disfunção cardíaca (James et al, 2011). Estudos mostram que 10-40% dos pacientes com DMD morrem por falência cardíaca, e é estimado que a cardiomiopatia possa diminuir a expectativa de vida desses pacientes em até dois anos (Baxter, 2006). A melhora do suporte ventilatório aumentou a sobrevivência dos pacientes com DMD e permitiu que os danos cardíacos fossem mais evidenciados (Bach & Martinez, 2011). O envolvimento cardíaco é ainda mais

prevalente em pacientes com BMD, onde a partir dos 40 anos mais de 90% desses pacientes desenvolvem sinais de doença cardíaca (Politano e cols, 1996). Esta alta incidência na BMD é considerada uma consequência natural do maior tempo de vida desses pacientes, permitindo que os sinais clínicos cardíacos se desenvolvam (Melacini e cols, 1996). Além do transplante cardíaco, tratamentos paliativos são os únicos possíveis até agora (Baxter, 2006; Quinlivan & Dubowitz, 1992).

O diagnóstico de cardiomiopatia na DMD não é facilmente realizado, uma vez que esses pacientes apresentam tolerância reduzida a exercícios físicos, o que mascara os problemas cardíacos. O recomendado é que se faça ecocardiografia e ecocardiograma anualmente após os 10 anos de idade (Spurney, 2011).

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 (Bridges, 1986; Hainsey e cols, 2003). 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 (Quinlan e cols, 2004; Lefaucheur e cols, 1995). 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 (Quinlan e cols, 2004; Sapp e cols, 1996). Os sintomas de cardiopatia dilatada podem ser mais facilmente detectados em camundongos mais velhos. Pesquisadores descreveram alterações ecocardiográficas em camundongos com 40 semanas de idade, mostrando o coração hipertrofiado, com dificuldades de contração e menor frequência (Quinlan e cols, 2004). 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 (Nakamura e cols, 2002).

Os danos cardíacos são aparentemente mais extensos em pacientes DMD do que em camundongos *mdx/mdx*. Estudos em necropsia 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 (Frankel & Rosser, 1976).

A partir desse conjunto de dados descritos, decidimos, no presente trabalho, caracterizar aspectos básicos da resposta inflamatória celular e dano tecidual nos corações de camundongos

*mdx/mdx*. Buscamos, ainda, estudar o processo de migração de populações celulares sanguíneas para o tecido alvo, e possíveis funções efetoras e reguladoras que afetem a progressão da doença.

## **2) OBJETIVOS**

### **2.1) OBJETIVO GERAL**

A contribuição de linfócitos T na patogênese e regulação do processo inflamatório muscular na DMD ainda não está completamente elucidada. Entretanto, destaca-se a observação de que essas células são encontradas em baixa frequência entre os componentes dos infiltrados inflamatórios de camundongos *mdx/mdx*.

Assim, postulamos a existência de desregulação no processo de migração linfocitária nesses animais, e decidimos estudar se células T são capazes de aderir firmemente ao endotélio para transmigração e chegada ao tecido muscular cardíaco, bem como a expressão de moléculas de adesão e de fatores inflamatórios potencialmente envolvidos nesses processos.

### **2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Avaliação da cinética de destruição de fibras musculares cardíacas em camundongos *mdx/mdx*;
2. Análise estrutural e ultra-estrutural do tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx*;
3. Estudar as populações linfóides que migram para o coração em decorrência da progressão da doença;
4. Avaliar se há alguma modulação na expressão de moléculas de adesão nos linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx*;
5. Avaliar a capacidade de células T CD4 e CD8 sanguíneas interagirem firmemente com o endotélio cardíaco através de moléculas de adesão *in vitro*;

### **3) Material e Métodos**

#### **3.1) Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos *mdx/mdx* e C57BL10/J machos, com 2, 6, 9, 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 (SEA LITEB-LBC) por 5-7 dias antes dos experimentos e todos os procedimentos foram feitos conforme a resolução 196/96 do Ministério da Saúde, sendo o projeto aprovado (0308/06 e LW13/11) pela Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz. Para evitar possíveis diferenças induzidas por variações genéticas e ambientais da colônia utilizada, alguns experimentos foram repetidos utilizando camundongos C57BL/10 e *mdx/mdx* obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP). Todos os resultados foram reprodutíveis usando as duas colônias.

#### **3.2) Eletrocardiografia**

Para obter os traçados eletrocardiográficos, os transdutores foram colocados sob a pele dos camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 48 semanas de idade, de acordo com a derivação desejada (DII). Obtivemos os traçados através de um sistema digital Power Lab 2/20 acoplado a um bioamplificador com captação de sinais em 2 mV por 1 segundo. Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100 Hz e os traçados foram visualizados e analisados no software Scope for Windows V3.6.10. Medimos então a frequência cardíaca e a variação dos intervalos de ondas P-Q, QRS e Q-T em ms (milissegundo).

#### **3.3) Análise Histopatológica**

Os camundongos foram eutanasiados com CO<sub>2</sub> e o músculo cardíaco foi removido, incluído em OCT e congelado em nitrogênio líquido (Sakura, CA, USA). Foram feitos cortes de 10 µm para coloração por hematoxilina e eosina (H&E) e a extensão da área danificada do

miocárdio (inflamação) foi avaliada pela delimitação da área afetada por campo microscópico em um total de 100 campos por idade. A análise foi feita utilizando o programa Scion (Scion Program National Institutes of Health, Image Program). Foram considerados infiltrados inflamatórios grupos de no mínimo dez células inflamatórias, e a quantificação é representativa de três cortes de tecido coletados de no mínimo três camundongos por idade estudada. Para a análise histopatológica do tecido cardíaco de camundongos controle e infectados com *Trypanosoma cruzi*, os corações foram removidos, fixados em solução Millonig (10% de formaldeído em PBS) e embebidos em parafina para posterior processamento e coloração por H&E. Nos camundongos infectados com *T. cruzi*, o número de infiltrados inflamatórios e o número de células inflamatórias por infiltrado foi determinado pela análise de 30 campos microscópicos individuais por amostra e foram utilizados cinco camundongos por grupo.

#### **3.4) Análise de Estrutura e Ultra-estrutura**

Fragmentos de músculo cardíaco de 1-2 mm foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma Aldrich, MO, USA) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7.2 por 1 h 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, Germany), ferricianeto de potássio 0,8% (Sigma) e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M (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, Germany). Os cortes ultra-finos (70 nm) foram coletados em grades de cobre, corados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-10C (Zeiss).

### **3.5) Obtenção de células inflamatórias cardíacas**

Os corações de camundongos *mdx/mdx* 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. Ainda assim, as amostras de células cardíacas que continham mais de 5% de células T CD62L<sup>alto</sup>(sangue) eram desprezadas. Os fragmentos foram então transferidos para uma solução de colagenase tipo IV 0,2% (Sigma, Lote 035K8636, 277 units/mg) e submetidos a 7 ciclos de digestão enzimática em agitação suave por 20 minutos a 37°C. As células isoladas em cada ciclo foram centrifugadas e imediatamente transferidas para meio RPMI 1640 (Sigma) gelado contendo 10% de SFB e mantidas a 4 °C. Antes da incubação com anticorpos para a avaliação fenotípica, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C com meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de SFB e 10% de soro de carneiro inativado, para bloqueio de receptores Fcγ.

### **3.6) Citometria de fluxo**

Para análise fenotípica por citometria de fluxo, tanto células sanguíneas como inflamatórias cardíacas, com receptores Fcγ bloqueados, foram incubadas com os seguintes anticorpos previamente titulados: anti-CD3 PE, anti-CD3 FITC, anti-NK1.1 FITC, anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PE, anti-CD8 APC, anti-TCRγδ PE, anti-CD62L PE-Cy7, anti-CD49d PE, anti-LFA1 PE, anti-CD43 PE, anti-CD69 APC (todos BD Pharmingen). As marcações foram realizadas em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de SFB por 30 minutos a 4°C em 20 µl 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 Cyan ADP (Dako, Houston, TX, USA) e a análise dos dados foi realizada utilizando o software Summit 4.3 (Dako) sempre na região morfológica (FSC x SSC) excluindo apenas debris celulares e agregados.

### **3.7) Dot blotting**

As amostras de sangue de camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas de idade foram obtidas por punção cardíaca sem anti-coagulante e deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Para a coleta do soro, as amostras foram centrifugadas a 9000 g por 5 minutos e a dosagem de proteínas totais foi feita pelo método Lowry (BioRad, Hercules, CA, USA). Para os ensaios de *dot blotting*, foram aplicadas por poço 80, 40 ou 20 µg de amostra/100 µl de tampão TRIS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Foi utilizada uma bomba de vácuo para a imobilização das proteínas em membrana de nitrocelulose previamente hidratada em tampão Tris por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 60 minutos em tampão Tris contendo 5% de albumina bovina (BSA) (Sigma) e incubada com anticorpo primário monoclonal contra CD62-L (BD Pharmingen) por 1 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 2x por 20 minutos cada em tampão Tris e incubada por mais 1 h com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (Southern Biotech). Após mais duas lavagens, a revelação foi feita com substrato NBT/BCIP (Southern Biotech). Como controle positivo, extratos de linfócitos de sangue de camundongos C57BL/10 foram utilizados, conforme descrito no item 3.5.

### **3.8) Purificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de sangue**

Os linfócitos de sangue foram obtidos por punção cardíaca com heparina e  $1 \times 10^7$  células foram incubadas com anticorpo contra CD8, CD4 ou CD3 (Miltenyi Biotech, Bergischgladbach, Alemanha) conjugados a partículas magnéticas por 20 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas (250g/10 min), ressuspendidas em RPMI (Sigma) e aplicadas em colunas MiniMACS (Miltenyi Biotech) em um suporte magnético, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A eficácia da purificação foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com anticorpos contra CD8 FITC (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), CD4 PercP (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) ou contra CD3 PE (BD Pharmingen). Experimentos com enriquecimento de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup> inferior a 95 % foram desprezados.



### **3.9) Ensaio de adesão**

Cortes congelados e não fixados com 16 µm de espessura foram obtidos de tecido cardíaco recém-coletado de camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas e C57BL/10 de 6 semanas de idade. Os cortes foram incubados com 100 µL de suspensão de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> purificadas de sangue na concentração de 3x10<sup>6</sup> células (como descrito no item 3.5). As células foram purificadas de sangue de camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas de idade e co-incubadas sob agitação a 60 rpm por 40 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados 4 vezes com PBS e corados com panótico (Labor Bioclin, Osasco, Brasil). As células que aderiram ativamente aos vasos do tecido cardíaco foram identificadas devido a sua coloração mais intensa e aspecto tridimensional em relação às células que já faziam parte do corte de tecido. O número de células aderidas/vaso foi quantificado em todo o tecido usando o microscópio de luz Axioplan 2 (Zeiss).

### **3.10) Ensaio de permeabilização por ATP**

Após a coleta de sangue dos camundongos por punção cardíaca na presença de heparina, as células mononucleares foram obtidas por centrifugação em gradiente de Ficoll-histopaque 1077 (Sigma) e incubadas por 30 minutos a 4°C com anticorpo contra CD3, CD4 ou CD8 conjugados ao FITC (Southern Biotech). As células foram então lavadas e ressuspensas em meio RPMI contendo 10 mM de HEPES (Sigma), pré-aquecidas por 5 min a 37°C e depois incubadas por 10 min na presença ou ausência de ATP 5 mM (Sigma). Durante os últimos 5 minutos de incubação foi adicionado iodeto de propídio (Sigma) às células na concentração final de 0,1 µg/ml e as amostras foram adquiridas imediatamente usando citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson). As células positivas para o iodeto de propídio após o estímulo com o agonista foram consideradas sensíveis ao ATP (permeabilizadas).

### **3.11) Bloqueio *in vitro* do receptor P2X7**

Linfócitos T CD3<sup>+</sup> foram purificados do sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 como descrito no item 3.5 e pré-incubados ou não com o antagonista de P2X7 KN-62 (100nM) (Sigma) por 30 min. Em seguida, as amostras foram incubadas com meio RPMI apenas ou meio

mais ATP<sub>e</sub> 100 µM (Sigma) por 1 h. A concentração de ATP<sub>e</sub> foi escolhida após estudo cinético considerando a menor dose de ATP que induziu a clivagem de CD62L sem indução de morte celular. Os sobrenadantes foram coletados e usados em ensaios de *dot blotting* para avaliar os níveis de CD62L solúvel.

### **3.12) Tratamento com azul brilhante G para bloqueio in vivo do receptor P2X7**

O azul brilhante G (BBG) (Sigma) foi diluído em solução veículo (PBS + DMSO 0,2%) na concentração de 3 mg/mL. Durante o tratamento, camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 9 semanas de idade foram pesados uma vez por semana e receberam BBG preparado na hora (45,5 mg/Kg) ou veículo através de injeções intraperitoneais a cada 48 h durante 3 semanas.

### **3.13) Western blotting**

Linfócitos T CD3<sup>+</sup> purificados (ver item 3.5) foram lisados com tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, NP-40 1%, leupeptina 1 mM, PMSF 100 mM, pepstatin A 1 mM, EDTA 100 mM). A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Lowry (BioRad) e 50 µg de proteínas totais/*slot* foram resolvidos em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose, bloqueadas em tampão TRIS contendo 5% de leite desnatado e incubadas com anticorpo primário contra P2X7 (Alomone, Jerusalém, Israel) por 2 h. As membranas foram lavadas 2X com tampão de bloqueio e incubadas por 1 h com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (SouthernBiotech). A revelação das membranas foi feita com NBT/BCIP (SouthernBiotech). Para detecção de TCR αβ, um fragmento do ventrículo esquerdo foi extensivamente lavado em PBS gelado e cortado em fragmentos de 1-2 mm. As proteínas totais também foram obtidas utilizando tampão de extração, centrifugadas a 500xg por 5 min e aplicadas ao SDS-PAGE como descrito anteriormente. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo contra TCR αβ conjugado à biotina (Mybiosource, CA, USA), lavadas com tampão de bloqueio e incubadas por 1 h com estreptoavidina conjugada à peroxidase (Dako). A detecção foi feita por quimioluminescência, utilizando o kit ECL plus (GEhealthcare, Piscataway, NJ, USA) em um sistema de imagem Storm 860 (Amersham, Uppsala, Sweden).

### **3.14) Dosagem de citocinas**

Para a análise das citocinas no soro, o sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6 e 12 semanas de idade foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 900 g para a obtenção do soro. Para a análise das citocinas no músculo cardíaco, os corações foram retroperfundidos através da aorta com PBS em uma vazão de 10 mL/min para completa remoção do sangue das coronárias. Os corações foram coletados, fragmentados, lisados com uma solução de lise (PBS, tween 20 0,1%, leupeptina 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 100 mM, pepstatina A 1 mM, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 100 mM; todos reagentes Sigma), e os extratos foram centrifugados a 9000 g por 5 min. A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método de Lowry. A quantificação das citocinas foi feita por citometria de fluxo utilizando o kit CBA flex (BD Pharmingen) e a concentração de citocinas é mostrada por mg de proteínas totais por amostra.

### **3.15) Atividade da creatina quinase sérica (CK-MB e CK-NAC)**

A atividade das isoformas de creatina quinase, de músculo cardíaco (CK-MB) e músculo esquelético (CK-NAC), foi dosada no soro de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 controle e tratados com BBG. A dosagem foi feita semanalmente durante as três semanas de tratamento e ainda por duas semanas após o término do tratamento. As amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda desses animais em tubos capilares heparinizados, centrifugadas para obtenção do plasma e analisadas utilizando kits comerciais (Wiener lab, Rosario, Argentina). 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 em leituras consecutivas e é diretamente proporcional à atividade da enzima. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa VERSAmax microplate reader (Molecular Device) a 340 nm. Esse ensaio quantitativo foi utilizado como marcador de dano muscular.

### **3.16) Análise da atividade física espontânea**

Para avaliação da atividade física espontânea dos camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 tratados ou não com BBG, foi utilizada a plataforma ethovision, empregando o sistema Noldus Ethovision XT6 (Noldus, Leesburg, Holanda) com uma câmera posicionada a uma distância de

Um dos animais. Cada camundongo foi individualmente adaptado na arena por 10 minutos antes da medição que durou 20 minutos. Neste ensaio foi avaliada a extensão percorrida por cada animal.

### **3.17) Infecção com *Trypanosoma cruzi***

Os parasitas foram isolados de camundongos *swiss-webster* como previamente descrito (Araújo-Jorge e cols, 1989), e camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 foram infectados por injeção intraperitoneal contendo  $1 \times 10^4$  formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y em 200  $\mu$ L de PBS. Camundongos controle (não-infectados) receberam 200  $\mu$ L de PBS, e todos os animais foram eutanasiados no 15<sup>o</sup> dia pós-infecção.

### **3.18) Imunohistoquímica**

O músculo cardíaco foi coletado, congelado em isopentano resfriado por nitrogênio líquido (Merck), como previamente descrito (Guerron e cols, 2010), e mantido em nitrogênio líquido até a utilização. Cortes de tecido cardíaco com 8  $\mu$ m de espessura foram fixados com formaldeído 4% por 10 min à temperatura ambiente, e depois lavados duas vezes em PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 10 min, e os receptores Fc $\gamma$  foram bloqueados com meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de SFB e 10% de soro de carneiro inativado. Os cortes de tecido cardíaco foram então incubados com anticorpo contra CD3 $\epsilon$  (SouthernBiotech) por 12 h à temperatura ambiente. Os cortes foram extensivamente lavados com PBS, incubados com anticorpo secundário conjugado à biotina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 1 h, lavados em PBS e incubados com estreptoavidina conjugada à peroxidase (Dako) por mais 1 h. A revelação foi feita com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Dako).

### **3.19) Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o teste t de Student (GraphPad prism version 4.00 software) e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 4) Resultados

Para avaliar a extensão do dano em tecidos musculares nos camundongos *mdx/mdx*, foi feita a dosagem da atividade das enzimas indicadoras de morte de fibras cardíacas (CK-MB) e esqueléticas (CK-NAC) no sangue. O CK-NAC foi utilizado como controle, uma vez que os níveis dessa enzima no soro dos camundongos *mdx/mdx* são bem descritos na literatura. Foi observado um aumento da atividade da enzima em ambos os tipos musculares, porém, como esperado, esse aumento foi bem mais pronunciado no tecido esquelético (Fig. 4.1A), quando comparado ao tecido cardíaco (Fig. 4.1B).

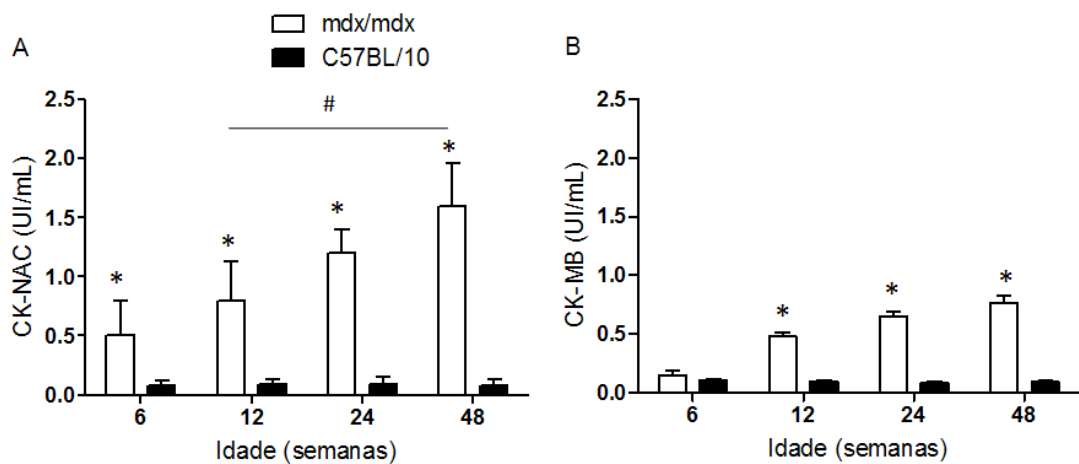


Figura 4.1: Avaliação de lesão muscular em músculo esquelético e cardíaco de camundongos *mdx/mdx*. O plasma dos camundongos *mdx/mdx* ou C57BL/10 foi coletado nas idades indicadas e a atividade enzimática de CK-NAC (A) e CK-MB (B) foi quantificada. Os dados são representativos de quatro experimentos com cinco animais cada. \*  $p < 0,05$  quando camundongos *mdx/mdx* são comparados com C57BL/10 de mesma idade e #  $p < 0,05$  quando comparados *mdx/mdx* de idades diferentes.

Uma vez que houve um aumento da atividade da enzima CK-MB, decidimos avaliar a capacidade funcional do coração de animais *mdx/mdx* por eletrocardiografia. Para este ensaio, foram utilizados camundongos *mdx/mdx* mais velhos (48 semanas), uma vez que, de acordo com a literatura, alterações cardíacas funcionais são observadas nos camundongos *mdx/mdx* a partir de 40 semanas de idade. Os camundongos C57BL/10 apresentaram atividade elétrica cardíaca normal (Fig. 4.2A) e 80% dos camundongos *mdx/mdx* apresentaram bloqueio atrioventricular de 2º grau (Fig. 4.2B), 60% apresentaram bradicardia sinusal (Fig. 6C) e 40% apresentaram arritmia sinusal (Fig. 4.2C).

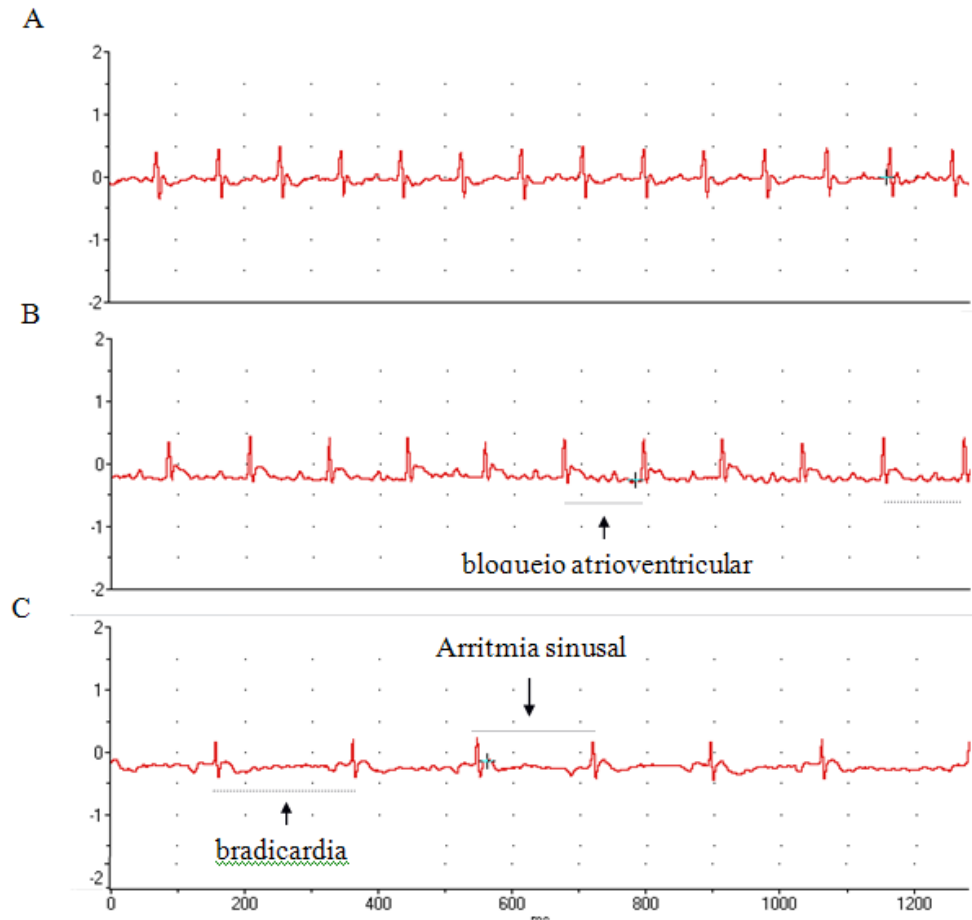


Figura 4.2: Eletrocardiografia de camundongos *mdx/mdx* e *C57BL/10*. São mostrados registros representativos de um camundongo *C57BL/10* (A) e dois *mdx/mdx* (B e C) de 48 semanas de idade. As setas e o símbolo (+) indicam exemplos de bloqueio atrioventricular (B), bradicardia (C) e arritmia sinusal (C). O eixo das abscissas comporta tempo, representado em segundos, e o eixo das ordenadas comporta diferença de potencial, representado por milivoltagem. Foram feitos três experimentos independentes, com seis animais por grupo em cada.

A coloração por HE foi utilizada com o objetivo de acompanhar a progressão das alterações histopatológicas no tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx* nas idades indicadas e foram observadas algumas alterações em comparação ao *C57BL/10* (Fig. 4.3A). Nos camundongos *mdx/mdx* de 2 (Fig 4.3B) e 6 (Fig 4.3C) semanas não foram encontradas alterações inflamatórias. Por outro lado, no camundongo de 12 semanas, foram observados poucos focos inflamatórios e células inflamatórias distribuídas em todo o tecido. Nesta idade, foram observados ainda alguns cardiomiócitos danificados (Fig. 4.3D). Nos animais de 24 semanas,

houve um aumento na área inflamatória/fibrótica (Fig. 4.3E) e, particularmente nos camundongos de 48 semanas, foram encontradas células esparsas compondo grandes infiltrados (Fig. 4.3F).

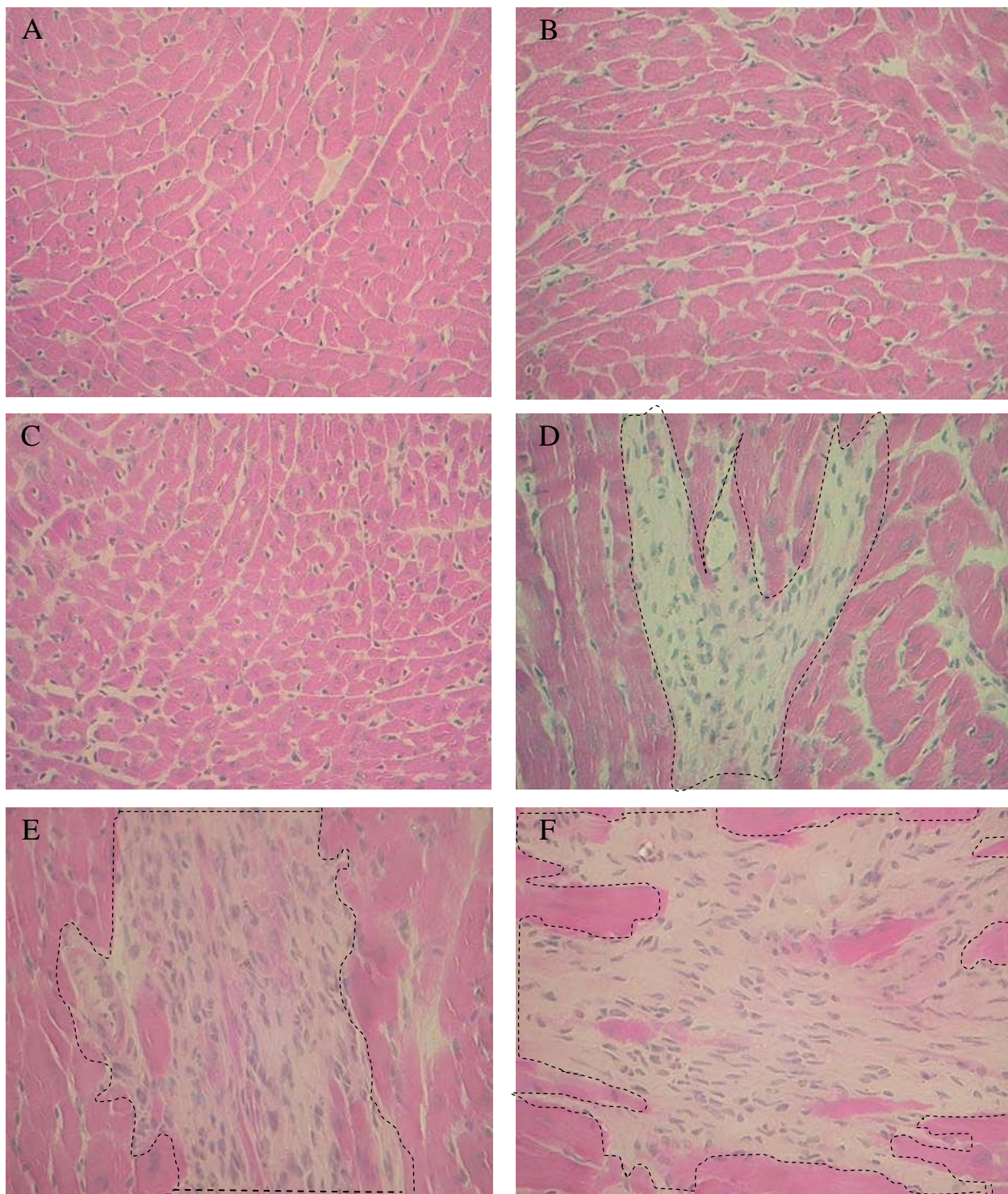


Figura 4.3: *Análise histopatológica do tecido cardíaco de camundongo mdx/mdx*: A histopatologia do tecido cardíaco de camundongos C57BL/10 de 6 semanas (A) e camundongos *mdx/mdx* de 2 (B), 6 (C), 12 (D), 24 (E) e 48 (F) semanas foi avaliada através da coloração com hematoxilina-eosina. Observa-se focos

de infiltrado inflamatório (área tracejada) a partir de 12 semanas de idade (D). Os resultados são representativos de análises de 15 campos microscópicos em pelo menos três camundongos por idade. Aumento de 200x.

Ainda que grandes infiltrados inflamatórios sejam encontrados com a progressão da doença, eles são pontualmente distribuídos no tecido e relativamente pouco frequentes. Desta forma, foi feita a quantificação da extensão das áreas inflamatórias/fibróticas nos cortes de tecido cardíaco. Nenhuma região danificada foi encontrada em camundongos *mdx/mdx* de 2 semanas (Fig. 4.4), e animais de 6 semanas mostraram apenas 0,07% da área do tecido ocupada por inflamação. Com a progressão da doença, foi observado um aumento de áreas inflamadas/fibróticas, atingindo 4,4% em 12 semanas, 9,5% em 24 semanas e 8,3% em 48 semanas (Fig. 4.4).

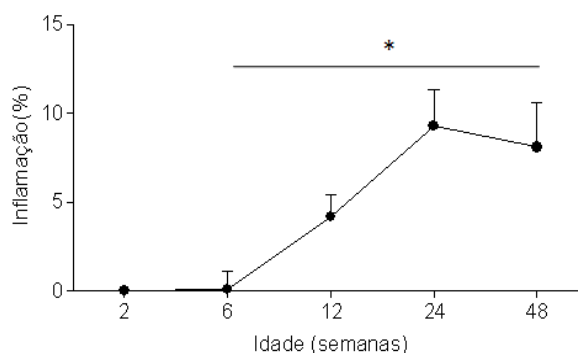


Figura 4.4: Quantificação da área do tecido cardíaco ocupada por inflamação em camundongos *mdx/mdx*. A extensão de área cardíaca ocupada por células inflamatórias/tecido fibroso (%) foi quantificada em um total de 100 campos microscópicos/3 camundongos/idade. O gráfico mostra o aumento da área do tecido cardíaco ocupada por infiltrados inflamatórios durante a progressão da doença. \*  $p < 0,05$  quando comparados camundongos de 12, 24 e 48 semanas de idade com os animais de 2 e 6 semanas de idade.

Para a melhor identificação das alterações patológicas na arquitetura do tecido de camundongos *mdx/mdx* de 6 (Fig 4.5A), 12 (Fig 4.5B), 24 (Fig 4.5C) e 48 (Fig 4.5D) semanas de idade, foram utilizados cortes semi-finos de tecido cardíaco incluído em resina Epon e corados com azul de toluidina. A análise morfológica mostrou principalmente macrófagos e fibroblastos no tecido cardíaco em todas as idades avaliadas (Fig. 4.5A-D). É importante ressaltar que nos camundongos de 24 e 48 semanas de idade, foram observados alguns núcleos de células



inflamatórias com cromatina aparentemente fragmentada e não-espiralada, além de estruturas citoplasmáticas não identificáveis (Fig. 4.5C figura inserida e Fig. 4.5D).

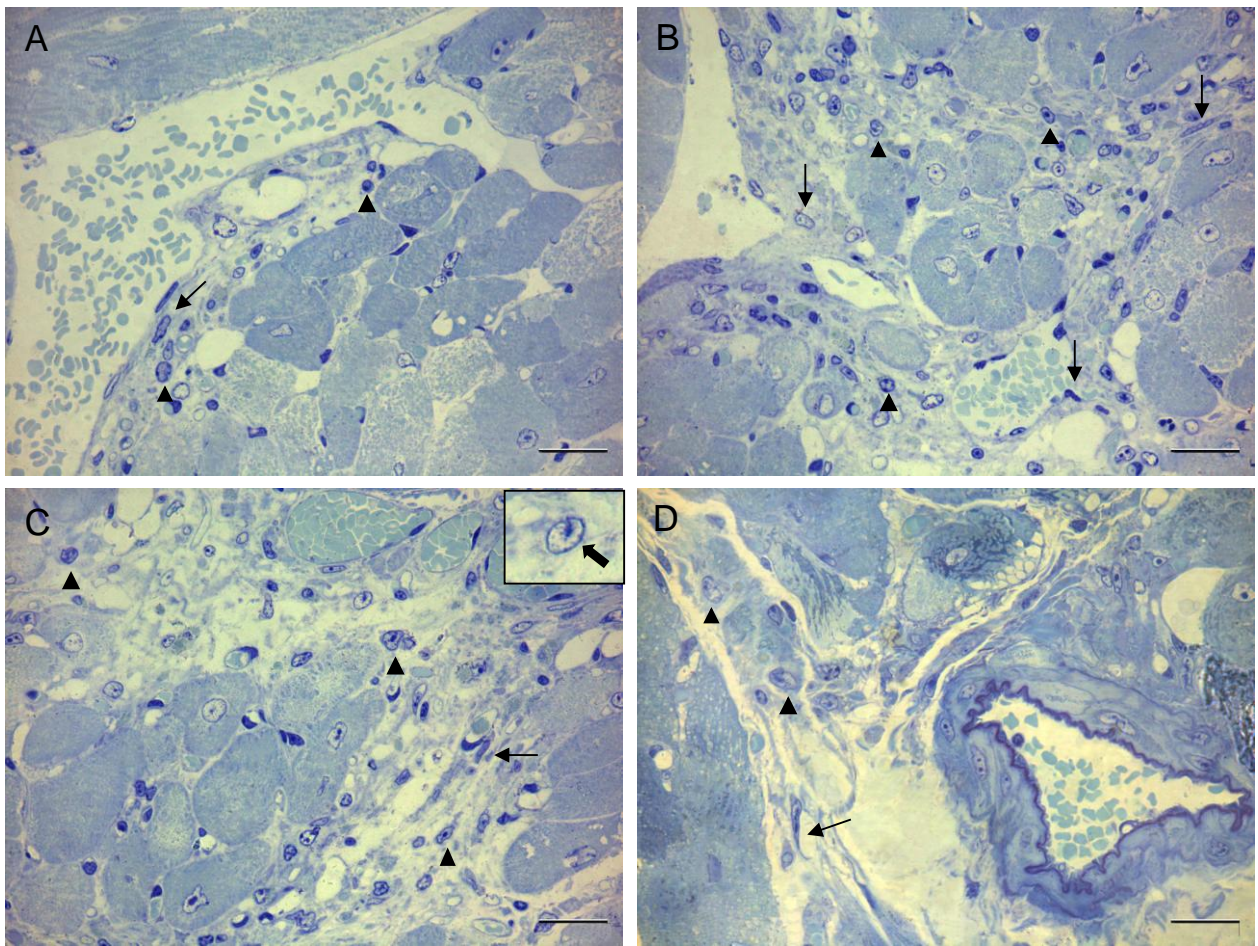


Figura 4.5: *Arquitetura geral e composição celular do infiltrado inflamatório*: Fragmentos cardíacos foram coletados de camundongos *mdx/mdx* de 6 (A), 12 (B), 24 (C) e 48 semanas (D), emblocados em Epon e processados para análise em microscopia de luz após coloração com azul de toluidina. Características morfológicas gerais de macrófagos (cabeça de seta), fibroblastos (seta) e células mortas (seta grossa) (painel inserido) foram identificadas em três camundongos por idade. Barra = 20 $\mu$ m.

Uma vez que a análise de cortes semi-finos sugeriu células inflamatórias em processo de morte celular, foi realizada microscopia eletrônica para melhor avaliação dessa possibilidade. Em camundongos *mdx/mdx* com 6 semanas, foram observados fibroblastos e macrófagos interagindo diretamente com cardiomiócitos (Fig. 4.6A). Em camundongos com 12 semanas, foram observadas algumas fibras musculares com edema no citoplasma (Fig. 4.6B e figura inserida).

Além disso, em animais de 24 semanas, houve muitas células inflamatórias com núcleos bastante peculiares, mostrando cromatina degradada e com regiões aparentemente super condensadas (Fig. 4.6C e 4.6D). Com relação ao conteúdo citoplasmático, não foram identificadas organelas intactas, em geral com morfologias alteradas e possivelmente não funcionais. Alguns núcleos, por exemplo, apresentaram descontinuidade de membrana (Fig 4.6E). Ainda nos animais de 24 semanas, foram observadas muitas células inflamatórias com corpos lipídicos (lipofuscina) distribuídos no citoplasma (Fig 4.6F e 4.6G). Estas estruturas estão aparentemente fundindo-se umas às outras e ocupam porções extensas do conteúdo celular. Nos animais de 48 semanas, foi observado que os leucócitos compondo grandes infiltrados inflamatórios estavam aparentemente morrendo através de uma via não-apoptótica, uma vez que não foram observados corpos apoptóticos ou condensação peculiar da cromatina. Este dado foi confirmado pela marcação de TUNEL (dado não mostrado). Aparentemente, trata-se de uma via que envolve perda de integridade de membrana plasmática (necrose), o que também pode contribuir para o recrutamento de mais células inflamatórias e para a gravidade da doença (Fig. 4.6H e 4.6I). Experimentos adicionais estão em andamento para melhor avaliação da morte de células inflamatórias nos infiltrados cardíacos de camundongos *mdx/mdx*.

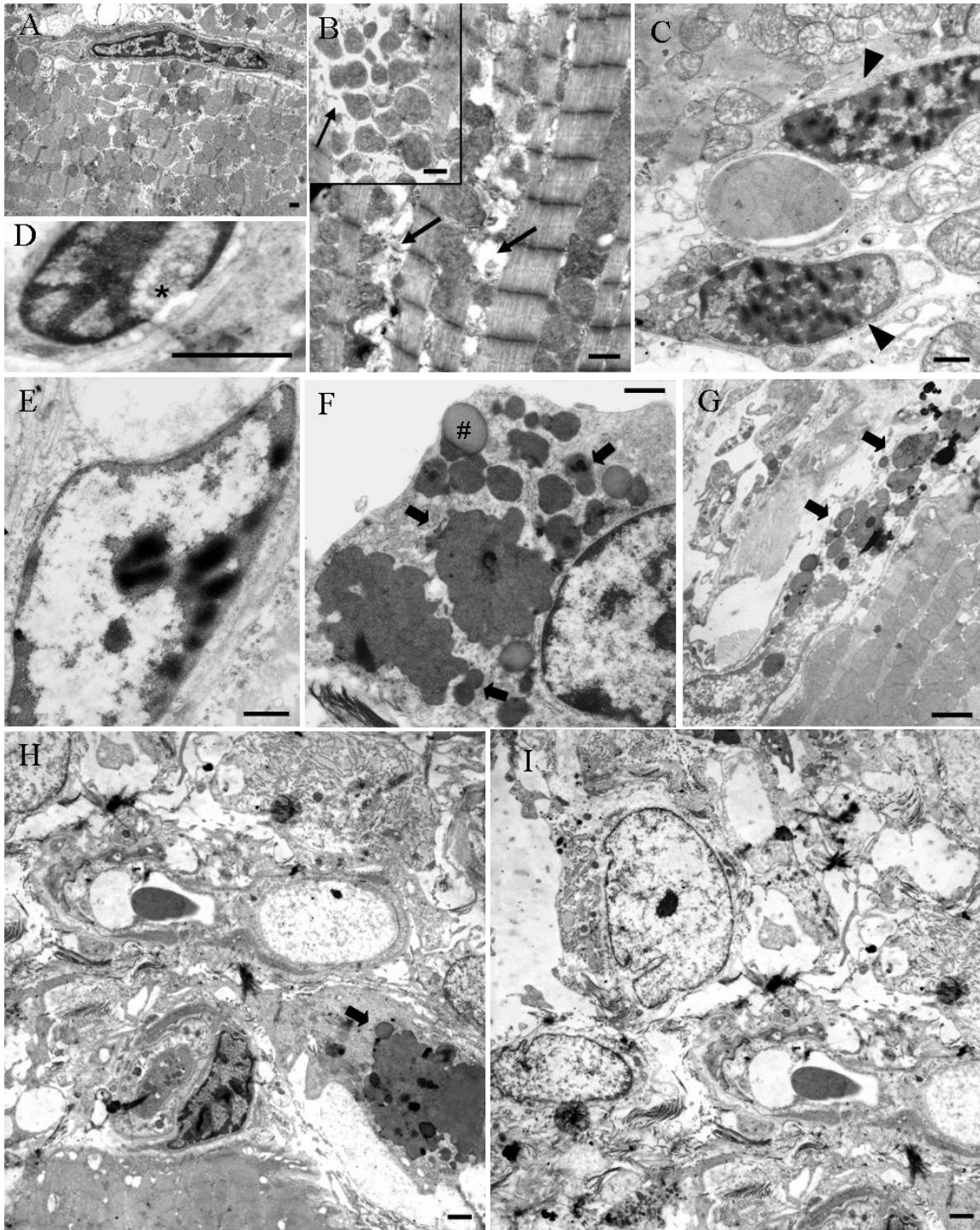


Figura 4.6: *Análise ultra-estrutural do tecido cardíaco*: Fragmentos cardíacos foram coletados de camundongos *mdx/mdx* de 6 (A), 12 (B) 24 (C – G) e 48 semanas (H e I) e processados para análise por microscopia eletrônica. As seguintes alterações foram observadas: edema em células musculares (B - setas finas), núcleos com micro- regiões com cromatina hiper-condensada (C - cabeça de seta), descontinuidade do envoltório nuclear (D - asterisco), acúmulo de lipofuscina (F,G e H - setas largas) e fusão de grânulos de lipofuscina (F - #).

Embora os infiltrados inflamatórios musculares de camundongos *mdx/mdx* sejam compostos principalmente por células mielóides, linfócitos têm sido descritos como populações celulares importantes na progressão da doença. Estas células foram então isoladas do tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx* com 6, 12, 24 e 48 semanas de idade e analisadas por citometria de fluxo na região de linfócitos (Fig 4.7A). Foi observado um decréscimo progressivo no percentual de células T CD3<sup>+</sup> durante o período estudado (Fig 4.7B) e uma predominância de células T CD4<sup>+</sup> (Fig 4.7C) sobre T CD8<sup>+</sup> (Fig 4.7D) nos animais com 6 e 12 semanas de idade. Os percentuais de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> decaem com a progressão da doença, atingindo níveis basais nos camundongos mais velhos (Fig 4.7C e D). Além disso, células T  $\gamma\delta$  CD4/CD8 duplo-negativas foram encontradas apenas em animais de 12 semanas (12% na região de linfócitos), concomitante com a redução de células T  $\alpha\beta$  (Fig. 4.7E). No sangue, as células  $\gamma\delta$  correspondem a menos de 1% dos linfócitos (dado não mostrado), o que indica quimiotaxia específica para o coração. Não foi observada migração relevante de células NK, NKT ou linfócitos B CD19<sup>+</sup> para o miocárdio (menos de 1%).

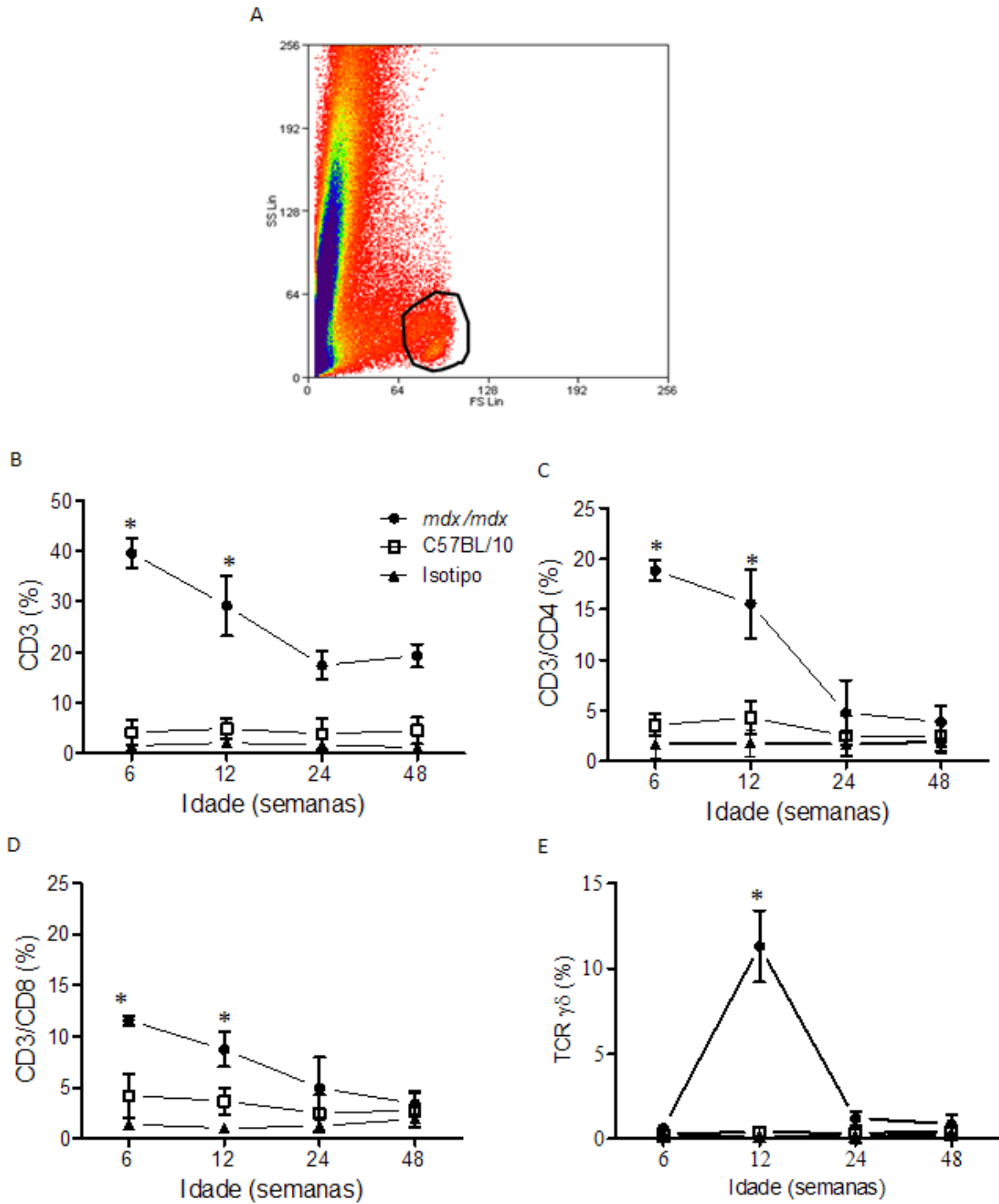


Figura 4.7: Identificação de linfócitos T no tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10. O tecido cardíaco foi enzimaticamente dissociado e as células obtidas foram avaliadas por citometria de fluxo. Tendo como base os parâmetros FSC e SSC, foi feita uma região nas células mononucleares (A) e a análise foi realizada de acordo com a expressão de CD3 (B), CD3/CD4 (C) e CD3/CD8 (D) e TCR  $\gamma\delta$  (E)

nas idades indicadas. Os gráficos mostram uma redução de linfócitos T CD3/CD4 e CD3/CD8 (B, C e D) com a progressão da doença, além de um pico único de células T  $\gamma\delta$  nos camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade (E). Os dados representam cinco experimentos independentes com quatro a cinco animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparados *mdx/mdx* e C57BL/10.

Uma vez que houve uma cinética bem determinada de chegada de linfócitos T  $\alpha\beta$  CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no tecido cardíaco dos camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas, o perfil de moléculas de adesão que poderiam estar envolvidas na migração dessas células para o músculo cardíaco foi avaliado. Para isso, linfócitos isolados do sangue e do coração desses animais foram marcados com anticorpos contra CD62L, LFA-1, CD43 e CD49d. Como esperado, foi observada a redução da expressão da molécula de adesão CD62L nos linfócitos do tecido cardíaco em todas as idades testadas (Fig. 4.8A) quando comparado ao sangue. Isso acontece porque há liberação dessa molécula após a interação com o endotélio ativado, assim, as células dos sítios inflamatórios são CD62L baixo ou negativas (Rainer, 2002). Entretanto, as células T sanguíneas virgens são CD62L positivas (Rainer, 2002). De fato, os linfócitos de camundongos *mdx/mdx* (Fig.4.8B e C) e C57BL/10 (Fig 4.8B e D) de 6 semanas expressavam a molécula, mas houve uma grande redução na expressão do CD62L nos linfócitos de sangue dos camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas (Fig. 4.8B e E). O mesmo não foi observado em camundongos C57BL/10 com 12 semanas de idade (Fig 4.8B e F), que expressavam níveis normais da molécula. Essa modulação negativa da expressão de CD62L é transitória, uma vez que linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* com 24 semanas de idade expressam níveis normais da molécula (Fig 4.8 B). Não houve alteração na expressão das demais moléculas de adesão testadas (CD43, LFA-1, e CD49d) nos linfócitos de sangue ou coração (dado não mostrado).

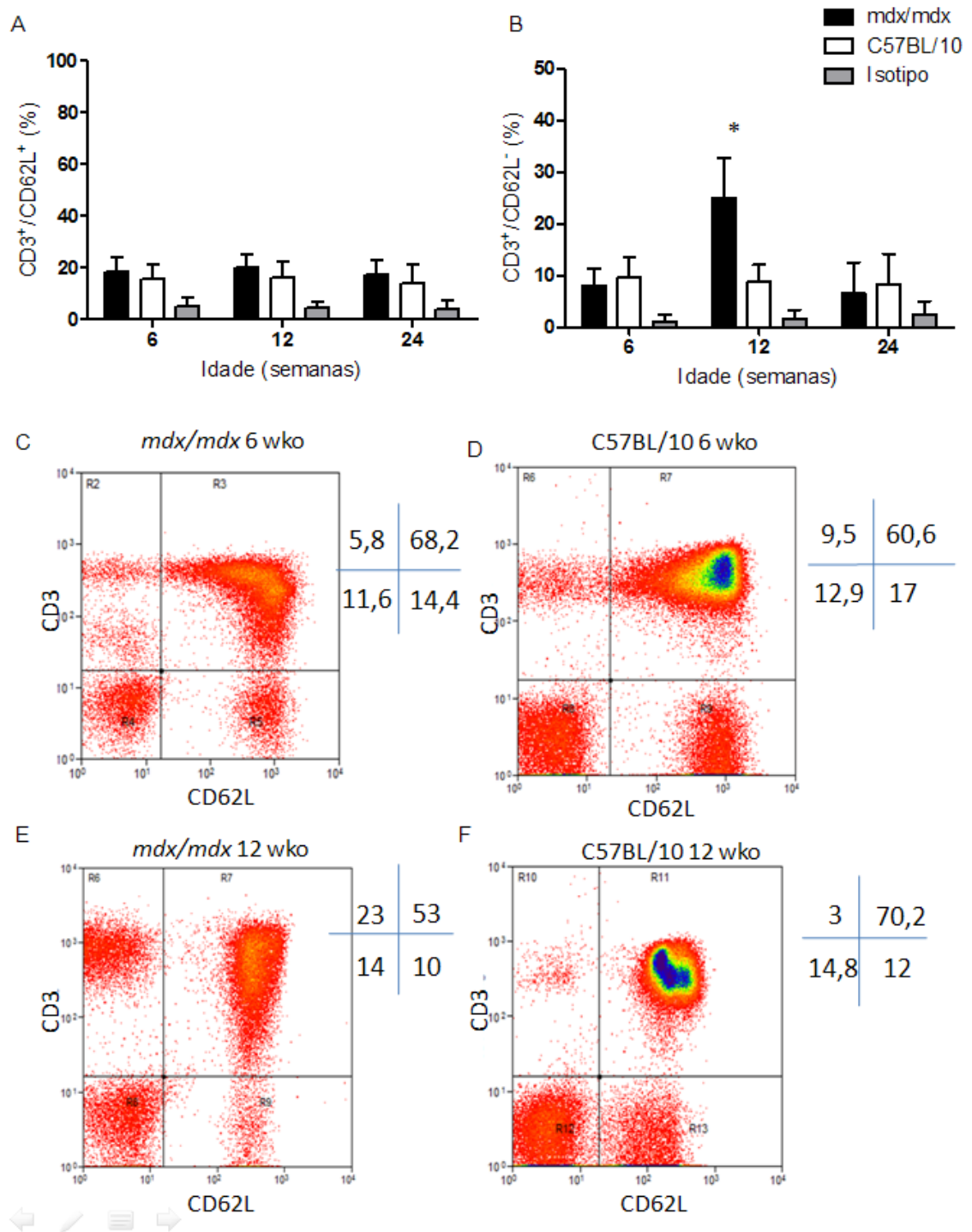


Figura 4.8: *Expressão de CD62L em linfócitos sanguíneos e cardíacos*: A expressão de CD62L foi avaliada por citometria de fluxo em linfócitos cardíacos CD3<sup>+</sup> isolados por dissociação enzimática dos corações de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6, 12 e 24 semanas de idade (A). O gráfico mostra o percentual de células CD3<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> nas células obtidas do tecido cardíaco (A). A expressão de CD62L foi avaliada também por citometria de fluxo em linfócitos T CD3<sup>+</sup> sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* e

C57BL/10 de 6, 12 e 24 semanas de idade (B). O gráfico mostra o percentual de células  $CD3^+/CD62L^-$  no sangue periférico (B). São mostrados os *dot plots* representativos da marcação de células de sangue periférico com anticorpos contra CD3 e contra CD62L em camundongos *mdx/mdx* de 6 (C) e 12 (E) semanas de idade e camundongos C57BL/10 de 6 (D) e 12 (F) semanas de idade. Ao lado dos *dot plots* (C, D, E e F), estão indicados os percentuais de células em cada quadrante. A análise de CD62L em células CD3 foi realizada na região de células mononucleares, tendo como base os parâmetros FSC e SSC. \*  $P \leq 0,05$  quando comparado com células de animais de 6 semanas e C57BL/10 de mesma idade. Os dados representam dez experimentos independentes com cinco animais por grupo.

Uma vez que foi observada uma redução na expressão de CD62L em linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade, a expressão dessa molécula também foi avaliada em granulócitos e monócitos sanguíneos por citometria de fluxo. Para essa análise, o sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 de 6 e 12 semanas foi coletado, as hemácias foram lisadas e os leucócitos totais foram incubados com anticorpo contra CD62L. A análise da expressão de CD62L foi realizada nas respectivas regiões de morfologia de granulócitos e monócitos, tendo como base os parâmetros FSC e SSC (Fig. 4.9A). Não foi observada alteração na expressão de CD62L em granulócitos (Fig. 4.9B) e monócitos (Fig. 4.9C) sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* quando comparados a camundongos C57BL/10 em nenhuma das duas idades avaliadas. Logo, esses resultados indicam que a modulação na expressão dessa molécula é específica de linfócitos.



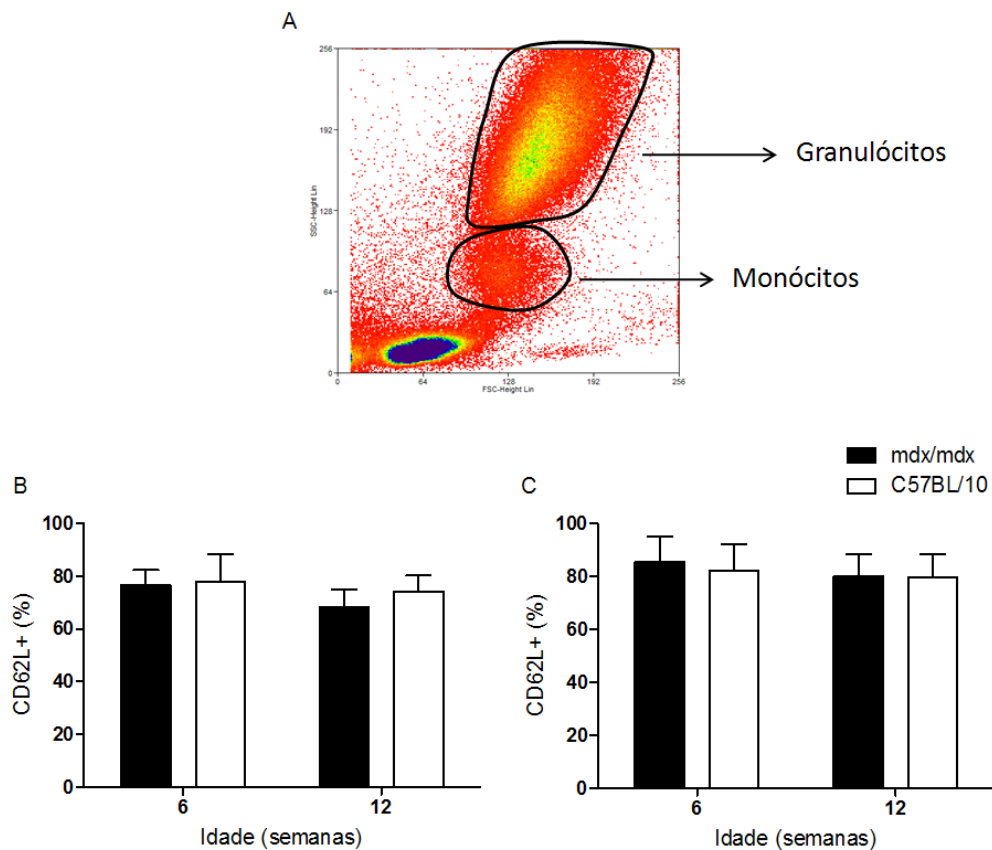


Figura 4.9: Expressão de CD62L em granulócitos e monócitos sanguíneos. O sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 de 6 e 12 semanas de idade foi coletado e após lise das hemácias, foi feita a incubação com anticorpo contra CD62L. A expressão de CD62L foi avaliada por citometria de fluxo em granulócitos (B) e monócitos (C) sanguíneos. A análise foi realizada nas regiões de morfologia de monócitos e granulócitos, baseada nos parâmetros FSC e SSC (A). Os gráficos mostram o percentual de granulócitos (B) e monócitos (C) que expressam CD62L. Os dados representam três experimentos independentes com cinco animais por grupo.

Para avaliar se essa modulação negativa na expressão de CD62L em linfócitos se deve à clivagem da molécula da superfície das células T, os níveis solúveis desta molécula foram avaliados no soro de camundongos *mdx/mdx* por *dot blotting*. Foi observado que camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade apresentam maiores níveis de CD62L solúvel quando comparados com animais de 6 semanas de idade (Fig 4.10A e C). A molécula LFA-1 foi utilizada como controle e não foram observados níveis aumentados desta molécula no soro de camundongos *mdx/mdx* com 6 ou 12 semanas de idade (Fig 4.10B e D).

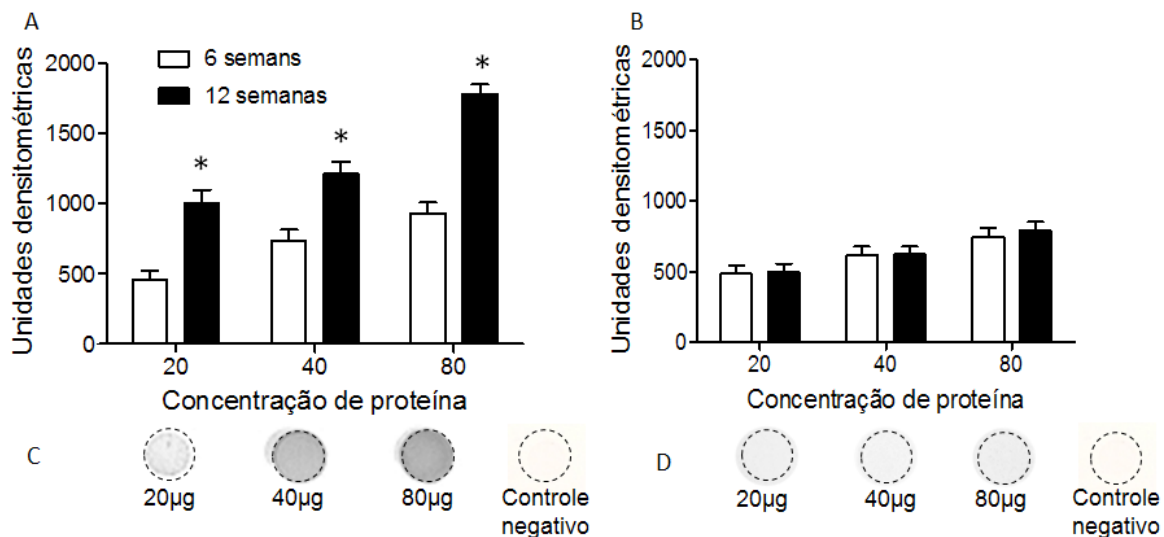


Figura 4.10: CD62L solúvel no soro de camundongos *mdx/mdx*: As concentrações séricas de CD62L (A) e LFA-1 (B) foram avaliadas em camundongos *mdx/mdx* com 6 e 12 semanas de idade por *dot blotting*, usando 20, 40 e 80 µg de proteínas totais por poço. São mostradas as membranas representativas de CD62-L (C) e LFA-1 (D) de um camundongo *mdx/mdx* de 12 semanas de idade. Os dados representam quatro experimentos independentes com quatro a cinco animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$ .

O CD62L é uma molécula chave na migração de linfócitos T virgens para os linfonodos, local onde ocorre a ativação dessas células. No entanto, apesar da clivagem do CD62L observada nos camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas, nunca foi descrita imunossupressão, maior susceptibilidade a infecções ou menor capacidade de montar respostas imunes específicas em qualquer idade. Isto sugere que a migração de linfócitos T virgens para os linfonodos esteja preservada. Sendo assim, o percentual de células CD62L<sup>+</sup> foi avaliado em linfócitos T virgens e recém-ativados. Para isso foi utilizado o CD69, um marcador de ativação inicial de linfócitos T. Nenhuma redução na expressão de CD62L foi observada nos linfócitos T CD69<sup>+</sup> ou CD69<sup>-</sup> de camundongos C57BL/10 (Fig 4.11A) e *mdx/mdx* (Fig 4.11B) com 6 semanas de idade ou C57BL/10 com 12 semanas de idade (Fig 4.11C). Por outro lado, foi observado que apenas 40% dos linfócitos T sanguíneos CD69<sup>+</sup> de camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade mantêm o CD62L na superfície (Fig 4.11D). O mesmo não foi observado nos linfócitos T CD69<sup>-</sup> onde foram observados níveis normais de expressão da molécula (Fig 4.11D). Estes dados indicam uma modulação negativa de CD62L específica de linfócitos T recém-ativados.

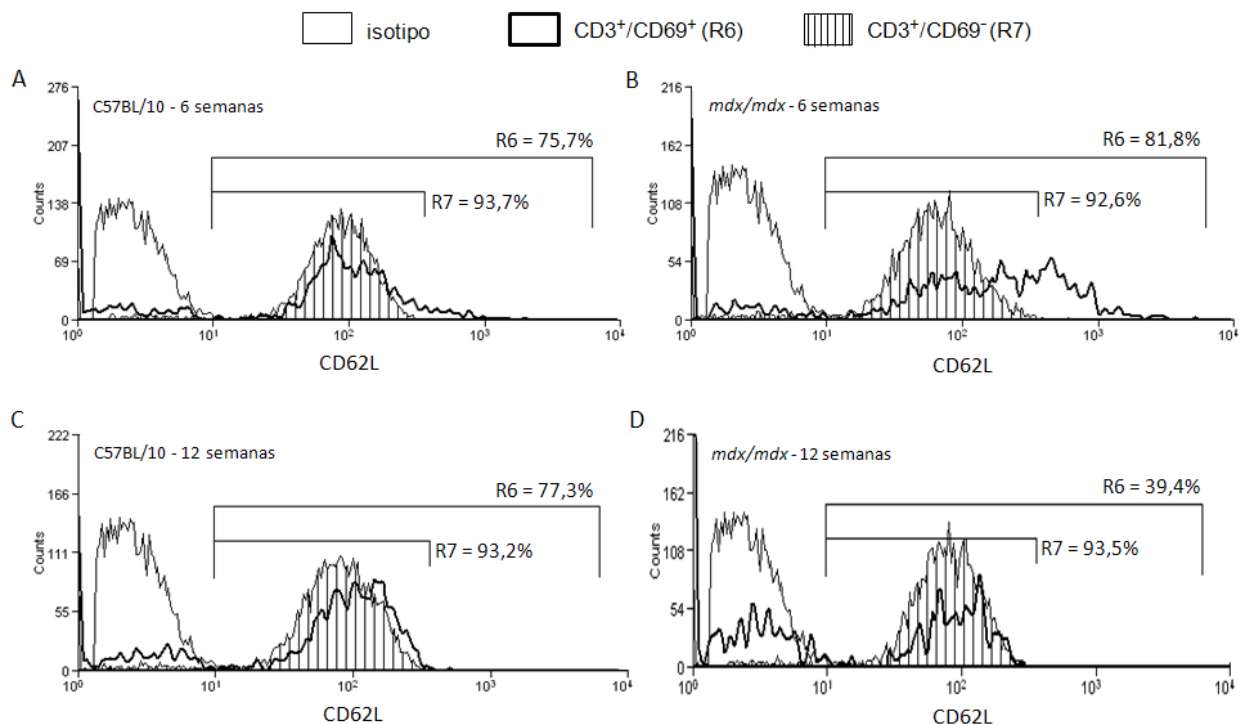
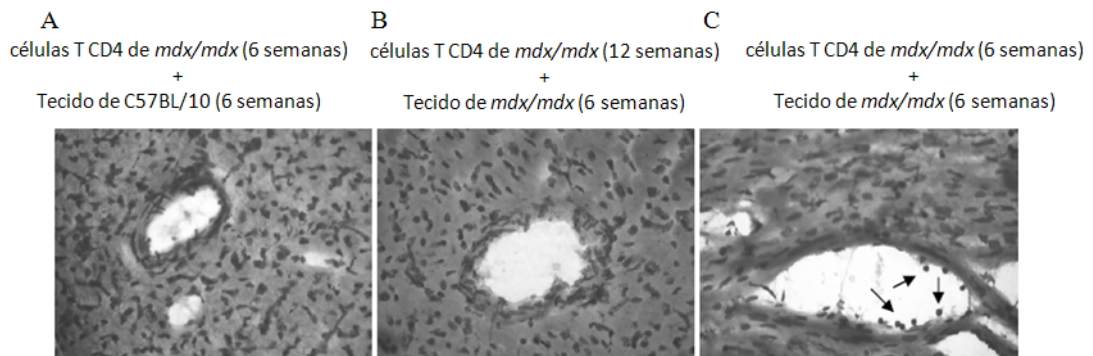


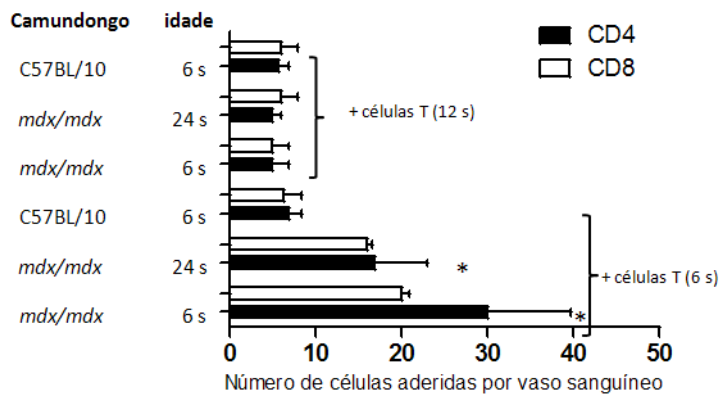
Figura 4.11: Expressão de CD62L em linfócitos T recém-ativados. PBMC de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6 e 12 semanas de idade foram marcadas com anticorpos contra CD3, CD69 e CD62L e analisadas por citometria de fluxo. A análise foi feita na região de células mononucleares (FSC x SSC) e em células CD3+/CD69<sup>-</sup> (R7) ou CD3+/CD69<sup>+</sup> (R6). Todos os painéis mostram a marcação com de CD62L e isotipo controle (linha fina) em células CD3+/CD69<sup>-</sup> (linha hachurada-R7) ou CD3+/CD69<sup>+</sup> (linha escura-R6). O eixo Y representa o número relativo de células e o eixo X corresponde a intensidade de fluorescência. Figura representativa de três experimentos independentes com três a quatro animais por grupo.

Uma vez que a redução da molécula de adesão CD62L no sangue coincide com a diminuição de linfócitos no tecido cardíaco, a capacidade de adesão dessas células do sangue aos vasos do coração foi avaliada. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram purificados de camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas e, então, colocados em contato com cortes de tecido cardíaco de camundongos C57BL/10 ou *mdx/mdx*. Foi observado que linfócitos sanguíneos obtidos de animais *mdx/mdx* com 6 e 12 semanas não aderiram aos vasos de animais controle C57BL/10 (Fig. 4.12A e D). Da mesma forma, houve uma redução na capacidade de linfócitos T de camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas aderirem aos vasos de animais *mdx/mdx* de 6 e 24 semanas (Fig 4.12B e D) os quais apresentam resposta inflamatória local. Já células T de camundongos *mdx/mdx* de 6 semanas são capazes de aderir firmemente ao endotélio cardíaco de

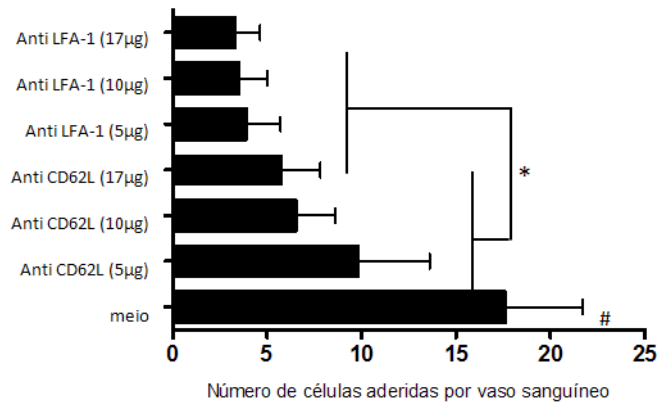
animais *mdx/mdx* de 6 (Fig. 4.12C e D) e 24 semanas (Fig. 4.12D). Para avaliar se essa reduzida interação dos linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade com o endotélio pode ocorrer devido à reduzida expressão de CD62L por essas células, foi realizado um ensaio funcional onde linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados foram incubados com três concentrações de anticorpo monoclonal contra CD62L para bloqueio dessa molécula. Em seguida, essas células foram colocadas em contato com cortes de tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx* com 24 semanas, onde a adesão ocorre normalmente, e o número de células aderidas aos vasos foi quantificado. Neste ensaio o bloqueio de LFA-1 foi utilizado como controle, uma vez que esta molécula é sabidamente fundamental para a interação firme entre leucócitos e as células endoteliais. Foi observado que, ainda que o bloqueio de LFA-1 seja mais eficiente em impedir a interação linfócito/endotélio, o bloqueio de CD62L também reduz de forma significativa essa interação (Fig 4.12 E). Estes dados indicam que, assim como em outros modelos de inflamação, a expressão de CD62L é importante para a transmigração de células T para os sítios inflamatórios em coração de camundongos *mdx/mdx*.



**D Corte de tecido**



**E**



*Figura 4.12: Reconhecimento e adesão de linfócitos ao endotélio cardíaco.* Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram purificadas do sangue de camundongos *mdx/mdx* por separação magnética nas idades indicadas (A-C) e incubadas com cortes de tecido cardíaco de camundongos C57BL/10 ou *mdx/mdx*, como indicado (A-C). As setas indicam linfócitos aderidos aos vasos cardíacos. Foi então feita a quantificação de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> aderidas aos vasos sanguíneos cardíacos, nas combinações indicadas (D). Células T CD3<sup>+</sup> purificadas do sangue de camundongos *mdx/mdx* com 6 semanas de idade foram pré-incubadas com meio ou anticorpos neutralizantes contra LFA-1 ou CD62L nas concentrações indicadas e número de células aderidas por vaso sanguíneo foi quantificado (E). Os dados são representativos de três experimentos independentes com quatro a sete animais por grupo. \* p ≤ 0,05 quando comparados cortes de tecido de *mdx/mdx* com o controle C57BL/10 (D) ou a mesma concentração de anticorpo neutralizante entre os grupos pré-incubados com CD62L ou LFA-1 (E).

Um dos estímulos capazes de induzir a liberação do CD62L da superfície de linfócitos é o receptor purinérgico P2X7. Sendo assim, a atividade e a expressão desse receptor foi avaliada em linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6 e 12 semanas de idade. Inicialmente, o padrão de resposta funcional do receptor P2X7 foi avaliado através de ensaios de permeabilização para avaliar a sua capacidade de induzir abertura de poros na membrana celular após ativação pelo agonista ATP. Foi observado um padrão de resposta bastante diferenciado nos linfócitos T de sangue dos dois grupos, onde cerca de 20% dos linfócitos T de camundongos C57BL/10 com 6 e 12 semanas apresentaram permeabilização da membrana plasmática induzida por ATP<sub>e</sub> (Fig. 4.13A). Com relação aos camundongos *mdx/mdx*, foi observado um aumento da permeabilização induzida por ATP<sub>e</sub> nos animais de 6 semanas quando comparado aos de 12 semanas (Fig. 4.13B). Para determinar a habilidade do receptor P2X7 de induzir clivagem do CD62L da superfície de linfócitos T sanguíneos, foi realizado um ensaio *in vitro* onde linfócitos T CD3<sup>+</sup> purificados do sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 9 semanas de idade foram incubados ou não com um antagonista do receptor P2X7 (KN-62) e, posteriormente, estimulados com ATP<sub>e</sub>. A idade de 9 semanas foi escolhida por ser o momento onde o processo de clivagem do CD62L se inicia (dado não mostrado). Foi observado que as células T sanguíneas dos camundongos *mdx/mdx* são mais suscetíveis à clivagem do CD62L induzida por ATP do que os linfócitos T dos camundongos C57BL/10 (Fig 4.13C). Essa clivagem foi bloqueada pelo KN-62, o que sugere participação específica de P2X7 nesse processo (Fig 4.13C). Mais uma vez o LFA-1 foi utilizado como controle e não foi observada clivagem dessa molécula induzida por ATP<sub>e</sub> (Fig 4.13D). Estes dados sugerem que o camundongo *mdx/mdx* é mais susceptível à

liberação do CD62L induzida pelo receptor P2X7 do que o C57BL/10, e é possível que, pelo menos em parte, seja responsável pela perda de CD62L da superfície celular.

Os níveis de expressão de P2X7 em linfócitos T CD3<sup>+</sup> sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 foram avaliados por western blotting e não foram observadas diferenças de expressão do receptor entre os animais e idades avaliadas (Fig 4.13E). Logo, a clivagem de CD62L da superfície de linfócitos T sanguíneos nos camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade não se deve a uma maior expressão desse receptor.

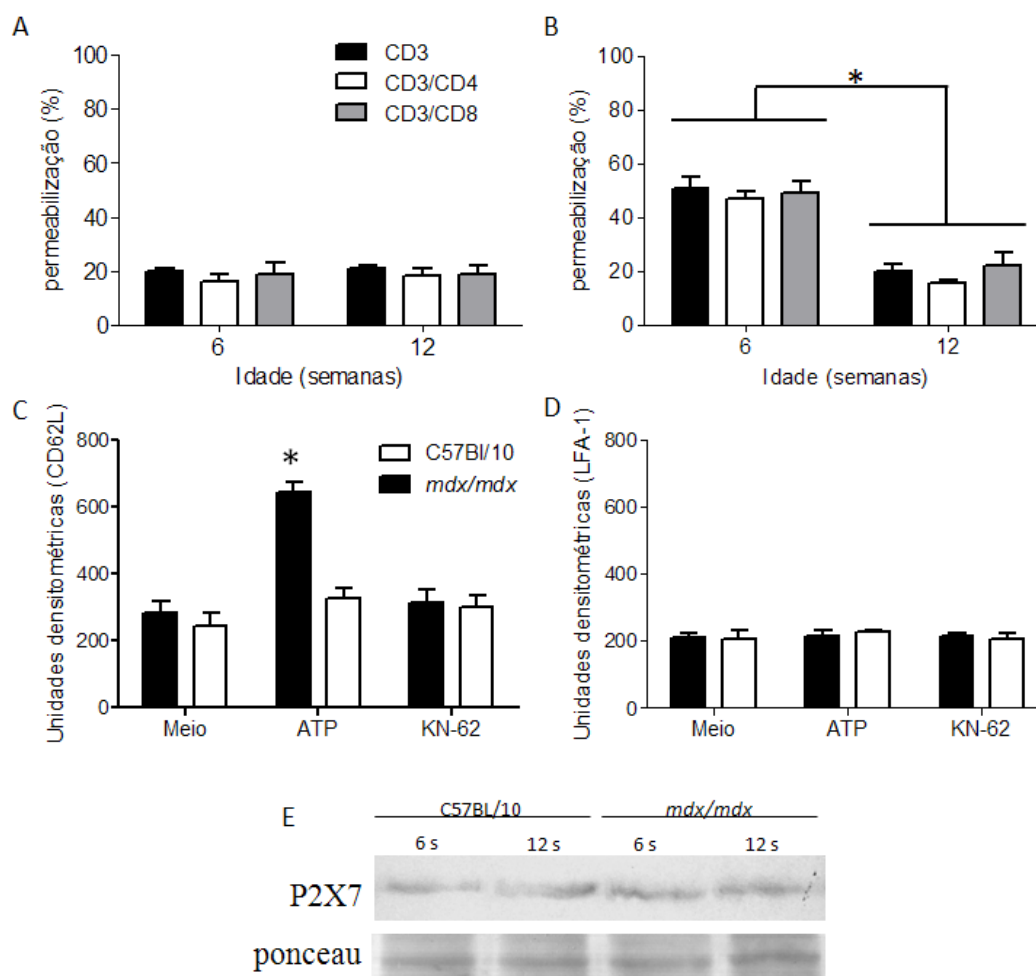


Figura 4.13: Atividade *in vitro* de P2X7 em células T sanguíneas. PBMC de camundongos C57BL/10 (A) e *mdx/mdx* (B) foram marcadas com anticorpos contra CD3, CD4 e CD8 e incubadas com ATP<sub>e</sub> (5 mM). A permeabilização de membrana das células T induzida por ATP<sub>e</sub> foi avaliada pela incorporação de iodo de propídeo utilizando citometria de fluxo e os gráficos mostram o percentual de células positivas para esse traçador (A e B). A habilidade do P2X7 de induzir clivagem de CD62L (C) e LFA-1 (D) em linfócitos sanguíneos T CD3<sup>+</sup> foi avaliada por dot blotting. Linfócitos T CD3<sup>+</sup> purificados do sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 9 semanas de idade foram incubados ou não com KN-62 e

depois estimulados com ATP<sub>e</sub>. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para determinar os níveis de CD62L (C) e LFA-1 (D). A expressão de P2X7 por linfócitos T CD3<sup>+</sup> purificados do sangue de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6 e 12 semanas de idade foi avaliada por western blotting (E). O controle do total de proteína aplicada em cada amostra foi feito por coloração com vermelho de ponceau (E). Cada experimento foi realizado três vezes com quatro a cinco animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$ .

É descrito na literatura que o sinergismo entre as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é capaz de induzir um aumento da atividade do receptor P2X7 em monócitos (Humphreys & Dubyak, 1998). Sendo assim, a concentração dessas citocinas no soro de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6 e 12 semanas de idade foi avaliada. Além disso, avaliamos o perfil de outras citocinas inflamatórias como IL-6, IL-12, IL-10 e da quimiocina MCP-1. Foi observado um aumento nas concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos camundongos *mdx/mdx* (Fig. 4.14A e B) quando comparados aos camundongos controle C57BL/10 (Fig. 4.14C e D). Além disso, houve também um aumento de IL-6 e IL-12 em camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas (Fig. 4.14B) em relação a 6 semanas (Fig. 4.14A) de idade. Porém, nenhuma diferença significativa na concentração de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi observada entre os camundongos *mdx/mdx* com 6 e 12 semanas de idade (Fig. 4.14A e B). Logo, aparentemente não há uma correlação entre a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e o aumento da capacidade do receptor P2X7 de induzir a liberação de CD62L da superfície dos linfócitos nos animais *mdx/mdx* com 12 semanas de idade.

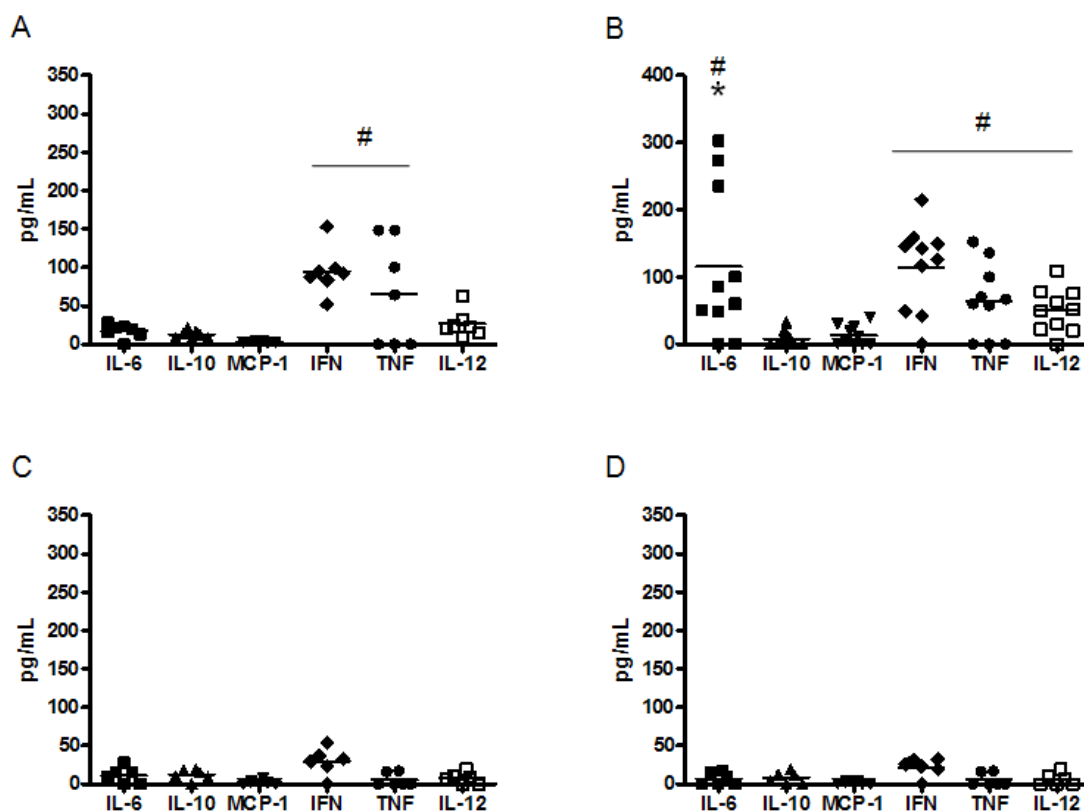
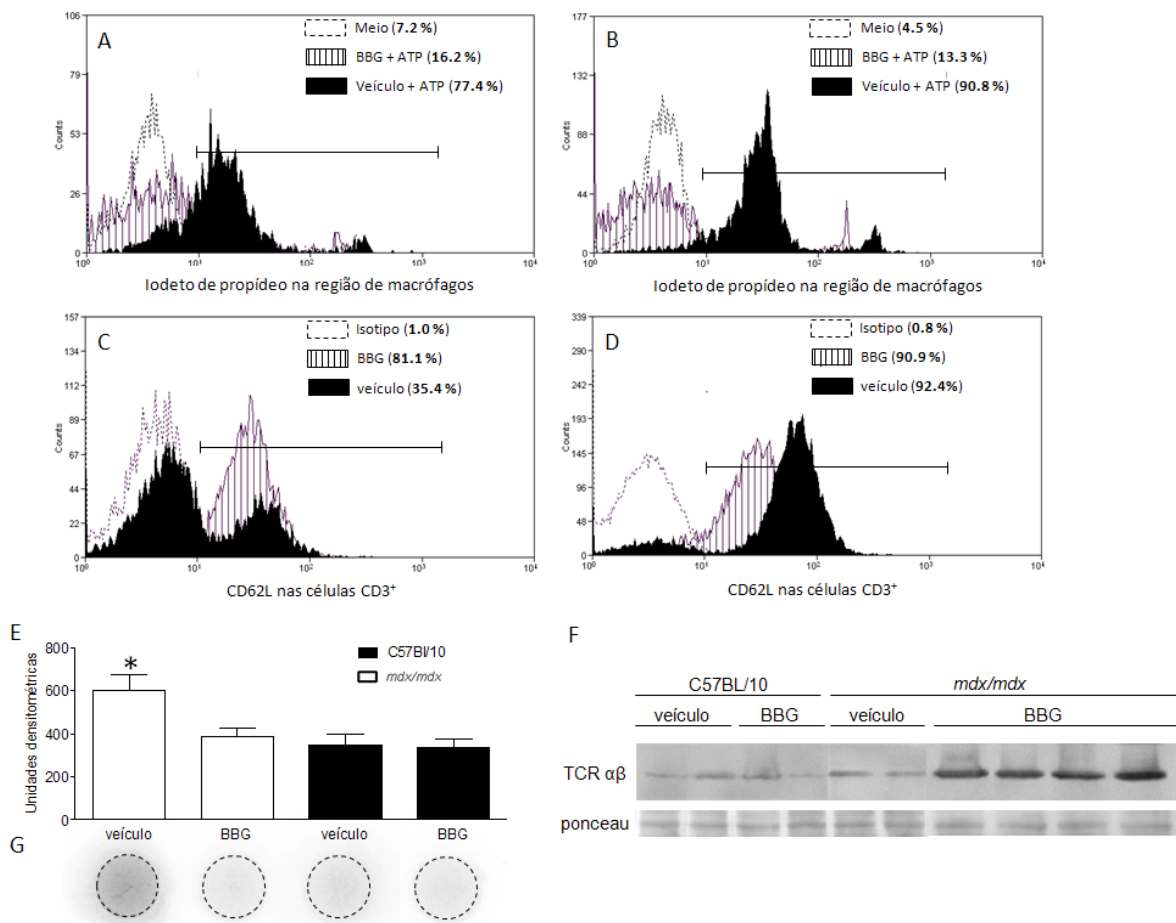


Figura 4.14: Concentração de citocinas no soro de camundongos *mdx/mdx* e *C57BL/10*. O soro foi obtido de camundongos *mdx/mdx* com 6 (A) e 12 (B) semanas de idade e de camundongos *C57BL/10* com 6 (C) e 12 (D) semanas e a concentração de citocinas (pg/mL) foi avaliada por citometria de fluxo através da utilização do kit CBA flex. Os dados representam três experimentos com oito a dez animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparados camundongos *mdx/mdx* de 6 e 12 semanas e #  $p \leq 0,05$  quando comparados camundongos *mdx/mdx* e *C57BL/10* de mesma idade.

Para avaliar a relevância *in vivo* do receptor P2X7 na clivagem de CD62L da superfície de linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx*, camundongos controle *C57BL/10* e *mdx/mdx* com 9 semanas de idade foram tratados com BBG, um outro antagonista do receptor P2X7, durante 3 semanas. Em seguida, a expressão de CD62L nos linfócitos T sanguíneos, bem como a sua concentração no soro desses animais foram avaliadas. Para verificar se o tratamento com BBG foi eficiente em bloquear o receptor P2X7 foi feito, primeiramente, um ensaio de permeabilização induzido por ATP<sub>e</sub> utilizando macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram escolhidos para esse ensaio por apresentarem alta susceptibilidade ao ATP. Foi observado que a administração de BBG praticamente aboliu a formação de poros induzida por ATP na membrana celular dos macrófagos tanto de camundongos *mdx/mdx* (Fig 4.15A, redução de 77.4% para 16.2%) quanto de camundongos *C57BL/10* (Fig 4.15B, redução de 90.8% para 13.3%). Com



relação à expressão de CD62L, foi observado que o tratamento com BBG restaurou a sua expressão nos linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* (Fig 4.15C, aumentado de 35.4% para 81.1%). Por outro lado, células T sanguíneas de camundongos C57BL/10 tratados com BBG ou veículo se mantiveram positivas para CD62L (Fig 4.15D) (90.9% e 92.4%, respectivamente), ainda que com uma maior frequência de expressão dessa molécula nos camundongos tratados com veículo (MFI=70) quando comparados com os animais tratados com BBG (MFI=32). Simultaneamente, o tratamento com BBG reduziu os níveis solúveis de CD62L apenas no sangue de camundongos *mdx/mdx*. (Fig 4.15E e F). Uma vez que o tratamento com BBG restaurou a expressão de CD62L nos camundongos *mdx/mdx*, a capacidade dessas células, agora CD62L<sup>+</sup>, de migrarem para o tecido cardíaco foi avaliada. Para isso, foram realizados ensaios de western blotting com extratos de tecido cardíaco obtidos de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 tratados com veículo ou BBG, utilizando anticorpo contra TCR $\alpha\beta$ . Foi observado que após o tratamento com BBG, há uma maior migração de linfócitos T  $\alpha\beta$  para o músculo cardíaco de camundongos *mdx/mdx* (Fig 4.15G). Esse aumento não foi observado nos camundongos C57BL/10 tratados com BBG (Fig 4.15G).



*Figura 4.15: Papel in vivo do P2X7 na clivagem de CD62L da superfície de linfócitos T:* Células peritoneais de camundongos *mdx/mdx* (A) e C57BL/10 (B) tratados com BBG ou veículo por três semanas (9 a 12 semanas de idade) foram coletadas e incubadas com ATP<sub>e</sub> e iodeto de propídeo. Os ensaios de permeabilização foram feitos por citometria de fluxo e a análise foi feita na região de macrófagos de acordo com parâmetros morfológicos (FSC x SSC). Os percentuais de células PI + estão indicados nos parênteses. PBMC foram coletadas de camundongos *mdx/mdx* (C) e C57BL/10 (D) após três semanas de tratamento com BBG ou veículo e os percentuais de células CD3<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> estão indicados nos parênteses. As barras horizontais definem o ponto de corte para positividade. O eixo Y representa o número relativo de células e o X corresponde a intensidade de fluorescência. Os níveis de CD62L solúvel no soro de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 tratados com BBG ou veículo foram avaliados por *dot blotting* (E e G-membrana representativa) e extratos de tecido cardíaco foram utilizados para detecção de células T  $\alpha\beta$  por western blotting (F). Os dados são representativos de três experimentos independentes com quatro a cinco animais por grupo. \* p  $\leq$ 0,05.

Para avaliar se essa maior migração de linfócitos T  $\alpha\beta$  pós-tratamento com BBG levou a um maior dano muscular, a atividade de CK-MB (Fig 4.16A) e CK-NAC (Fig 4.16B) foi quantificada em um grupo de camundongos durante as três semanas de tratamento com BBG e por mais duas semanas após o tratamento. Foi observado que camundongos *mdx/mdx* tratados com BBG apresentam maior atividade de CK-MB e CK-NAC após duas semanas de tratamento quando comparados com os outros grupos de camundongos. Depois desse período a atividade de CK decresce atingindo níveis similares aos observados nos camundongos *mdx/mdx* tratados com veículo (Fig 4.16A e B). Para determinar se esse aumento de lesão muscular observado nos camundongos *mdx/mdx* após duas semanas de tratamento com BBG se deve a uma maior atividade física desses animais, a atividade motora espontânea foi avaliada nos camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 tratados com veículo ou BBG, durante o período de pico da atividade de CK. Foi observado que os camundongos *mdx/mdx* tratados com BBG apresentam menor atividade motora espontânea quando comparados aos *mdx/mdx* tratados com veículo (Fig 4.16C). Logo, a maior lesão muscular observada nos camundongos *mdx/mdx* tratados com BBG não se deve a uma maior atividade física desses animais.

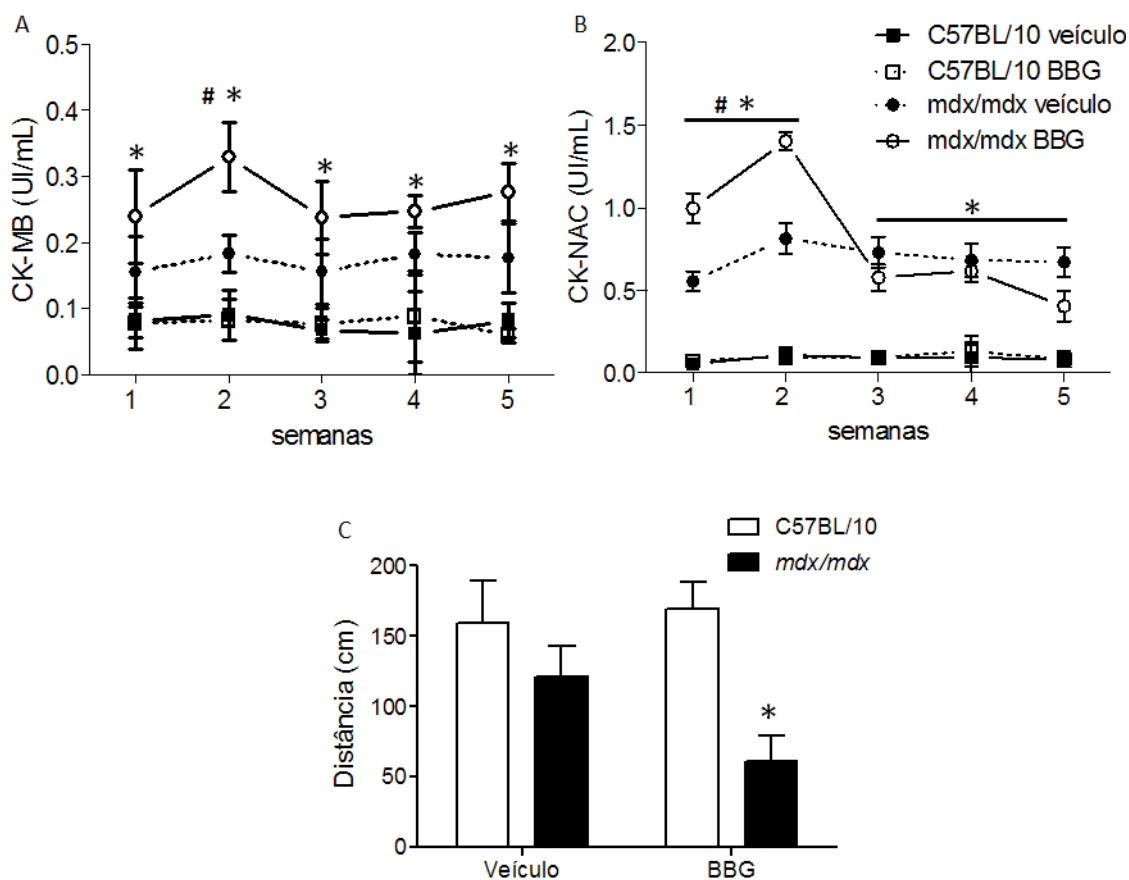


Figura 4.16: Análise de dano muscular e atividade motora em camundongos tratados com BBG. Camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 foram tratados com BBG ou veículo por três semanas (9 a 12 semanas de idade) e a atividade de CK-MB (A) e CK-NAC (B) foi avaliada uma vez por semana durante o tratamento e por mais duas semanas após o tratamento. A atividade motora espontânea foi avaliada na segunda semana de tratamento (C), usando o sistema Noldus Ethovision XT6. O gráfico mostra a distância percorrida pelos animais em 20 minutos de medição (C). Os dados representam três experimentos independentes com sete animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparados camundongos *mdx/mdx* tratados e não tratados com camundongos C57BL/10 tratados e não tratados; #  $p \leq 0,05$  quando comparados camundongos *mdx/mdx* tratados e não-tratados.

Uma vez que a infecção por *Trypanosoma cruzi* induz uma miocardite, composta principalmente por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 6 e 12 semanas de idade foram infectados com *T. cruzi* para testar se nos camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas, onde uma grande parte das células T de sangue são CD62L<sup>-</sup>, haveria migração de linfócitos T para o coração. Foi observado que camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 de 6 e 12 semanas infectados com *T. cruzi* apresentam números equivalentes de infiltrados cardíacos por campo e altos números de infiltrados quando comparados aos camundongos *mdx/mdx* não-infectados (Fig

4.17 A). O número de células inflamatórias por infiltrado nos camundongos *mdx/mdx* infectados é maior do que em camundongos *mdx/mdx* não-infectados e C57BL/10 infectados (Fig 4.17 B). A coloração com HE de cortes de tecido cardíaco mostra o aspecto geral da infiltração inflamatória em camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas infectados (Fig 4.17 C) e não-infectados (Fig 4.16 D). Com relação a presença de células T, não foram observados infiltrados inflamatórios e marcação com anticorpo contra CD3 em camundongos C57BL/10 não-infectados (Fig 4.17 E). Por outro lado, cortes de tecido cardíaco de camundongos C57BL/10 infectados apresentaram altos números de células T CD3<sup>+</sup> (Fig 4.17 F), em contraste com camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas infectados e não-infectados, onde poucas células CD3<sup>+</sup> foram observadas (Fig 4.17 G e H). Esses dados foram confirmados por Western blotting de extratos de tecido cardíaco obtidos de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 de 12 semanas, utilizando anticorpo contra TCR  $\alpha\beta$  (Fig 4.17 I). Em conjunto, esses dados sugerem que linfócitos T de camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas têm menor capacidade de migração para o tecido cardíaco.

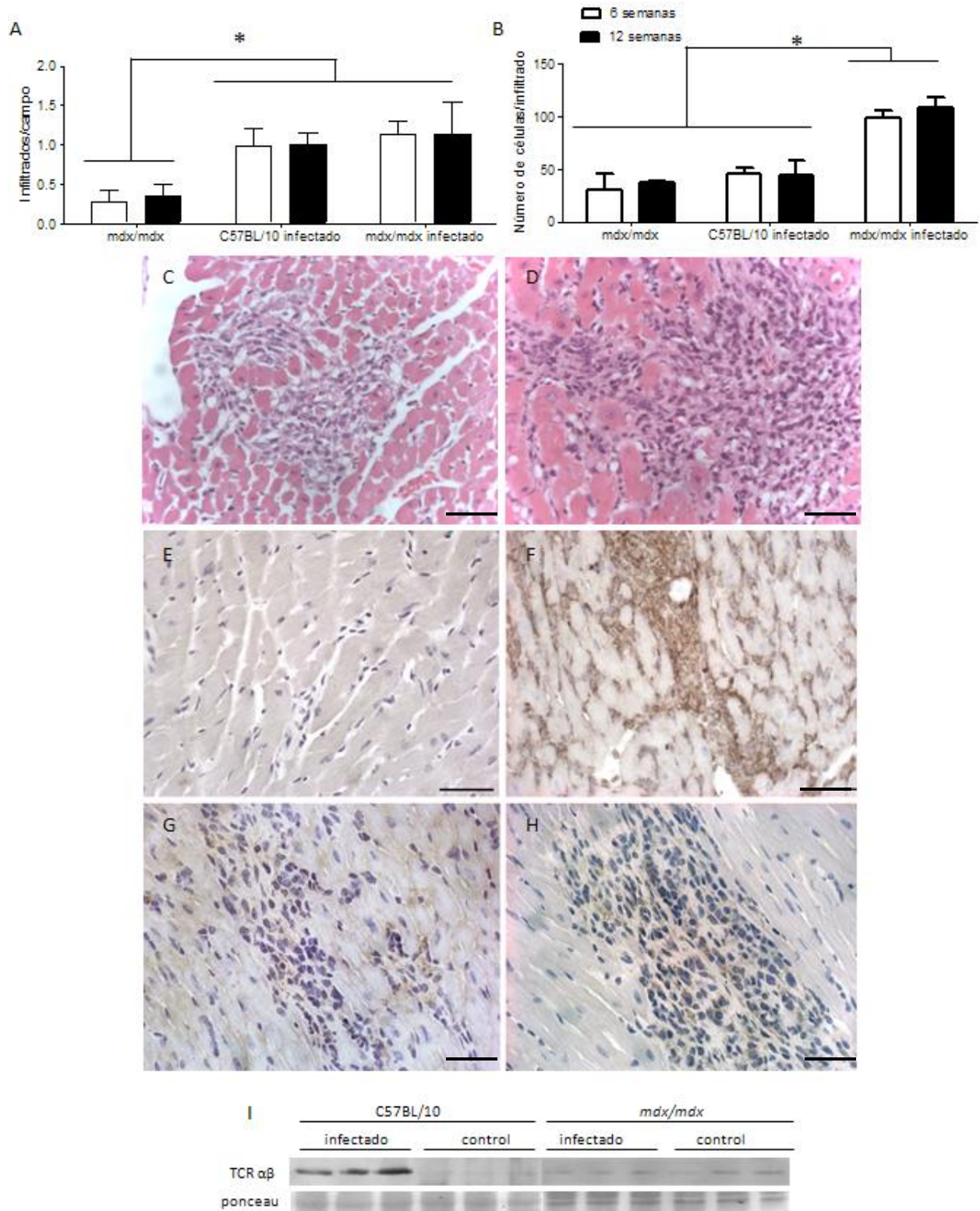


Figura 4.17: Infecção de camundongos *mdx/mdx* com *Trypanosoma cruzi*. Camundongos C57BL/10 e *mdx/mdx* foram infectados com *T. cruzi* e os corações foram coletados quinze dias após a infecção. O número de infiltrados por campo microscópico (A) e o número de células por infiltrado (B) foram quantificados por microscopia de luz em cortes de tecidos de camundongos com 6 e 12 semanas de idade

corados com HE. Cortes de tecido de camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade não-infectados (C) ou infectados (D) foram usados para ilustrar as características gerais do infiltrado inflamatório. A identificação de células T foi feita por imunohistoquímica em cortes de coração de camundongos C57BL/10 de 12 semanas não-infectados (E) e infectados (F) e *mdx/mdx* de 12 semanas não-infectados (G) e infectados (H), utilizando anticorpo contra CD3. Extratos de tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 com 12 semanas de idade foram utilizados para detecção de linfócitos T por western blotting utilizando anticorpo contra TCR  $\alpha\beta$  (I). Os dados são representativos de três experimentos com sete animais cada. \*  $p \leq 0,05$  e barra= 50 $\mu$ m.

## 5) Discussão

Ainda que 30% dos pacientes com DMD morram devido à falência cardíaca, a cardiomiopatia nesta doença ainda não é tão estudada como os danos nos músculos esqueléticos. Ainda não é claro porque a mutação no gene da distrofina causa uma doença muscular esquelética mais pronunciada na DMD, enquanto outras mutações menos extensas no mesmo gene afetam principalmente o músculo cardíaco, como a BMD e a XLDC. A degeneração do músculo cardíaco na DMD é baseada em lesão celular, levando a uma resposta inflamatória difusa com migração de células inflamatórias para o coração. Essas células irão compor os infiltrados inflamatórios, geralmente associados a regiões com cardiomiócitos danificados.

Neste trabalho, foram estudadas as populações de leucócitos presentes no músculo cardíaco de camundongos *mdx/mdx* distribuídas pelo tecido ou compondo infiltrados inflamatórios. As análises de células linfóides foram feitas por citometria de fluxo devido à alta viabilidade observada nestes tipos celulares após o isolamento enzimático do tecido. Por outro lado, células mielóides, como macrófagos e fibroblastos, são mais dificilmente obtidas e, para que não analisássemos subpopulações minoritárias selecionadas pelo processamento, optamos por análises por histologia.

Sabe-se que macrófagos são células de grande importância em processos inflamatórios agudos e crônicos, expressando receptores de membrana especializados no reconhecimento de patógenos e sinais de perigo, ativação de células imuno-competentes, secreção de mediadores pró-e anti-inflamatórios, dentre outros (Murray & Wynn, 2011). Essas células atuam, ainda, na retirada de células mortas e *debris* celulares do tecido. É importante salientar que, embora primariamente a lesão mecânica de cardiomiócitos seja induzida pela mutação genética, diversos fatores contribuem para a lesão das células musculares. Nesse sentido, dados da literatura indicam uma atividade citotóxica de macrófagos em *mdx/mdx*, provavelmente atuando como uma fonte secundária de lesão celular e contribuindo para maior chegada de novas células inflamatórias para os músculos esqueléticos e cardíaco (Wehling e cols, 2001). Há então um acúmulo progressivo de células mielóides em grandes infiltrados inflamatórios ricos em tecido fibrótico, as quais eventualmente morrem por uma via semelhante à necrose. Essas células mortas podem atuar ainda como um fator adicional de estímulo inflamatório, gerando, em conjunto, uma resposta inflamatória vigorosa e de longa duração que suplantaria a capacidade de regeneração do tecido e contribui para a severidade da doença. É possível que espécies reativas de oxigênio

(ROS) também tenham um papel importante no fenômeno de morte celular no tecido cardíaco. Macrófagos e outras células mielóides são grandes produtoras de ROS (Tavakoli & Asmis, 2012; Steevels & Meyaard, 2011), o que pode ser inclusive indicado pelo acúmulo de lipofuscina no citoplasma que observamos em diversos leucócitos. Nakae e colaboradores corroboram esses dados, mostrando que há um acúmulo de lipofuscina nos músculos esqueléticos de pacientes DMD e camundongos *mdx/mdx* (Nakae e cols, 2004). A lipofuscina é formada pela degradação oxidativa de macromoléculas por ROS e íons com atividade redox.

Em inflamações crônicas, a produção de óxido nítrico (NO) pode ser muito alta, resultando em grandes quantidades disponíveis para reações posteriores com oxigênio e radicais superóxido, adicionalmente gerando espécies altamente reativas. 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 (Calcerrada e cols, 2011; Lonkar P & Dedon, 2011). Uma vez que o NO pode atravessar livremente as membranas celulares, pode também afetar as células cardíacas vizinhas aos focos inflamatórios. Dentre os componentes que podem gerar ROS, podemos destacar o anidrido nitroso ( $N_2O_3$ ), que poderia ser em parte responsável pelo aspecto degradado observado na cromatina de diversas células inflamatórias no *mdx/mdx*. Danos diretos no DNA podem ser resultado da nitrosilação de amins primárias nas bases do DNA, levando à deaminação, por exemplo. O resultado final deste processo é a substituição de um grupo amina por um grupo hidroxila. Essa deaminação pode deixar o DNA suscetível à ação de endonucleases, levando à formação de quebras em fita simples (Burney e cols, 1997). Por outro lado, dados aparentemente conflitantes foram publicados, indicando que níveis aumentados de NO em camundongos *mdx/mdx* transgênicos com alta expressão de nNOS, previne a fibrose e a miocardite (Wehling-Henricks, 2005). Isto pode ser, por exemplo, resultado de altos níveis de NO desde o nascimento nestes animais transgênicos, prevenindo a migração inicial de células inflamatórias para o tecido. Dados previamente publicados mostram que o NO inibe a ativação e diapedese de células inflamatórias mielóides (Clancy e cols, 1992).

A análise histológica do tecido cardíaco revelou que a infiltração inflamatória avança pelo endomísio, e com a progressão da resposta há um isolamento tanto de fibras musculares como de leucócitos em áreas onde há abundante deposição de componentes de matriz extracelular (fibrose), como observado em cortes de tecido cardíaco corados com vermelho de picrossirius (dado não mostrado). É possível que esse isolamento também contribua para a morte celular através de hipóxia e redução no aporte de nutrientes. Desta forma, podemos sugerir que diversos



fatores tóxicos para o tecido atuam no comprometimento funcional do coração, sendo que a base primária da patologia deve-se à ausência da distrofina. O dano celular e fibrose resultante levariam à disfunção contrátil do coração, que é agravada com a progressão da doença. As principais alterações observadas no nosso trabalho foram: bloqueio átrio-ventricular, bradicardia e arritmia sinusal, alterações que em humanos podem levar à morte súbita.

Além das diversas possibilidades de indução de lesão celular citadas acima, principalmente baseadas em células mielóides, é possível ainda que células linfóides também exerçam atividade citotóxica. De fato, foi descrito que células T CD8 produtoras de perforina induzem morte de fibras musculares esqueléticas em camundongos *mdx/mdx* (Spencer e cols, 1997).

Com relação aos linfócitos T  $\alpha\beta$ , houve um enriquecimento destas células no coração de *mdx/mdx* de 6 semanas, decaindo em animais de 12 semanas, e níveis ainda menores foram encontrados em animais a partir de 24 semanas. Sendo assim, as alterações cardíacas funcionais observadas nos animais mais velhos (a partir de 40 semanas) provavelmente são independentes de linfócitos T ou são respostas tardias ao dano causado prematuramente por essas células. Além disso, é importante ressaltar que, embora raros focos inflamatórios tenham sido encontrados no tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx* de 6 semanas (fig. 4.3), células linfóides foram observadas dispersas pelo tecido, não compondo infiltrados inflamatórios.

Diferentes possibilidades podem contribuir para o número reduzido de linfócitos T no cardíaco músculo de pacientes DMD e camundongos *mdx/mdx*, como, por exemplo, altos níveis de morte dessas células no tecido muscular. Isso poderia ocorrer devido à atividade citotóxica de outras células contra linfócitos T ou à alta produção de fatores solúveis, como TNF. Porém, pouquíssimas células TUNEL<sup>+</sup> foram observadas nos músculos esqueléticos e cardíacos, sugerindo baixos níveis de apoptose nesses tecidos. Por outro lado, esse baixo número de células TUNEL<sup>+</sup> pode ocorrer devido a um processo muito eficiente de remoção das células mortas, o que impediria a detecção por TUNEL. Isso pode ser ilustrado pelo baixo número de células TUNEL<sup>+</sup> no timo, apesar da morte por apoptose de aproximadamente 95% dos tímócitos durante os processos seletivos intratímicos (Paessens e cols, 2008). Sendo assim, a possibilidade de apoptose de linfócitos T não detectada pelas técnicas utilizadas atualmente não pode ser excluída e pode colaborar em parte para o reduzido número dessas células no tecido muscular cardíaco.

Outra possibilidade para os baixos números de células T no músculo cardíaco seria uma migração ineficiente dessas células para os tecidos. Diversos fatores poderiam contribuir para esse fenômeno, como baixa ativação desses linfócitos nos linfonodos, produção reduzida de

fatores quimiotáticos, reduzida expressão de receptores para esses fatores quimiotáticos nos linfócitos T, ou interação ineficiente célula T/endotélio devido à reduzida expressão de moléculas de adesão nos linfócitos T ou nas células endoteliais. Muitas dessas alternativas ainda precisam ser testadas. Com relação à primeira alternativa, o camundongo *mdx/mdx* não é considerado como mais suscetível a infecções e não mostra nenhuma outra característica de imunocompetência reduzida. Nossos dados também indicam uma imunocompetência normal desses animais, uma vez que eles apresentaram parasitemia semelhante a dos camundongos C57BL/10 após infecção com *T. cruzi* (dado não mostrado). Além disso, não foi observada nenhuma diferença significativa no percentual de células T CD44<sup>high</sup> entre camundongos *mdx/mdx* com 6 (5,38% ± 1,17) e 12 (4,54% ± 0,96) semanas de idade. A produção de diversos fatores quimiotáticos que poderiam estar envolvidos na migração de linfócitos para o coração ainda precisa ser verificada. Porém, nenhuma diferença nos níveis cardíacos de citocinas como TNF, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e MCP-1 foi observada entre camundongos *mdx/mdx* com 6 e 12 semanas de idade. Com relação a moléculas de adesão envolvidas no processo de transmigração de linfócitos para o tecido alvo, dentre todas as moléculas avaliadas (CD62L, CD49d, LFA-1, VCAM e ICAM), apenas o CD62L apresentou reduzida expressão nos linfócitos T sanguíneos de camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas.

Nossos dados mostraram ainda que linfócitos T virgens e não recém-ativados (CD69<sup>-</sup>) mantém a expressão de CD62L e que apenas uma parte das células T ativadas recentemente (CD69<sup>+</sup>) perdem a selectina. Esses dados indicam que a modulação negativa de CD62L ocorre especificamente no grupo de linfócitos T recém-ativados, e coincide com o período de maior escassez de linfócitos T no tecido cardíaco.

A modulação negativa do CD62L poderia ser resultado de uma reduzida transcrição gênica, tradução ou clivagem da superfície celular. Uma vez que foram observados altos níveis de CD62L no soro de camundongos *mdx/mdx* com 12 semanas de idade, nós consideramos a clivagem proteolítica da superfície celular a alternativa mais provável. Dados da literatura juntamente com nossos resultados mostram que o CD62L é necessário para a migração de células T para tecidos não linfóides, ainda que a importância do LFA-1 seja ainda maior (Zhang e cols, 2001; Galkina e cols, 2006). Estudos utilizando camundongos CD62L<sup>-/-</sup> mostraram que leucócitos, incluindo linfócitos T, apresentam reduzida capacidade de rolamento e migração para sítios de inflamação, reduzindo a resposta inflamatória (Arbonés e cols, 1994). Além disso, a administração de anticorpo contra CD62L suprime os sinais clínicos e a infiltração de linfócitos T no sistema nervoso central em um modelo experimental de encefalomielite (Archelos e cols,

1998). Estudos utilizando um modelo de choque séptico também propõem que uma rápida clivagem endoproteolítica de CD62L da superfície de linfócitos T modula a capacidade de essas células migrarem para os sítios de inflamação (Steeber e cols, 1999). Esses dados indicam que o CD62L é necessário para o rolamento de linfócitos T ao longo do endotélio e migração para o tecido alvo.

Nossos resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram que a atividade do P2X7 leva à clivagem do CD62L da superfície de linfócitos T sanguíneos nos camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas. Por outro lado, ainda que camundongos *mdx/mdx* e C57BL/10 expressem níveis similares de P2X7, a permeabilização de membrana induzida por ATP<sub>e</sub> está aumentada apenas nos animais de 6 semanas. Nós esperávamos o resultado contrário, onde a permeabilização estivesse aumentada nos camundongos *mdx/mdx* de 12 semanas, concomitante com a clivagem de CD62L induzida por P2X7. Porém, outros trabalhos mostram que diversas vias bioquímicas intracelulares podem ser desencadeadas pela ativação de P2X7, levando a respostas celulares independentes. Como exemplo, podemos citar um estudo recente utilizando camundongos *mdx/mdx*, onde foi observada uma expressão aumentada de P2X7 nos músculos esqueléticos, concomitante com altos níveis de ERK 1/2 fosforilada e influxo de cálcio induzidos por ATP<sub>e</sub>. No entanto, a ativação sustentada de P2X7 pelo ATP<sub>e</sub> não induz formação de poro nessas células (Young e cols, 2012). Juntos esses dados mostram que a formação de poro e outras vias de sinalização induzidas por P2X7 podem estar dissociadas.

O tratamento com BBG foi eficiente em bloquear a clivagem de CD62L dependente de P2X7 e a permeabilização de membrana induzida por ATP<sub>e</sub>. Porém, como foi utilizado um tratamento *in vivo*, não podemos descartar a possibilidade de o bloqueio de P2X7 afetar outros tipos celulares que migram para os músculos, como macrófagos, ou de o BBG estar agindo sobre outras vias dependentes de receptores P2. Esses efeitos ainda precisam ser investigados. Com relação aos linfócitos T, nossos dados sugerem que a expressão sustentada do CD62L possa contribuir para a migração dessas células para o músculo cardíaco, e para a consequente indução de lesão nos músculos esqueléticos e cardíaco duas semanas após tratamento com BBG, como verificado pela atividade de CK-NAC e CK-MB. Esses dados estão de acordo com resultados de outros grupos que mostram que as células T aumentam os danos patológicos e indicam a importância do P2X7 e das selectinas no dano muscular induzido por linfócitos T na DMD.

Por outro lado, após três semanas de tratamento, apesar da maior migração de células T para o coração, nenhuma diferença na atividade de CK foi detectada entre camundongos *mdx/mdx* tratados e não tratados com BBG. Isso poderia acontecer devido a uma atividade

funcional reduzida dessas células após migração para o tecido cardíaco, seja por ação direta do BBG nessas células ou por ação de outras subpopulações celulares atenuando a atividade desses linfócitos. Porém, essas alternativas ainda precisam ser testadas.

Para o nosso conhecimento, o camundongo *mdx/mdx* é o primeiro modelo experimental de infecção com *T. cruzi* onde se observa uma miocardite não linfóide. O camundongo C57BL/10 infectado, bem como pacientes chagásicos e outros modelos experimentais, apresentam infiltrados inflamatórios compostos principalmente por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Porém, no camundongo *mdx/mdx* com 12 semanas de idade, a capacidade de o linfócito T interagir com o endotélio é aparentemente tão prejudicada que mesmo um estímulo forte de migração linfocitária, como a infecção por *T. cruzi*, é incapaz de promover a migração dessa célula para o músculo cardíaco.

Além das células T  $\alpha\beta$  no coração, foram observados linfócitos T  $\gamma\delta$  em um pico único apenas nos animais de 12 semanas de idade. Embora ainda não tenhamos investigado os fatores envolvidos neste enriquecimento peculiar, é possível que citocinas e quimiocinas secretadas pelo tecido cardíaco como um todo e o repertório de receptores das células  $\gamma\delta$  determinem este processo. É possível ainda que as células  $\gamma\delta$  também influenciem na redução de células  $\alpha\beta$  no tecido, seja por atividade citotóxica direta, seja por imunorregulação de outra natureza, como por exemplo, secreção de citocinas. Por exemplo, na miocardite induzida pelo vírus coxsackie B3 em camundongos BALB/c, o coração é enriquecido em células CD4 Th1 com potencial patogênico patogênicas sobre células Th2 com papel protetor. Porém, utilizando camundongos *gld/gld* (FasL<sup>-/-</sup>) infectados, os autores concluíram que células T  $\gamma\delta$  exerciam atividade citotóxica contra as células Th2 protetoras através da interação Fas/FasL (Huber e cols, 2000). Esses resultados mostram a importância de estudar as populações inflamatórias em doenças agudas e crônicas, tentando correlacionar seus possíveis papéis com o desenvolvimento da doença. Na DMD, ainda é necessário aprofundar os estudos sobre a relevância individual das distintas populações celulares na cardiomiopatia.

Possivelmente, existe uma rede integrada no tecido cardíaco coordenando os níveis celulares de diversas populações envolvidas na resposta inflamatória, regeneração e fibrose. Nesse sentido, fatores moduladores do tráfego celular, como quimiocinas e outras citocinas, liberados pelo próprio tecido cardíaco (fibras musculares, células residentes, endoteliais e inflamatórias), poderiam afetar a migração diferenciada e a função das diversas subpopulações encontradas no tecido. É importante que essas interações sejam estudadas, pois podem fornecer

valiosas informações para novas alternativas de tratamento, com possibilidade de alterar a história natural da doença e capacidade de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## 6) Conclusões

- 1- O coração apresenta lesões inflamatórias de menor gravidade que o tecido esquelético, porém são suficientes para alterar a função do órgão;
- 2- Existe uma cinética específica de migração de células linfóides para o tecido cardíaco, cujas funções ainda devem ser exploradas;
- 3- Há a liberação da molécula CD62L da superfície de linfócitos sanguíneos concomitante à redução dessas células no tecido cardíaco e menor capacidade de adesão aos vasos;
- 4- O receptor P2X7 está aparentemente envolvido no processo de clivagem de CD62L da superfície de linfócitos T sanguíneos.
- 5- A restauração da expressão de CD62L nos linfócitos T sanguíneos induz maior migração dessas células para o músculo cardíaco.

## Perspectivas

- 1- Avaliar quimiocinas e receptores de quimiocinas que possam estar envolvidos na migração de células inflamatórias para o músculo cardíaco;
- 2- Avaliar a expressão de CD62L em linfócitos sanguíneos de pacientes DMD, bem como a concentração solúvel dessa molécula no soro desses pacientes;
- 3- Estudar o papel dos linfócitos T  $\gamma\delta$  no tecido cardíaco de camundongos *mdx/mdx*;
- 4- Estudar os possíveis mecanismos envolvidos na morte de células inflamatórias nos infiltrados cardíacos em camundongos *mdx/mdx*.

## 7) Referências bibliográficas

- Agarkova I, Schoenauer R, Ehler E, Carlsson L, Carlsson E, Thornell LE, et al. The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur J Cell Biol.* 2004;83(5):193-204.
- Allamand V, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet.* 2000;9(16):2459-67.
- Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic.* 2007;8(3):177-83.
- Ameen V, Robson LG. Experimental models of duchenne muscular dystrophy: relationship with cardiovascular disease. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:265-77.
- Amenta AR, Yilmaz A, Bogdanovich S, McKechnie BA, Abedi M, Khurana TS, et al. Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(2):762-7.
- Arbonés ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1994;1(4):247-60.
- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):495-507.
- Bach JR, Martinez D. Duchenne muscular dystrophy: continuous noninvasive ventilatory support prolongs survival. *Respir Care.* 2011;56(6):744-50.
- 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;37(5):583-92.
- Baxter P. Treatment of the heart in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 2006;48(3):163.
- Berger EM, Gottlieb AB. Developments in systemic immunomodulatory therapy for psoriasis. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(4):434-44.
- 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. *Immunol Rev.* 1989;111:59-77.

- Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(7):1725-31.
- Bies RD. X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1994;330(5):368-9; author reply 70.
- Birnkrant DJ, Ashwath ML, Norritz GH, Merrill MC, Shah TA, Crowe CA, et al. Cardiac and pulmonary function variability in Duchenne/Becker muscular dystrophy: an initial report. *J Child Neurol.* 2010;25(9):1110-5.
- 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 Rev.* 2007;18(1-2):33-43.
- Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, et al. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther.* 2012;20(2):443-55.
- Branco DM, Wolf CM, Sherwood M, Hammer PE, Kang PB, Berul CI. Cardiac electrophysiological characteristics of the mdx (5cv) mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J Interv Card Electrophysiol.* 2007;20(1-2):1-7.
- 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;82(5):743-52.
- Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B, et al. L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15376-81.
- Bridges LR. The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. *J Neurol Sci.* 1986;72(2-3):147-57.
- 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]. *Arch Ital Anat Embriol.* 1983;88(2):137-55.
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, et al. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol.* 2005;174(7):3880-90.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(4):1189-92.



- Burney S, Tamir S, Gal A, Tannenbaum SR. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):130-44.
- Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol*. 1991;115(2):411-21.
- 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. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1789-96.
- Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2011;17(35):3905-32.
- Carmignac V, Durbeej M. Cell-matrix interactions in muscle disease. *J Pathol*. 2012;226(2):200-18.
- Cheuk DK, Wong V, Wraige E, Baxter P, Cole A, N'Diaye T, et al. Surgery for scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(1):CD005375.
- 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. *J Clin Invest*. 1992;90(3):1116-21.
- 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;94(5):1744-50.
- Coito AJ, Korom S, Hancock WW, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of alpha 4 beta 1-integrin-fibronectin adhesive interactions prevents chronic allograft rejection in sensitized recipients. *Transplant Proc*. 1998;30(4):939-40.
- Collett C, Munro JM. Selective induction of endothelial L-selectin ligand in human lung inflammation. *Histochem J*. 1999;31(4):213-9.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 1997;36(9):1277-83.
- Constantin B, Sebille S, Cognard C. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27(5-7):375-86.
- Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1988;14(1):53-70.

- Coutinho-Silva R, Persechini PM. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am J Physiol.* 1997;273(6 Pt 1):C1793-800.
- Cox GF, Kunkel LM. Dystrophies and heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 1997;12(3):329-43.
- de Araújo-Jorge TC. The biology of Trypanosoma cruzi-macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84(4):441-62.
- De Luca A, Nico B, Liantonio A, Didonna MP, Fraysse B, Pierno S, et al. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol.* 2005;166(2):477-89.
- 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;90(4):717-27.
- 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. *J Cell Biol.* 1996;135(2):497-510.
- Délèze J. Cell-to-cell communication in the heart: structure-function correlations. *Experientia.* 1987;43(10):1068-75.
- Di Virgilio F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today.* 1995;16(11):524-8.
- Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 14):2801-3.
- Elliott JI, Higgins CF. Major histocompatibility complex class I shedding and programmed cell death stimulated through the proinflammatory P2X7 receptor: a candidate susceptibility gene for NOD diabetes. *Diabetes.* 2004;53(8):2012-7.
- Farini A, Meregalli M, Belicchi M, Battistelli M, Parolini D, D'Antona G, et al. T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. *J Pathol.* 2007;213(2):229-38.
- Fazekas S, Székessy-Hermann V. [Molecular mechanisms of muscle contraction]. *Orv Hetil.* 1989;130(32):1707-10, 13.
- Finsterer J. Cardiopulmonary support in duchenne muscular dystrophy. *Lung.* 2006;184(4):205-15.
- Frankel KA, Rosser RJ. The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: epimyocardial fibrosis. *Hum Pathol.* 1976;7(4):375-86.

- Fukunaga H, Sonoda Y, Atsuchi H, Osame M. [Respiratory failure and its care in Duchenne muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku*. 1991;31(2):154-8.
- Galkina E, Tanousis K, Preece G, Tolaini M, Kioussis D, Florey O, et al. L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 2003;198(9):1323-35.
- Ghosh S, Panaccione R. Anti-adhesion molecule therapy for inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2010;3(4):239-58.
- Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(6):475-529.
- Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci*. 1996;135(1):10-7.
- Gorospe JR, Tharp M, Demitsu T, Hoffman EP. Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. *Neuromuscul Disord*. 1994;4(4):325-33.
- Gu B, Bendall LJ, Wiley JS. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*. 1998;92(3):946-51.
- Guérette B, Skuk D, Célestin F, Huard C, Tardif F, Asselin I, et al. Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol*. 1997;159(5):2522-31.
- Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med*. 2001;193(7):863-72.
- Hainsey TA, Senapati S, Kuhn DE, Rafael JA. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. *Neuromuscul Disord*. 2003;13(4):294-302.
- Haribabu B, Steeber DA, Ali H, Richardson RM, Snyderman R, Tedder TF. Chemoattractant receptor-induced phosphorylation of L-selectin. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13961-5.
- Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1179-81.
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol*. 2001;10(1):1-10.
- Hirose M, Matsumura R, Sato K, Murai T, Kawashima H. Binding of L-selectin to its vascular and extravascular ligands is differentially regulated by pH. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414(2):437-42.
- Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2000;45(3):579-87.

- Humphreys BD, Dubyak GR. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol.* 1998;64(2):265-73.
- Ingalls RR, Arnaout MA, Delude RL, Flaherty S, Savedra R, Golenbock DT. The CD11/CD18 integrins: characterization of three novel LPS signaling receptors. *Prog Clin Biol Res.* 1998;397:107-17.
- Issekutz AC, Szpejda M. Evidence that platelet activating factor may mediate some acute inflammatory responses. Studies with the platelet-activating factor antagonist, CV3988. *Lab Invest.* 1986;54(3):275-81.
- Ito K, Kimura S, Ozasa S, Matsukura M, Ikezawa M, Yoshioka K, et al. Smooth muscle-specific dystrophin expression improves aberrant vasoregulation in mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2006;15(14):2266-75.
- James J, Kinnett K, Wang Y, Ittenbach RF, Benson DW, Cripe L. Electrocardiographic abnormalities in very young Duchenne muscular dystrophy patients precede the onset of cardiac dysfunction. *Neuromuscul Disord.* 2011;21(7):462-7.
- Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol.* 2002;14(2):83-92.
- Johnston B, Chee A, Issekutz TB, Ugarova T, Fox-Robichaud A, Hickey MJ, et al. Alpha 4 integrin-dependent leukocyte recruitment does not require VCAM-1 in a chronic model of inflammation. *J Immunol.* 2000;164(6):3337-44.
- Jung TM, Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol.* 1990;144(8):3130-6.
- Jutila MA, Berg EL, Kishimoto TK, Picker LJ, Bargatze RF, Bishop DK, et al. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils, and monocytes. Role of homing receptors and other adhesion molecules. *Transplantation.* 1989;48(5):727-31.
- Kahn J, Ingraham RH, Shirley F, Migaki GI, Kishimoto TK. Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *J Cell Biol.* 1994;125(2):461-70.
- Kang SW, Kang YS, Sohn HS, Park JH, Moon JH. Respiratory muscle strength and cough capacity in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Yonsei Med J.* 2006;47(2):184-90.
- Kapsa R, Kornberg AJ, Byrne E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol.* 2003;2(5):299-310.

- Karagol U, Gardner-Medwin D, Mastaglia FL. Neutrophil function in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 1986;73(1):73-7.
- Kelly KA, Allport JR, Yu AM, Sinh S, Sage EH, Gerszten RE, et al. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):748-56.
- Khan AI, Landis RC, Malhotra R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation.* 2003;27(5):265-80.
- Kieseier BC, Wiendl H, Hemmer B, Hartung HP. Treatment and treatment trials in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2007;20(3):286-93.
- Klyen BR, Shavlakadze T, Radley-Crabb HG, Grounds MD, Sampson DD. Identification of muscle necrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy using three-dimensional optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2011;16(7):076013.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol.* 2002;168(12):6436-45.
- Lagrotta-Candido J, Vasconcellos R, Cavalcanti M, Bozza M, Savino W, 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(3):121-32.
- Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, et al. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem.* 1994;269(6):4021-6.
- Lawler JM. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol.* 2011;589(Pt 9):2161-70.
- Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec.* 1995;242(1):70-6.
- Lemaire I, Falzoni S, Leduc N, Zhang B, Pellegatti P, Adinolfi E, et al. Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells. *J Immunol.* 2006;177(10):7257-65.
- Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(5):325-35.
- Lin PS, Tsai S, Wallach DF, Ehrhart C. Visualization of surface topology of human lymphoid cells by scanning electron microscopy. *Bibl Haematol.* 1975(40):263-9.

- Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284(3):1139-46.
- Mackarel AJ, Russell KJ, Brady CS, FitzGerald MX, O'Connor CM. Interleukin-8 and leukotriene-B(4), but not formylmethionyl leucylphenylalanine, stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(2):154-61.
- Madhavan R, Jarrett HW. Calmodulin-activated phosphorylation of dystrophin. *Biochemistry.* 1994;33(19):5797-804.
- Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol.* 1996;74(6):749-57.
- Manole E. The dystrophin gene and its product--a view. *Rom J Neurol Psychiatry.* 1995;33(2):109-19.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Schioppa T, Saccani A, Allavena P, et al. Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Novartis Found Symp.* 2004;256:137-45; discussion 46-8, 259-69.
- Marques MJ, Ventura Machado R, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle Nerve.* 2008;37(1):61-7.
- Martìn-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. *J Cell Biol.* 1998;142(1):117-27.
- Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32(1):277-307.
- Melacini P, Vianello A, Villanova C, Fanin M, Miorin M, Angelini C, et al. Cardiac and respiratory involvement in advanced stage Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1996;6(5):367-76.
- Meuser-Batista M, Correa JR, Soares MJ, Henriques-Pons A. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Cell.* 2008;40(5):309-16.
- Michele DE, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem.* 2003;278(18):15457-60.

- Migliorisi G, Folkes E, Pawlowski N, Cramer EB. In vitro studies of human monocyte migration across endothelium in response to leukotriene B4 and f-Met-Leu-Phe. *Am J Pathol.* 1987;127(1):157-67.
- 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. *Cell Signal.* 2008;20(3):557-68.
- Morrison J, Lu QL, Pastoret C, Partridge T, Bou-Gharios G. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab Invest.* 2000;80(6):881-91.
- Moxley RT, Pandya S, Ciafaloni E, Fox DJ, Campbell K. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol.* 2010;25(9):1116-29.
- Mrowietz U. Treatment targeted to cell surface epitopes. *Clin Exp Dermatol.* 2002;27(7):591-6.
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731-40.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-37.
- Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, Chiozzi P, Morelli A, Baricordi OR, et al. Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol.* 1999;163(4):1958-65.
- Nakae Y, Stoward PJ, Kashiyama T, Shono M, Akagi A, Matsuzaki T, et al. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J Mol Histol.* 2004;35(5):489-99.
- 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 Lett.* 2002;520(1-3):18-24.
- 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. *J Clin Invest.* 1994;94(3):1037-42.
- Nishiyama T, Takeda S. [Induced pluripotent stem (iPS) cell-based cell therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects]. *Brain Nerve.* 2012;64(1):39-46.
- Nonaka I. Animal models of muscular dystrophies. *Lab Anim Sci.* 1998;48(1):8-17.

- Oak SA, Russo K, Petrucci TC, Jarrett HW. Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry*. 2001;40(37):11270-8.
- Orlova VV, Chavakis T. Regulation of vascular endothelial permeability by junctional adhesion molecules (JAM). *Thromb Haemost*. 2007;98(2):327-32.
- Paessens LC, Fluitsma DM, van Kooyk Y. Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes. *J Pathol*. 2008;214:96-103.
- Penido C, Costa MF, Souza MC, Costa KA, Candéa AL, Benjamim CF, et al. Involvement of CC chemokines in gammadelta T lymphocyte trafficking during allergic inflammation: the role of CCL2/CCR2 pathway. *Int Immunol*. 2008;20(1):129-39.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998;282(5392):1281-4.
- Pinto-Mariz F, Carvalho LR, de Mello W, Araújo AeQ, Ribeiro MG, Cunha MoC, et al. Differential integrin expression by T lymphocytes: potential role in DMD muscle damage. *J Neuroimmunol*. 2010;223(1-2):128-30.
- 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;275(17):1335-8.
- Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet*. 2002;11(3):263-72.
- Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci*. 2010;87(3-4):69-82.
- Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*. 2001;7(5):213-21.
- 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;14(8-9):491-6.
- Quinlivan RM, Dubowitz V. Cardiac transplantation in Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1992;2(3):165-7.
- Radley HG, Grounds MD. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol Dis*. 2006;23(2):387-97.



- Rafael-Fortney JA, Chimanji NS, Schill KE, Martin CD, Murray JD, Ganguly R, et al. Early treatment with lisinopril and spironolactone preserves cardiac and skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy mice. *Circulation*. 2011;124(5):582-8.
- Sabatelli P, Gualandi F, Gara SK, Grumati P, Zamparelli A, Martoni E, et al. Expression of collagen VI  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  chains in human muscle and in Duchenne muscular dystrophy-related muscle fibrosis. *Matrix Biol*. 2012;31(3):187-96.
- Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol*. 1996;6(1):25-35.
- Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2291-301.
- Sapp JL, Bobet J, Howlett SE. Contractile properties of myocardium are altered in dystrophin-deficient mdx mice. *J Neurol Sci*. 1996;142(1-2):17-24.
- Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids*. 2004;26(4):321-9.
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2002;100(4):1354-61.
- Schatzberg SJ, Anderson LV, Wilton SD, Kornegay JN, Mann CJ, Solomon GG, et al. Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 1998;21(8):991-8.
- 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;127(Pt 5):1182-90.
- Schön MP, Zollner TM, Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol*. 2003;121(5):951-62.
- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol*. 1997;272(2 Pt 1):E181-90.
- 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;164(8):4348-58.

- Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol.* 2001;98(2):235-43.
- Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1997;99(11):2745-51. Epub 1997/06/01.
- Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1997;99(11):2745-51. Epub 1997/06/01.
- Spurney CF. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. *Muscle Nerve.* 2011;44(1):8-19.
- Steevels TA, Meyaard L. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):575-87.
- Stoddart JH, Jr., Jasuja RR, Sikorski MA, von Andrian UH, Mier JW. Protease-resistant L-selectin mutants. Down-modulation by cross-linking but not cellular activation. *J Immunol.* 1996;157(12):5653-9.
- Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol.* 1997;139(2):375-85.
- Sugita H, Takeda S. Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(7):748-56.
- 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. *J Neurol Sci.* 2008;267(1-2):48-56.
- Sundd P, Pospieszalska MK, Cheung LS, Konstantopoulos K, Ley K. Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology.* 2011;48(1):1-35.
- Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Ikezawa M, Nonaka I, Matsuo M. Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum Mol Genet.* 1999;8(3):493-500.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 1996;272(5262):735-8.
- Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH, Luster AD. BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med.* 2000;192(3):439-46.

- Tavakoli S, Asmis R. Reactive Oxygen Species and Thiol Redox Signaling in the Macrophage Biology of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2012.
- Thathiah P, Sanapala S, Rodriguez AR, Yu JJ, Murthy AK, Guentzel MN, et al. Non-FcεR bearing mast cells secrete sufficient interleukin-4 to control *Francisella tularensis* replication within macrophages. *Cytokine*. 2011;55(2):211-20.
- Tinsley JM, Blake DJ, Pearce M, Knight AE, Kendrick-Jones J, Davies KE. Dystrophin and related proteins. *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3(3):484-90.
- Torelli S, Brown SC, Jimenez-Mallebrera C, Feng L, Muntoni F, Sewry CA. Absence of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a pathological marker for the diagnosis of Becker muscular dystrophy with rod domain deletions. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30(5):540-5.
- Tu L, Poe JC, Kadono T, Venturi GM, Bullard DC, Tedder TF, et al. A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J Immunol*. 2002;169(4):2034-43.
- Unsoeld H, Mueller K, Schleicher U, Bogdan C, Zwirner J, Voehringer D, et al. Abrogation of CCL21 chemokine function by transgenic over-expression impairs T cell immunity to local infections. *Int Immunol*. 2007;19(11):1281-9.
- van der Kooi AJ, Frankhuizen WS, Barth PG, Howeler CJ, Padberg GW, Spaans F, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the Netherlands: gene defect identified in half the families. *Neurology*. 2007;68(24):2125-8.
- Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev*. 2007;218:178-96.
- 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. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1583-94.
- Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):482-96.
- Voisin V, de la Porte S. Therapeutic strategies for Duchenne and Becker dystrophies. *Int Rev Cytol*. 2004;240:1-30.
- Voit T, Stuetgen P, Cremer M, Goebel HH. Dystrophin as a diagnostic marker in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Correlation of immunofluorescence and western blot. *Neuropediatrics*. 1991;22(3):152-62.

- Waddell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. *J Biol Chem.* 1994;269(28):18485-91.
- Walcheck B, Alexander SR, St Hill CA, Matala E. ADAM-17-independent shedding of L-selectin. *J Leukoc Biol.* 2003;74(3):389-94.
- Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature.* 1996;380(6576):720-3.
- Watchko JF, O'Day TL, Hoffman EP. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol.* 2002;93(2):407-17.
- Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(6):624-31.
- Wedepohl S, Beceren-Braun F, Riese S, Buscher K, Enders S, Bernhard G, et al. L-Selectin - a dynamic regulator of leukocyte migration. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(4):257-64.
- Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol.* 2001;155(1):123-31.
- Wehling-Henricks M, Jordan MC, Gotoh T, Grody WW, Roos KP, Tidball JG. Arginine metabolism by macrophages promotes cardiac and muscle fibrosis in mdx muscular dystrophy. *PLoS One.* 2010;5(5):e10763.
- 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. *Hum Mol Genet.* 2005;14(14):1921-33.
- 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;14(8-9):483-90.
- Weir AP, Morgan JE, Davies KE. A-utrophin up-regulation in mdx skeletal muscle is independent of regeneration. *Neuromuscul Disord.* 2004;14(1):19-23.
- Whewey JM, Roberts RG. The dystrophin lymphocyte promoter revisited: 4.5-megabase intron, or artifact? *Neuromuscul Disord.* 2003;13(1):17-20.
- Wiley JS, Gargett CE, Zhang W, Snook MB, Jamieson GP. Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X7 channel. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 1):C1224-31.
- Williams IA, Allen DG. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(2):H846-55.

- Woolf PJ, Lu S, Cornford-Nairn R, Watson M, Xiao XH, Holroyd SM, et al. Alterations in dihydropyridine receptors in dystrophin-deficient cardiac muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(6):H2439-45.
- Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Górecki DC. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis.* 2004;15(2):212-20.
- Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 2011;118(26):6743-51.
- Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol.* 2008;172(1):1-7.
- Zhang W, Chancey AL, Tzeng HP, Zhou Z, Lavine KJ, Gao F, et al. The development of myocardial fibrosis in transgenic mice with targeted overexpression of tumor necrosis factor requires mast cell-fibroblast interactions. *Circulation.* 2011;124(19):2106-16.
- Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology.* 2012;135(4):268-75.
- Zhao X, Bi C, Yang Z. Studies on the creatine kinase MM isoforms of normal and Duchenne muscular dystrophic patients. *Chin Med J (Engl).* 1998;111(1):75-7.

## **Anexo**

## Defective T-Lymphocyte Migration to Muscles in Dystrophin-Deficient Mice

Cynthia M. Cascabulho, Cristiane Bani Corrêa,  
Vinícius Cotta-de-Almeida, and  
Andrea Henriques-Pons

From the Laboratory for Innovations in Therapy, Teaching and Bioproducts, Oswaldo Cruz Institute-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

**Duchenne muscular dystrophy (DMD), an X-linked recessive disorder affecting 1 in 3500 males, is caused by mutations in the dystrophin gene. DMD leads to degeneration of skeletal and cardiac muscles and to chronic inflammation. The *mdx/mdx* mouse has been widely used to study DMD; this model mimics most characteristics of the disease, including low numbers of T cells in damaged muscles. In this study, we aimed to assess migration of T cells to the heart and to identify any alterations in adhesion molecules that could possibly modulate this process. In 6-week-old *mdx/mdx* mice, blood leukocytes, including T cells, were CD62L<sup>+</sup>, but by 12 weeks of age down-modulation was evident, with only approximately 40% of T cells retaining this molecule. Our *in vitro* and *in vivo* results point to a P2X7-dependent shedding of CD62L (with high levels in the serum), which in 12-week-old *mdx/mdx* mice reduces blood T cell competence to adhere to cardiac vessels *in vitro* and to reach cardiac tissue *in vivo*, even after *Trypanosoma cruzi* infection, a known inducer of lymphoid myocarditis. In *mdx/mdx* mice treated with Brilliant Blue G, a P2X7 blocker, these blood lymphocytes retained CD62L and were capable of migrating to the heart. These results provide new insights into the mechanisms of inflammatory infiltration and immune regulation in DMD. (Am J Pathol 2012, 181: 593–604; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.023>)**

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive disorder that affects 1 in 3500 males and is caused by mutations in *DMD*, the dystrophin gene. *DMD* is the largest gene described in humans, with more than 2.5 million base pairs.<sup>1</sup> The dystrophin protein provides a link between intracellular F-actin and the dystrophin glycoprotein complex (DGC), which binds to laminin in the

extracellular matrix.<sup>2</sup> The absence of functional dystrophin destabilizes the muscle fiber, leading to progressive cell damage through membrane leakage.<sup>3</sup> DMD patients are usually wheelchair-bound by 12 years of age and die of cardiac-respiratory failure in their early twenties.<sup>4,5</sup>

The *mdx/mdx* mouse is widely used as an experimental animal model to study DMD. These mice are derived from a naturally occurring mutant that arose within a C57BL/10 colony and were initially defined by high plasma levels of creatine kinase (CK). Although *mdx/mdx* mice have muscle fiber damage and local inflammatory response in muscles, they exhibit only a mild myopathy.<sup>6</sup>

It is postulated that the local inflammatory response in human patients and experimental models further damage the sarcolemma, leading to more myofiber death.<sup>7,8</sup> Cellular inflammatory infiltration in DMD is characterized by high numbers of myeloid cells (mostly macrophages, but also mast cells and others). Wehling et al<sup>9</sup> showed that macrophages can injure normal skeletal myotubes *in vitro* and that depletion of macrophages in *mdx/mdx* mice prevents muscle necrosis, suggesting a macrophage-dependent cytotoxic activity. On the other hand, few T lymphocytes are found in skeletal muscles and heart,<sup>10</sup> and their role has also been largely associated with increased muscle damage. Early depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells (at 6 to 8 days of age) led to reduced pathology.<sup>11</sup> Moreover, adoptive transfer of *mdx/mdx* splenocytes and muscle extract to C57BL/10 resulted in increased migration of CD8<sup>+</sup> T cells to muscle and increased pathology, but no increase in CK levels.<sup>11</sup> However, antibody-mediated depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells of 4week-old *mdx/mdx* mice did not influence fibrosis in older mice.<sup>12</sup> Although the contribution of cytotoxic T lymphocytes to DMD pathology remains unclear,<sup>13</sup> experiments using null mutants for both dystrophin and perforin showed that lack of perforin decreased dystrophic muscle pathology.<sup>14</sup>

Supported by the Oswaldo Cruz Foundation (Fundação Oswaldo Cruz) and the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq).

Accepted for publication April 12, 2012.

Address reprint requests to Andrea Henriques-Pons, Av. Brasil, 4365, Pavilhão Cardoso Fontes, 2<sup>o</sup> andar sala 66, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: [andreah@ioc.fiocruz.br](mailto:andreah@ioc.fiocruz.br).

Unlike the case with DMD patients and *mdx/mdx* mice, inflammatory foci of many myopathies are composed mostly of T lymphocytes, regardless of their protective or pathological role. CD8<sup>+</sup> T cells invading non-necrotic muscle fibers are typically found in polymyositis, for example, and cellular infiltrations in dermatomyositis and inclusion body myositis consist predominantly of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.<sup>15,16</sup> Moreover, high numbers of T cells also migrate to cardiac tissue in ischemic heart disease,<sup>17</sup> *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis,<sup>18</sup> and other forms of infectious myocarditis, such as coxsackie B-3 and Theiler virus.<sup>19,20</sup> It is currently not known why few T cells are found in DMD muscles, or whether pre- or post-endothelial interactions are lacking or malfunctional.

Leukocyte recruitment into inflamed tissues is a multi-step cascade of adhesive interactions between leukocytes and endothelial cells.<sup>21</sup> This involves selectin-mediated leukocyte tethering and rolling, in which CD62E and CD62P are expressed on the activated endothelium and CD62L is constitutively expressed on leukocytes.<sup>22</sup> The second step is the integrin-dependent firm adhesion of leukocytes (expressing LFA-1 and VLA-4) to the endothelial layer (expressing ICAM and VCAM) and, finally, transmigration.<sup>23</sup> A large number of cell types express CD62L (including monocytes, T and B lymphocytes, eosinophils, NK cells, and neutrophils), and a variety of ligands have been described (including GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1, and PSGL-1).<sup>24,25</sup> Integrins must undergo functional activation for efficient interaction with counter-receptors, which is mediated by chemokines and cytokines and results in increased affinity for the ligands.<sup>26</sup> Blood leukocyte recruitment and transmigration to tissues is essential for appropriate inflammatory responses against infection and injury.

CD62L, also known as L-selectin, is a 90-kDa glycoprotein with two basic functions: lymphocyte homing to lymph nodes during normal blood/lymph recirculation and migration of leukocytes to inflammatory sites.<sup>27</sup> Some authors have believed that CD62L is important to T cells homing to lymph nodes, but not to nonlymphoid tissues.<sup>28</sup> However, it was shown by others that CD62L also plays a role in T-cell migration to inflamed tissues.<sup>24,29,30</sup> The binding of CD62L to its ligands on activated endothelial cells initiates a cascade of downstream intracellular events in the leukocyte, resulting in free cytosolic calcium increase and phosphorylation of targeted proteins, including mitogen-activated protein kinases (MAPKs).<sup>31</sup> These intracellular events result in rapid endoproteolytic cleavage of L-selectin from the membrane proximal domain, leading to the shedding of a functionally active L-selectin to blood.<sup>32</sup> This L-selectin sheddase has been identified in thymocytes as the tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme (TACE).<sup>33</sup> Endothelial-independent shedding of L-selectin from leukocytes can be induced by different stimuli, including phorbol myristate acetate and bacterial streptolysin O, and cross-linking with anti-L-selectin and ATP through P2X7 receptor.<sup>34–36</sup> Increased soluble L-selectin can alter the ability of immune cells to interact with high-endothelial venules and migration to inflamed tissues by masking the ligands

on endothelial cells, leading to reduced inflammatory responses.<sup>37</sup>

The P2X7 receptor is a ligand-gated ion channel that mediates nonselective cation conductance when stimulated with appropriate ligands, such as extracellular ATP (ATP<sub>e</sub>). However, prolonged exposure or high concentrations of ATP<sub>e</sub> lead to a pore formation that renders plasma membrane permeable to molecules such as propidium iodide (PI) and YO-PRO Yellow.<sup>38</sup> A variety of cells express P2X7 receptor, including lymphocytes, granulocytes, osteoclasts, osteoblasts, microglia, monocytes, and macrophages,<sup>39,40</sup> and it is known that inflammatory cytokines (eg, TNF and IFN- $\gamma$ ) can up-regulate the expression of P2X7.<sup>41</sup> Regarding CD62L shedding induced by P2X7 activity, Sengstake et al<sup>35</sup> showed that agonistic stimulation of the receptor resulted in proteolytic cleavage of CD62L from both naïve and memory B and T cells. Scheuplein et al<sup>42</sup> showed that endogenous sources of NAD<sup>+</sup> and ATP released from lysed cells activate P2X7 on T lymphocytes, leading to CD62L shedding from cell surface.

Despite the strong inflammatory process evident in DMD muscles, little is known about the mechanisms governing leukocyte trafficking into these tissues. To evaluate the ability of T cells to migrate to cardiac tissue, we sought to explore the role played by adhesion molecule-mediated T cell-endothelium interactions in *mdx/mdx* mice. Our results show a defective migration of T cells to the heart of these mice, which may be, at least in part, a result of CD62L shedding from T-cell surface. Furthermore, we show that this shedding is induced by P2X7 *in vitro* and *in vivo*, because the blockage of the receptor after Brilliant Blue G (BBG) treatment led T lymphocytes in *mdx/mdx* mice to retain functional CD62L on the membrane and allowed their migration to the heart.

## Materials and Methods

### Animals

All experiments were conducted with mice obtained from the Center for Breeding of Laboratory Animals at Fundação Oswaldo Cruz. We used 6-, 9-, 12-, 24-, and 48-week-old male *mdx/mdx* mice and age-matched C57BL/10 control mice. Mice were housed for 7 to 10 days at the Center for Animal Experimentation under environmental factors and sanitation according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011). This project was approved by the Fiocruz Committee of Ethics in Research (0308/06), according to resolution 196/96 of the National Health Council of Brazilian Ministry of Health. To avoid possible interference from genetic and environmental drift in the mouse colony used, most experiments were repeated with C57BL/10 and *mdx/mdx* mice obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB/Unicamp, Sao Paulo, Brazil). This is an internationally certified animal breeding facility and a member of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). All results were reproducible using both colonies.



### Isolation of Cardiac Inflammatory Cells

Hearts from *mdx/mdx* and C57BL/10 mice were collected and cut in fragments 1 to 2 mm thick in ice-cold PBS. Fragments were then transferred to a 0.1% solution of collagenase type IV (5.2 U/mg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and submitted to four or five cycles of enzymatic digestion under gentle agitation for 20 minutes each at 37°C. Isolated cells were centrifuged and immediately transferred to ice-cold RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich) and maintained in ice.

### Flow Cytometry

For phenotypic labeling by flow cytometry, all cells were incubated for 30 minutes at 4°C with RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 10% inactivated normal sheep serum for Fc $\gamma$ R blockage. Cells were incubated with previously titrated APC/Cy7-conjugated anti-CD3, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD8, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD62L, PE/Cy7-conjugated anti-CD69, PE-conjugated anti-LFA-1 (all from eBioscience, San Diego, CA), PE-conjugated anti-CD49d (SouthernBiotech, Birmingham, AL), and/or PE-conjugated anti-CD43 (BD Pharmingen, San Diego, CA) for 30 minutes in ice. All samples were washed twice in RPMI 1640 medium and fixed using 2% formaldehyde (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) in PBS until acquisition in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) or a Dako Cyan ADP analyzer (Beckman Coulter, Houston, TX). Data analysis was performed using Dako Summit version software 4.3. For cytokine secretion, we used a cytometric bead array flex set, as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen).

### Permeabilization Assay

Blood was collected by cardiac puncture in the presence of heparin and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll-Histopaque 1077 gradient (StemCell Technologies, Vancouver, BC). Cells were incubated for 30 minutes at 4°C with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD3, anti-CD4, or anti-CD8 (SouthernBiotech), washed in RPMI 1640 medium, resuspended in prewarmed RPMI 1640/HEPES 10 mmol/L for 5 minutes at 37°C, and incubated for 10 minutes in the presence or absence of ATP<sub>e</sub> (5 mmol/L; Sigma-Aldrich). During the last 5 minutes of incubation, propidium iodide (Sigma-Aldrich) was added at the final concentration of 0.1  $\mu$ g/mL, and all samples were immediately acquired in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Peritoneal cells were collected using ice-cold RPMI 1640/HEPES 10 mmol/L; cells in a macrophage region based on forward scatter by side scatter (FSC  $\times$  SSC) were used as a positive control.

### Purification of Blood T Lymphocyte Subsets

PBMCs were obtained as described above, and  $1 \times 10^7$  cells were incubated with bead-conjugated anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) for 20 minutes at 4°C, resuspended in 500  $\mu$ L of PBS, and applied to a MiniMACS column (Miltenyi Biotec) under a magnetic field, as recommended by the manufacturer. Samples were centrifuged and resuspended in RPMI 1640 medium and sort purity was determined by labeling the cells with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD3 (SouthernBiotech) for flow cytometry analysis. We used samples of  $\geq 95\%$  enrichment for T-cell subsets.

### Dot Blotting

Blood samples were obtained from *mdx/mdx* or C57BL/10 mice by cardiac puncture without heparin; samples were left at room temperature for 30 minutes. Serum was obtained by blood centrifugation at  $500 \times g$  for 5 minutes, and protein concentration was determined using a Lowry modified RC DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For dot-blotting assay, serum samples with 80, 40, or 20  $\mu$ g of total proteins/100  $\mu$ L of Tris buffer were added per well. Proteins were then immobilized in Tris buffer prehydrated nitrocellulose membranes for 15 minutes at room temperature, blocked for 60 minutes in Tris buffer supplemented with 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), and incubated with anti-CD62L or anti-LFA-1 (eBioscience) for 1 hour at room temperature. The membrane was then washed twice with Tris buffer and incubated for 1 hour with goat anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (SouthernBiotech). Primary antibody was suppressed in one of the samples for negative control. Detection was performed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium solution (BCIP/NBT; SouthernBiotech).

### Western Blotting

Purified T lymphocytes were lysed, as described previously,<sup>43</sup> with extraction buffer (Tris-HCl 50 mmol/L, 1% NP-40, leupeptin 1 mmol/L, phenylmethylsulfonyl fluoride 100 mmol/L, pepstatin A 1 mmol/L, EDTA 100 mmol/L; all purchased from Sigma-Aldrich). Total proteins (50  $\mu$ g/slot) were resolved using SDS-PAGE (12%). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes, blocked using nonfat dry milk (5%) in Tris buffer, and incubated with anti-P2X7 primary antibody (Alomone, Jerusalem, Israel) for 2 hours. The membrane was then rinsed in blocking buffer and incubated with goat anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (SouthernBiotech) for 1 hour. Detection was performed using BCIP/NBT (SouthernBiotech). For TCR  $\alpha\beta$  detection, a fragment of left ventriculus was extensively washed in ice-cold PBS and cut in fragments 1 to 2 mm thick. Total proteins were extracted using extraction buffer, centrifuged at  $500 \times g$  for 5 minutes and subjected to SDS-PAGE as described above. Nitrocellulose mem-

branes were incubated with biotin-conjugated anti-TCR  $\alpha\beta$  (MyBioSource, San Diego, CA), rinsed in blocking buffer, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Dako, Carpinteria, CA) for 1 hour. Detection was performed by chemifluorescence using an ECL plus kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) in a Storm 860 imaging system (Amersham-GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

### In Vitro Blockage of P2X7

Blood CD3<sup>+</sup> T lymphocytes purified from 9-week-old *mdx/mdx* and C57BL/10 mice were preincubated or not with KN-62 (100 nmol/L) for 30 minutes and then incubated with only medium or ATP<sub>o</sub> 100  $\mu$ mol/L for 1 hour. We chose this concentration based on a kinetic study considering the lowest dose of ATP that induced CD62L shedding with no cell death or permeabilization, as ascertained by 7-aminoactinomycin D and PI, respectively (data not shown). Supernatants were collected and used in dot-blotting assays revealed with anti-CD62L and goat anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody.

### Adhesion Assay

The ability of peripheral blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to attach to cardiac vessels was tested in a modified Stampfer-Woodruff assay.<sup>44</sup> Freshly cut, unfixed, frozen cardiac sections (15  $\mu$ m thick) from 6- or 24-week-old *mdx/mdx* or C57BL/10 mice were incubated with 100  $\mu$ L of a cell suspension containing  $3 \times 10^6$  purified CD4 or CD8 T cells from 6- or 12-week-old *mdx/mdx* mice in RPMI 1640 medium with 10 mmol/L HEPES and 5% fetal calf serum. The incubation was performed under gentle circular agitation at 60 revolutions per minute for 40 minutes at room temperature. After extensive washings with prewarmed PBS, the slides were fixed and stained with a Romanowsky-based staining kit (Laborclin, Pinhais, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The number of adhered cells per blood vessel was counted under a light microscope. To characterize cell surface molecules involved in T-cell adhesion to endothelial cardiac blood vessels, some experiments were conducted with purified T cell subsets pretreated with different concentrations of anti-CD62L or anti-LFA-1 monoclonal antibodies (eBioscience).

### BBG Treatment for in Vivo Blockage of P2X7

BBG reagent (Sigma-Aldrich) was diluted at 3 mg/mL in vehicle solution (calcium- and magnesium-free PBS/0.2% dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich). For *in vivo* treatment, *mdx/mdx* and C57BL/10 mice were weighed once a week during drug administration and received freshly prepared BBG (45.5 mg/kg) or vehicle via intraperitoneal injection every 48 hours. Mice were treated from 9 to 12 weeks of age.

### T. cruzi Infection

Parasites were isolated from infected Swiss-Webster mice as described previously<sup>45</sup> and *mdx/mdx* or C57BL/10 mice were intraperitoneally injected with  $1 \times 10^4$  blood trypomastigote forms of *T. cruzi* Y strain in 200  $\mu$ L of PBS. Age-matched, uninfected control mice received 200  $\mu$ L of PBS and were treated under the same conditions. Samples were collected on day 15 after infection.

### Histopathological Analysis

Control and infected C57BL/10 and *mdx/mdx* mice were euthanized, and the hearts were removed, sagittally divided, and fixed using Millonig-Rosman solution (10% formaldehyde in PBS). Paraffin-embedded samples were further processed and stained with H&E in 5- $\mu$ m-thick slices. In *T. cruzi*-infected mice, the number of inflammatory foci (defined as  $\geq 10$  inflammatory cells) and the number of inflammatory cells per focus were determined by scanning the whole tissue in approximately 30 individual microscopic fields per sample.

### Immunohistochemistry

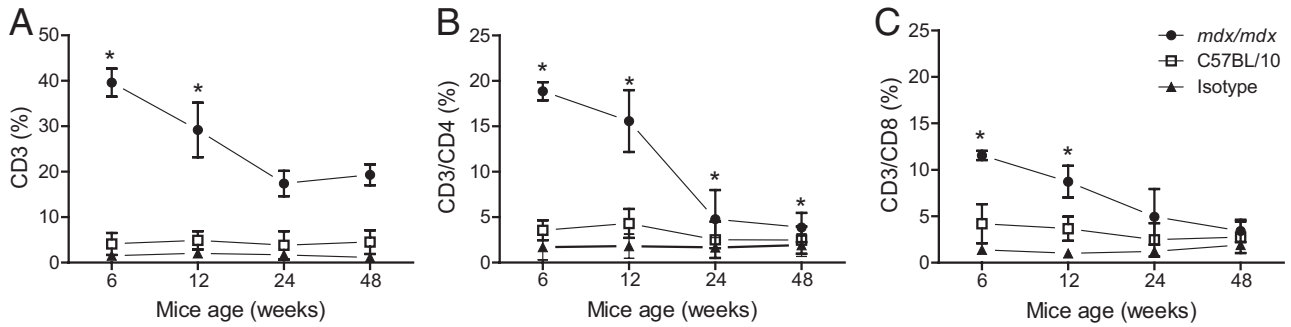
Cardiac muscles were collected, frozen using cold isopentane,<sup>46</sup> and stored in liquid nitrogen until use. Cardiac slices (8  $\mu$ m thick) were then fixed with 4% formaldehyde for 10 minutes at room temperature and then were washed twice in PBS. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes, and then slices were washed twice more. Fc $\gamma$ R was blocked, and the slices were incubated with anti-CD3 $\epsilon$  chain primary antibody (SouthernBiotech) overnight at room temperature under agitation. Slices were washed with PBS and incubated with goat anti-rat biotin-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 hour and then with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Dako) for 1 hour. Detection was performed using 3-amino-9-ethylcarbazole (Dako).

### Biochemical Analysis

CK isoforms from cardiac (CK-MB) and skeletal (CK-NAC) muscles were assessed in mouse serum. Blood samples were collected from tail snips in heparinized capillary tubes, centrifuged, and analyzed using commercially available kits (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina). This quantitative assay is used as a marker of muscle damage; data are expressed as a rate of NADPH increase ( $\Delta E/\text{min}$ ) in three sequential readings in a spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 340 nm.

### Spontaneous Mouse Activity

We used a video tracking system to measure spontaneous activity (EthoVision XT6; Noldus, Leesburg, Holland), with a recording camera placed at a distance of 1 m from the subjects. Each mouse was individually adapted in the



**Figure 1.** Distribution of T lymphocytes in cardiac tissue from *mdx/mdx* and C57BL/10 mice. Cardiac tissue was enzymatically dissociated, and all cells were obtained for flow cytometry analysis. Mononuclear cells were gated by FSC × SSC parameters and analyzed according to the expression of CD3 (A), CD3/CD4 (B), and CD3/CD8 (C) at 6, 12, 24, and 48 weeks of age. Data are expressed as means ± SD from five independent experiments. \**P* ≤ 0.05 versus C57BL/10. *n* = 4 or 5 animals per group.

arena for 10 minutes before the experimental measurement, which lasted 20 minutes.<sup>47</sup>

*Statistical Analysis*

Data were analyzed using Student's *t*-test (GraphPad Prism version 4.00 software; GraphPad Software, La Jolla, CA). A *P* value of ≤0.05 was considered significant.

**Results**

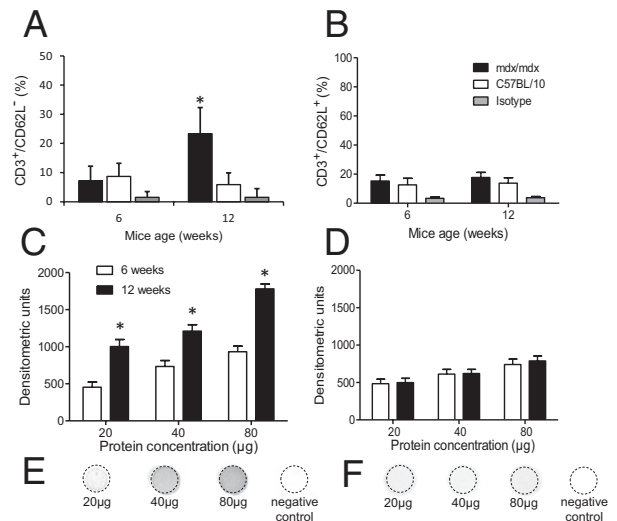
*Cardiac T-Cell Numbers and CD62L Shedding to Blood*

Given that most previous studies have associated T cells with increased pathology in DMD, we evaluated by flow cytometry the presence of these cells in cardiac muscles from 6-, 12-, 24-, and 48-week-old *mdx/mdx* mice (Figure 1). CD3<sup>+</sup> T cells progressively decreased in the time frame studied (Figure 1A), although with a predominance of CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells over CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells in 6- and 12-week-old animals (Figure 1, B and C). We found neither NK, NKT, nor T<sub>reg</sub> cells in the cardiac muscle of *mdx/mdx* mice (data not shown), and did not find T cells at >5% in C57BL/10 mice.

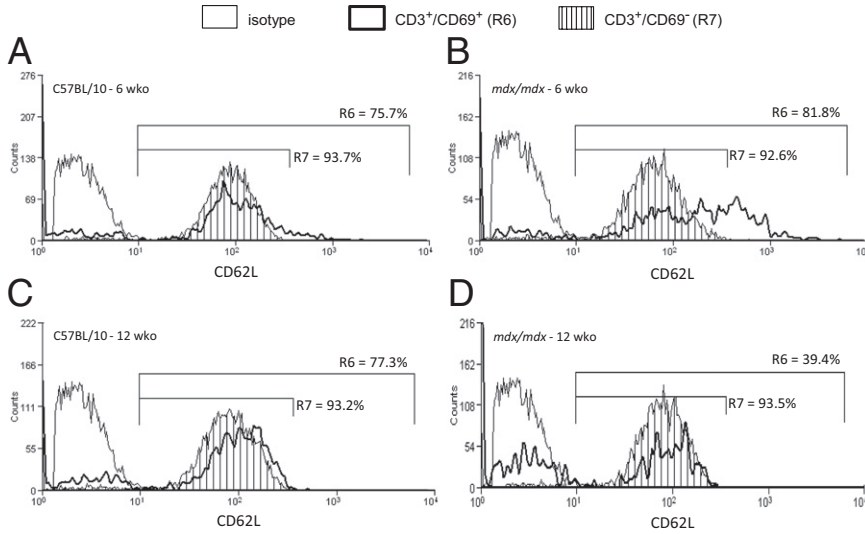
Because blood T cells from *mdx/mdx* mice could be less competent to migrate to cardiac tissue, we checked the panel of adhesion molecules expressed by blood and cardiac T cells. We observed normal levels of CD62L expression in blood T lymphocytes from 6- and 12-week-old C57BL/10 mice and 6-week-old *mdx/mdx* mice. This means that very few T cells were CD62L<sup>-</sup> (Figure 2A). However, many T cells from 12-week-old *mdx/mdx* mice became CD62L<sup>-</sup> (Figure 2A). This down-regulation was transitory, because we observed that 24-week-old *mdx/mdx* mice express similar levels of selectin, compared with age-matched C57BL/10 mice (data not shown). Cardiac T lymphocytes from 6- and 12-week-old *mdx/mdx* mice expressed low levels of this molecule (Figure 2B), as expected after endothelial interaction.<sup>22</sup> We observed no differences in the expression of LFA-1, CD43, and CD49d in blood T cells from C57BL/10 and *mdx/mdx* mice at all ages, and there were always normal levels of

CD62L expression in blood granulocytes and monocytes (data not shown). To determine whether the CD62L down-regulation could be due to cleavage from the T-cell surface, we evaluated the levels of this soluble molecule in mouse serum by dot blotting. The 12-week-old *mdx/mdx* mice had higher levels of soluble CD62L, compared with 6-week-old mice (Figure 2, C and E). LFA-1 was used as a control, and we never observed increased levels of this molecule in blood (Figure 2, D and F).

CD62L is a key molecule for naïve T cells homing to lymph nodes, where antigen interaction takes place for cell activation and effector function. However, despite the shedding of CD62L that we observed, immunosuppression has not been described in *mdx/mdx* mice, suggest-



**Figure 2.** T-cell expression and blood soluble CD62L in *mdx/mdx* mice. PBMCs (A) and cardiac cells (B) were obtained from 6- and 12-week-old *mdx/mdx* and C57BL/10 mice and labeled with anti-CD3 and anti-CD62L. Shown is the percentage of CD3<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> PBMCs (A) and CD3<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> (B) or isotype labeling (A and B) as gated in the morphological region (FSC × SSC) of mononuclear cells. Serum concentrations of CD62L (C) and LFA-1 (D) in 6- and 12-week-old *mdx/mdx* mice was evaluated by dot blotting using 20, 40, and 80 μg of total proteins per slot. Representative membranes of CD62L (E) and LFA-1 (F) of 12-week-old *mdx/mdx* mice are shown. Membrane labeling was performed with primary antibody, then phosphatase alkaline-conjugated goat anti-rat secondary antibody, and revealed with NBT/BCIP. For negative control, 80 μg of total proteins were immobilized and primary antibody was omitted. Data are expressed as means ± SD from four independent experiments. \**P* ≤ 0.05. *n* = 4 or 5 animals per group.



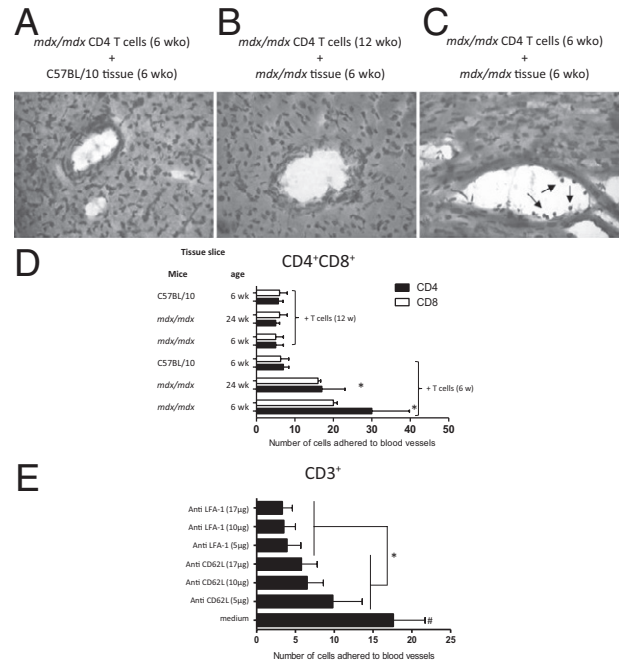
**Figure 3.** CD62L expression and activation status of blood T cells. PBMCs from 6- and 12-week-old C57BL/10 and *mdx/mdx* mice were labeled with anti-CD3, anti-CD69, and anti-CD62L monoclonal antibody and analyzed by flow cytometry in FSC × SSC gated PBMCs. Percentages of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>-</sup> cells expressing CD62L are defined by R6 and R7 markers, respectively. Data are representative of three independent experiments. *n* = 3 or 4 animals per group.

ing that naïve T-cell homing to lymph nodes is preserved. We then decided to evaluate whether the shedding of CD62L was from activated or naïve T-cell subpopulations. Using the early activation marker CD69, we found no reduction of CD62L expression in CD69<sup>+</sup> or CD69<sup>-</sup> T cells from 6-week-old C57BL/10 mice (Figure 3A), 6-week-old *mdx/mdx* mice (Figure 3B), and 12-week-old C57BL/10 mice (Figure 3C). On the other hand, although there was no down-regulation of CD62L in CD69<sup>-</sup> T cells from 12-week-old *mdx/mdx* mice (Figure 3D), only approximately 40% of CD69<sup>+</sup> T cells from these mice retained this selectin on cell surface (Figure 3D).

#### Limited Ability of Blood CD62L<sup>-</sup> T Cells to Firmly Adhere to Cardiac Vessels

Because the reduction of CD62L expression in blood T lymphocytes coincides with reduction of T cells in cardiac tissue, we tested the adhesion of these blood T cells to cardiac vessels *in vitro*. Purified blood CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from 6- or 12-week-old *mdx/mdx* mice were placed to adhere over cardiac tissue sections from 6- or 24-week-old C57BL/10 or *mdx/mdx* mice. Blood lymphocytes from 6- and 12-week-old *mdx/mdx* mice did not adhere to cardiac vessels in sections from control C57BL/10 mice (Figure 4, A and D). Likewise, T lymphocytes from 6-week-old *mdx/mdx* mice were capable of adhering to cardiac vessels from either 6- or 24-week-old *mdx/mdx* mice (Figure 4, C and D). We chose 24-week-old mice because the onset of tissue inflammation in the heart is present in older mice, which involves primarily macrophages. We also observed that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from 6-week-old *mdx/mdx* mice preferably adhered to vessels in proximity to inflamed areas of *mdx/mdx* cardiac slices (data not shown). Moreover, we ob-

served no differences in cardiac endothelial cell expression of VCAM and ICAM between 6- and 12-week-old *mdx/mdx* and age-matched C57BL/10 mice (data not shown). Because we found few T cells from 12-week-old



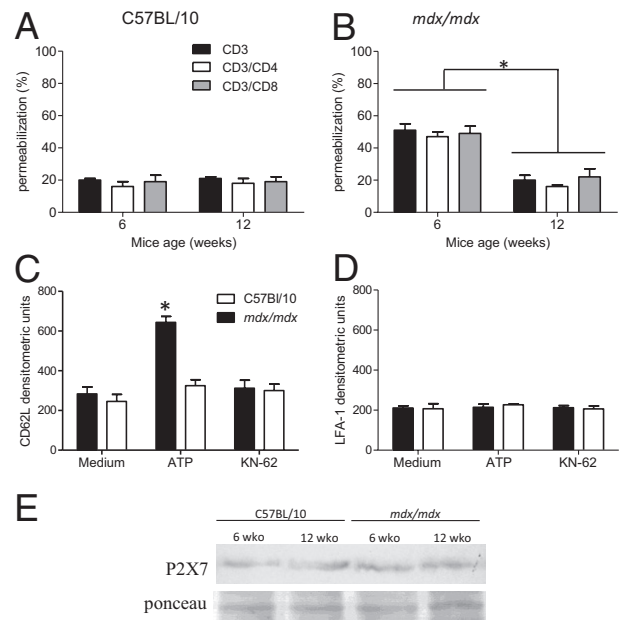
**Figure 4.** T lymphocytes binding to cardiac endothelium. **A–C:** CD4<sup>+</sup> T cells from *mdx/mdx* mice were purified from blood by magnetic sorting at indicated 6 or 12 weeks of age (wko) and were incubated over fresh frozen cardiac tissue slices from C57BL/10 or *mdx/mdx*. **Arrows** indicate blood purified T lymphocytes adhering to cardiac vessels. **D:** Quantification of purified CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells adhering to cardiac blood vessels in C57BL/10 and *mdx/mdx* mice at 6 or 24 weeks of age. **E:** Blood purified CD3<sup>+</sup> T cells from 6-week-old *mdx/mdx* mice were preincubated with either medium alone or neutralizing antibodies against CD62L or LFA-1 at three different concentrations. These cells were then incubated under agitation over fresh frozen cardiac slices from 6-week-old *mdx/mdx* mice and the number of cells adhering to cardiac blood vessels was quantified. Data are expressed as means ± SD from three independent experiments. \**P* ≤ 0.05 *mdx/mdx* versus control (**D**) or a given concentration versus preincubation with CD62L or LFA-1 (**E**); #*P* ≤ 0.05 versus all other variables. *n* = 5–7 animals per group. Original magnification, ×400.

*mdx/mdx* mice bound to cardiac vessels (Figure 4D), we tested whether the weak adhesion might be associated with the lower levels of CD62L on T cells from these mice. Blood purified CD4<sup>+</sup> lymphocytes from 6-week-old *mdx/mdx* mice were then incubated with anti-CD62L or anti-LFA-1 before the adhesion assay. We observed that, although the blockage of LFA-1 is more efficient in impairing lymphocyte/endothelial cell interaction, the blockage of CD62L also reduces T-cell adhesion to cardiac vessels (Figure 4E). At this point, it seemed to us that there are two different pathways for CD62L shedding in 12-week-old *mdx/mdx* mice: first, normal shedding of CD62L from leukocytes, including T cells, during endothelial interaction for transmigration to inflamed tissues; second, CD62L shedding from T cells in blood, before blood vessel interaction, reducing endothelial adhesion. We therefore decided to explore possible mechanistic pathways that might be leading to the second pathway for CD62L shedding.

### P2X7-Induced CD62L Shedding from Blood T Cells

Because P2X7 receptor can induce CD62L proteolytic cleavage, we evaluated the function and expression of this receptor in T cells from C57BL/10 and *mdx/mdx* mice. We first performed a permeabilization assay to evaluate P2X7 ability to induce pore formation on cell membrane on activation by ATP<sub>e</sub>. We observed an increase in ATP<sub>e</sub>-induced permeabilization in T lymphocytes from 6-week-old *mdx/mdx* mice, compared with 6- and 12-week-old C57BL/10 and 12-week-old *mdx/mdx* mice (Figure 5, A and B). To determine P2X7 ability to induce CD62L shedding, we performed an *in vitro* assay with purified blood T cells obtained from 9-week-old *mdx/mdx* and C57BL/10 mice incubated in the presence or absence of an antagonist of P2X7 (KN-62) and then stimulated with ATP<sub>e</sub>. We chose the age of 9 weeks because this is when the shedding process begins (data not shown). T cells from *mdx/mdx* mice were more susceptible to ATP<sub>e</sub>-induced CD62L shedding than C57BL/10 mice, and this shedding was blocked by KN-62 (Figure 5C). Once more, LFA-1 was used as a control and no shedding was observed (Figure 5D). We performed Western blotting to evaluate whether P2X7 expression was up-regulated in T lymphocytes from 12-week-old *mdx/mdx* mice; levels of P2X7 expression were similar in 6- and 12-week-old *mdx/mdx* and C57BL/10 mice (Figure 5E). Because IFN- $\gamma$  and TNF are known to up-regulate P2X7 activity in monocytes, we evaluated whether these cytokines were increased in blood from 12-week-old *mdx/mdx* mice; however, no differences were observed between 6- and 12-week-old *mdx/mdx* mice (data not shown).

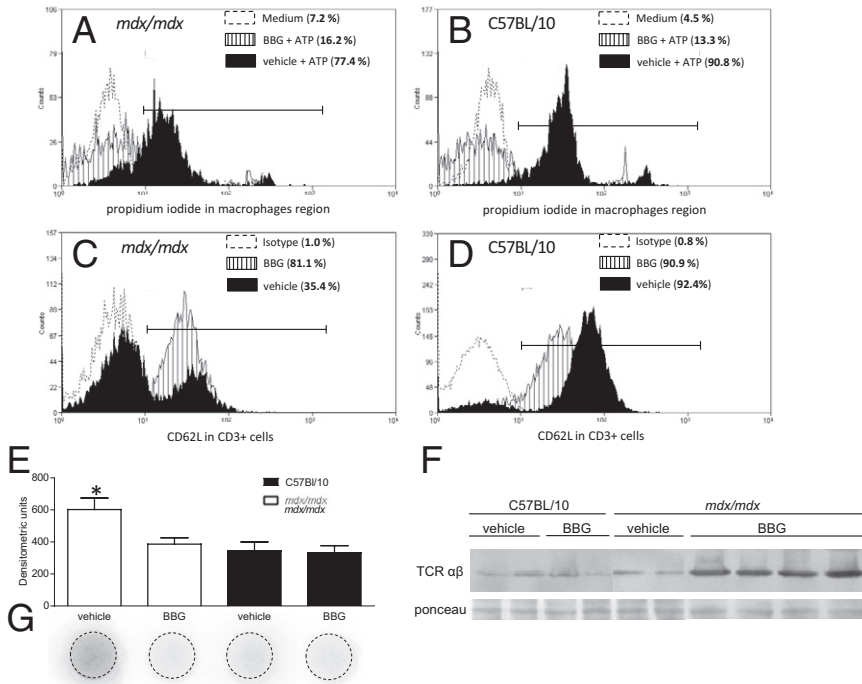
To assess the *in vivo* relevance of our findings, we treated *mdx/mdx* and C57BL/10 mice for 3 weeks with BBG, another antagonist of P2X7, and then evaluated CD62L expression on blood T lymphocytes and the concentration of soluble CD62L in serum. First, we tested whether the treatment was efficient in blocking the recep-



**Figure 5.** *In vitro* P2X7 activity in blood T cells. **A** and **B**: PBMCs from 6- and 12-week-old C57BL/10 (**A**) and *mdx/mdx* (**B**) mice were labeled with anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 monoclonal antibody and incubated with ATP<sub>e</sub> (5 mmol/L) for 10 minutes in the presence of PI in the last 5 minutes. T-cell membrane permeabilization was then evaluated by PI incorporation using flow cytometry. **C** and **D**: P2X7 ability to induce CD62L and LFA-1 shedding from purified CD3<sup>+</sup> T lymphocyte surface was evaluated by dot blotting. Purified blood CD3<sup>+</sup> T lymphocytes from 9-week-old *mdx/mdx* or C57BL/10 mice were incubated either in the presence or absence of KN-62 (a P2X7 blocker) and then stimulated with ATP<sub>e</sub> (100  $\mu$ mol/L). Supernatants were collected and used to determine CD62L (**C**) and LFA1 (**D**) levels. **E**: P2X7 expression by CD3<sup>+</sup> T lymphocytes purified from 6- and 12-week-old *mdx/mdx* and C57BL/10 mice was evaluated by Western blotting. Ponceau red staining served as control for total protein applied in each sample. Each experiment was performed three times. \**P* < 0.05. *n* = 5–7 animals per group.

tor through an ATP<sub>e</sub>-induced permeabilization assay using peritoneal macrophages, cells that are greatly susceptible to ATP. We observed that BBG administration almost abolished ATP<sub>e</sub>-induced pore formation in cells from both *mdx/mdx* (reduction from 77.4% to 16.2%) and C57BL/10 mice (reduction from 90.8% to 13.3%) (Figure 6, A and B). Regarding CD62L, we observed that BBG treatment restored its expression in blood T lymphocytes from *mdx/mdx* mice (increase from 35.4% to 81.1%) (Figure 6C). On the other hand, blood T cells from BBG- or vehicle-treated C57BL/10 mice were CD62L<sup>+</sup> (90.9% and 92.4%, respectively) (Figure 6D), although with a higher frequency of CD62L expression in vehicle-treated (MFI = 70), compared with BBG-treated mice (MFI = 32). Simultaneously, BBG treatment reduced soluble levels of CD62L only in blood from *mdx/mdx* mice (Figure 6, E and G).

We then decided to evaluate whether, after BBG treatment, more T cells would be able to reach the cardiac tissue of these mice. We performed Western blotting assays with cardiac extracts from BBG- and vehicle-treated *mdx/mdx* and C57BL/10 mice using anti-TCR  $\alpha\beta$  and observed that, after BBG treatment, T cells migrated more to the cardiac muscle of *mdx/mdx* mice (Figure 6F). Moreover, we monitored a group of mice for 5 weeks during and after BBG treatment, measuring muscle damage markers for cardiac muscle (CK-MB) (Figure 7A) and



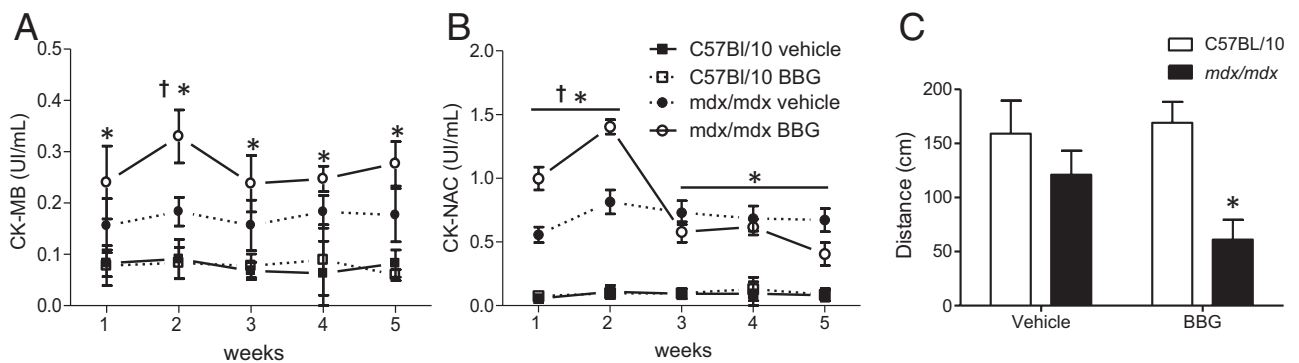
**Figure 6.** *In vivo* role of P2X7 in CD62L shedding from the T-cell surface. **A** and **B**: Peritoneal cells from *mdx/mdx* (**A**) and C57BL/10 (**B**) mice treated with BBG (45.5 mg/kg) or vehicle (from 9 to 12 weeks of age) were collected and incubated with ATP<sub>e</sub> (5 mmol/L) and PI for permeabilization assays by flow cytometry in gated macrophages (FSC × SSC). Percentage of PI positive cells is indicated in parentheses. **C** and **D**: PBMCs were collected from *mdx/mdx* mice (**C**) and C57BL/10 mice (**D**) treated with BBG or vehicle. Percentage of CD3<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> cells is indicated in parentheses. **Horizontal bars** define fluorescence positivity. **E** and **G**: Soluble CD62L was evaluated in serum samples from all groups of mice using dot-blotting assays. **F**: Cardiac tissue extracts were used for  $\alpha\beta$  T-cell detection by Western blotting. Data are representative of at least three independent experiments. \**P* ≤ 0.05. *n* = 4 or 5 animals per group.

skeletal muscle (CK-NAC) (Figure 7B). BBG-treated *mdx/mdx* mice exhibited higher CK-MB and CK-NAC activity until 2 weeks of treatment, compared with all other groups; after 2 weeks, CK-NAC activity decreased, reaching levels similar to those observed in vehicle-treated *mdx/mdx* mice.

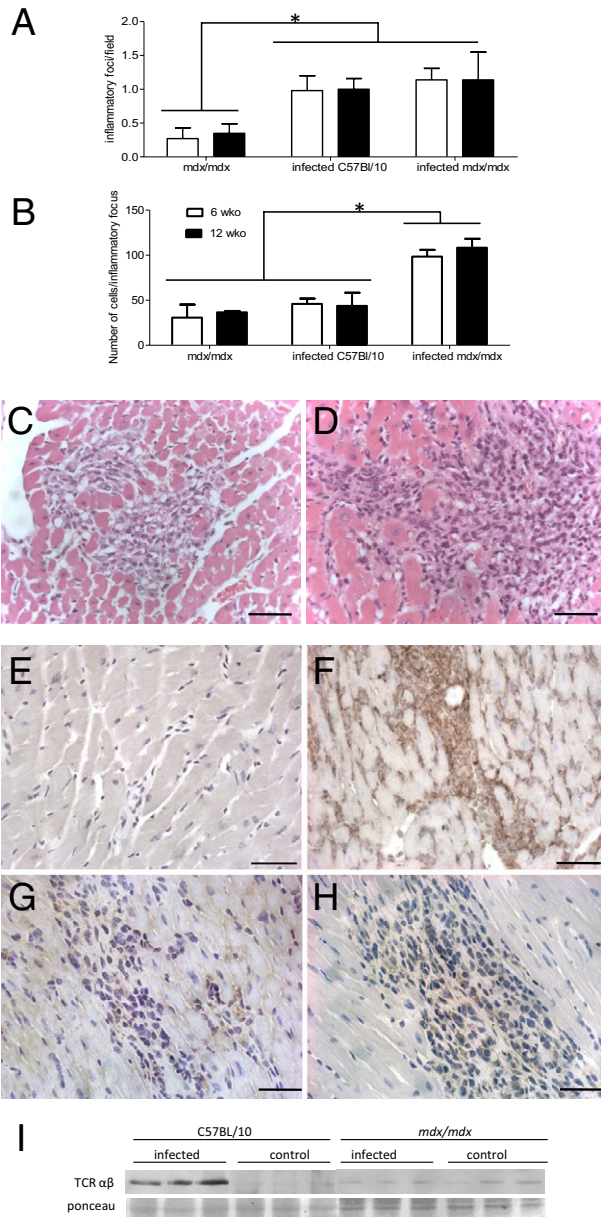
To determine whether the increase in muscle lesion observed after BBG treatment was due to increased physical activity, we evaluated motor spontaneous activity using an EthoVision video tracking system and observed that BBG-treated *mdx/mdx* mice have even lower spontaneous activity, compared with vehicle-treated *mdx/mdx* mice (Figure 7C).

Because *T. cruzi* infection induces a myocarditis composed mostly of CD8<sup>+</sup> T cells, we infected 6- and 12-week-old *mdx/mdx* mice to test whether fewer blood CD62L<sup>+</sup> T cells would lead to nonlymphoid inflammatory

infiltrates. The 6- and 12-week-old infected *mdx/mdx* and C57BL/10 mice had equivalent numbers of cardiac infiltrates per field, and the numbers were higher, compared with noninfected *mdx/mdx* mice (Figure 8A). The number of inflammatory cells per inflammatory focus in infected *mdx/mdx* mice was higher than in noninfected *mdx/mdx* and infected C57BL/10 mice (Figure 8B). H&E staining of cardiac samples from 12-week-old uninfected (Figure 8C) and infected (Figure 8D) *mdx/mdx* mice showed a general appearance of inflammatory infiltration. Regarding the presence of T cells, we did not observe inflammatory infiltration and CD3 labeling in noninfected C57BL/10 mice (Figure 8E). On the other hand, cardiac tissues from infected C57BL/10 mice showed high numbers of CD3<sup>+</sup> T cells (Figure 8F), in contrast to noninfected and infected 12-week-old *mdx/mdx* mice, which have few CD3<sup>+</sup> cells (Figure 8, G and H). TCR  $\alpha\beta$  stain-



**Figure 7.** Analysis of muscle damage and motor activity with BBG treatment. **A** and **B**: *mdx/mdx* and C57BL/10 mice were treated with BBG (45.5 mg/kg) or vehicle from 9 to 12 weeks of age (weeks 1 to 3) and CK-MB (**A**) and CK-NAC (**B**) were measured once a week during the treatment and for 2 weeks more after the treatment (weeks 4 and 5). **C**: Motor spontaneous activity was evaluated on the second week of treatment, using a Noldus EthoVision XT6 video tracking system. \**P* ≤ 0.05 *mdx/mdx* versus treatment-matched C57BL/10 mice; †*P* ≤ 0.05 treated versus untreated *mdx/mdx* mice.



**Figure 8.** *T. cruzi* infection of *mdx/mdx* mice. **A** and **B**: C57BL/10 and *mdx/mdx* mice were infected with *T. cruzi* and hearts were collected 15 days after infection. The number of inflammatory foci per microscopic field (**A**) and the number of cells per inflammatory focus (**B**) were quantified by light microscopy in H&E-stained slices from 6- and 12-week-old mice. **C** and **D**: H&E-stained samples from 12-week-old uninfected (**C**) and infected (**D**) *mdx/mdx* mice were used to illustrate general characteristics of inflammatory foci. **E–H**: Identification of T cells was performed in heart slices using anti-CD3 monoclonal antibody in 12-week-old uninfected (**E**) and infected (**F**) C57BL/10 mice and in uninfected (**G**) and infected (**H**) *mdx/mdx* mice. **I**: Cardiac extracts from 12-week-old mice were used in Western blotting to evaluate T-cell lymphocytic infiltration; membranes were incubated with anti- $\alpha\beta$  TCR monoclonal antibody. **Arrows** indicate CD3<sup>+</sup> cells. \**P*  $\leq$  0.05. Scale bar = 50  $\mu$ m.

ing in Western blotting of cardiac extracts from infected and noninfected 12-week-old *mdx/mdx* and C57BL/10 mice confirmed these data (Figure 8I). Regardless of the technique used, throughout our study we always found more cardiac T cells in control *mdx/mdx* mice, compared with control C57BL/10 mice.

## Discussion

Although skeletal muscles are more studied in DMD, cardiac function and anatomy are also affected, in both patients and experimental models. Using echocardiography, Quinlan et al<sup>48</sup> found that 8-week-old *mdx/mdx* mice had normal cardiac function, but 29-week-old mice exhibited minor alterations and 42-week-old mice exhibited dilated cardiomyopathy; they also found a four-fold increase in interstitial cardiac fibrosis in 17-week-old *mdx/mdx* mice. Moreover, Nakamura et al<sup>49</sup> found an increase in left ventricular wall with inflammation and fibrosis after regular treadmill exercise. Nonetheless, the precise role of the inflammatory response to the onset of cardiac pathology is currently unknown, especially the reason why T lymphocytes are rarely found in cardiac muscle. Many reports have described a great number of myeloid cells, mainly macrophages, mast cells, and some eosinophils in cardiac and skeletal muscles.<sup>50–52</sup> In contrast to DMD, other myopathies (including polymyositis, inclusion body myositis, dermatomyositis, and cardiomyopathies induced by the protozoan *T. cruzi* and coxsackie B3 virus) induce migration of T lymphocytes.<sup>15,18</sup>

We observed that T cells, mainly CD4<sup>+</sup> T cells, are present in the cardiac tissue of 6-week-old *mdx/mdx* mice and that their frequency decreases with age, being almost undetectable in 24-week-old animals. Thus, reduced cardiac function and increased damage in older mice seem to be T cell-independent or likely delayed from early T-cell function.

Different possibilities might account for the reduced number of T cells in muscles from DMD patients and *mdx/mdx* mice, such as high levels of lymphocyte death in the tissue. This finding could be due to either cytotoxic activity of other cells targeting T lymphocytes or high production of soluble factors, such as TNF. However, we (data not shown) observed that cardiac muscles have few TUNEL-positive cells, suggesting low levels of apoptosis in the muscle, including T cells. On the other hand, the paucity of TUNEL-positive cells could be due to a very efficient scavenging process of dying cells. This can be illustrated by the presence of very few TUNEL-positive cells in thymus, despite the death of approximately 95% of thymocytes not rescued by positive selection (death by neglect) and during negative selection. Therefore, at this point and regardless of our present results, we cannot exclude the possibility that apoptosis undetected by current techniques could be occurring in cardiac muscle and contributing more or less to the reduced number of T cells.

Another possibility is inefficient migration of blood T cells to the cardiac tissue, which could be due to defective activation in lymph nodes, reduced muscle production of T cell chemotactic factors, reduced expression of chemotactic receptors by T cells, or inefficient T lymphocyte/endothelial cell interaction due to reduced expression/activation of adhesion molecules, such as selectins and integrins. Many of these alternatives remain to be tested. However, regarding the first possibility, *mdx/mdx* mice are not considered more susceptible to infections, for example, nor do they show any other characteristic of

significant reduced immunocompetence. In accord, we observed no difference in blood parasitemia after *T. cruzi* infection between *mdx/mdx* and C57BL/10 mice (data not shown). Moreover, we observed no significant differences in total CD44<sup>high</sup> blood T cells between 6-week-old (5.38% ± 1.17) and 12-week-old (4.54% ± 0.96) *mdx/mdx* mice. Regarding the production of TNF, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, MCP-1, and IL-12 (potential regulators for T-cell migration) in extracts of reperfused hearts, we observed no significant differences between 6- and 12-week-old *mdx/mdx* mice (data not shown). On the other hand, of the various adhesion molecules for endothelial interaction (CD62L, CD49d, LFA-1, ICAM, and VCAM), only CD62L was absent from blood T cells in a window of time in *mdx/mdx* mice (10 to 20 weeks old). The 24-week-old *mdx/mdx* mice recovered expression of CD62L on T lymphocytes, although these cells were still not observed in the cardiac tissue. This suggests that CD62L-independent mechanisms can still prevent T-cell migration at this age, but this alternative remains to be tested.

Our data also showed that naïve and long-term activated T cells (CD69<sup>-</sup>) retain CD62L on cell surface, and only a part of the early-activated T cells (CD69<sup>+</sup>) shed the selectin. These data further support the concept that lack of CD62L in T-cell subpopulations does not affect the acquired immune response to most antigens.

CD62L down-regulation could be a result of reduced molecular transcription or translation, with membrane molecules targeted to lysosomal destruction or shedding. Because we observed high levels of serum CD62L in 12-week-old *mdx/mdx* mice, we considered proteolytic cleavage from the cell surface as the most likely alternative. Data from the literature<sup>24,29</sup> and our present results show that CD62L is required for T-cell migration to non-lymphoid tissues, although we and others have observed that LFA-1 seems to be more important.<sup>23</sup> Studies using CD62L<sup>-/-</sup> mice showed that leukocytes, including T cells, have significantly reduced ability to roll and enter sites of inflammation, which blunts inflammatory responses.<sup>53</sup> Moreover, anti-CD62L antibody administration suppressed clinical signs and T-lymphocyte infiltration in the central nervous system in an experimental autoimmune encephalomyelitis model.<sup>54</sup> Based on studies using a septic shock model, Chalaris et al<sup>55</sup> also proposed that rapid CD62L endoproteolytic release from T-cell surface modulates lymphocyte ability to migrate and enter sites of inflammation. These data further support that CD62L is necessary for T-cell rolling along the endothelium of blood vessels and for subsequent migration.

Our *in vitro* and *in vivo* results show that P2X7 activity led to CD62L shedding in 12-week-old *mdx/mdx* mice. On the other hand, although C57BL/10 and *mdx/mdx* mice expressed similar levels of P2X7, ATP<sub>e</sub>-induced membrane permeabilization was increased only in 6-week-old *mdx/mdx* mice. We expected a different result, that permeabilization would be increased also in 12-week-old *mdx/mdx* mice, concomitant with P2X7-induced CD62L shedding. However, this is not the first finding of receptor expression, intracellular biochemical pathways, and resultant cellular responses indepen-

dently triggered by P2X7 agonistic stimuli. For example, we observed previously that both *T. cruzi*-infected and noninfected C57BL/6 thymocytes expressed P2X7, but agonistic stimulus did not induce a Ca<sup>2+</sup> signal or permeabilization in control mice, which acquired these functions only after infection.<sup>43</sup> In *mdx/mdx* mice, Young et al<sup>56</sup> found increased expression of P2X7 in dystrophic skeletal muscles, concomitant with higher levels of phospho-ERK1/2 and calcium influx induced by ATP<sub>e</sub>; however, sustained activation of P2X7 by ATP<sub>e</sub> did not induce pore formation in these cells. Together, these data show that pore formation and other P2X7 signaling pathways can be dissociated.

BBG treatment was efficient in blocking P2X7-dependent CD62L shedding and membrane permeabilization. In terms of an *in vivo* treatment, however, we do not know other possible activities of BBG over P2X7 function in other cell types, such as macrophages and mast cells that migrate to muscles, and even over other P2 receptor-dependent pathways. Regarding T cells, sustained expression of CD62L allowed cell migration to cardiac muscle and induced cardiac and skeletal lesions for 2 weeks after BBG treatment, as ascertained by CK-NAC and CK-MB. These data are in agreement with other studies showing that T cells increase pathology<sup>11,12,14</sup> and corroborate the importance of P2X7 and selectins to T cell-dependent muscle damage in DMD. However, we do not know whether the treatment also affected other cell types, inducing increased migration of other leukocyte subpopulations to the muscles, which could lead to more tissue damage. Nonetheless, after 3 weeks of treatment, when the mice were 12 weeks of age, we found no differences in CK levels between BBG-treated and untreated *mdx/mdx* mice, despite the migration of more T cells to the heart. This lack of difference may be due to a reduced functional effector activity of T cells, because we found that <10% of harvested cardiac T cells from 12-week-old *mdx/mdx* mice retain CD2 and CD44<sup>high</sup> on cell membrane, unlike 6-week-old mice, which showed higher levels of both molecules (data not shown).

To our knowledge, *mdx/mdx* mice were the first experimental model of *T. cruzi* infection that induced a nonlymphocytic myocarditis. C57BL/10 infected mice, as well as Chagas' disease patients and other experimental models, have inflammatory foci composed mostly of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.<sup>57</sup> Although it is still not completely known which cytotoxic pathways and cells induce cardiomyocyte death in the infection, it is largely accepted that T cells are mainly responsible for cell death and inflammation. In 12-week-old *mdx/mdx* mice, however, T cell competence to interact with endothelial cells is apparently so inefficient that, even after infection, most of these cells were still not able to reach the muscle. Even though the infection induced a new assortment of alterations in the immune system of *mdx/mdx* mice, it is noteworthy that T-cell migration to damaged muscles was actively prevented.

The present findings suggest that blood T cells from 12-week-old *mdx/mdx* mice lack the necessary repertoire of adhesion molecules, which may be, at least in part,



responsible for the paucity of T cells found in muscles of *mdx/mdx* mice.

### Acknowledgments

We thank Marcelo Meuser Batista for infection of the mice and Dr. Robson Coutinho Silva for Western blotting support.

### References

- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A: Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003, 2:731–740
- Ehmsen J, Poon E, Davies K: The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 2002, 115:2801–2803
- Waite A, Tinsley CL, Locke M, Blake DJ: The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann Med* 2009, 41:344–359
- Fayssol A, Orlikowski D, Nardi O, Annane D: Atteintes cardiaques au cours de la myopathie de Duchenne [Cardiac involvement in Duchenne muscular dystrophy]. *Presse Med* 2008, 37:648–653
- Fukunaga H, Sonoda Y, Atsuchi H, Osame M: [Respiratory failure and its care in Duchenne muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 1991, 31:154–158
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ: X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:1189–1192
- Clafin DR, Brooks SV: Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, 294:C651–C658
- Deconinck N, Dan B: Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol* 2007, 36:1–7
- Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG: A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mice. *J Cell Biol* 2001, 155:123–131
- Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, Miceli MC, Spencer MJ: Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- $\beta$ . *J Clin Invest* 2009, 119:1583–1594
- Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG: Helper (CD4<sup>+</sup>) and cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* 2001, 98:235–243
- Morrison J, Palmer DB, Cobbold S, Partridge T, Bou-Gharios G: Effects of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the *mdx* mouse. *Am J Pathol* 2005, 166:1701–1710
- Mantegazza R, Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Oksenberg JR, Simoncini O, Mora M, Cornelio F, Steinman L: Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. Restricted V alpha/beta rearrangements may indicate antigen-driven selection. *J Clin Invest* 1993, 91:2880–2886
- Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG: Myonuclear apoptosis in dystrophic *mdx* muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest* 1997, 99:2745–2751
- Dalakas MC: Review An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011, 37:226–242
- Fasth AE, Dastmalchi M, Rahbar A, Salomonsson S, Pandya JM, Lindroos E, Nennesmo I, Malmberg KJ, Söderberg-Nauclér C, Trollmo C, Lundberg IE, Malmström V: T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells. *J Immunol* 2009, 183:4792–4799
- Zuidema MY, Zhang C: Ischemia/reperfusion injury: the role of immune cells. *World J Cardiol* 2010, 2:325–332
- de Oliveira GM, Diniz RL, Batista W, Batista MM, Bani Correa C, de Araújo-Jorge TC, Henriques-Pons A: Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2007, 171:79–86
- Gómez RM, Rinehart JE, Wollmann R, Roos RP: Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced cardiac and skeletal muscle disease. *J Virol* 1996, 70:8926–8933
- Huber SA, Job LP: Cellular immune mechanisms in Coxsackievirus group B, type 3 induced myocarditis in Balb/C mice. *Adv Exp Med Biol* 1983, 161:491–508
- Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994, 84:2068–2101
- Langer HF, Chavakis T: Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 2009, 13:1211–1220
- Denucci CC, Mitchell JS, Shimizu Y: Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit Rev Immunol* 2009, 29:87–109
- Hickey MJ, Forster M, Mitchell D, Kaur J, De Caigny C, Kubes P: L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *J Immunol* 2000, 165:7164–7170
- Rosen SD: Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004, 22:129–156
- Laudanna C, Bolomini-Vittori M: Integrin activation in the immune system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009, 1:116–127
- Ley K, Kansas GS: Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev* 2004, 4:325–335
- Ager A: Regulation of lymphocyte migration into lymph nodes by high endothelial venules. *Biochem Soc Trans* 1997, 25:421–428
- Graifer JJ, Koderer M, Steeber DA: L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci* 2009, 56:141–147
- Uchimura K, Rosen SD: Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol* 2006, 27:559–565
- Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B, Steinhausen M, Coggeshall KM, Linderkamp O, Lang F: L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:15376–15381
- Kahn J, Ingraham RH, Shirley F, Migaki GI, Kishimoto TK: Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *J Cell Biol* 1994, 125:461–470
- Killock DJ, Ivetić A: The cytoplasmic domains of TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J* 2010, 428:293–304
- Jung TM, Dailey MO: Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol* 1990, 144:3130–3136
- Sengstake S, Boneberg EM, Illges H: CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. *Int Immunol* 2006, 18:1171–1178
- Stoddart JH Jr, Jasuja RR, Sikorski MA, von Andrian UH, Mier JW: Protease-resistant L-selectin mutants. Down-modulation by cross-linking but not cellular activation. *J Immunol* 1996, 157:5653–5659
- Tu L, Poe JC, Kadono T, Venturi GM, Bullard DC, Tedder TF, Steeber DA: A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J Immunol* 2002, 169:2034–2043
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G: The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 1996, 272:735–738
- Coutinho-Silva R, Persechini PM: P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am J Physiol* 1997, 273:C1793–C1800
- Wiley JS, Gargett CE, Zhang W, Snook MB, Jamieson GP: Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X7 channel. *Am J Physiol* 1998, 275:C1224–C1231
- Humphreys BD, DUBYAK GR: Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol* 1998, 64:265–273
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F: NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* 2009, 182:2898–2908
- Cascabulho CM, Menna-Barreto RF, Coutinho-Silva R, Persechini PM, Henriques-Pons A: P2X7 modulatory web in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2008, 103:829–838

44. Stamper HB Jr, Woodruff JJ: Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 1976, 144:828–833
45. Araújo-Jorge TC, Sampaio EP, De Souza W, Meirelles Mde N: Trypanosoma cruzi: the effect of variations in experimental conditions on the levels of macrophage infection in vitro. *Parasitol Res* 1989, 75:257–263
46. Guerron AD, Rawat R, Sali A, Spurney CF, Pistilli E, Cha HJ, Pandey GS, Gernapudi R, Francia D, Farajian V, Escolar DM, Bossi L, Becker M, Zerr P, de la Porte S, Gordish-Dressman H, Partridge T, Hoffman EP, Nagaraju K: Functional and molecular effects of arginine butyrate and prednisone on muscle and heart in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2010, 5:e11220
47. Haba R, Shintani N, Onaka Y, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Baba A, Hashimoto H: Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: possible role of activation of the central amygdala. *Behav Brain Res* 2012, 228:423–431
48. 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, 14:491–496
49. 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 Lett* 2002, 520:18–24
50. 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. *Am J Pathol* 2000, 156:1789–1796
51. Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP: Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci* 1996, 135:10–17
52. Villalta SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B, Tidball JG: Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet* 2011, 20:790–805
53. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P: L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 1995, 181:2259–2264
54. Archelos JJ, Jung S, Rinner W, Lassmann H, Miyasaka M, Hartung HP: Role of the leukocyte-adhesion molecule L-selectin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 1998, 159:127–134
55. Chalaris A, Adam N, Sina C, Rosenstiel P, Lehmann-Koch J, Schirmacher P, Hartmann D, Cichy J, Gavrilova O, Schreiber S, Jostock T, Matthews V, Häslér R, Becker C, Neurath MF, Reiss K, Saftig P, Scheller J, Rose-John S: Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* 2010, 207:1617–1624
56. Young C, Brutkowski W, Lien CF, Arkle S, Lochmüller H, Zablocki K, Górecki DC: P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: Relationship to pathology and potential target for treatment. *J Cell Mol Med* 2012, 16:1026–1037
57. Henriques-Pons A, Oliveira GM, Paiva MM, Correa AF, Batista MM, Bisaggio RC, Liu CC, Cotta-De-Almeida V, Coutinho CM, Persechini PM, Araújo-Jorge TC: Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in Trypanosoma cruzi infection. *Int J Exp Pathol* 2002, 83:67–79