

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN**

**EFEITO DE DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS SOBRE A**  
**EXPRESSÃO GÊNICA E A ATIVIDADE DE METALOPROTEASES**  
**NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

**SÃO CARLOS – SP**

**2008**

**JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN**

**EFEITO DE DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS SOBRE A  
EXPRESSÃO GÊNICA E A ATIVIDADE DE METALOPROTEASES  
NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra Tania de Fátima Salvini

Apoio Financeiro: CNPQ

SÃO CARLOS – SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D962ed

Durigan, João Luiz Quagliotti.

Efeito de diferentes modelos experimentais sobre a expressão gênica e a atividade de metaloproteases no músculo esquelético / João Luiz Quagliotti Durigan. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

156 f.

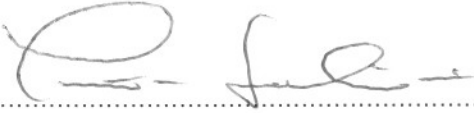
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Reabilitação. 2. Asma. 3. Alternagina-C. 4. Regeneração muscular. 5. Exercícios físicos. 6. Biologia molecular. I. Título.

CDD: 617.03 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de João Luiz Quagliotti Durigan

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania de Fátima Salvini ..... 

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Ferreira de Souza ..... 

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maeli Dal Pai Silva ..... 

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Audrey Borghi e Silva ..... 

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elen Haruka Miyabara ..... 

***BANCA EXAMINADORA :***

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tania Fátima Salvini (PPG-FT e CF – UFSCAR - Orientadora)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dulce Helena Ferreira de Souza (PPG-CF - UFSCAR)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Audrey Borghi e Silva (PPG-FT - UFSCAR)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Anna Raquel Silveira Gomes (PPG-EF - UFPR)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maeli Dal Pai Silva (PPG-IB- UNESP)

***SUPLENTES:***

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elen Haruka Miyabara (PPG-FT - UNICID)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Ozores Polacow (PPG-FT - UNIMEP)

*“Eu mantenho comigo seis servos honestos,  
Eles ensinaram-me tudo o que sei,  
Seus nomes são O que, Por que e Quando,  
Como, Onde e Quem.”*

*Kipling (The Elephant's Child)*

## **DEDICATÓRIA**

A Deus pela minha vida e por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, Maria Ivone Quaglioti Durigan e Victório Durigan e a minha madrinha, Maria Irma Qualiotti, que me incentivaram e auxiliaram em todos os momentos, e principalmente pela oportunidade que me proporcionaram na realização de mais um grande sonho.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À Tania de Fátima Salvini,

Por me aceitar no seu laboratório sem me conhecer; por respeitar as minhas limitações e me ensinar a superá-las; por me mostrar todos os caminhos da pesquisa; por me ensinar que política é mais importante que a técnica; pela proposta e colaboração na realização de todos os estudos, pelos conselhos e pela grande amizade. Certamente a sua competência está relacionada com o meu crescimento profissional. Serei eternamente grato. Muito Obrigado!



## AGRADECIMENTOS

Aos meus grandes e velhos amigos (Além dos Paranaenses, os Paulistanos e também os Paraibanos) pela amizade incondicional, pois sempre, sabia a quem confiar.

À grande amiga Sabrina Messa Peviani. Desde o primeiro dia que eu te conheci eu tinha certeza que seria uma grande amiga. Obrigado por toda ajuda durante o doutorado. Desde a primeira “pipetada” até a interpretação de uma curva de PCR. Agradeço também, pois eu aprendi com você que num grupo de pesquisa todos precisam se respeitar. Cada pessoa possui qualidades e defeitos e temos que respeitar isso. Seria uma grande felicidade trabalhar com você novamente. Você tem duas qualidades que estão em extinção, consegue ser competente e amiga (sincera). Quem sabe um dia estaremos na mesma bancada novamente. Seja muito feliz, do fundo do meu coração.

Ao grande amigo Gabriel Borges Delfino. Percebi o quanto você me considera como um grande amigo no dia que me parabenizou pelo resultado do concurso da UFPB. O seu corpo modulou uma reação autonômica. Seu olho encheu de lágrimas e você me disse “vou sentir saudades”. Infelizmente, vou deixar um grande amigo com um futuro brilhante (garoto nota 10). Mas a vida dá voltas (*Life is a Loop*) e certamente vamos nos encontrar novamente em algum laboratório.

Ao grande amigo Thiago Russo. Obrigado por todo o ensinamento. Você teve muita paciência comigo no início e sempre esteve disposto a ajudar no que fosse necessário. Respeitou as minhas limitações. Tenho certeza que crescemos juntos durante todos esses anos. Desejo também muito sucesso na sua vida.

Ao grande amigo Jonato Prestes, por todas as conversas sobre as vias moleculares e as adaptações musculares inerentes ao treinamento de força. Pelo convívio nesses dois anos e meio. Por respeitar as minhas manias. Seguramente, essa “disciplina” nos ajudou a crescer muito durante o doutorado.

À grande amiga Rita de Cássia Marqueti. Obrigado pela ajuda nesses anos. Sempre disposta a ajudar todos a sua volta. Você é uma pessoa “do bem”. Desejo muito sucesso na sua vida. Que todas as suas expectativas sejam traduzidas em conquistas profissionais e principalmente pessoais. Certamente isso ocorrerá.

À amiga Márcia Cominetti, muito obrigado pela ajuda no trabalho da ALT-C. Sua ajuda na discussão dos dados e elaboração do manuscrito foi de fundamental importância. Também desejo sucesso na sua vida profissional.

Ao amigo Rodolfo Paula Vieira, pela ajuda no trabalho em parceria com o professor Celso e principalmente por todos os conselhos. Obrigado.

À professora Heloísa, por ter aberto o seu laboratório para a minha iniciação na Biologia Molecular e por ter me respeitado mesmo eu sendo um iniciante. Nunca me esquecerei da experiência de apresentar um seminário da sua disciplina. Eu nunca me esforcei tanto para uma apresentação. Espero que tenha sido razoável, pois para mim foi um grande aprendizado e superação. Obrigado por tudo, pelo apoio para a minha felicidade profissional e pessoal.

Ao professor Carlos Castros. Como dizia o Gabriel, o meu “Guru”. O Carlão é uma pessoa fantástica, me acolheu como um filho em São Carlos. Você tem um coração de Ouro. Uma das maiores experiências da minha vida foi dividir a disciplina de Fisiogeral com você. Toda terça-feira eu passava na sua sala antes da aula muito ansioso. Eu tinha certeza que aquele momento era único. Era um momento que eu estava aprendendo muito sobre uma disciplina que eu tenho paixão. Uma disciplina que você domina como poucos. Muito obrigado por me acolher e compartilhar todo o seu conhecimento comigo. Obrigado também, por me ensinar como ser um fisioterapeuta (de verdade). Tenho você no meu coração.

Ao grande amigo Dório, agora colega de trabalho (quem diria...). Os seus conselhos durante o doutorado me confortavam principalmente nos momentos difíceis. Quando sortiei o tema de hidroterapia na prova didática do concurso da UFPB você me deu um grande incentivo e apoio. Os seus conselhos foram de fundamental importância nas minhas conquistas profissionais e pessoais. Agora, que venha João Pessoa!!!

Ao grande amigo Nivaldo Parizotto. Você me ajudou muito durante o estágio. Foi um grande prazer dividir o estágio de fisioterapia geral com você e com o Carlão. Além disso, você me mostrou que é possível ser um grande pesquisador e um grande clínico ao mesmo tempo. Muito obrigado por todos os seus conselhos.

A Teresa pela amizade e inestimável ajuda durante a toda fase experimental. Mas principalmente por todos os momentos de convivência no laboratório, que foram muito agradáveis. Apesar de você ficar nervosa pelas brincadeiras, tenho certeza que “um dia”

você sentirá saudades. Espero que eu tenha sido um aluno que marcou a sua vida. E que um dia você conte as nossas histórias para os futuros alunos da Tania.

Ao professor Celso Carvalho, pela oportunidade de parceria com o nosso laboratório. Obrigado por abrir as portas do seu laboratório para a realização desse trabalho.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado do Laboratório da Professora Tania e Heloísa que sempre me ajudaram no aprendizado de todas as técnicas de laboratório.

À amiga Paula Bosi, Fernando Bosi e Edileide Bosi, obrigado pelo apoio e incentivo nos momentos de dificuldade durante os últimos anos.

À professora, eterna orientadora, grande amiga, Maria Luíza Ozores Polacow, por abrir as “portas” para a realização desse grande sonho e de todas as minhas conquistas profissionais.

À grande amiga Karina Maria Cancellero, por me ensinar como escrever um resumo de congresso. Nunca me esquecerei da sua ajuda durante o mestrado, bem como (Lembra-se do bem como ?) do grande apoio durante o doutorado.

Ao professor e grande amigo Carlos Alberto da Silva, que durante o mestrado me ensinou que na relação aluno/professor, pode surgir uma grande amizade, e é assim que o considero, um grande amigo.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e Fisioterapia da UFSCar pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

A todos os amigos de Pós-Graduação pela agradável convivência.

A todos os membros da minha banca, que aceitaram esse convite, para acrescentarem nesse trabalho.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro, sem esse, seria impossível a execução desse trabalho.

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MANUSCRITO I</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	Resumo.....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	Introdução.....	<b>20</b>
<b>2.3</b>	Material e Métodos.....	<b>22</b>
<b>2.4</b>	Resultados.....	<b>27</b>
<b>2.5</b>	Discussão.....	<b>29</b>
<b>2.6</b>	Conclusão.....	<b>32</b>
<b>2.7</b>	Referências Bibliográficas.....	<b>32</b>
<b>2.8</b>	Tabelas.....	<b>37</b>
<b>2.9</b>	Figuras.....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO II</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1</b>	Resumo.....	<b>44</b>
<b>3.2</b>	Introdução.....	<b>45</b>
<b>3.3</b>	Material e Métodos.....	<b>46</b>
<b>3.4</b>	Resultados.....	<b>49</b>
<b>3.5</b>	Discussão.....	<b>50</b>
<b>3.6</b>	Conclusão.....	<b>53</b>
<b>3.7</b>	Referências Bibliográficas.....	<b>53</b>
<b>3.8</b>	Tabela.....	<b>57</b>
<b>3.9</b>	Figura.....	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO III</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1</b>	Resumo.....	<b>61</b>
<b>4.2</b>	Introdução.....	<b>62</b>

<b>4.3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>72</b>
<b>4.6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>77</b>
<b>4.7</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>77</b>
<b>4.8</b>	<b>Tabela.....</b>	<b>83</b>
<b>4.9</b>	<b>Figuras.....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>Apêndice I – Manuscrito submetido ao periódico <i>Respiratory Medicine</i>....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Apêndice II – Manuscrito submetido ao periódico <i>Muscle and Nerve</i>.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Apêndice III – Manuscrito submetido ao periódico <i>Toxicon</i>.....</b>	<b>125</b>

## APRESENTAÇÃO

Ao ingressar no programa de Doutorado da UFSCar, Ciências Fisiológicas, fui convidado a trabalhar na linha de pesquisa experimental relacionada com a Plasticidade Muscular coordenada pela Prof. Tania Fátima Salvini. O primeiro projeto de pesquisa que cooperei foi intitulado “O efeito da eletroestimulação baseada nas modificações de excitabilidade muscular sobre a expressão gênica, variáveis elétricas e área de secção transversa do músculo desnervado de ratos”. Como resultado desse estudo, houve uma publicação:

- Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Salvini TF. *Muscle Nerve*. 2008;35(5):593-600.

Está fase inicial foi de grande importância para a minha formação, pois possibilitou o aprendizado das técnicas relacionadas com a biologia molecular. Posteriormente, com os resultados prévios desse primeiro estudo, foi proposto outro trabalho como objetivo avaliar o efeito da eletroestimulação e do alongamento intermitentes, bem como sua associação, sobre a expressão gênica da MyoD, atrogina-1 e miostatina, atividade de metaloproteases e a área de secção transversa da fibra muscular desnervada de ratos. Com os resultados desse estudo, 2 artigos científicos foram elaborados e serão submetidos a periódicos internacionais indexados:

- Effects of stretching, electrical stimulation and their association in the metalloproteinase-2 gene expression and activity during early denervation phase in rat skeletal muscle increase. Peviani SM, Russo TL, Durigan JL, Vieira BS, Pinheiro CM, Galassi MS, Salvini TF, e
- Electrical stimulation, stretching and their combination regulate differently genic expression in rat denervated muscle. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Salvini TF.



Além disso, como parte do doutorado foi instituída duas parcerias que resultaram em dois projetos distintos. O primeiro estudo resultou do início de uma cooperação com o grupo de pesquisa da Universidade de São Paulo sob a coordenação do professor Celso Ricardo Carvalho. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes intensidades do treinamento físico aeróbio na expressão gênica e área de secção transversa do músculo tibial anterior, bem como na atividade de metaloproteases do músculo diafragma em camundongos submetidos à inflamação pulmonar alérgica crônica. Os resultados deste estudo, apresentados no corpo da Tese em forma de artigos científicos, foram submetidos a periódicos internacionais indexados:

Manuscrito número 1 – submetido ao periódico *Respiratory Medicine* (Apêndice I):

- Effects of aerobic training on atrophy gene expression in mouse skeletal muscle with chronic allergic lung inflammation. Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Duarte AC, Vieira RP, Martins MA, Carvalho CRF, Salvini TF.

Manuscrito número 2 - submetido ao periódico *Muscle Nerve* (Apêndice II):

- Aerobic physical training increases MMPs activities in diaphragm muscle of mice with chronic allergic airway inflammation. Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Duarte AC, Vieira RP, Martins MA, Carvalho CRF, Salvini TF.

Esse primeiro estudo terá continuidade com a parceria entre os dois grupos de pesquisa com objetivo de investigar os efeitos do treinamento aeróbio na inflamação pulmonar crônica (animais submetidos inicialmente a inflamação pulmonar crônica e posteriormente ao treinamento aeróbio), bem como no modelo de enfisema pulmonar em camundongos.

Na segunda parceria, estudamos, em colaboração com a professora Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo vinculada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, os possíveis efeitos da desintegrina alternagina-C (ALT-C) na regeneração muscular em ratos. Como resultado desse projeto, foi elaborado um artigo científico apresentado no corpo da Tese.

Manuscrito número 3 - submetido ao periódico *Toxicon* (Apêndice III):

- Effects of Alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and metalloproteinase activity in regenerating skeletal muscle. Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Delfino GB, Cominetti MR, Selistre-de-Araujo HS, Salvini TF.

Os resultados iniciais desse primeiro estudo fornecem subsídios para a realização de outros estudos *in vivo* utilizando uma curva dose-resposta para avaliar um possível efeito benéfico da ALT-C no processo de regeneração muscular.

**MANUSCRITO I**

## **EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO NA EXPRESSÃO DE GÊNES ATRÓFICOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA CRÔNICA**

João Luiz Quagliotti Durigan<sup>1</sup> (MS), Sabrina Messa Peviani<sup>1</sup> (MS), Thiago Luiz Russo<sup>1</sup> (MS), Anna Cecília Duarte<sup>2</sup> (MS), Rodolfo Paula Vieira<sup>3</sup> (PhD), Milton Arruda Martins<sup>4</sup> (PhD), Celso Ricardo Fernandes Carvalho<sup>2</sup> (PhD), Tania Fátima Salvini<sup>1</sup> (PhD).

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Fisioterapia, <sup>3</sup> Departamento de Patologia, e <sup>4</sup> Departamento de Medicina, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. Avenida Doutor Arnaldo, 455, 1º Andar, Sala 1216, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil.

**Título resumido:** Expressão gênica muscular e asma

### **Agradecimentos:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brasil (Processo nº 05/04413-1 e 05/5474-3). J. L. Q. Durigan é bolsista de Doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); T. L. Russo, S. M. Peviani e Anna Cecília Duarte são bolsistas de Doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); e Rodolfo P. Vieira é bolsista de Pós-Doutorado da FAPESP. Os autores também são gratos a Tereza F. Piassi.

**Autor correspondente:** Tania Fátima Salvini. Fone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail: tania@power.ufscar.br

## RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da inflamação pulmonar alérgica crônica e do treinamento aeróbio de baixa e moderada intensidades em esteira ergométrica na área de secção transversa (AST) e nos níveis de RNAm da atrogina-1 e MuRF1 no músculo tibial anterior (TA) de camundongo. Foram utilizados 30 animais, divididos em 6 grupos: (1) animais não sensibilizado e não treinado (controle), (2) sensibilizado com ovalbumina (OA); (3) não sensibilizado e treinado a 50% da velocidade máxima - baixa intensidade (Ex50%), (4) não-sensibilizado e treinado a 75% da velocidade máxima - intensidade moderada (Ex75%); (5) sensibilizado com OA e treinado a 50% (OAEx50%), (6) sensibilizado com OA e treinado a 75% (OAEx75%). Não houve diferença na AST entre os grupos. Além disso, não houve diferença na expressão da atrogina-1 e MuRF1 entre os grupos controle e OA. No entanto, todos os grupos treinados apresentaram diminuição da expressão desses genes, quando comparado com os grupos controle e OA. Desse modo, o curto período de OA não induziu atrofia muscular no TA de camundongos. Além disso, o treinamento aeróbio em esteira, em diferentes intensidades regulou de forma negativa as vias de atrofia muscular, independentemente da inflamação alérgica pulmonar. Estes resultados iniciais sugerem que o treinamento aeróbio pode ser usado para impedir degradação mioprotéica inerente ao desuso muscular periférico em doenças respiratórias.

**Palavras-chave:** treinamento aeróbio, asma, genes atrofícos, camundongo, atrofia muscular.

## INTRUDUÇÃO

A asma é uma inflamação crônica relacionada com a redução da função pulmonar e também com a redução da capacidade física (Gina et al., 2006). Vários estudos experimentais e clínicos sugerem que a redução da função pulmonar pode estar relacionada à inflamação e remodelamento das vias aéreas (Kuhn et al., 2000; Matsumoto et al., 2005). Por outro lado, a redução na atividade física, considerada secundária a redução da função pulmonar, está fortemente relacionada com o desuso muscular periférico (Mancuso et al., 2006). Esses efeitos secundários também foram demonstrados em crianças e em adultos asmáticos (Lucas e Platts-Mills, 2005).

Recentemente, dois estudos demonstraram o aumento da expressão de genes relacionados à atrofia muscular em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Doucet et al. (2007) relataram um aumento nos níveis de RNAm da atrogina-1 e MurRF1 no músculo quadríceps em pacientes com DPOC. Além disso, Ottenheijm et al. (2006) também demonstraram um aumento na expressão gênica da atrogina-1 no músculo diafragma em pacientes com DPOC moderada. A atrogina-1 e MurRF1 são marcadores moleculares envolvidos na atrofia muscular e estão substancialmente aumentados durante várias condições de desuso e caquexia muscular, como desnervação, imobilização, câncer, septicemia, envelhecimento, entre outros (Lecker et al., 1999; Lecker et al., 2004; McKinnell e Rudnicki, 2004). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos no desuso muscular em pacientes asmáticos ainda não são conhecidos.

O treinamento aeróbio tem sido recomendado como um tratamento eficaz no controle dos sintomas em pacientes asmáticos. Esse tipo de treinamento promove vários efeitos benéficos como o aumento no desempenho físico e na capacidade ventilatória, redução dos sintomas relacionados à asma, como o broncoespasmo eliciado pelo

exercício físico, bem como o uso de esteróides inaláveis (Carroll e Sly, 1999; Neder et al., 1999; Reid, 2001; Fanelli et al., 2007). Outros autores demonstraram que os pacientes asmáticos submetidos a um programa de treinamento aeróbio também apresentaram melhora na força e função dos músculos periféricos e respiratórios. (Counil et al., 2003; Counil e Voisin, 2006). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa melhora ainda não estão descritos.

Recentemente, foi demonstrado que animais previamente submetidos à inflamação alérgica crônica das vias aéreas apresentaram redução na inflamação e remodelamento pulmonar após o treinamento aeróbio em esteira (Vieira et al., 2007). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do treinamento aeróbio antes do desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar no músculo periférico em animais asmáticos. Tal fato pode ser importante, pois a fraqueza muscular está presente em pacientes asmáticos, (McComas, 1994; Goldney et al., 2003) sendo interessante conhecer se o treinamento aeróbio pode fornecer algum tipo proteção antes da indução da asma.

Baseado nesses fatos, a hipótese desse estudo foi que a inflamação alérgica pulmonar crônica poderia reduzir a área de secção transversa (AST) das fibras musculares e aumentar a expressão da atrogina-1 e MuRF1 no músculo tibial anterior (TA). Outra hipótese foi que o treinamento aeróbio aplicado antes da indução da inflamação alérgica pulmonar crônica poderia reduzir esses efeitos. Considerando que diferentes intensidades de treinamento aeróbio induzem diferentes adaptações na respostas inflamatória em camundongos asmáticos, (Pastva et al., 2004; Ram et al., 2005; Vieira et al., 2007) o presente estudo analisou o efeitos de duas diferentes intensidades de treinamento.

Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do treinamento aeróbio em esteira (intensidades leve e moderada) antes e durante a inflamação alérgica pulmonar crônica na AST das fibras musculares e nos níveis de RNAm da atrogina-1 e MuRF1 no músculo TA de camundongos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Esse estudo foi aprovado e revisado pelo comitê de ética de animais da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo e foi desenvolvido de acordo com o guia nacional para cuidados e manejo para animais de laboratório (National Research Council, 1996).

### ***Animais***

Foram utilizados 30 camundongos da linhagem Balb/c, com aproximadamente 120 dias de idade ( $28.5 \pm 0.8\text{g}$ ), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas e alimentação à vontade em ciclo claro-escuro de 12 horas.

### **Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em 6 grupos, com 5 animais em cada grupo. Os grupos foram classificados em: controle salina (Controle), ovalbumina (OA), salina e exercício leve (Ex50%), salina e exercício moderado (Ex75%), ovalbumina e exercício leve (OAEx50%), ovalbumina e exercício moderado (OAEx75%).



### **Teste ergométrico e programa de condicionamento físico**

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (Modelo KT 4000, marca Inbramed, RS, Brasil) por um período de 12 semanas. Na semana anterior ao início do treinamento, os animais foram submetidos a 3 dias de adaptação na esteira ergométrica que consistia em 15 minutos de atividade a uma velocidade de 0.2 km/h. Quarenta e oito horas após o terceiro dia de adaptação, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo. O teste consistiu em 5 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0.2 km/h que era aumentada em 0.1 km/h a cada 2,5 minutos até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiam permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos (Vieira et al., 2007). A intensidade do treinamento foi calculada a partir da velocidade máxima atingida no teste. Dessa forma, os camundongos foram treinados nas intensidades leve e moderada (50% e 75%, respectivamente), 60 minutos por sessão, 5 vezes por semana, durante 12 semanas (8 semanas de treinamento antes da sensibilização e 4 semanas após a exposição a OA ou salina) (Vieira et al., 2007). O teste foi repetido no período pré-sensibilização (após 08 semanas de treinamento) e pós-sensibilização (após as 12 semanas do protocolo de treinamento físico e sensibilização - 72 horas antes da eutanásia).

### **Sensibilização e inflamação pulmonar alérgica crônica**

O período de sensibilização alérgica crônica iniciou-se na nona semana após o início do treinamento aeróbio e teve duração de 4 semanas. Os camundongos foram

sensibilizados por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) de ovalbumina (OA, 20 µg por animal) diluída em soro fisiológico (NaCl 0.9%) nos dias 0 e 14 ou com solução salina. A partir da última semana de sensibilização, foram iniciadas as inalações de OA (1%) diluída em soro fisiológico, 4 vezes na semana, durante 30 minutos, até o final da décima segunda semana.

Para o procedimento de inalação, os camundongos foram colocados numa caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplado a um nebulizador ultrassônico (modelo pulmoclear II luxo, marca Soniclear, SP, Brasil), e submetidos à inalação de um aerossol de OA preparada conforme descrito acima. Os animais não sensibilizados foram inalados com soro fisiológico. A figura 1 mostra o desenho experimental.

### **Anestesia e Eutanásia dos animais**

Após 72 horas do final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados por meio de injeção i.p. (xilazina; 12 mg/Kg/peso corporal; e cetamina; 95 mg/Kg/peso corporal) para a retirada dos músculos. Posteriormente, todos foram eutanasiados por overdose anestésica.

### **Retirada dos músculos**

Após o período experimental, os camundongos foram pesados, e os TAs (D e E) de todos os animais foram retirados e pesados com o animal anestesiado. O TA esquerdo foi utilizado para a análise morfométrica e o TA direito foi empregado para análise da expressão gênica. Todos os músculos foram congelados e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **Análise Histológica**

Da região medial de todos os músculos TA esquerdos foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (10  $\mu\text{m}$ ) em micrótomo criostato ( $-25^{\circ}\text{C}$ ). As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina para avaliação morfológica.

A análise da AST das fibras musculares foi realizada utilizando-se microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) acoplado com uma câmera digital (Sony DSC S75, Tokyo, Japan) e o software AxionVision 3.0.6 SP4 (Zeiss, Jena, Germany). Foi mensurada a AST de cem fibras musculares de cada TA, escolhidas aleatoriamente em um corte histológico (Peviani et al., 2007; Russo et al., 2008).

## **Extração de RNA total**

A extração de RNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). A densidade óptica (DO) das amostras foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (razão  $\geq 1.8$ ). Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (25 $\mu\text{g}$  de RNA total) em gel denaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídeo.

## **Transcrição reversa (RT)**

Para a reação de RT foi utilizado: 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, 1  $\mu\text{l}$  de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água (para volume de 10,5 $\mu\text{l}$ ) que foram incubados a  $70^{\circ}\text{C}$

por 10 min e então resfriados rapidamente em gelo. Adicionou-se a cada amostra uma mistura contendo: 1µl de dNTPmix contendo 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> de cada base (APT, CTP, GTP e TTP) (Promega, Madison, WI), 2µl de DTT 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, 4µl de 5x buffer e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI) e então as amostras foram reaquecidas a 42°C por 60 min e a 95°C por 10 min. A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida por meio da realização de gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

### Primers

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers para as reações de polimerase em cadeia, foram: GAPDH e atrogina-1 construídos a partir do software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA); e MuRF1 que foi retirado de Dehoux et al. (2003). As seqüências utilizadas foram atrogina-1 (senso: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; antisenso: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT), MuRF1 (senso: TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG; antisenso: TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG) e GAPDH (senso: CCACCAACTGCTTAGCCC; antisenso: GCCAAATTCGTTGTCATACC).

### Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq)

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por polimerase em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR *real-time*, Rotor Gene 3000, Cobert Research). As amplificações por

PCRq foram efetuadas utilizando-se 40ng/μl de cDNA adicionado a uma reação contendo 25μl de SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) master mix, 180nM dos primers (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 50μl, dividido em dois tubos (duplicata). As condições de ciclagem consistiram em: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos com duas etapas, 15s de desnaturação à 94°C; 60s de anelamento à 56°C para o GAPDH, 56°C para a Atrogina-1 e 64°C para o MuRF1, seguido de 72°C por 60s e 72°C por 10min.

Após a reação de PCRq, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (*Ct*, *cycle threshold*) de cada amostra, que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica da Atrogina-1 e MuRF1. A expressão gênica foi normalizada pelo gene GAPDH que foi utilizado como controle interno, de acordo com outros autores (Luden et al., 2007). Além disso, foi utilizado um controle negativo contendo RNA, mas não M-MLV RT, para garantir que o produto do PCRq não estava amplificando DNA genômico (Schwartz et al., 2005).

### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos aos testes de Homogeneidade (Teste de Levene) e Normalidade. Em seguida, foi aplicada análise de variância ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey para detectar as diferenças entre os diferentes grupos. O nível de significância mínimo estabelecido foi de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Peso corporal, peso do músculo TA e AST**

Todos os grupos apresentaram um aumento no peso corporal final quando comparado o peso inicial ( $p < 0.05$ ), porém não houve diferença estatística entre o peso final nos diversos grupos (tabela 1). Apesar de redução do peso do TA nos grupos OAE<sub>50%</sub> e OAE<sub>75%</sub>, não houve diferença significativa da AST entre os grupos analisados.

### **Capacidade aeróbia (Endurance)**

A tabela 2 mostra os resultados dos testes ergométricos inicial (antes do protocolo de treinamento físico e sensibilização), pré-sensibilização (após 08 semanas de treinamento) e pós-sensibilização (após as 12 semanas do protocolo de treinamento físico e sensibilização) dos grupos experimentais. Não houve diferença de desempenho no teste inicial, demonstrando que todos os animais começaram o treinamento nas mesmas condições físicas. Como esperado, os grupos controle e OA não apresentaram diferenças entre os três testes, já que não realizaram treinamento físico. Por outro lado, os grupos Ex<sub>50%</sub>, Ex<sub>75%</sub>, OAE<sub>50%</sub> e OAE<sub>75%</sub> apresentaram melhoras significativas de desempenho entre os testes inicial e pré-sensibilização ( $P < 0,05$ ) e mantiveram este melhor desempenho no teste pós-sensibilização, não havendo diferença entre estes dois testes finais.

### **Expressão gênica da atrogina-1 e MuRF1**

A expressão gênica da atrogina-1 não foi alterada no grupo OA quando comparado ao grupo controle (Figura 3;  $P > 0.05$ ). No entanto, o treinamento aeróbio promoveu redução da expressão da atrogina-1 no músculo TA em todos os grupos experimentais comparados ao controle e ao grupo OA (Figura 3;  $P < 0.05$ ).

Resultados similares foram encontrados na expressão gênica do MuRF1, que não foi alterada no grupo OA quando comparado com o controle (Figura 4;  $P > 0.05$ ). Ademais, foi observada uma redução na sua expressão no músculo TA em todos os grupos experimentais após o treinamento aeróbio quando ao controle e ao grupo OA (Figura 4;  $P < 0.05$ ).

## **DISCUSSÃO**

Esse estudo analisou os efeitos do treinamento aeróbio em esteira em diferentes intensidades nos marcadores moleculares relacionados à atrofia muscular no músculo periférico em modelo animal de asma. A análise dos dados revelou que a inflamação alérgica pulmonar crônica não modificou a AST, bem como a expressão gênica da atrogina-1 e MuRF1 nos músculos TA. Entretanto, todos os animais submetidos ao treinamento aeróbio apresentaram redução na expressão desses genes. Tal fato sugere um possível efeito protetor do treinamento aeróbio contra a atrofia muscular observada em pacientes com doenças respiratórias, como a asma, durante a reabilitação fisioterapêutica.

Recentemente, estudos prévios demonstraram um aumento dos marcadores moleculares relacionados à atrofia muscular em pacientes com DPOC (Ottenheim et al., 2006; Doucet et al., 2007). Doucet e colaboradores (2007) observaram aumento na expressão gênica da atrogina-1 e MuRF1 no músculo quadríceps femoral em pacientes com DPOC. Esses trabalhos demonstraram que esses marcadores de atrofia podem estar envolvidos nos mecanismos moleculares da atrofia e fraqueza muscular nesses pacientes, uma vez que o aumento da expressão gênica da atrogina-1 e MuRF1 estão

diretamente relacionados com a caquexia e atrofia por desuso muscular (Lecker et al., 1999; Lecker et al., 2004; McKinnell e Rudnicki, 2004).

Interessantemente, os resultados do presente trabalho demonstraram que o curto período de inflamação alérgica pulmonar crônica não induziu atrofia muscular, bem como não modificou os marcadores moleculares relacionados à atrofia no músculo TA de camundongos. Esses resultados não corroboram aos apresentados por Doucet e colaboradores (2007) e algumas considerações relacionadas com a metodologia empregada podem justificar essas diferenças. Provavelmente, essas diferenças podem estar relacionadas com os modelos distintos de doença pulmonar avaliados, uma vez que o presente trabalho avaliou um modelo de camundongos asmáticos, enquanto Doucet et al. (2007) avaliou pacientes portadores de DPOC. Além disso, a ausência dos marcadores de atrofia no grupo OA também pode estar relacionada ao curto período (4 semanas) de sensibilização alérgica. Possivelmente, esse período não foi suficiente para induzir atrofia muscular.

Adicionalmente, esse estudo avaliou o músculo TA, que é predominantemente constituído por fibras do tipo II. Entretanto, seria de extrema importância examinar um músculo constituído principalmente por fibras do tipo I, já que estes são mais suscetíveis à atrofia do que os músculos compostos por fibras do tipo II (Lieber, 2002). Dessa forma, futuros estudos são necessários para avaliar se um músculo predominantemente composto por fibras do tipo I é mais susceptível à atrofia em um modelo de asma.

Outro aspecto interessante desses resultados está associado com o modelo animal utilizado no presente estudo. Esse modelo de asma induzida pela ovalbumina tem sido amplamente utilizado em estudos experimentais, pois apresenta algumas similaridades com a asma em humanos, particularmente relacionadas com a inflamação das vias aéreas (Tang et al., 2005). No entanto, não há descrição na literatura se esse



modelo promove atrofia e fraqueza muscular freqüentemente observada em pacientes asmáticos. Os resultados do presente estudo sugerem que apenas 4 semanas de indução de asma em camundongos não foram suficiente para promover atrofia muscular. Estudos futuros com animais submetidos a um longo período de indução de asma são necessários para avaliar se esse modelo promove atrofia muscular em camundongos.

Apesar do treinamento aeróbio em intensidade moderada promover efeitos antiinflamatórios na asma (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007), há escassez de trabalhos que avaliam os efeitos desse tipo de treinamento no músculo periférico nessa doença. Alguns autores demonstraram que o treinamento aeróbio pode ser utilizado para prevenir a atrofia em condições de desuso muscular (Diaz-Herrera et al., 2001; Song et al., 2006). O presente estudo mostrou que o treinamento aeróbio em esteira não alterou a AST das fibras do músculo TA. Tal fato está de acordo com estudos prévios, que também demonstraram que 12 semanas de treinamento aeróbio (75% do VO<sub>2</sub> máximo) não modifica a AST das fibras do músculo TA em ratos jovens (Song et al., 2006).

Embora o presente estudo não evidenciou alterações na AST das fibras do músculo TA após o treinamento aeróbio, outros trabalhos demonstraram que esse treino promove aumento da força e função dos músculos periféricos e respiratórios em pacientes asmáticos (Counil et al., 2003; Counil e Voisin, 2006), fato esse não avaliado nesse estudo. Desse modo, futuros estudos também são necessários para avaliar a força e função muscular após treinamento aeróbio em modelo de camundongo asmático.

Destaca-se ainda que as duas intensidades do treinamento aeróbio (50% e 75%) reduziram os níveis de RNAm da atrogina-1 e MuRF1 no músculo TA nos grupos asmáticos e não asmáticos, quando comparado com o grupo controle. Esses resultados sugerem que o treinamento aeróbio pode promover uma proteção contra a degradação de proteínas musculares, bem como na redução de força muscular inerente a caquexia e

o desuso muscular, freqüentemente presentes em doenças crônicas como a asma. Clinicamente, esses achados podem ser importantes para a reabilitação de doenças respiratórias, uma vez que esse protocolo modificou genes relacionados com as vias da atrofia muscular.

## CONCLUSÃO

Esse estudo sugere que o curto período de inflamação alérgica pulmonar crônica não induz atrofia muscular em modelo de asma. Além disso, o treinamento aeróbio de intensidade leve ou moderada regula de forma negativa essa via de atrofia muscular, independentemente da inflamação alérgica pulmonar crônica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CARDIOVASCULAR & PULMONARY REHABILITATION. **Guidelines of pulmonary rehabilitation programs**. 2.ed. Champaign: Human Kinetics, 1998.

BRITISH THORACIC SOCIETY STANDARDS OF CARE SUB-COMMITTEE ON PULMONARY REHABILITATION. **Thorax**, v.56, p.827-834, 2001.

CAROLL, N.; SLY, P. Exercise training as an adjunct to asthma management? **Thorax**, v.54, p.190-191, 1999.

CLARK, C.; COCHRANE, L. Assessment of work performance in asthma for determination of cardiorespiratory fitness and training capacity. **Thorax**, v.43, p.745-749, 1988.

COUNIL, F.P.; VARRAY, A.; MATECKI, S.; BEUREY, A.; MARCHAL, P.; VOISIN, M.; PRÉFAUT, C. Training of aerobic and anaerobic fitness in children with asthma. **J Pediatr**, v.142, p.179-184, 2003.

COUNIL, F.P.; VOISIN, M. Physical fitness in children with asthma. **Arch Pediatr**, v.13, p.1136-1141, 2006.

DIAZ-HERRERA, P.; TORRES, A.; MORCUENDE, J.A.; GARCIA-CASTELLANO, J.M.; CALBET, J.A.; SARRAT, R. Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats. **Histol Histopathol**, v.16, p.29-35, 2001.

DIMITRIJEVIC, M.M.; DIMITRIJEVIC, M.R. Clinical elements for the neuromuscular stimulation and functional electrical stimulation protocols in the practice of neurorehabilitation. **Artif Organs**, v.26, p.256-259, 2002.

DOUCET, M.; RUSSELL, A.P.; LÉGER, B.; DEBIGARÉ, R.; JOANISSE, D.R.; CARON, M.A.; LEBLANC, P.; MALTAIS, F. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.176, p.261-269, 2007.

FANELLI, A.; CABRAL, A.L.B.; NEDER, J.A.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, C.R.F. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatics children. **Med Sci Sports Exerc**, v.39, p.1474-1480, 2007.

GOLDNEY, R.D.; RUFFIN, R.; FISHER, L.J.; WILSON, D.H. Asthma symptoms associated with depression and lower quality of life: a population survey. **Med J Aust**, v.138, p.437-441, 2003.

GOSKER, H.R.; WOUTERS, E.F.; VAN DER VUSSE, G.J.; SCHOLS, A.M. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. **Am J Clin Nutr**, v.71, p.1033-1047, 2000.

KUHN, C.; HOMER, R.J.; ZHU, Z.; WARD, N.; FLAVELL, R.A.; GEBA, G.P.; ELIAS, J.A. Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, .22, p.289-295, 2000.

LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB J**, v.18, p.39-51, 2004.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. **J Nutr**, v.129, p.227-237, 1999.

LIEBER R.L. **Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation**. Philadelphia: Lippincott; 2002.

LUCAS, S.R.; PLATTS-MILLS, T.A. Physical activity and exercise in asthma: relevance to etiology and treatment. **J Allergy Clin Immunol**, v.115, p.928-934, 2005.

LUDEN, N.; JEMIOLO, B.; WHITSETT, D.; TRAPPE, S. Effects of 13 weeks of aerobic training on basal gene expression. **FASEB J**, v.21, p.921-929, 2007.

MANCUSO, C.A.; SAYLES, W.; ROBBINS, L.; PHILLIPS, E.G.; RAVENELL, K.; DUFFY, C.; WENDEROTH, S.; CHARLSON, M.E. Barriers and facilitators to healthy physical activity in asthma patients. **J Asthma**, v.43, p.137-143, 2006.

MATSUMOTO, H.; NIIMI, A.; TAKEMURA, M.; UEDA, T.; MINAKUCHI, M.; TABUENA, R.; CHIN, K.; MIO, T.; ITO, Y.; MURO, S.; HIRAI, T.; MORITA, S.; FUKUHARA, S.; MISHIMA, M. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. **Thorax**, v.60, p.277-281, 2005.

MCCOMAS, A.J. Human neuromuscular adaptations that accompany changes in activity. **Med Sci Sports Exerc**, v.26, p.1498-1509, 1994.

MCKINNELL, I.W.; RUDNICKI, M.A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. **Cell**, v.119, p.907-910, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington: National Academy Press, 1996.

NEDER, J.A.; NERY, L.E.; SILVA, A.C.; CABRAL, A.L.; FERNANDES, A.L. Short-term effects of aerobic training in the clinical management of moderate to severe asthma in children. **Thorax**, v.54, p.202-206, 1999.

OTTENHEIJM, C.A.C.; HEUNKS, L.M.A.; DEKHUIJZEN, R.P.N. Diaphragm adaptations in patients with COPD. **Respir Res**, v.24, p.9-12, 2008.

PASTVA, A.; ESTELL, K.; SCHOEB, T.R.; ATKINSON, T.P.; SCHWIEBERT, L.M. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. **J Immunol**, v.172, p.4520-4526, 2004.

PEVIANI, S.M.; GOMES, A.R.; MOREIRA, R.F.; MORISCOT, A.S.; SALVINI, T.F. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, v.35, p.363-370, 2007.

RAM, F.S.; ROBINSON, S.M.; BLACK, P.N. Effects of physical training in asthma: a systematic review. **Br J Sports Med**, v.34, p.162-167, 2000.

RAM, F.S.; ROBINSON, S.M.; BLACK, P.N.; PICOT, J. Physical training for asthma. **Cochrane Database Syst Rev**, v.19, p. CD001116, 2005.

REID, B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J Appl Physiol**, v.90, p.724-731, 2001.

RUSSO, T.L.; PEVIANI, S.M.; DURIGAN, J.L.; SALVINI, T.F. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, v.37, p.593-600, 2008.

SCHWARTZ, P.H.; NETHERCOTT, H.; KIROV, I.I.; ZIAEIAN, B.; YOUNG, M.J.; KLASSEN, H. Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. **Stem Cells**, v.23, p.1286-1294, 2005.

SONG, W.; KWAK, H.B.; LAWLER, J.M. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. **Antioxid Redox Signal**,

TANG, L.F.; DU, L.Z.; ZOU, C.C.; GU, W.Z. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in guinea pig asthma model following ovalbumin challenge. **Fetal Pediatr Pathol**, v.24, p.81-87, 2005.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Global Initiative for Asthma (GINA), from workshop report of global strategy for asthma management and prevention issued 1995 and revised 2006**. U.S. Washington (DC): Government Printing Office, v.8, p.517-528, 2006.

VIEIRA, R.P.; CLAUDINO, R.C.; DUARTE, A.C.S.; SANTOS, A.B.G.; PERINI, A.; FARIA-NETO, H.C.C.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; DOLHNIKOFF, M.; CARVALHO, C.R.F. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v.176, p.871-877, 2007.

**TABELA****Tabela 1:** Peso corporal inicial, final, ganho percentual, peso muscular e AST do músculo TA

	<b>Controle</b>	<b>OA</b>	<b>Ex50%</b>	<b>Ex75%</b>	<b>OAEx50%</b>	<b>OAEx75%</b>
<b>Peso Inicial (g)</b>	26.5±1.8	25.5±0.8	27.2±1.4	25.3±1.1	25.6±0.7	25.08±1.3
<b>Peso Final (g)</b>	29.3±1.7	28.8±1.3	29.7±1.5	27.7±0.4	28.3±1.2	27.1±0.8
<b>Ganho (%)</b>	10.8	13.1	9.1	9.3	10.5	7.9
<b>Peso TA (mg)</b>	57.98±4.8	54.7±4.3	54.2±4.9	56±3.7	50.40±4.9*	45.91±3.7*†
<b>AST TA (µm<sup>2</sup>)</b>	1529.4±130	1595.7±266.2	1585.5±264.4	1428.4±222.3	1377.9±140.1	1386.6±60.1

Músculo TA normal (controle), grupo sensibilizado pela OA (OA); grupo submetido ao treinamento aeróbio leve (Ex50%), grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio leve (OAEx50%), grupo submetido ao treinamento aeróbio moderado (Ex75%) e grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio moderado (OAEx75%). \*P < 0.05: comparado ao controle; † P < 0.05 comparado ao OA, Ex50% e Ex75%.

**Tabela 2:** Desempenho no teste ergométrico (minutos na esteira).

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Inicial</b>	<b>Pré-sensibilização</b>	<b>Pós-sensibilização</b>
<b>Controle</b>	38.8 ± 3.6	39.2 ± 2.0	40.1 ± 1.8
<b>OA</b>	39.9 ± 2.8	40.9 ± 2.8	39.7 ± 3.1
<b>Ex50%</b>	39.9 ± 2.8	48.0 ± 4.1	50.2 ± 4.6*
<b>Ex75%</b>	39.7 ± 2.1	45.4 ± 5.0	46.2 ± 5.3*
<b>OAE50%</b>	38.9 ± 3.2	48.5 ± 5.8	49.5 ± 4.0*
<b>OAE75%</b>	39.3 ± 3.1	43.1 ± 1.9	43.6 ± 1.7*

Controle, grupo sensibilizado pela OA (OA); grupo submetido ao treinamento aeróbio leve (Ex50%), grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio leve (OAE50%), grupo submetido ao treinamento aeróbio moderado (Ex75%) e grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio moderado (OAE75%). \*P < 0.05: comparado intra-grupo inicial.



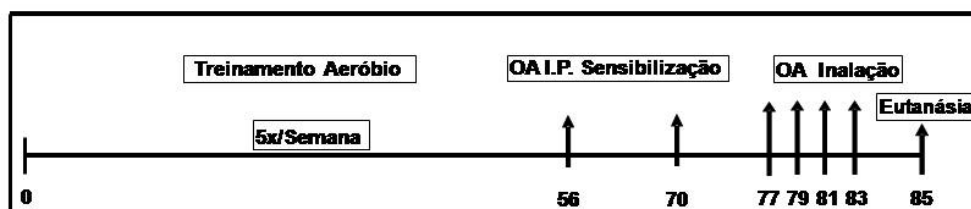


Figura 1 – Treinamento aeróbio = 8 semanas; sensibilização pela OA = 2 semanas; A inalação de OVA começou após a segunda semana de sensibilização e foi realizada 4 vezes. Os animais foram eutanasiados 48 horas após a última inalação de OA.

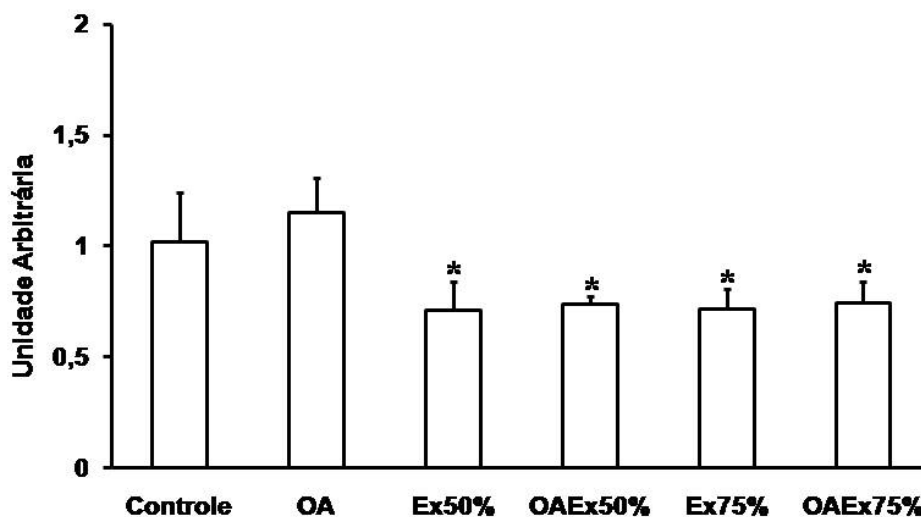


Figura 2 – Níveis de RNAm da atrogina-1 no músculo tibial anterior (TA) de camundongos. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo TA normal (controle), grupo sensibilizado pela OA (OA); grupo submetido ao treinamento aeróbio leve (Ex50%), grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio leve (OAEx50%), grupo submetido ao treinamento aeróbio moderado (Ex75%) e grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio moderado (OAEx75%). \*P < 0.05 comparados ao grupo controle e OA.

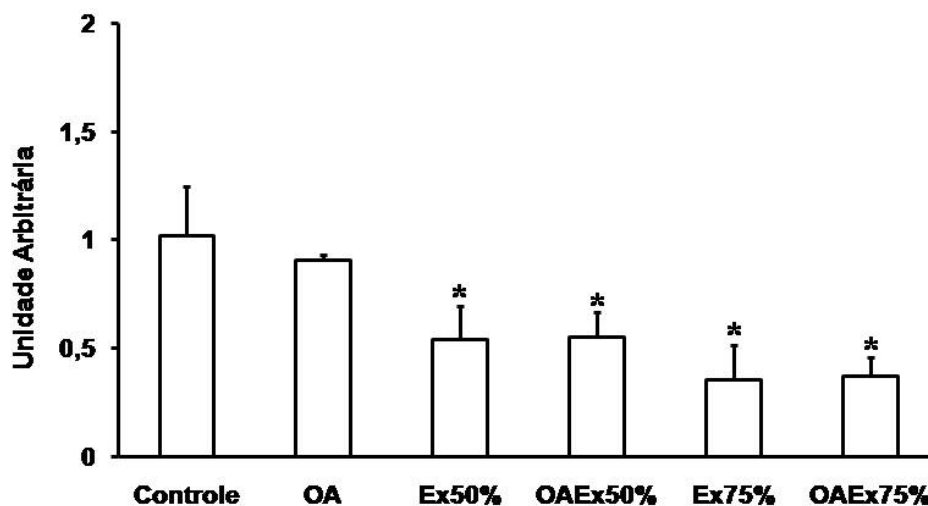


Figura 4 – Níveis de RNAm do MuRF1 no músculo tibial anterior (TA) de camundongos. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo TA normal (controle), grupo sensibilizado pela OA (OA); grupo submetido ao treinamento aeróbio leve (Ex50%), grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio leve (OAE50%), grupo submetido ao treinamento aeróbio moderado (Ex75%) e grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio moderado (OAE75%). \*P < comparados ao grupo controle e OA.

**MANUSCRITO II**

## **O TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO AUMENTA A ATIVIDADE DA MMP-2 NO MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA CRÔNICA**

João Luiz Quagliotti Durigan<sup>1</sup> (MS), Sabrina Messa Peviani<sup>1</sup> (MS), Thiago Luiz Russo<sup>1</sup> (MS), Anna Cecília Duarte<sup>2</sup> (MS), Rodolfo Paula Vieira<sup>3</sup> (PhD), Milton Arruda Martins<sup>4</sup> (PhD), Celso Ricardo Fernandes Carvalho<sup>2</sup> (PhD), Tania Fátima Salvini<sup>1</sup> (PhD).

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Fisioterapia, <sup>3</sup> Departamento de Patologia, e <sup>4</sup> Departamento de Medicina, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. Avenida Doutor Arnaldo, 455, 1º Andar, Sala 1216, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil.

**Título resumido:** MMPs e treinamento aeróbio na asma

### **Agradecimentos:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brasil (Processo nº 05/04413-1 e 05/5474-3). J. L. Q. Durigan é bolsista de Doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); T. L. Russo, S. M. Peviani e Anna Cecília Duarte são bolsistas de Doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); e Rodolfo P. Vieira é bolsista de Pós-Doutorado da FAPESP. Os autores também são gratos a Tereza F. Piassi.

**Autor correspondente:** Tania Fátima Salvini. Fone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail: [tania@power.ufscar.br](mailto:tania@power.ufscar.br)

## RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da inflamação pulmonar alérgica crônica e do treinamento aeróbio de baixa e moderada intensidade na atividade das metaloproteases (MMPs) no músculo diafragma em camundongos. Foram utilizados 30 animais, divididos em 6 grupos: (1) controle, não-sensibilizado e não-treinado, (2) sensibilizado com ovalbumina (OA); (3) não sensibilizado e treinado a 50% da velocidade máxima - baixa intensidade (Ex50%), (4) não-sensibilizado e treinado a 75% da velocidade máxima - intensidade moderada (Ex75%); (5) sensibilizado com OA e treinado a 50% (OAEx50%), (6) sensibilizado com OA e treinado a 75% (OAEx75%). Não houve diferença na atividade da MMP-2 entre os grupos controle, OA, Ex50% e Ex75%. Entretanto, a associação da sensibilização por OA com o exercício 50% ou 75% aumentou a atividade da MMP-2 quando comparado com o controle e OA. Nossos resultados demonstraram que inflamação alérgica pulmonar não alterou a atividade das MMPs. No entanto, o treinamento aeróbio em diferentes intensidades, associado à inflamação alérgica pulmonar crônica aumentou a atividade da MMP-2, sugerindo um aumento do remodelamento da matriz extracelular no músculo diafragma de camundongos.

**Palavras-chave:** MMPs, treinamento aeróbio, asma, músculo diafragma, camundongo.

## INTRUDUÇÃO

Pacientes asmáticos apresentam um aumento na resistência das vias aéreas e hiperinsuflação pulmonar (Laviets 1988), fato esse que aumenta e prejudica a atividade contráctil do músculo diafragma (Travaline et al., 1997). Tradicionalmente, a fraqueza muscular do diafragma tem sido atribuída à hiperinsuflação pulmonar, que induz o seu encurtamento e promove uma desvantagem mecânica e uma posição sub-ótima na curva comprimento e tensão (Cormier 1990; Ottenheijm et al., 2008). Além disso, foi recentemente proposto que as citocinas e o estresse oxidativo estão envolvidos na lesão sarcomérica e na proteólise muscular, levando à redução da força do músculo diafragma em pacientes com hiperinsuflação pulmonar (Vassilakopoulos et al., 2004 Ottenheijm et al., 2008). No entanto, pouco se sabe quanto às alterações moleculares e celulares envolvidas na fraqueza dos músculos respiratórios em indivíduos asmáticos.

As metaloproteases (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco composta de 22 membros subdivididos em collagenases, estromelinas, gelatinases e MMP do tipo membrana (Carmeli et al., 2004). Em doenças inflamatórias alérgicas, tais como a asma, as MMP-2 e -9 possuem um papel crucial na migração de células inflamatórias através das membranas endoteliais e epiteliais, bem como no processo de hiperresponsividade das vias áreas pulmonares (Okada et al., 1997; Kumagai et al., 1999). A MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas principalmente no remodelamento da matriz extracelular (ECM) do músculo esquelético (Bar-Shai et al., 2005; Russo et al., 2008), bem como em diversas miopatias (Schiotz et al. 2005; Carvalho et al., 2006).

O treinamento aeróbio melhora a aptidão física global e o estado de saúde dos pacientes asmáticos (Hallstrand et al., 2000; Fanelli et al., 2007), a força muscular

respiratória e função pulmonar (Counil et al., 2003; Counil e Voisin 2006). Evidências recentes sugerem que o treinamento físico aeróbio também promove efeitos antiinflamatórios na inflamação pulmonar alérgica crônica (Vieira et al., 2007), embora os mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito permanecem desconhecidos. Interessantemente, as MMPs estão envolvidas no remodelamento da ECM do músculo esquelético após sessão de treinamento aeróbio (Koskinen et al., 2001; Carmeli et al., 2005). Apesar deste fato, há escassez de trabalhos sobre os efeitos do exercício físico na atividade das MMPs no músculo diafragma. Embora essas enzimas sejam expressas nos músculos respiratórios, não há descrição das MMPs no músculo diafragma na asma. Baseado nestas afirmações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inflamação pulmonar alérgica crônica e do treinamento aeróbio na atividade das MMPs no músculo diafragma de camundongos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Esse estudo foi aprovado e revisado pelo comitê de ética de animais e foi desenvolvido de acordo com o guia nacional para cuidados e manejo para animais de laboratório (National Research Council, 1996).

### **Animais e desenho experimental**

Foram utilizados 30 camundongos da linhagem Balb/c, com aproximadamente 120 dias de idade ( $28.5 \pm 0.8$ g) que foram divididos em 6 grupos (5 animais em cada grupo): (1) não sensibilizado e não treinado (grupo controle); (2) sensibilizado com ovalbumina (OA) e não treinado; (3) não sensibilizado e treinado a 50% da velocidade máxima (Ex50%); (4) não sensibilizado e treinado a 75% da velocidade máxima



(Ex75%); (5) sensibilizado com OA e treinado a 50% da velocidade máxima (OAEx50%); (6) sensibilizado com OA e treinado a 75% da velocidade máxima (OAEx75%).

### **Teste ergométrico e programa de condicionamento físico**

Os animais foram submetidos a 3 dias de adaptação na esteira ergométrica (15 min, de 0.2 km/h). Em seguida, foi realizado um teste de esforço máximo com 5 minutos de aquecimento (0.2 km/h), sendo que a velocidade da esteira foi aumentada (a cada 2,5 minutos) até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiam permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos (Vieira et al., 2007). A intensidade do treinamento foi calculada a partir da velocidade máxima atingida no teste. Os camundongos foram treinados nas intensidades leve e moderada (50% e 75%, respectivamente), 60 minutos por sessão, 5 vezes por semana, durante 12 semanas (8 semanas de treinamento antes da sensibilização e 4 semanas após a exposição a OA ou salina) (Vieira et al., 2007).

### **Sensibilização com OA**

O período de sensibilização alérgica crônica iniciou-se na nona semana após o início do treinamento aeróbio e teve duração de 4 semanas. Os camundongos foram sensibilizados por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) de ovalbumina (OA, 20 µg por animal) diluída em soro fisiológico (NaCl 0.9%) nos dias 0 e 14 ou com solução salina, seguido de 4 inalações de OA (1%) conforme previamente descrito (Vieira et al., 2007).

## **Anestesia e Eutanásia dos animais**

Após 72 horas do final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados por meio de injeção i.p. (de xilazina; 12 mg/Kg/peso corporal; e cetamina; 95 mg/Kg/peso corporal) para a retirada dos músculos. Posteriormente, todos foram eutanasiados por overdose anestésica.

## **Zimografia**

O diafragma foi escolhido, pois é um dos mais importantes músculos respiratórios. Eles foram cuidadosamente removidos, pesados e congelados para a zimografia. A extração do tecido e a técnica de zimografia foram realizadas de acordo com a metodologia previamente descrita (Russo et al., 2008). A massa molecular referente à atividade das MMPs foi determinada pela comparação das bandas de atividade com um padrão de proteína de massa molecular conhecida (PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario). A identificação das bandas das MMPs seguiu o seu peso molecular previamente descrito (72 kDa: pro-MMP-2; 66 kDa: intermediária-MMP-2; 64 kDa: ativa-MMP-2; 52 kDa: pro-MMP-1; e 44 kDa: ativa MMP-1), como previamente descrito (Gueders et al., 2006; Fukushima et al., 2007). A análise densitométrica das bandas foi realizada utilizando o software GeneTools v3.06 (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

## **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos aos testes de Homogeneidade (Teste de Levene) e Normalidade. Em seguida, foi aplicada análise de variância ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey para detectar as diferenças entre os diferentes grupos. O nível de significância mínimo estabelecido foi de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Peso corporal e peso do músculo diafragma**

Todos os grupos apresentaram um aumento no peso corporal quando comparado o peso inicial com o final ( $P < 0,05$ ), sendo que não houve diferença entre eles (Tabela 1). Também não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ) no peso do diafragma entre os grupos avaliados.

### **Atividade das MMPs no músculo diafragma**

A análise quantitativa da densidade das bandas mostrou que os componentes da MMP-2 aumentaram a sua atividade nos grupos OAEx50% e OAEx75% (Fig. 1-A), em comparação com o controle e o OA ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos OAEx50% e OAEx75% ( $P > 0,05$ ). Interessantemente, a atividade da MMP-1 também foi aumentada nos grupos OAEx50% e no OAEx75% (Fig. 1-B), quando comparado ao controle e ao OA ( $P < 0,05$ ). A atividade da MMP-1 não se alterou entre os grupos OAEx50% e OAEx75% ( $P > 0,05$ ). A atividade de ambas MMP-2 e MMP-1 foi completamente inibida quando os géis foram incubados com 15mM de EDTA (dados

não apresentados). Além disso, a atividade da MMP-9 não foi identificada em nenhum dos grupos analisados.

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo é pioneiro em analisar o possível papel das MMPs no modelo de asma atópica em um músculo respiratório associado ao treinamento aeróbio em diferentes intensidades. Nossos resultados mostraram que a inflamação pulmonar não alterou a atividade das MMPs no músculo diafragma de camundongos. No entanto, o treinamento aumentou a atividade da MMP-2 apenas nos animais asmáticos. Além disso, não foi observado atividade da MMP-9.

Recentemente, foi demonstrado que a ativação da MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas na miopatia induzida por insuficiência cardíaca. Carvalho et al. (2006) relataram um aumento na expressão gênica da MMP-2 e MMP-9 no músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca. Os autores sugeriram que estas alterações podem contribuir para a miopatia do músculo esquelético durante a insuficiência cardíaca. Parece que as MMPs induzem a disfunção contrátil, contribuindo assim para diminuir a resistência à fadiga muscular inerente à insuficiência cardíaca (Schiotz et al., 2005).

Interessantemente, os nossos resultados demonstraram que o modelo de asma utilizado no presente estudo não foi capaz de alterar a atividade das MMPs no músculo diafragma de camundongos. Esses resultados não corroboram os estudos de Carvalho et al. (2006) e Schiotz et al. (2005). Provavelmente, estas discrepâncias podem ser atribuídas às variações entre os estudos, como os modelos de doença e os músculos avaliados, uma vez que o presente estudo analisou um modelo de asma, enquanto Carvalho e Schiotz avaliaram um modelo de insuficiência cardíaca. Além disso, o

presente estudo avaliou um músculo respiratório, em contraste ao estudo de Schiotz, que analisou músculos periféricos. Apesar destas diferenças, a ausência de alterações na atividade da MMP-2 sugere que o modelo de inflamação pulmonar crônica não está envolvido na miopátia no músculo diafragma em camundongos. No entanto, futuras investigações serão necessárias para testar esta hipótese.

Outro achado interessante desse estudo foi a ausência da atividade da MMP-9 no músculo diafragma em todos os grupos experimentais. A MMP-9 é expressa apenas em condições de lesão muscular ou de ativação anormal do músculo (ou seja, fase aguda do processo inflamatório ou desnervação crônica) (Kherif et al, 1998; Carmeli et al., 2004), o que poderia sugerir que o músculo diafragma não foi lesado no grupo OA durante o treinamento aeróbio (Koskinen et al., 2001; Carmeli et al., 2004). Este fato também corrobora a hipótese de que a inflamação pulmonar crônica não está envolvida na miopátia no músculo diafragma em camundongos.

Além disso, a ausência de alterações na atividade das MMPs no grupo OA também poderia ser atribuída ao curto período (4 semanas) de indução da asma. Talvez, o período avaliado não foi suficiente para induzir as alterações na função do diafragma e, conseqüentemente modificar a atividade das MMPs. No entanto, futuras investigações com período de avaliação mais prolongado serão necessárias para fins comparativos, uma vez que a fraqueza muscular respiratória é comum em indivíduos com asma (McConnell et al., 2005; Garrod e Lasserson, 2007).

A ativação das MMP-2 e MMP-9 modificam-se com as alterações de demanda no músculo esquelético, fato esse que depende do tipo de exercício físico e do músculo avaliado. Carmeli et al. (2005) observaram que a alta intensidade (70% do  $VO_{2max}$ ) de exercício em esteira aumentou os níveis de RNAm da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio e no quadríceps, porém nenhuma alteração foi encontrada no exercício de

baixa intensidade (50% do  $VO_{2max}$ ). Interessantemente, os nossos resultados indicam que ambas as intensidades de exercício não modificaram a atividade das MMPs no músculo diafragma. Provavelmente, as diferenças entre o presente trabalho e o estudo de Carmeli et al. (2005) devem estar relacionados com o protocolo de treinamento e o tipo de músculo avaliado. Carmeli et al. (2005) utilizou um programa de 2 semanas de exercício, enquanto o protocolo utilizado no presente estudo foi crônico (12 semanas). Além disso, o padrão de recrutamento muscular do estudo de Carmeli et al. (2005) difere consideravelmente do presente trabalho, uma vez que esse estudo avaliou um músculo respiratório, enquanto Carmeli et al. (2005) analisou músculos periféricos.

De fato, os nossos resultados sugerem que o aumento na atividade da MMP-2 nos grupos OAEx50% e no OAEx75% podem estar relacionadas a uma sobrecarga de trabalho no músculo diafragma, como descrito anteriormente por Carvalho et al. (2006) durante a insuficiência cardíaca no músculo diafragma. Foi relatado que o modelo de inflamação crônica pulmonar em camundongos induz disfunção mecânica no parênquima e aumenta o remodelamento pulmonar, levando a alterações da mecânica respiratória (Xisto et al., 2005). Provavelmente, estas alterações mecânicas poderiam aumentar o trabalho do músculo diafragma durante o treinamento aeróbio, uma vez que foi observado um aumento na atividade da MMP-2 apenas nos animais submetidos à inflamação pulmonar associada ao exercício de baixa e moderada intensidades.

Além disso, foi encontrado aumento na atividade da MMP-1 somente nos grupos OAEx50% e no OAEx75%. A atividade da MMP-1 também está envolvida na ativação da MMP-2, que envolve a clivagem de um domínio amino-terminal da MMP-2 latente, ou pró MMP-2 (McCawley e Matrisian, 2001; Gueders et al., 2006). Nossos dados sugerem que a atividade da MMP-1 foi aumentada para clivar e ativar a MMP-2

latente, uma vez que foi observado um aumento na atividade das MMP-1 e MMP-2 nos mesmos grupos.

## CONCLUSÃO

Este estudo indica que o curto período de inflamação pulmonar alérgica crônica não alterou a atividade das MMPs no músculo diafragma de camundongos. Além disso, o treinamento aeróbio em baixa e moderada intensidade associado com a inflamação pulmonar alérgica crônica aumenta a atividade da MMP-2, sugerindo alterações no remodelamento da ECM no músculo diafragma. Estes resultados iniciais fornecem a base para outros estudos com objetivo de determinar o significado funcional das alterações das MMPs nos músculos respiratórios inerentes ao treinamento físico em um modelo de asma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAR-SHAI, M.; CARMELI, E.; COLEMAN, R.; ROZEN, N.; PEREK, S.; FUCHS, D.; REZNICK, A.Z. The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats. **Mech Ageing Dev**, v.126, p.289-297, 2005.

CARMELI, E.; MOAS, M.; LENNON, S.; POWERS, S.K. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Exp Physiol**, v.90, p.613-619, 2005.

CARMELI, E.; MOAS, M.; REZNICK, A.Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v.29, p.191-197, 2004.

CARVALHO, R.F.; DARIOLLI, R.; JUSTULIN, L.A.; SUGIZAKI, M.M.; OKOSHI, M.; CICOGNA, A.C.; FELISBINO, S.L.; DAL PAI-SILVA, M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. **Int J Exp Pathol**, v.87, p.437-443, 2006.

CORMIER, Y.; LECOURS, R.; LEGRIS, C. Mechanisms of hyperinflation in asthma. **European Respiratory Journal**, v.3, p.619-624, 1990.

COUNIL, F.P.; VARRAY, A.; MATECKI, S.; BEUREY, A.; MARCHAL, P.; VOISIN, M.; PRÉFAUT, C. Training of aerobic and anaerobic fitness in children with asthma. **J Pediatr**, v.142, p.179-184, 2003.

COUNIL, F.P.; VOISIN, M. Physical fitness in children with asthma. **Arch Pediatr**, v.13, p.1136-1141, 2006.

FANELLI, A.; CABRAL, A.L.B.; NEDER, J.A.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, C.R.F. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatics children. **Med Sci Sports Exerc**, v.39, p.1474-1480, 2007.

FUKUSHIMA, K.; NAKAMURA, A.; UEDA, H.; YUASA, K.; YOSHIDA, K.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). **BMC Musculoskelet Disord**, v.28, p.8-54, 2007.

GARROD, R.; LASSERSON, T. Role of physiotherapy in the management of chronic lung diseases: An overview of systematic reviews. **Respir Med**, v.101, p.2429-2436, 2007.

GUEDERS, M.M.; FOIDART, J.M.; NOEL, A.; CATALDO, D.D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. **Eur J Pharmacol**, v.533, p.133-144, 2006.



**Guide for care and use of laboratory animals** (NIH publication 85-23, revised 1985).

HALLSTRAND, T.S.; BATES, P.W.; SCHOENE, R.B. Aerobic conditioning in mild asthma decreases the hyperpnea of exercise and improves exercise and ventilatory capacity. **Chest**, v.533, p.1460-1469, 2000.

KHERIF, S.; DEHAUPAS, M.; LAFUMA, C.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H.S. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v.24, p.309-319, 1998.

KOSKINEN, S.O.; WANG, W.; AHTIKOSKI, A.M.; KJAER, M.; HAN, X.Y.; KOMULAINEN, J.; KOVANEN, V.; TAKALA, T.E. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.280, p.1292-1300, 2001.

KUMAGAI, K.; OHNO, I.; OKADA, S.; OHKAWARA, Y.; SUZUKI, K.; SHINYA, T.; NAGASE, H.; IWATA, K.; SHIRATO, K. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. **J Immunol**, v.162, p.4212-4219, 1999.

LAVIETES, M.H.; GROCELA, J.A.; MANIATIS, T.; POTULSKI, F.; RITTER, A.B.; SUN-DERAM, G. Inspiratory muscle strength in asthma. **Chest**, v.93, p.1043-1048, 1988.

MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr Opin Cell Biol**, v.13, p.534-540, 2001.

MCCONNELL, A.K. The role of inspiratory muscle function and training in the genesis of dyspnoea in asthma and COPD. **Prim Care Respir J**, v.14, p.186-194, 2005.

OKADA, S.; KITA, H.; GEORGE, T.J.; GLEICH, G.J.; LEIFERMAN, K.M. Migration of eosinophil through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.17, p.519-528, 1997.

OTTENHEIJM, C.A.C.; HEUNKS, L.M.A.; DEKHUIJZEN, R.P.N. Diaphragm adaptations in patients with COPD. **Respir Res**, v.24, p.9-12, 2008.

RUSSO, T.L.; PEVIANI, S.M.; DURIGAN, J.L.; SALVINI, T.F. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, v.37, p.593-600, 2008.

SCHIOTZ, T.H.M.; STRANDA, B.J.A.; LUNDE, P.K.; SJAASTAD, I.; KOLSET, S.O.; SEJERSTED, O.M.; IVERSEN, P.O. Enhanced matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles of rats with congestive heart failure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.289, p.389-394, 2005.

TRAVALINE, J.M.; SUDARSHAN, S.; ROY, B.G.; CORDOVA, F.; LEYENSON, V.; CRINER, G.J. Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, p.1567-1571, 1997.

VASSILAKOPOULOS, T.; DIVANGAHI, M.; RALLIS, G.; KISHTA, O.; PETROF, B.; COMTOIS, A.; HUSSAIN, S.N. Differential cytokine gene expression in the diaphragm in response to strenuous resistive breathing. **Am J Respir Crit Care Med**, v.170, p.154-161, 2004.

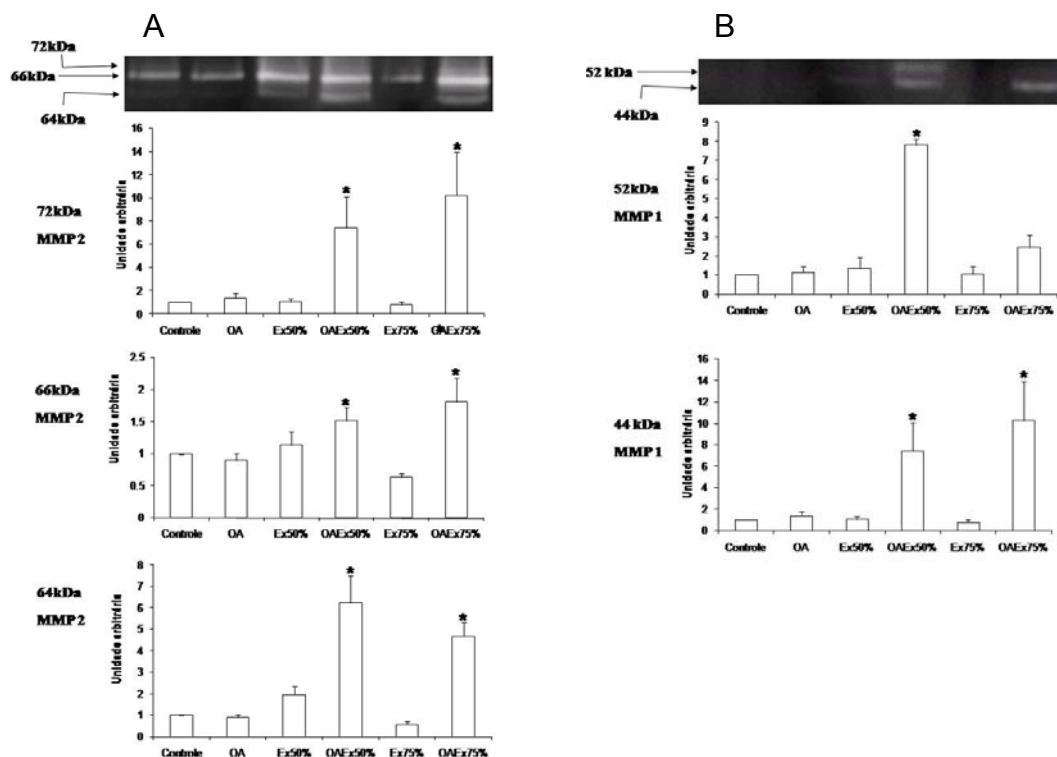
VIEIRA, R.P.; CLAUDINO, R.C.; DUARTE, A.C.S.; SANTOS, A.B.G.; PERINI, A.; FARIA-NETO, H.C.C.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; DOLHNIKOFF, M.; CARVALHO, C.R.F. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v.176, p.871-877, 2007.

XISTO, D.G.; FARIAS, L.L.; FERREIRA, H.C.; PICANÇO, M.R.; AMITRANO, D.; LAPA, E.; SILVA, J.R.; NEGRI, E.M.; MAUAD, T.; CARNIELLI, D.; SILVA, L.F.; CAPELOZZI, V.L.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v.171, p.829-837, 2005.

**Tabela 1:** Peso corporal inicial, final, ganho percentual e peso do músculo diafragma

	<b>Controle</b>	<b>OA</b>	<b>Ex50%</b>	<b>Ex75%</b>	<b>OAEx50%</b>	<b>OAEx75%</b>
<b>Peso Inicial (g)</b>	26.5±1.8	25.5±0.8	27.2±1.4	25.6±0.7	25.3±1.1	25.08±1.3
<b>Peso Final (g)</b>	29.3±1.7	28.8±1.3	29.7±1.5	28.3±1.2	27.7±0.4	27.1±0.8
<b>Ganho (%)</b>	10.8	13.1	9.1	10.5	9.3	7.9
<b>Peso (mg)</b>	100.9±16.2	106.8±21.7	101.5±18.2	125.2±18.4	100±11.5	117.5±17

Músculo diafragma normal (controle), grupo sensibilizado pela OA (OA); grupo submetido ao treinamento aeróbio leve (Ex50%), grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio leve (OAEx50%), grupo submetido ao treinamento aeróbio moderado (Ex75%) e grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio moderado (OAEx75%).



**FIGURA 1.** Densitometria óptica das bandas da MMP-2 e MMP-1 em unidade arbitrária. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo diafragma normal (controle), grupo sensibilizado pela OA (OA); grupo submetido ao treinamento aeróbio leve (Ex50%), grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio leve (OAE50%), grupo submetido ao treinamento aeróbio moderado (Ex75%) e grupo sensibilizado pela OA e submetido ao treinamento aeróbio moderado (OAE75%). A- Pró-MMP-2 (72 kDa); Intermediária-MMP-2 (66 kDa); Ativa-MMP-2 (64 kDa). B- Pró-MMP-1 (52 kDa); Ativa-MMP-1 (44 kDa). \* $p < 0.05$ : comparado ao grupo controle.

**MANUSCRITO III**

## **EFEITOS DA ALTERNAGINA-C NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA ATIVIDADE DAS METALOPROTEASES DURANTE A REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

João Luiz Quagliotti Durigan<sup>1</sup> (MS), Sabrina Messa Peviani<sup>1</sup> (MS), Thiago Luiz Russo<sup>1</sup> (MS), Gabriel Borges Delfino<sup>1</sup> (PT), Márcia Regina Cominetti<sup>2</sup> (PhD), Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo<sup>2</sup> (PhD), Tania Fátima Salvini<sup>1</sup> (PhD).

<sup>1</sup>Departamento de Fisioterapia e <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

**Título resumido:** ALT-C e regeneração do músculo esquelético

**Agradecimentos:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brasil (Processo nº 05/5474-3 e 04/06986-6). J. L. Q. Durigan é bolsista de Doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); T. L. Russo e S. M. Peviani são bolsistas de Doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); G. B. Delfino é bolsista de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores também são gratos à Tereza F. Piassi pela assistência técnica.

**Autor correspondente:** Tania Fátima Salvini. Fone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail: [tania@power.ufscar.br](mailto:tania@power.ufscar.br)

## RESUMO

A Alternagina-C (ALT-C), uma proteína tipo desintegrina extraída a partir do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus*, induz a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em fibroblastos e em células endoteliais, bem como a proliferação de mioblastos. Esses resultados iniciais indicam que a ALT-C possui um bom potencial em estudos que envolvem a regeneração tecidual. Este estudo avaliou os efeitos da ALT-C sobre os níveis de RNAm do VEGF, MyoD, MMP-2 e na atividade das MMPs durante a regeneração do músculo tibial anterior (TA). Foram utilizados 6 ratos wistar (3 meses de idade,  $258,9 \pm 27$ g) por grupo: (1) animais sem intervenção (controle); (2) TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); (3) TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C), (4) TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e (5) TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). O ventre do músculo TA foi lesado com uma barra de ferro previamente congelada em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi aplicado 25 $\mu$ l de ALT-C (50nM) sobre o ventre do TA. Foram obtidos cortes transversais (10 $\mu$ m) do músculo para análise da área de lesão muscular. A atividade das MMPs foi analisada pela técnica de zimografia e os níveis de RNAm da MyoD, VEGF e MMP-2 por meio reação em cadeia de polimerase em tempo real. A ALT-C não reduziu a área de lesão muscular, bem como não alterou os níveis de RNAm da MyoD e VEGF nos grupos submetidos a lesão muscular. No entanto, a ALT-C reduziu os níveis de RNAm da MMP-2 e a sua atividade no músculo TA após a criolesão. Esse estudo indica que o tratamento com ALT-C na concentração de 50nM não acelerou o processo de regeneração muscular. A redução tanto nos níveis de RNAm quanto na atividade da MMP-2 no músculo TA, sugere que ALT-C altera o *turnover* das proteínas da MEC durante a regeneração muscular.

**Palavras-chave:** ALT-C, Regeneração muscular, Criolesão, VEGF, MyoD, MMP-2.

## INTRODUÇÃO

A regeneração do músculo esquelético é um processo altamente orquestrado que envolve a ativação e a proliferação de células satélite adultas, que se diferenciam em mioblastos, os quais se fundem para formar os miotubos (Marsh et al., 1997; Shi and Garry, 2006). A ativação das células satélite é caracterizada pelo rápido aumento de expressão da MyoD e Myf5, que fazem parte de uma superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice denominados fatores regulatórios miogênicos (MRFs) (Sakuma et al., 1999; Shi e Garry, 2006). A MyoD é rapidamente expressa após 12 horas de lesão muscular (Rantanen et al., 1995), e atinge um pico de expressão no terceiro dia após criolesão no músculo tibial anterior (TA) (Warren et al., 2002). Posteriormente, ocorre um aumento de expressão dos MRFs secundários (Miogenina e o MRF4) que promovem a diferenciação dos mioblastos em miócitos adultos (Charge e Rudnicki, 2004).

Além disso, a revascularização desempenha um importante papel no sucesso da regeneração muscular. Este evento é altamente regulado pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e pelas metaloproteases (MMPs) (Prior et al. 2004). O VEGF exerce múltiplos efeitos sobre o endotélio vascular, incluindo a sua proliferação, aderência e migração celular, rápido aumento da permeabilidade microvascular, promove sinal de sobrevivência celular e induz a expressão gênica dessas células (Senger et al., 1993; Olsson et al., 2006). Recentemente, Wagatsuma (2007) mostrou que os níveis de RNAm do VEGF aumentam a partir terceiro dia após a criolesão, sendo que o seu pico de expressão ocorre no quinta dia no músculo gastrocnêmio de camundongos. Esses resultados sugerem que o VEGF está envolvido no início do processo de regeneração no músculo esquelético.



As fibras do músculo esquelético estão envolvidas por uma membrana basal composta predominantemente de colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e proteoglicanos de heparan sulfato. Há evidências de um extenso remodelamento da matriz extracelular (MEC) nas células musculares durante a sua regeneração (Gulati et al., 1983). A MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas principalmente no remodelamento da MEC do músculo esquelético (Carmeli et al., 2004). As MMPs possuem um diferente padrão temporal de expressão durante o processo de regeneração muscular. A ativação da MMP-2 está relacionada com a regeneração de novas miofibrilas, provavelmente devido à degradação do colágeno tipo IV da membrana basal durante proliferação dos mioblastos, migração e fusão. Por outro lado, a ativação da MMP-9 está relacionada com o início da fase inflamatória e à ativação das células satélite (Kherif et al. 1999; Fukushima et al., 2007). As MMPs também são indispensáveis na angiogênese, pois degradam as junções intercelulares e a membrana basal, permitindo o crescimento dos vasos sanguíneos (Carmeli et al., 2004).

As integrinas formam uma família de receptores de superfície celular, mediando interações entre célula-célula e célula-matriz. A integrina  $\alpha_2\beta_1$  é o principal receptor de colágeno tipo I e possui papel essencial na adesão das células normais e tumorais à MEC (Mariano-Oliveira et al., 2000). A alternagina, uma proteína purificada do veneno da serpente brasileira *Bothrops alternatus*, é sintetizada como uma forma precursora pertencente à classe PIII das metaloproteases de veneno de serpente (SVMP). A alternagina possui um domínio metaloprotease, tipo desintegrina e rico em cisteína que após processamento proteolítico, libera os domínios tipo desintegrina e rico em cisteína do domínio proteinase e forma a alternagina-C (ALT-C) (Souza et al., 2000). A ALT-C interage competitivamente com a integrina  $\alpha_2\beta_1$ , inibindo assim a sua

interação com o colágeno (Selistre-de-Araujo et al., 2005), e induz uma atividade quimiotática sobre neutrófilos (Mariano-Oliveira et al., 2003).

Além disso, Cominetti et al. (2004) evidenciaram ainda que a ALT-C induziu a expressão de VEGF em fibroblastos humanos e a proliferação celular em HUVECs (células endoteliais de veias de cordão umbilical humano) *in vitro*. A ALT-C e ALT-C PEP, um peptídeo derivado de sua seqüência, foram capazes de induzir angiogênese em ratos com lesão de pele (resultados não publicados) e aumento na expressão do receptor 2 de VEGF (VEGFR2, KDR) em células HUVEC (Ramos et al., 2007). A ALT-C também promoveu a proliferação de células precursoras miogênicas, bem como acelerou o processo de diferenciação das miofibrilas com aumento da expressão de miosina (resultados não publicados).

Estes resultados iniciais são interessantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam minimizar condições patológicas associadas com a redução da capacidade de regeneração muscular. Caso estes resultados se confirmem em estudos *in vivo*, a ALT-C poderá ser considerada um novo recurso terapêutico a ser investigado no processo de regeneração muscular. Baseado nestas afirmações, a hipótese do presente estudo é que a ALT-C atue favorecendo a regeneração muscular *in vivo*. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da ALT-C nos níveis de RNAm do VEGF, MyoD, MMP-2 e atividade das MMPs na regeneração do músculo TA em ratos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e grupos experimentais**

Foram utilizados 30 ratos Wistar com 3 meses de idade ( $258,9 \pm 27g$ ). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas e alimentação à vontade em ciclo claro-escuro de 12 horas. Esse estudo foi aprovado e revisado pelo comitê de ética de animais da Universidade Federal de São Carlos e foi desenvolvido de acordo com o guia nacional para cuidados e manejo para animais de laboratório.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, com 6 animais em cada um: (1) animais sem intervenção (controle); (2) TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); (3) TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C), (4) TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e (5) TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C).

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12 mg/kg) e cetamina (95 mg/kg) durante a indução da lesão muscular, aplicação da ALT-C no músculo TA e para a sua remoção. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico.

### **Indução da Lesão muscular**

O músculo TA foi escolhido, pois todas as suas fibras estão presentes no seu ventre muscular e são distribuídas de tendão a tendão. Além disso, é um músculo que apresenta o ventre localizado superficialmente na região anterior da pata do animal, com fácil acesso cirúrgico. Para induzir a lesão muscular no ventre do TA direito, a pele que o recobre foi tricotomizada e limpa com álcool iodado. Em seguida, foi realizada uma incisão transversal, de aproximadamente 1 cm, na região correspondente ao ventre do músculo. Para completa exposição do músculo, foi seccionada e afastada a fáscia que o

recobre. Posteriormente, a lesão tecidual foi induzida por congelamento (criolesão) na região central do ventre do músculo. Uma barra de ferro retangular (40 x 20 mm<sup>2</sup>) foi previamente congelada em nitrogênio líquido e, em seguida, posicionada transversalmente sobre o ventre do músculo por 10 segundos. O mesmo procedimento foi repetido 2 vezes consecutivas com um intervalo de tempo de 30s (Oliveira et al., 2006; Miyabara et al., 2006).

### **ALT-C**

A purificação da ALT-C a partir do veneno bruto de *Bothrops alternatus* foi realizada de acordo com Souza et al. (2000). Após a criolesão, foi aplicado 25µl de ALT-C (50nM, diluído em tampão PBS) no ventre exposto do músculo TA. Nos grupos L3 e L7, também foi aplicado 25µl de solução salina. A concentração de 50nM foi escolhida devido a um estudo prévio (resultados não publicados), que observou proliferação de mioblastos *in vitro*.

### **Retirada dos músculos**

Os ratos foram pesados e o TA direito de todos os animais foram retirados e pesados com o animal anestesiado. Os músculos foram divididos em duas partes iguais na porção central do ventre muscular, sendo o fragmento proximal utilizado para a análise histológica e o distal para a análise do RNAm e zimografia. Para a avaliação histológica, o fragmento muscular foi imediatamente pré-congelado em isopentano, e posteriormente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C (Forma Scientific, Marietta, Ohio). Para as análises dos níveis de RNAm e zimografia, o fragmento muscular foi congelado em nitrogênio líquido e também conservado a -80°C.

### **Área de lesão muscular**

Foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (uma seção de 10 $\mu$ m a cada 100 $\mu$ m) em micrótomo criostato (Microm HE 505, Jena, Alemanha), ao longo do ventre do músculo TA. As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina para avaliação morfométrica por meio de microscopia óptica (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha). Foi escolhido um corte transversal de cada músculo localizado na região central da lesão muscular para medir a área de secção transversal do músculo lesado e não lesado, utilizando um software de morfometria (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Alemanha). Para tal, fotos da secção transversal dos músculos foram obtidos por microscopia óptica para reconstruir a área de secção transversal total, o que permitiu identificar e medir as áreas intactas e lesadas de cada músculo. Foi utilizado o procedimento duplo-cego para a escolha dos cortes dos músculos lesados a serem avaliados, bem como para a mensuração das áreas intactas e lesadas de cada músculo.

### **Extração de RNA total**

A extração de RNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). A densidade óptica (DO) das amostras foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão  $\geq$  1.8). Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (25 $\mu$ g de RNA total) em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídeo.

## Transcrição reversa (RT)

Para a reação da RT foi utilizado: 1 µg de RNA total, 1 µl de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água (para volume de 10,5µl) que foram incubados a 70°C por 10 min e então resfriados rapidamente em gelo. Adicionou-se a cada amostra uma mistura contendo: 1µl de dNTPmix contendo 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> de cada base (APT, CTP, GTP e TTP) (Promega, Madison, WI), 2µl de DTT 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, 4µl de 5x buffer e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI) e então as amostras foram reaquecidas a 42°C por 60 min e a 95°C por 10 min. A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida por meio um gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

## Primers

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) para as reações em cadeia da polimerase foram: GAPDH que foi construído utilizando-se o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA); MMP-2 que foi retirado de Menon et al. (2005); Myo-D retirado de Hill and Goldspink (2003); e VEGF que foi descrito por Asano et al. (2007). As seqüências utilizadas foram GAPDH (senso: CCACCAACTGCTTAGCCC; antisenso: GCCAAATTCGTTGTCATACC); MMP-2 (senso: CTGATAACCTGGATGCAGTCGT; antisenso: CCAGCCAGTCCGATTT); Myo-D (senso: GGAGACATCCTCAAGCGAT-C; antisenso: GCACCTGGTAAATCGGATTG) e VEGF (senso: TGCACCCACGACAGAAGG; antisenso: GCACACAGGACGGCTTGA).

### **Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq)**

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por polimerase em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR real-time, Rotor Gene 3000, Cobert Research). As amplificações por PCRq foram efetuadas utilizando-se 40ng/ $\mu$ l de cDNA adicionado a uma reação contendo 25 $\mu$ l de SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) master mix, 180nM dos primers (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 50 $\mu$ l, dividido em dois tubos (duplicata). As condições de ciclagem consistiram em: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos com duas etapas, 15s de desnaturação à 94°C; 60s de anelamento à 56°C para o GAPDH, 48°C para a MMP-2; 48°C para o Myo-D; e 56°C para o VEGF, seguido de 72°C por 60s e 72°C por 10min.

Após a reação de PCRq, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, cycle threshold) de cada amostra, que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica da MMP-2, Myo-D e VEGF. A expressão gênica foi normalizada pelo gene GAPDH que foi utilizado como controle interno (Wagatsuma, 2007). Ademais, foi utilizado um controle negativo contendo RNA, mas não M-MLV RT, para garantir que o produto do PCRq não estava amplificando DNA genômico (Schwartz et al., 2005).

### **Zimografia**

A extração do tecido e a técnica de zimografia foram realizadas de acordo com a metodologia previamente descrita (Russo et al., 2008). A massa molecular referente à atividade das MMPs foi determinada pela comparação das bandas de atividade com um

padrão de proteína de massa molecular conhecida (PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario). As bandas das MMPs foram identificados segundo suas massas moleculares (72 kDa: Pró-MMP-2; 66 kDa: intermediária-MMP-2; 64 kDa: ativa-MMP-2; 85 kDa: ativa-MMP-9), como previamente descrito (Gueders et Al., 2006; Fukushima et al., 2007). A análise densitométrica das bandas foi realizada utilizando o software GeneTools v3.06 (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos aos testes de Homogeneidade (Teste de Levene) e Normalidade. Em seguida, foi aplicada análise de variância ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey para detectar as diferenças entre os diferentes grupos. O teste *t* de student foi utilizado para a comparação entre os músculos TA do mesmo grupo. O nível de significância mínimo estabelecido foi de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Peso corporal, peso e área de lesão muscular do TA**

Não houve diferença no peso corporal entre os grupos avaliados ( $P > 0.05$ ). Todos os grupos apresentaram uma redução no peso do músculo TA em comparação com controle ( $P < 0.05$ , Tabela 1). O tratamento com a ALT-C não reduziu a área de lesão 3 e 7 dias após a criolesão ( $P > 0,05$ , Tabela 1). Além disso, a área de lesão foi menor nos grupos L7 e L7+ALT-C quando comparados com L3 e L3+ALT-C.



### **Expressão gênica da MyoD, VEGF e MMP-2**

A expressão gênica da Myo-D foi aumentada em todos os grupos quando comparados com o controle ( $P < 0.05$ ). Os maiores níveis de RNAm foram observados nos grupos L3 e L3+ALT-C. Estes níveis foram significativamente menores nos grupos L7 e L7+ALT-C comparados com o terceiro dia de lesão, porém ainda permaneceram maiores do que o controle ( $P < 0.05$ ). A ALT-C não alterou a expressão da MyoD em nenhum grupo experimental ( $P > 0.05$ , Figura 1).

Foi observado um aumento na expressão gênica do VEGF em todos os grupos quando comparados com o controle ( $P < 0.05$ ), no entanto não houve diferença estatística entre eles ( $P > 0.05$ , Figura 2).

Com relação à MMP-2, houve um aumento na sua expressão gênica no terceiro dia após a criolesão em comparação com o controle ( $P < 0.05$ , Figura 3). A ALT-C reduziu significativamente a expressão desse gene no grupo L3+ALT-C comparado ao L3 ( $P < 0.05$ ), porém esses valores ainda foram maiores que o controle ( $P < 0.05$ ). No sétimo dia após a lesão, os níveis de RNAm da MMP-2 permaneceram elevados nos grupos L7 e L7+ALT-C comparados ao controle ( $P < 0.05$ ). No entanto, esses valores foram menores quando comparados ao grupo L3 ( $P < 0.05$ ). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos L3+ALT-C, L7 e L7+ALT-C ( $P > 0.05$ , Figura 3).

### **Zimografia**

Os componentes da MMP-2 tiveram sua atividade elevada nos grupos L3, L3+ALT-C e L7 em comparação com o grupo controle (Figura 4). Além disso, a atividade da forma ativa (64kDa) da MMP-2 foi significativamente maior no grupo L7 comparado com todos os grupos ( $P < 0.05$ , Figura 4). Interessantemente, a atividade dos componentes da MMP-2, pró (72kDa), intermediária (66kDa) e ativa (64kDa) no grupo L7 foi similar ao controle ( $P > 0.05$ ) e menor do que o L7 ( $P < 0.05$ , Figure 4). A atividade da MMP-9 foi aumentada nos grupos L3 e L3+ALT-C quando comparados ao controle ( $P < 0.05$ ; Figura 5). Não foi observada diferença na atividade da MMP-9 entre os grupos controle, L7 e L7+ALT-C ( $P > 0.05$ , figura 5).

## **DISCUSSÃO**

Esse estudo foi pioneiro em analisar a influência da ALT-C na regeneração do músculo esquelético. Nossos resultados mostraram que o tratamento com a ALT-C não reduziu a área da lesão muscular e não modificou a padrão de expressão gênica do VEGF e da MyoD durante a regeneração muscular. No entanto, a ALT-C reduziu tanto os níveis de RNAm da MMP-2 quanto a sua atividade no músculo TA após a criolesão.

Estudos prévios demonstraram que a ALT-C induziu a expressão gênica do VEGF em fibroblastos, bem como a proliferação de células endoteliais (Cominetti et al., (2004). Além disso, a ALT-C induziu angiogênese em camundongos e aumentou a expressão do receptor 2 de VEGF (VEGFR2, KDR) em células HUVEC (Ramos et al., 2007). A ALT-C também promoveu proliferação de mioblastos de forma dose-dependente, principalmente com concentrações que variaram de 50 a 100nM (resultados não publicados). Estes resultados preliminares indicam que a ALT-C possui um bom potencial em estudos que envolvem a regeneração tecidual.

Interessantemente, nossos resultados demonstraram que a ALT-C, na concentração de 50nM, não minimizou a redução do peso muscular, bem como a área de lesão muscular. Do mesmo modo, a ALT-C não alterou o padrão de expressão da MyoD, sugerindo que a ALT-C não modula este fator regulatório miogênico que está envolvido na ativação das células satélite durante a regeneração muscular (Sakuma et al., 1999; Shi e Garry, 2006). De maneira geral, esses resultados indicam que a ALT-C não acelerou o processo de regeneração muscular em ratos.

Além disso, como foi previamente descrito que a ALT-C induz aumento da expressão gênica de VEGF em fibroblastos (Cominetti et al., 2004), uma das hipóteses desse trabalho foi que esse fato poderia fornecer algum efeito benéfico no processo de regeneração muscular *in vivo*. No entanto, os níveis de RNAm do VEGF não foram alterados nos grupos L3+ALT-C e L7+ALT-C quando comparados com o controle. Este efeito pode ser específico para cada tipo de célula, uma vez que em cultura celular de mioblastos não foi detectado alterações nos níveis de RNAm do VEGF, bem como na sua proteína (resultados não publicados). Tal fato poderia justificar os resultados do presente estudo, sugerindo que ALT-C é capaz de aumentar a expressão do VEGF apenas em cultura de fibroblastos.

A ausência de alterações na expressão da MyoD e VEGF em ambos os grupos tratados com ALT-C também pode ser atribuída ao tipo de estudo, uma vez que o presente trabalho avaliou o processo de regeneração muscular *in vivo*, enquanto Cominetti et al. (2004) mostraram os efeitos da ALT-C, em diferentes tipos de células, *in vitro*. Futuros estudos utilizando uma curva dose-resposta seriam necessários para avaliar um possível efeito benéfico da ALT-C no processo de regeneração muscular *in vivo*.

Por outro lado, os nossos resultados de PCRq indicaram que a expressão da MMP-2 foi aumentada durante os 3 primeiros dias após a criolesão, sendo que esses níveis de RNAm foram reduzidos no sétimo dia. Outros estudos demonstraram que os níveis de RNAm da MMP-2 atingem um pico entre 3 a 7 dias após a lesão muscular, enquanto que no décimo dia esses níveis retornam a valores basais (Kherif et al., 1999; Ferré et al., 2007). Do mesmo modo, a análise de zimografia mostrou que a MMP-2 foi ativada no terceiro dia 3 após a lesão, com aumento da sua atividade no sétimo dia, como previamente descrito por outros autores (Kherif et al., 1999).

Está bem documentado que a atividade da MMP-2 está relacionada com a regeneração de novas miofibrilas, possivelmente devido à degradação do colágeno tipo IV na membrana basal (Kherif et al., 1999; Ohtake et al., De 2006; Fukushima et al., 2007). Esse fato demonstra que o aumento da expressão da MMP-2, bem como a sua atividade está relacionada com a regeneração muscular, sugerindo que o remodelamento da MEC mediada pela MMP-2 e MMP-9 é um processo essencial na degeneração e regeneração da fibra muscular.

Interessantemente, a ALT-C reduziu o pico de expressão da MMP-2 três dias após a criolesão, enquanto que no sétimo dia não foi observado alteração da expressão dessa enzima. Está bem descrito que a expressão gênica da MMP-2 é regulada por vários fatores, dentre eles os ésteres de forbol, sinalização de integrinas, proteínas extracelulares e mudanças na forma celular (Kheradmand et al. 1998; Sternlicht e Werb, 2001). Apesar desse fato, a inter-relação entre as vias de sinalização que regulam a expressão da MMP-2 não são totalmente conhecidas (Sternlicht e Werb, 2001).

Na tentativa de um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação de proteínas com domínio tipo desintegrina, foi demonstrado que a jararagina, uma desintegrina homóloga a alternagina, presente no veneno da serpente *Bothrops*

*jararaca*, afeta a expressão gênica da MMP-1 em fibroblastos dependendo da forma como os mesmos são cultivados (Zigrino et al., 2002). A jararagina aumentou os níveis protéicos e de RNAm da MMP-1 quando os fibroblastos foram crescidos em monocamadas, porém não teve qualquer efeito quando as células foram crescidas em matriz tridimensional de colágeno, que mimetiza o ambiente celular *in vivo*. Os fibroblastos apresentam diferentes padrões de expressão gênica quando aderidos em matriz tridimensional quando comparado com cultura em monocamada de células (Cukierman et al., 2001). O colágeno desencadeia uma sinalização celular mediada pela integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que modifica a expressão gênica de várias proteínas, incluindo as MMPs (Zigrino et al., 2002). É possível que a ALT-C module a expressão gênica de fibroblastos *in vitro* e no músculo esquelético *in vivo* de maneira distinta, na dependência do tipo de receptor envolvido. Dessa forma, outros estudos, utilizando técnicas como o microarranjo de cDNA e análises *in vitro* com diferentes tipos de células são necessários para entender a interação entre a ALT-C e as MMPs e elucidar uma possível inter-relação entre essas vias de sinalização. Isto permitirá um melhor entendimento do mecanismo de ação da ALT-C em reduzir a expressão da MMP-2 durante a regeneração muscular.

A redução da atividade da MMP-2 no grupo L7+ALT-C também não está totalmente esclarecida, mas pode-se sugerir que a interação entre ALT-C e o colágeno IV possa impedir a ligação entre a MMP-2 e colágeno IV. Esta interação poderia reduzir a atividade da MMP-2, já que a sua ativação é aumentada na presença de interação com o colágeno tipo IV (Maquoi et al. 2000). De fato, já foi demonstrado que outras SVMPs, como a jararagina (*Bothrops jararaca*) e o domínio rico em cisteína da atrolisina A (*Crotalus atrox*) são capazes de se ligarem a diferentes tipos de colágeno (Serrano et al.,

2005 , 2006). Uma vez que a ALT-C é homóloga a estas proteínas seria possível sugerir uma função semelhante desta proteína na interação com o colágeno.

Além disso, a redução dos níveis de RNAm da MMP-2 no grupo L3+ALT-C poderia explicar a inibição da pró-MMP-2 no grupo L7+ALT-C, uma vez que a síntese e a atividade da MMP-2 são reguladas no nível transcricional (Carmeli et al., 2004). Apesar da complexa regulação das MMPs e da dificuldade para inferir detalhes de um padrão espacial e temporal da expressão de RNAm e da sua atividade (Page-McCaw et al., 2007), é possível sugerir que a redução no conteúdo de RNAm da pró-MMP-2 possa reduzir o conteúdo da sua proteína e conseqüentemente a sua atividade (Carmeli et al., 2004; Page-McCaw et al., 2007), como observado no presente estudo nos ensaios de zimografia. Além disso, a redução da forma ativa da MMP-2 no grupo L7+ALT-C poderia ser conseqüência da inibição da pró-MMP-2, e também pode ser justificada pela interação entre ALT-C e colágeno IV, que não permite a ligação entre MMP-2 e colágeno tipo IV.

Está bem estabelecido que a MMP-2 está envolvida na proliferação, migração dos mioblastos (Kherif et al., 1999; Ohtake et al., 2006; Fukushima et al., 2007), bem como no processo de brotamento capilar (Carmeli et al., 2004). Portanto, estes resultados iniciais aqui apresentados sugerem que a redução da quantidade RNAm da MMP-2 e da sua atividade inerente ao tratamento pela ALT-C poderia prejudicar o processo de regeneração muscular. No entanto, outros estudos são necessários para validar esta hipótese.

Outro achado interessante desse estudo foi a presença da atividade da MMP-9 no músculo TA nos grupos L3 e L3+ALT-C. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, os quais relataram que a atividade da MMP-9 é aumentada durante os 3 primeiros dias após lesão por cardiotoxina no músculo TA, sendo que após o terceiro

dia ocorre redução tanto nos níveis de RNAm, quanto no conteúdo protéico da MMP-9 (Kherif et al., 1999). Além disso, a MMP-9 está co-localizada com células inflamatórias, como leucócitos e macrófagos (Kherif et al., 1999). De maneira geral, estes dados sugerem que a MMP-9 está associada não só com o remodelamento da MEC durante a inflamação, mas também no início de regeneração muscular, provavelmente devido à ativação de células satélite (Fukushima et al., 2007). Além disso, nossos resultados demonstraram que a ALT-C não alterou a atividade da MMP-9 no músculo TA 3 dias após criolesão, sugerindo que ALT-C promove alterações na atividade somente na MMP-2.

## CONCLUSÃO

Esse estudo indica que o tratamento com a ALT-C, na concentração de 50nM, não acelerou o processo de regeneração muscular em ratos. No entanto, a ALT-C reduziu tanto os níveis de RNAm da MMP-2 quanto a sua atividade na zimografia no músculo TA após a criolesão, sugerindo que ALT-C altera o *turnover* das proteínas da MEC durante a regeneração muscular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASANO, T.; KANEKO, E.; SHINOZAKI, S.; IMAI, Y.; SHIBAYAMA, M.; CHIBA, T.; AI, M.; KAWAKAMI, A.; ASAOKA, H.; NAKAYAMA, T.; MANO, Y.; SHIMOKADO, K. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. **Circ J**, v.71, p.405-411, 2007.

CARMELI, E.; MOAS, M.; REZNICK, A.Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v.29, p.191-197, 2004.

CHARGE, S.B.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v.84, p.209-238, 2004.

COMINETTI, M.R.; RIBEIRO, J.U.; FOX, J.W.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. **Arch Biochem Biophys**, v.416, p.171-179, 2004.

CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D.R.; YAMADA, K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v.294, p.1708-1712, 2001.

FERRÉ, P.J.; LIAUBET, L.; CONCORDET, D.; SANCRISTOBAL, M.; URO-COSTE, E.; TOSSER-KLOPP, G.; BONNET, A.; TOUTAIN, P.L.; HATEY, F.; LEFEBVRE, H.P. Longitudinal analysis of gene expression in porcine skeletal muscle after post-injection local injury. **Pharm Res**, v.24, p.1480-1489, 2007.

FUKUSHIMA, K.; NAKAMURA, A.; UEDA, H.; YUASA, K.; YOSHIDA, K.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). **BMC Musculoskelet Disord**, v.28, p.8-54, 2007.

GUEDERS, M.M.; FOIDART, J.M.; NOEL, A.; CATALDO, D.D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. **Eur J Pharmacol**, v.533, p.133-144, 2006.



GULATI, A.; REDDI, A.; ZALEWSKI, A. Changes in the basement membrane zone components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration. **J Cell Biol**, v.97, p.957-962, 1983.

HILL, M.; GOLDSPIK, G. Expression and splicing of the insulinlike growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **J Physiol**, v.549, p.409-418, 2003.

KHERADMAND, F.; WERNER, E.; TREMBLE, P.; SYMONS, M.; WERB, Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. **Science**, v.280, p.898-902, 1998.

KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J.G.; VERDIÈRE-SAHUQUÉ, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H.S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Dev Biol**, v.205, p.158-170, 1999.

MAQUOI, E.; FRANKENNE, F.; NOËL, A.; KRELL, H.W.; GRAMS, F.; FOIDART, J.M. Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. **Exp Cell Res**, v.261, p.348-359, 2000.

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A.L.; TERRUGGI, C.H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M.S. Alternagin-C, a non-RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur J Biochem**, v.270, p.4799-4808, 2003.

MARSH, D.R.; CRISWELL, D.S.; CARSON, J.A.; BOOTH, F.W. Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. **J Appl Physiol**, v.83, p.1270-1275, 1997.

MENON, B.; SINGH, M.; SINGH, K. Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.289, p.168-176, 2005.

MIYABARA, E.H.; MARTIN, J.L.; GRIFFIN, T.M.; MORISCOT, A.S.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.290, p.1128-1138, 2006.

OHTAKE, Y.; TOJO, H.; SEIKI, M: Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. **J Cell Sci**, v.119, p.3822-3832, 2006.

OLIVEIRA, N.M.L.; RAINERO, E.P.; SALVINI, T.F. Three intermittent sessions of cryotherapy reduce the secondary muscle injury in skeletal muscle of rat. **J Sports Sci & Med**, v.5, p.228-234, 2006.

OLSSON, A.K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.7, p.359-371, 2006.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, p.221-233, 2007.

PRIOR, B.M.; YANG, H.T.; TERJUNG, R.L. What makes vessels grow with exercise training? **J Appl Physiol**, v.97, p.1119-1128, 2004.

RAMOS, O.H.; TERRUGGI, C.H.; RIBEIRO, J.U.; COMINETTI, M.R.; FIGUEIREDO, C.C.; BÉRARD, M.; CREPIN, M.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Arch Biochem Biophys**, v.461, p.1-6, 2007.

RANTANEN, J.; HURME, T.; LUKKA, R.; HEINO, J.; KALIMO, H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. **Lab Invest**, v.72, p.341-347, 1995.

RUSSO, T.L.; PEVIANI, S.M.; DURIGAN, J.L.Q.; SALVINI, T.F. Electrical stimulation increases matrix metallo-proteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, v.37, p.593-600, 2008.

SAKUMA, K.; WATANABE, K.; SANO, M.; URAMOTO, I.; SAKAMOTO, K.; TATSUKA, T. The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. **Biochim Biophys Acta**, v.1428, p.284-2926, 1999.

SCHWARTZ, P.H.; NETHERCOTT, H.; KIROV, I.I.; ZIAEIAN, B.; YOUNG, M.J.; KLASSEN, H. Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. **Stem Cells**, v.23, p.1286-1294, 2005.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz J Med Biol Res**, v.38, p.1505-1511, 2005.

SENGER, D.R.; VAN DE WATER, L.; BROWN, L.F.; NAGY, J.A.; YEO, K.T.; YEO, T.K.; BERSE, B.; JACKMAN, R.W.; DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer Metastasis Rev**, v.12, p.303-324, 1993.

SERRANO, S.M.; JIA, L.G.; WANG, D.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting

adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochem J**, v.391, p.69-76, 2005.

SERRANO, S.M.; KIM, J.; WANG, D.; DRAGULEV, B.; SHANNON, J.D.; MANN, H.H.; VEIT, G.; WAGENER, R.; KOCH, M.; FOX, J.W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **J Biol Chem**, v.281, p.39746-39756, 2006.

SHI, X.; GARRY, D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes Dev**, v.20, p.1692-1708, 2006.

SOUZA, D.H.; IEMMA, M.R.; FERREIRA, L.L.; FARIA, J.P.; OLIVA, M.L.; ZINGALI, R.B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys**, v.384, p.341-350, 2000.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p.463-516, 2001.

WAGATSUMA, A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. **Mol Cell Biochem**, v.298, p.151-159, 2007.

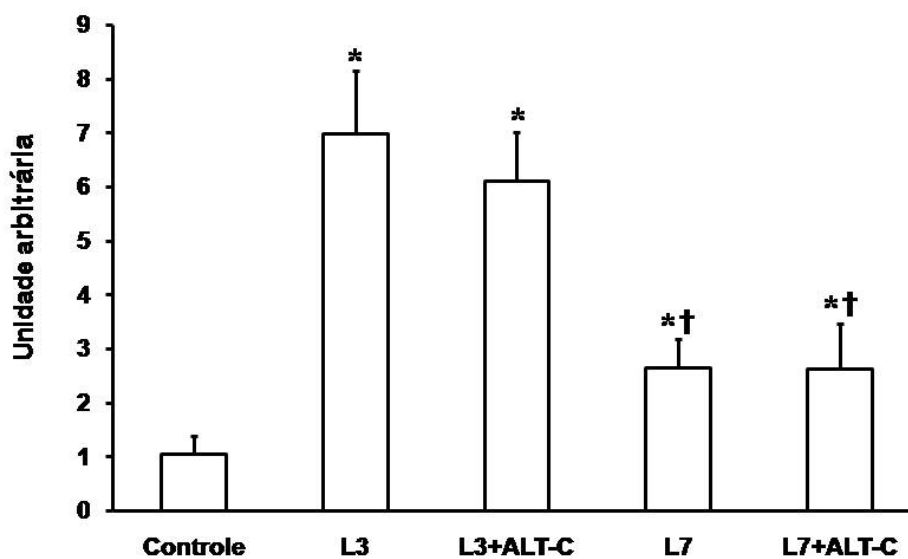
WARREN, G.L.; HULDERMAN, T.; JENSEN, N.; MCKINSTRY, M.; MISHRA, M.; LUSTER, M.I.; SIMEONOVA, P.P. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. **FASEB J**, v.16, p.1630-1632, 2002.

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A.S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J.W.; MAUCH, C. The reprotolysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J Biol Chem**, v.277, p.40528-40535, 2002..

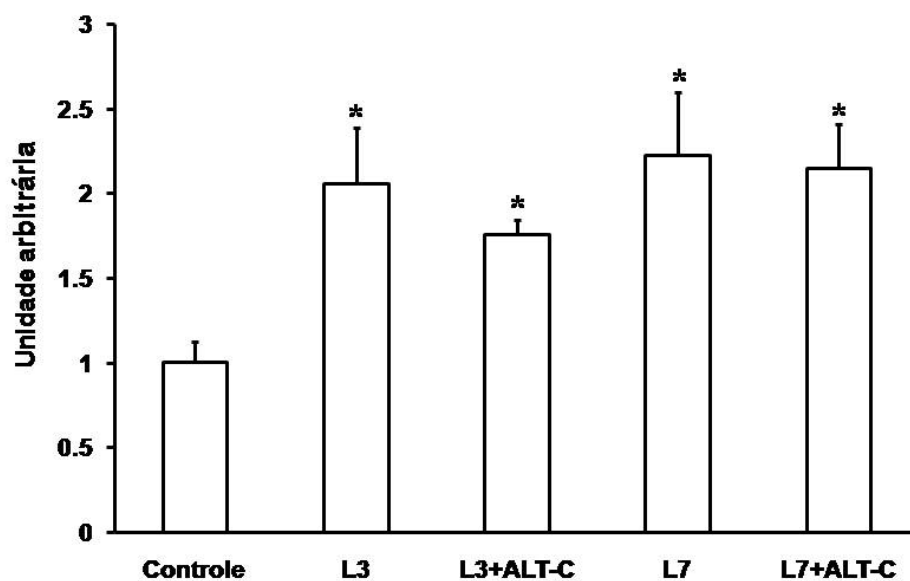
**Tabela 1:** Peso muscular e área de secção transversal total e lesada do músculo TA

<b>Grupos</b>	<b>Peso Muscular (g)</b>	<b>Área Total mm<sup>2</sup></b>	<b>Área Lesada mm<sup>2</sup></b>
<b>Controle</b>	0.55 ± 0.07	43.04±4.7	-
<b>L3</b>	0.43 ± 0.06*	42.26±4.6	24.13±4.5
<b>L3+ALT-C</b>	0.45 ± 0.04*	44.39±5.1	22.09±4.1
<b>L7</b>	0.44 ± 0.06*	41.76±4.8	16.76±3.6 †
<b>L7+ALT-C</b>	0.46±0.06*	45.84±3.1	15.68±4.0 †

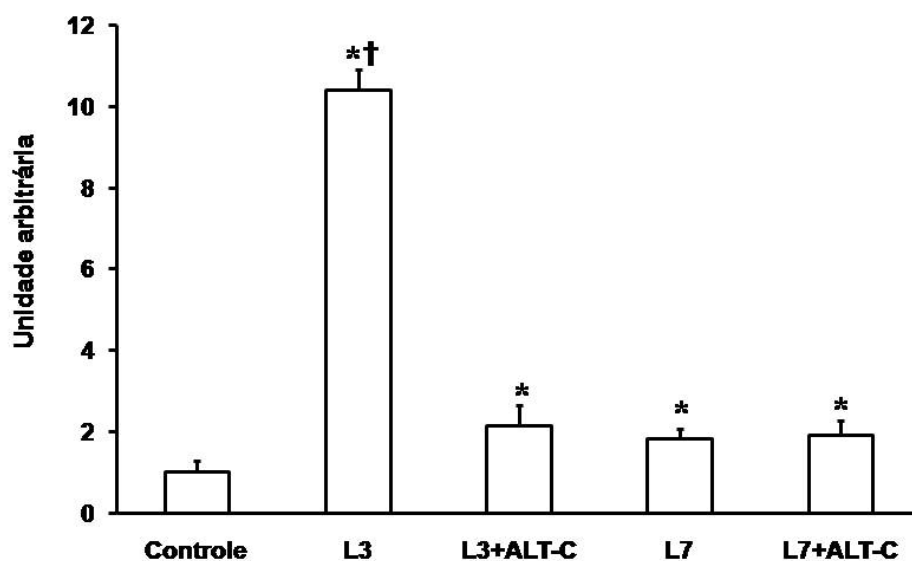
Os dados foram representados em média ± desvio padrão. Músculo tibial anterior (TA) normal (controle); TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C); TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). \*P < 0.05: comparado com o peso muscular do grupo controle; † P < 0.05: comparado com a área lesada dos grupos L3 e L3+ALT-C.



**FIGURA 1.** Níveis de RNAm da MyoD no músculo tibial anterior (TA) de ratos. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo tibial anterior (TA) normal (controle); TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C); TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). \* $P < 0.05$ : comparado ao grupo controle; †  $P < 0.05$ : comparado com os grupos L3, L3+ALT-C.

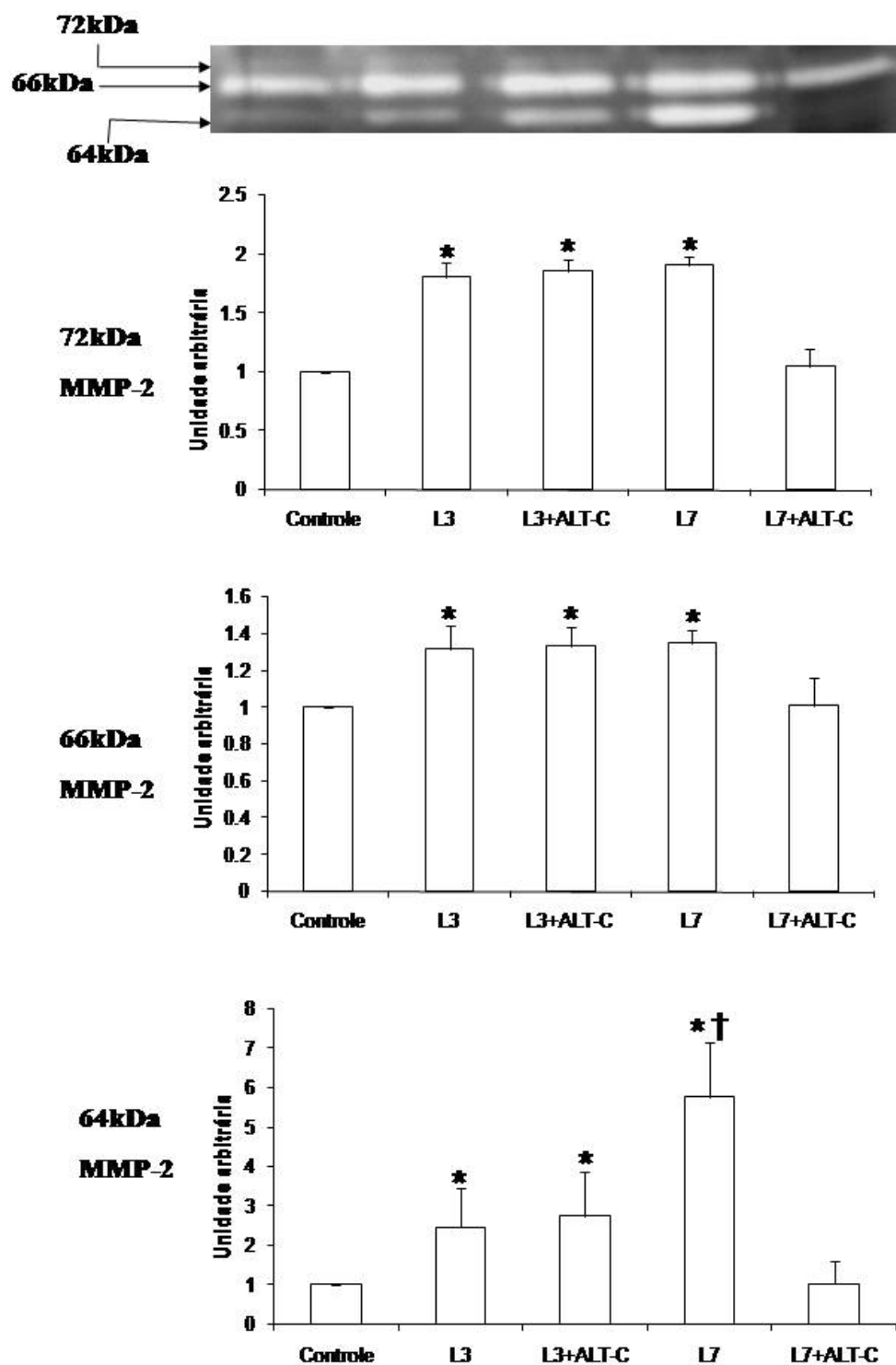


**FIGURA 2.** Níveis de RNAm da VEGF no músculo tibial anterior (TA) de ratos. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo tibial anterior (TA) normal (controle); TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C); TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). \*  $P < 0.05$ : comparado ao grupo controle.



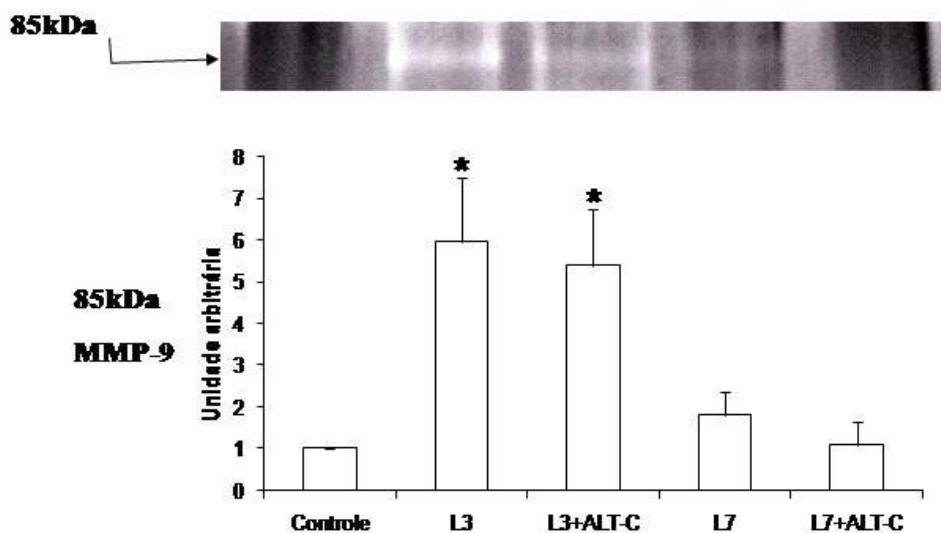
**FIGURA 3.** Níveis de RNAm da MMP-2 no músculo tibial anterior (TA) de ratos. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo tibial anterior (TA) normal (controle); TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C); TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). \* $P < 0.05$ : comparado ao grupo controle; †  $P < 0.05$ : comparado com todos os grupos.





**FIGURA 4.** Densitometria óptica das bandas da MMP-2 em unidade arbitrária do músculo tibial anterior (TA). Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo TA normal (controle); TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C); TA lesados e analisados 7 dias após

a lesão (L7) e TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). Pró-MMP-2 (72 kDa); Intermediária-MMP-2 (66 kDa); Ativa-MMP-2 (64 kDa). \*P<0.05: Comparado ao grupo controle; † P<0.05: comparado com todos os grupos.



**FIGURA 5.** Densitometria óptica da banda da MMP-9 em unidade arbitrária do músculo tibial anterior (TA). Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Músculo TA normal (controle); TA lesados e analisados 3 dias após lesão (L3); TA lesados 3 dias e tratados com ALT-C (L3+ALT-C); TA lesados e analisados 7 dias após a lesão (L7) e TA lesados 7 dias e tratados com ALT-C (L7+ALT-C). Ativa-MMP-9 (85 kDa); \* $P < 0.05$ : comparado ao grupo controle.

**APÊNDICE I:** Manuscrito submetido ao periódico *Respiratory Medicine*

**EFFECTS OF AEROBIC TRAINING ON ATROPHY GENE EXPRESSION IN  
MOUSE SKELETAL MUSCLE WITH CHRONIC ALLERGIC LUNG  
INFLAMMATION**

**Authors:**

João Luiz Quagliotti Durigan<sup>1</sup> (MS), Sabrina Messa Peviani<sup>1</sup> (MS), Thiago Luiz Russo<sup>1</sup> (MS), Anna Cecília Duarte<sup>2</sup> (MS), Rodolfo Paula Vieira<sup>3</sup> (MS, PhD), Milton Arruda Martins<sup>4</sup> (MD, PhD), Celso Ricardo Fernandes Carvalho<sup>2</sup> (MS, PhD), Tania Fátima Salvini<sup>1</sup> (MS, PhD).

<sup>1</sup> Unit of Skeletal Muscle Plasticity, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physical Therapy, <sup>3</sup> Department of Pathology, and <sup>4</sup> Department of Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Avenida Doutor Arnaldo, 455, 1º Andar, Sala 1216, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

**Acknowledgments:**

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brazil (grants n° 05/04413-1 and 05/5474-3). J. L. Q. Durigan is PhD fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); T. L. Russo, S. M. Peviani and Anna Cecilia Duarte are PhD fellows of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); and Rodolfo P. Vieira is Post-Doctoral fellow of FAPESP. The authors are grateful to Tereza F. Piassi for technical assistance.

**Mailing Address:** Tania Fátima Salvini. Phone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail: [tania@power.ufscar.br](mailto:tania@power.ufscar.br)

**Running head:** Muscle gene expression in asthma.

**ABSTRACT**

This study evaluated the effects of chronic allergic airway inflammation and of treadmill training at low and moderate intensities on muscle cross sectional area (CSA) and mRNA levels of atrogen-1 and MuRF1 in the tibialis anterior (TA) muscle. Six mice per group were examined: (1) control, non-sensitized and non-trained (C); (2) ovalbumin sensitized (OA); (3) non-sensitized and trained at 50% of maximum speed – low intensity (PT50%); (4) non-sensitized and trained at 75% of maximum speed – moderate intensity (PT75%); (5) OA sensitization and trained at 50% (OA+PT50%), (6) OA sensitization and trained at 75% (OA+PT75%). There was no difference in the CSA among all groups. Moreover, there was no difference in the atrogen-1 and MuRF1 expression between C and OA groups. However, all exercised groups showed decreased expression of these genes, when compared with C and OA groups. Thus, a short period of OA did not induce skeletal muscle atrophy in the mouse TA muscle. Furthermore, the treadmill training at different intensities negatively regulated the atrophy pathways in the skeletal muscle, independently of allergic lung inflammation. These initial results suggest that aerobic training should be used to prevent myoprotein degradation inherent to peripheral muscle disuse in respiratory disease.

**Key words:** aerobic training, asthma, atrophy genes, mice, muscle atrophy.

## INTRODUCTION

Asthma is a chronic airway inflammatory disease related to a progressive decrease in lung function and also of the physical capacity to exercise.<sup>0</sup> Many clinical and experimental studies have suggested that decreased lung function can be attributed directly to airway inflammation and remodeling.<sup>0,0</sup> On the other hand, decreased physical capacity is normally considered to be secondary to decreased lung function,<sup>0</sup> and it is strongly related to psychosocial to the effects of asthma<sup>0</sup> and peripheral skeletal muscle disuse.<sup>0</sup> In addition, these secondary effects have been demonstrated in both asthmatic children and asthmatic adults.<sup>0</sup>

Recently, two studies showed the increase in muscle specific-genes related to atrophy in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Doucet and colleagues<sup>0</sup> reported an increase in atrogin-1 and MurRF1 mRNA in the quadriceps muscle of patients with COPD. Furthermore, Ottenheijm et al.<sup>26)</sup> also showed an increase in atrogin-1 gene expression in the diaphragm muscle in patients with mild to moderate COPD. Atrogin-1 and MurRF1 mRNA levels are reliable molecular markers for muscle atrophy due to being substantially increased in peripheral skeletal muscle during various muscle-wasting conditions, such as denervation, immobilization, cancer, sepsis and aging.<sup>0,0,0</sup> However, the molecular mechanism involved in the skeletal muscles weakness in asthmatic subjects is still unknown.

Aerobic physical training has been recommended as an effective adjuvant treatment in the management of asthmatic patients.<sup>0,0</sup> The performance of aerobic physical training in asthmatic patients triggers several beneficial effects such as improvement in physical fitness and ventilatory capacity and a decrease in asthma-related symptoms, exercise-induced bronchospasm, and daily use of inhaled steroids.<sup>0,10),0,0</sup> Other authors demonstrated that asthmatic patients submitted to an aerobic physical training program

also presents improvement in respiratory and peripheral muscle strength and function.<sup>5),6)</sup> However, the mechanisms underlying these effects remains unknown.

Recently, we demonstrated that animals previously submitted to chronic airway allergic inflammation followed by aerobic exercise training presented decrease in airway inflammation and remodeling in a murine model of asthma.<sup>36)</sup> Nevertheless, relatively little is known with regard to the effects of aerobic training before the development of allergic response in peripheral skeletal muscles of asthmatic animals. This aspect should be important because skeletal muscles wasting frequently afflicts asthmatic patients<sup>0,0,0</sup> and it would be interesting to know if aerobic training could provide some kind of muscle protection before the induction of asthma.

Based on these statements, we hypothesized that chronic allergic lung inflammation reduces the cross sectional area (CSA) of the muscle fibers and increases the gene expression of atrogin-1 and MuRF1 in the tibialis anterior (TA) muscle. Another hypothesis was that aerobic physical training applied before the induction of chronic allergic lung inflammation could reduce these effects. Considering that different intensities of aerobic training may induce different adaptations in asthmatic inflammatory response<sup>0,0,36)</sup> in the present study, the effect of two aerobic treadmill training intensities was analyzed.

Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the effects of aerobic treadmill training at a low and moderate intensity before and during chronic allergic lung inflammation on the CSA of the muscle fibers and on mRNA levels of atrogin-1 and MuRF1 in the mouse TA muscle. Considering the similarities among mammal muscles, the results of this study could provide new information for the understanding and use of treadmill training with regard to peripheral muscles in asthma.



## **MATERIAL AND METHODS**

This study was approved by the review board for human and animal studies of the School of Medicine of the University of São Paulo and was developed in compliance with the national guidelines of the Guide for care and use of laboratory animals.<sup>0</sup>

### ***Animals and Experimental Design***

Thirty male Balb/c mice, 4 months-old ( $28.5 \pm 0.8$ g) were used and randomly divided into 6 groups with 5 animal in each: (1) non-sensitized and non-trained (control group); (2) ovalbumin sensitized and non-trained (OA group); (3) non-sensitized and treadmill trained at 50% of maximum speed – low intensity (PT50%); (4) non-sensitized and treadmill trained at 75% of maximum speed – moderate intensity (PT75%); (5) OA-sensitized and treadmill trained at 50% of maximum speed (OA+PT50%); and, (6) OA-sensitized and treadmill trained at 75% of maximum speed (OA+PT75%).

### ***Aerobic Exercise Treadmill Test and Aerobic Conditioning***

Animals were initially adapted to the treadmill during 3 days (15 min, 0.2 km/h). After that, a maximal exercise capacity test was performed with a 5 min warm-up (0.2 km/h) followed by an increase in the treadmill speed (every 2.5 minutes) until animal exhaustion, i.e., until they were not able to run even after 10 mechanical stimuli.<sup>36)</sup> Maximal aerobic capacity (100%) was established as the maximal speed reached by each animal. Mice were exercise trained at low or moderate intensities (respectively, 50% or 75% of maximal speed reached in the test) during 60 minutes a day, 5 days a week for 12 weeks (8 weeks before sensitization + 4 weeks after OA or saline

exposure.<sup>36)</sup> The improvement in exercise capacity was verified by repeating the maximal exercise test after 12 weeks of physical training (72 hours before sacrificing).

### ***Antigen Sensitization***

The antigen sensitization period started in the 9<sup>th</sup> week of physical training and lasted for 4 weeks. The mice were sensitized by intraperitoneal (i.p.) injection of OA (20 µg per mouse) adsorbed with aluminum hydroxide on days 0 and 14 or with saline (NaCl 0.9%), the diluent of OA. During the last week, the mice were challenged with aerosolized OA (1%) or with saline 4 times, every other day, for 30 minutes each. Challenging with aerosolized OA (or saline) was performed in an acrylic box (30 x 15 x 20 cm) coupled to an ultrasonic nebulizer. Figure 1 shows the time line of experimental protocol of aerobic test and training and also of OA sensitization.

### ***Anesthesia and Euthanasia of Animals***

Seventy-two hours after the end of the exercise conditioning and antigen sensitization protocols, animals were anesthetized by i.p. injection of xylazine (12 mg.kg<sup>-1</sup>) and ketamine (95 mg.kg<sup>-1</sup>) for muscle dissection. After that, they were euthanized by an overdose of the anesthetic.

### ***Muscle Evaluation***

The TA muscle was chosen because almost totally fibers cross the middle belly of the muscle and they are distributed from tendon to tendon. In addition, it is a large muscle and it is possible to evaluate the CSA of the muscle fibers and the gene expression in the same muscle. The mice were weighed and both the right and left TA muscles carefully removed and also weighed. The left TA was used for the morphological evaluation and was immediately frozen in isopentane, pre-cooled in

liquid nitrogen, and stored in a freezer at  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Marietta, Ohio). Serial cross-sections ( $10\ \mu\text{m}$ ) were then obtained from the middle belly of the frozen left TA muscles using a cryostat microtome (Microm HE 505, Jena, Germany) and stained with 1% toluidine blue/1% borax. The right TA was used for the mRNA analysis and they were frozen in liquid nitrogen and also stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as previously described.<sup>0,Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>

### ***Muscle-Fiber Cross-Section Area (CSA)***

One histological cross-section from the middle belly of each left TA muscle was used to measure the muscle-fiber CSA. The CSA measurements were realized in the central region of the histological section. A light microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (Sony DSC S75, Tokyo, Japan) was used. The CSA of 200 randomly chosen fibers was measured using the Axiovision 3.0.6 SP4 software (Zeiss, Jena, Germany).<sup>0,Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>

### ***RNA Isolation and Analysis***

RNA was isolated from one frozen fragment from the distal ends of each TA muscle using 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), in accordance with the manufacturer's instructions. The extracted RNA was dissolved in Tris-HCl and ethylenediaminetetracetic (EDTA) acid (pH 7.6) and quantified by spectrophotometry. The purity was assessed by determining the ratio of the absorbance at 260 nm and 280 nm. All samples had 260/280 nm ratios above 2.0. The integrity of the RNA was confirmed by inspection of ethidium bromide stained 18S and 28S ribosomal RNA under ultraviolet light (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### ***Reverse Transcription***

Total RNA was reverse transcribed to synthesize cDNA in two steps. First, 1 µl of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 9.5 µl of water was added to 1 µg of total RNA, heated to 70°C for 10 min and quickly cooled on ice. Second, 4 µl of 5x reverse transcription buffer, 1 µl of a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture containing 0.2mM each of dATP, dCTP, dGTP, and 0.1 M dTTP, 2 µl of 0.1M dithiothreitol (DTT) and 0.5 µl of M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI) in a total volume of 20 µl and it was incubated at 42°C for 60 min for each sample. To minimize variation in the reverse transcription reaction, all RNA samples were reverse transcribed simultaneously.

### ***Oligonucleotide Primers***

Oligonucleotide primers were designed for atrogen-1 (GenBank, AF441120), MuRF1 (GenBank, AY059627) and GAPDH (AF106860) using the Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences used were from rat atrogen-1 (forward: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; reverse: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT), from rat MuRF1 (forward: TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG; reverse: TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG) and from rat GAPDH (forward: CCACCAACTGCTTAGCCC; reverse: GCCAAATTCGTTGTCATACC) genes.

### ***Analysis by Real-Time Polymerase Chain Reactions (RT-PCR)***

Detection of mRNA for the different experimental and control muscles was performed in Rotor Gene 3000 (Cobert's, Sydney, Australia). The amplification mixes contained 1

$\mu$ l of cDNA sample, 25  $\mu$ l of fluorescent dye SYBR green Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer in a final volume of 50 $\mu$ l.

Thermal cycling conditions for atrogen-1, MuRF1 and GAPDH included 10 min at 95°C, and then 40 cycles each of 15 s at 94°C, 30s at 56°C for atrogen-1, at 64°C for MuRF1 and at 56°C for GAPDH, respectively, and 1 min at 72°C, then 10 min at 72°C. For each gene, all samples were amplified simultaneously in duplicate in one assay run. Data were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method. The target gene expression was normalized to GAPDH gene, as performed in accordance with others.<sup>0</sup>

### ***Statistical Analysis***

Levene's test was applied first to evaluate the homogeneity of the results. One way ANOVA was used to identify possible differences amongst groups. When differences were observed, the Tukey test was performed. For all tests, the significance level was set at 5% ( $p \leq 0.05$ ).

## **RESULTS**

### ***Body and Tibial Anterioris (TA) Muscle Weight and Cross Section Area (CSA)***

All groups presented an increase in body weight when comparing the initial and final weights ( $p < 0.05$ ) but no difference was found among them (Table 1). Although the weight of TA muscle was slightly lower in the OA+PT50% and OA+PT75% groups, no differences were found in the CSA among studied groups.

### ***Aerobic Exercise Capacity***

Figure 2 shows the average improvement in time of maximal exercise between the final and initial tests in all groups. Animals did not present any difference in the first exercise test ( $p > 0.05$ ) and the average exercise time was  $39.40 \pm 0.45$  minutes (data not shown).

After the protocol, non-trained groups (control and OA) did not present any improvement in exercise capacity. On the other hand, PT50%, PT75%, OA+PT50% and OA+PT75% groups presented improvements in the maximal exercise performance in the final test (after 8 weeks:  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively), and kept this better performance in the final test.

### *Atrogin-1 and MuRF1 Gene Expressions*

Atrogin-1 gene expression was not altered in OA group when compared with the control (Figure 3;  $p = 0.17$ ). However, aerobic training decreased the atrogin-1 gene expression in TA muscles of all trained groups in comparison with the control ( $1.01 \pm 0.2$  fold): PT50%:  $0.71 \pm 0.12$  fold,  $p = 0.03$ ; OA+PT50%:  $0.74 \pm 0.03$  fold,  $p = 0.02$ ; PT75%:  $0.71 \pm 0.09$  fold,  $p = 0.02$ ; OA+PT75%:  $0.74 \pm 0.09$  fold,  $p = 0.01$  (Figure 3).

Similar results were found in MuRF1 gene expression, which was not altered in OA group when compared with the control ( $p = 0.89$ ), (Figure 4). In addition, a decreased MuRF1 gene expression was also found in TA muscles after aerobic training when compared with the control ( $1.01 \pm 0.23$  fold): PT50%:  $0.53 \pm 0.20$  fold; OA+PT50%:  $0.55 \pm 0.11$  fold; PT75%:  $0.35 \pm 0.15$  fold; OA+PT75%:  $0.37 \pm 0.08$  fold ( $p = 0.01$  for all groups), (Figure 4).

## **DISCUSSION**

As far as we know, this is the first study that analyzed the effects of prolonged treadmill training at different intensities on the molecular markers for muscle atrophy in a peripheral skeletal muscle in an atopic asthma mouse model. Data analysis revealed that lung inflammation did not modify the CSA, atrogin-1 and MuRF1 gene expressions in the TA muscle. However, the treadmill training reduced the expression of these genes in all exercised groups, which could be beneficial for protection against skeletal muscle

atrophy in patients with respiratory diseases, such as asthma, during a rehabilitation program.

Recently, previous studies showed the increase in muscle muscle molecular atrophy markers in human COPD disease.<sup>0,26)</sup> Doucet and colleagues<sup>0</sup> reported an increase in the activation of muscle atrophy by the up-regulation: atrogen-1 and MuRF1 in the quadriceps muscle in COPD patients. They provided relevant knowledge of a potential molecular mechanism underlying the development of quadriceps muscle atrophy and weakness in these patients, since atrogen-1 and MuRF1 have been found to be markedly up-regulated during cachexia- and disuse-induced atrophy.<sup>0,0,0</sup>

Interestingly, the present study results demonstrated that a short period of OA was not effective to induce muscle atrophy, and to modify the molecular markers for muscle atrophy in mouse TA muscles. These results are interesting when compared with those of Doucet and colleagues'<sup>0</sup> and some aspects can contribute to finding differences. Probably, the differences between the present study and the Doucet<sup>0</sup> report could be related to different lung diseases and models assessed, since in the present study an asthmatic mouse model was studied, whereas Doucet<sup>0</sup> evaluated a COPD disease in humans. The absence of molecular markers for muscle atrophy in OA group in the present could be attributed to the short period (4 weeks) of the allergic sensitization protocol. Maybe, this period is not long enough to induce skeletal muscle atrophy. Furthermore, although it is difficult to undertake such a study in humans for ethical reasons, future investigations will be necessary for comparative purposes.

Additionally, in the present study the TA muscle was assessed, which is predominately composed of a high percentage of fast-twitch fibers. It should be interesting to examine skeletal muscle with high percentage of slow-twitch fibers, which are more susceptible to disuse atrophy than fast-twitch fibers.<sup>0</sup> Future studies would be necessary to evaluate

whether a muscle composed predominately of slow-twitch fibers is more susceptible to peripheral muscle-fiber atrophy in a mouse asthma model.

Another aspect of the present study results could be associated with the asthma animal model used here. It has been widely accepted that the mouse model of atopic asthma following OA presents some similarities to asthmatic reaction in humans, as regards airway inflammation.<sup>0</sup> Nevertheless, there is poor information whether this model triggers the mechanism of peripheral skeletal muscle weakness and atrophy, as observed in asthmatic subjects. The results of the present study suggest that only 4 weeks of atopic asthma following OA was not long enough to induce muscle fiber atrophy. Future investigations that examine animals submitted to a long period of asthma will be necessary to evaluate whether the asthma model used here is efficient to induce muscle fiber atrophy in mice.

In spite of the well described effects of aerobic training at a moderate intensity to provide anti-inflammatory effects in asthma,<sup>0,36)</sup> no information is available regarding the effects of training on peripheral skeletal muscle in this disease. Previous studies demonstrated that this type of exercise may be used to prevent muscle atrophy under disuse conditions.<sup>0,0</sup> The present study showed that treadmill physical training did not alter the CSA of the TA muscle fibers, which is in agreement with a previous study that reported that 12 weeks of treadmill physical training (75% of VO<sub>2</sub>max) had no effect on the CSA of the TA muscle in young rats.<sup>0</sup>

Although the present study did not report change in the CSA of the TA muscle fibers after aerobic treadmill training, other studies have demonstrated that aerobic training presents improvement in respiratory and peripheral muscle strength and function,<sup>5),6)</sup> which was not evaluated here. Therefore, in future studies will be important to assess



the muscle strength and function after aerobic treadmill training in the mouse asthmatic model.

It is interesting to note that both physical trainings (50% and 75%), reduced the accumulation of atrogin-1 and MuRF1 mRNA in TA muscle in both asthmatic and non-asthmatic groups, in comparison with non-trained groups. Decrease of atrogin-1 and MuRF1 mRNA levels by aerobic exercise may provide protection against myoprotein degradation and reduced contractile function inherent to muscle cachexia and disuse, for example, in chronic diseases such as asthma. Clinically, these findings should be important in respiratory disease rehabilitation, since this protocol was sufficient to change the expression of muscle specific-genes related to the atrophy pathway. Nevertheless, studies in humans are also necessary to examine this hypothesis.

Although further studies are necessary, these initial results suggest that aerobic training should be used during a rehabilitation program to prevent myoprotein degradation inherent to peripheral muscle wasting in respiratory disease. However, the evaluation of other muscles, both peripheral (quadriceps and soleus) and respiratory muscle (diaphragm) could be useful for a better understanding of the extent of muscular benefits of aerobic training for asthmatic patients. Furthermore, another hypothesis on the possible beneficial effects of aerobic training should be evaluated. For example, aerobic training at low and moderate intensities have been proposed to increase the anti-oxidant properties and decrease the production of oxidants, resulting in a decrease of muscle damage and in a optimal generation of isometric force.<sup>11),0</sup> Therefore, in addition to the evaluation of the muscle cross sectional area, another hypothesis - atrogin-1 and MuRF1 gene expression regulating muscle response in murine models of asthma could provide better knowledge about the beneficial effects of aerobic training for asthmatic patients.

In conclusion, this study indicated that a short period of chronic allergic lung inflammation did not induce skeletal muscle atrophy in the mouse asthma model. Furthermore, the treadmill aerobic training at low and moderate intensities could negatively regulate the atrophy pathways in skeletal muscles, independently of allergic lung inflammation.

## REFERENCES

- 1) American Association of Cardiovascular & Pulmonary Rehabilitation. Guidelines of pulmonary rehabilitation programmes. 2nd ed. Champaign: Human Kinetics; 1998.
- 2) British Thoracic Society Standards of Care sub-committee on Pulmonary Rehabilitation. *Thorax* 2001; 56: 827–834
- 3) Carroll N, Sly P. Exercise training as an adjunct to asthma management? *Thorax* 1999; 54: 190-1
- 4) Clark C, Cochrane L. Assessment of work performance in asthma for determination of cardiorespiratory fitness and training capacity. *Thorax* 1988; 43: 745-9.
- 5) Counil FP, Varray A, Matecki S, Beurey A, Marchal P, Voisin M, Préfaut C. Training of aerobic and anaerobic fitness in children with asthma. *J Pediatr* 2003; 142: 179-84.
- 6) Counil FP, Voisin M. Physical fitness in children with asthma. *Arch Pediatr* 2006; 13: 1136-41.
- 7) Diaz-Herrera P, Torres A, Morcuende JA, Garcia-Castellano JM, Calbet JA, Sarrat R. Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats. *Histol Histopathol* 2001; 16: 29-35.

- 8) Dimitrijevic MM, Dimitrijevic MR. Clinical elements for the neuromuscular stimulation and functional electrical stimulation protocols in the practice of neurorehabilitation. *Artif Organs* 2002; 26: 256-9.
- 9) Doucet M, Russell AP, Léger B, Debigaré R, Joanisse DR, Caron MA, Leblanc P, Maltais F. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 261-9.
- 10) Fanelli A, Cabral ALB, Neder JA, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatics children. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1474-80.
- 11) Faucher M, Steinberg JG, Barbier D, Hug F, Jammes Y. Influence of chronic hypoxemia on peripheral muscle function and oxidative stress in humans. *Clin Physiol Funct Imaging* 2004; 24: 75–84.
- 12) Goldney RD, Ruffin R, Fisher LJ, Wilson DH. Asthma symptoms associated with depression and lower quality of life: a population survey. *Med J Aust* 2003; 178: 437-441.
- 13) Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ, Schols AM. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1033-47.
- 14) Kuhn C 3rd, Homer RJ, Zhu Z, Ward N, Flavell RA, Geba GP, Elias JA. Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 289-95.
- 15) Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; 18: 39–51.

- 16) Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J Nutr* 1999; 129: 227-237.
- 17) Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation. Philadelphia: Lippincott; 2002.
- 18) Lucas SR, Platts-Mills TA. Physical activity and exercise in asthma: relevance to etiology and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 928-34.
- 19) Luden N, Jemiolo B, Whitsett D, Trappe S. Effects of 13 weeks of aerobic training on basal gene expression. *FASEB J* 2007; 21: 921.9
- 20) Mancuso CA, Sayles W, Robbins L, Phillips EG, Ravenell K, Duffy C, Wenderoth S, Charlson ME. Barriers and facilitators to healthy physical activity in asthma patients. *J Asthma* 2006; 43: 137-43.
- 21) Matsumoto H, A Niimi, M Takemura, T Ueda, M Minakuchi, R Tabuena, K Chin, T Mio, Y Ito, S Muro, T Hirai, S Morita, S Fukuhara, M Mishima. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax* 2005; 60: 277–281.
- 22) McComas AJ. Human neuromuscular adaptations that accompany changes in activity. *Med Sci Sports Exerc* 1994; 26: 1498-509.
- 23) McKinnell IW, Rudnicki MA. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell* 2004; 119: 907-10.
- 24) National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.
- 25) Neder JA, Nery LE, Silva AC, Cabral AL, Fernandes AL. Short-term effects of aerobic training in the clinical management of moderate to severe asthma in children. *Thorax* 1999; 54: 202-206.

- 26) Ottenheijm CA, Heunks LM, Li YP, Jin B, Minnaard R, van Hees HW, Dekhuijzen PN. Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 997-1002.
- 27) Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol* 2004; 172: 4520-6.
- 28) Peviani SM, Gomes AR, Moreira RF, Moriscot AS, Salvini TF. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 2007; 35: 363-370.
- 29) Ram FS, Robinson SM, Black PN. Effects of physical training in asthma: a systematic review. *Br J Sports Med* 2000; 34: 162-7.
- 30) Ram FS, Robinson SM, Black PN, Picot J. Physical training for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 19: CD001116
- 31) Reid B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-731.
- 32) Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2007 ;35: 87-97.
- 33) Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 517-28.
- 34) Tang LF, Du LZ, Zou CC, Gu WZ. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in guinea pig asthma model following ovalbumin challenge. *Fetal Pediatr Pathol* 2005; 24: 81-7.

- 35) U.S. National institutes of health. Global Initiative for Asthma (GINA), from workshop report of global strategy for asthma management and prevention issued 1995 and revised 2006. U.S. Washington (DC): Government Printing Office; 2006.
- 36) Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ABG, Perini A, Faria-Neto HCC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CRF. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 871-877.

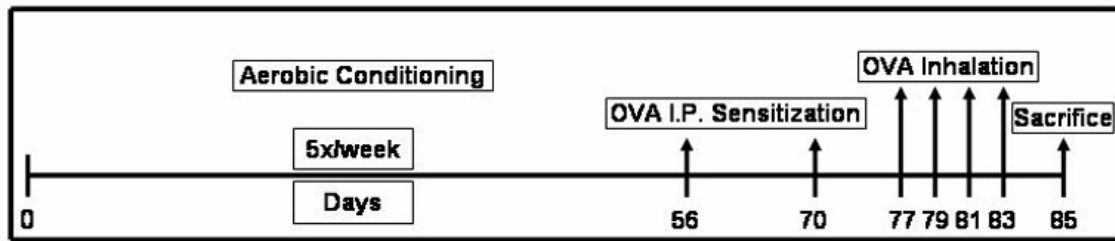


Figure 1 – Aerobic conditioning = 8 weeks; OA sensitization = 2 weeks, OaA inhalation begun 1 week after 2<sup>nd</sup> OA sensitization and it was performed 4 times. Forty eight hours after last OA inhalations, animals were sacrificed.

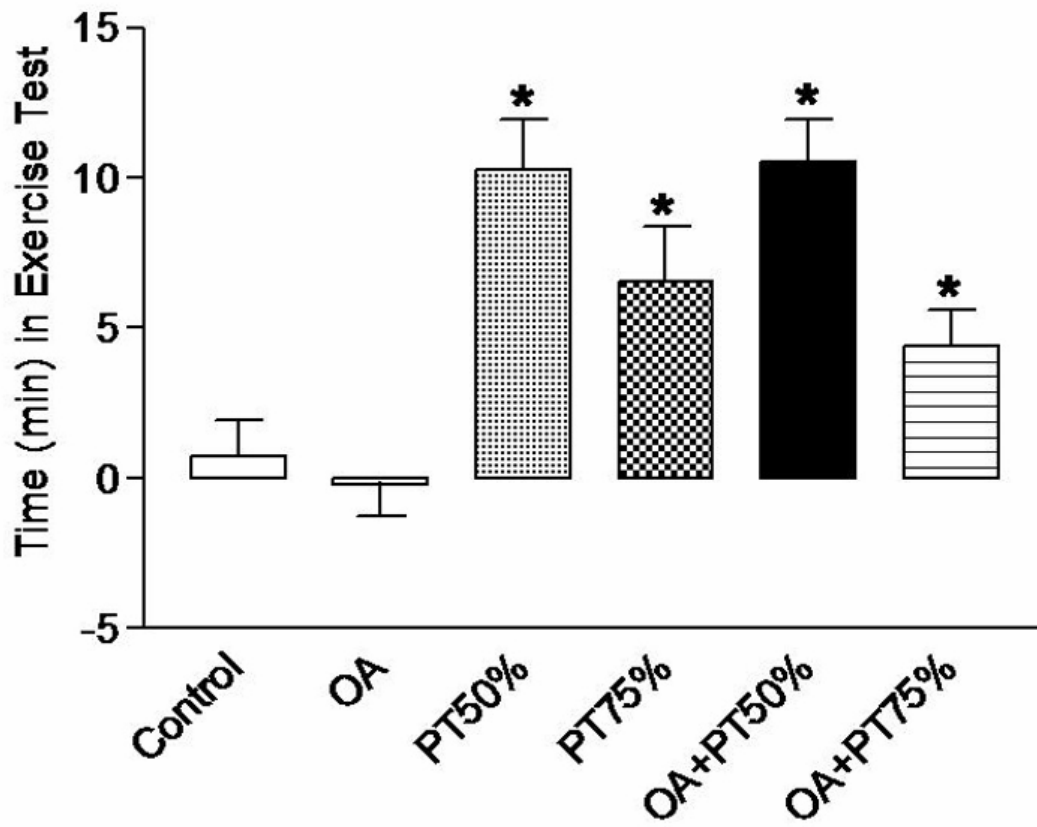


Figure 2 – The data present the difference in time (min) between the first and second physical test in each group. Results are expressed as mean and standard deviation. \* $p < 0.001$  when compared with non-trained groups (Control and OA).



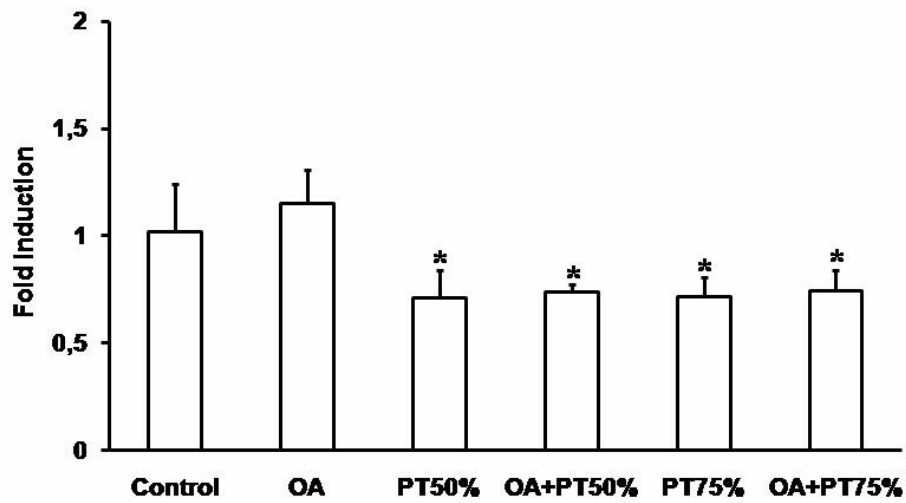


Figure 3 – Atrogin-1 mRNA levels in tibialis anterior (TA) of mice muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); group sensitized by OA (OA); group submitted to physical training at 50% of maximum speed (PT50%); sensitized by OA submitted to physical training at 50% (OA+PT50%); group submitted to physical training at 75% (PT75%), and sensitized by OA submitted to physical training at 75% (OA+PT75%). \* $P < 0.05$ , PT50%, OA+PT50%, PT75% and OA+PT75% groups compared with the control group.

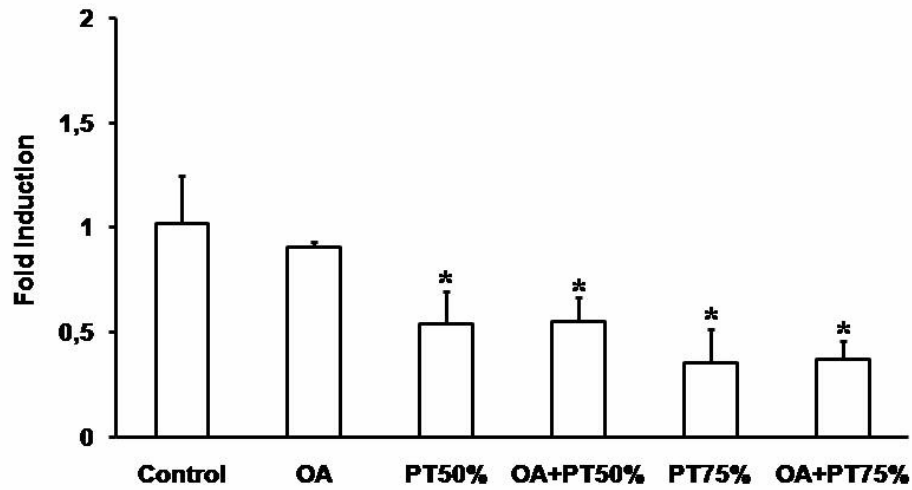


Figure 4 – MuRF1 mRNA levels in tibialis anterior (TA) of mice muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); group sensitized by OA (OA); group submitted to physical training at 50% of maximum speed (PT50%); sensitized by OA submitted to physical training at 50% (OA+PT50%); group submitted to physical training at 75% (PT75%), and sensitized by OA submitted to physical training at 75% (OA+PT75%). \* $P < 0.05$ , PT50%, OA+PT50%, PT75% and OA+PT75% groups compared with the control group.

**APÊNDICE II:** Manuscrito submetido ao periódico *Muscle Nerve* como *Short Communication*

**AEROBIC PHYSICAL TRAINING INCREASES MMPS ACTIVITIES IN DIAPHRAGM MUSCLE OF MICE WITH CHRONIC ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION**

João Luiz Quagliotti Durigan<sup>1</sup> (MS), Sabrina Messa Peviani<sup>1</sup> (MS), Thiago Luiz Russo<sup>1</sup> (MS), Anna Cecília Duarte<sup>2</sup> (MS), Rodolfo Paula Vieira<sup>3</sup> (PhD), Milton Arruda Martins<sup>4</sup> (PhD), Celso Ricardo Fernandes Carvalho (PhD)<sup>2</sup>, Tania Fátima Salvini<sup>1</sup> (PhD).

<sup>1</sup>Unit of Skeletal Muscle Plasticity, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

Departments of <sup>2</sup>Physical Therapy, <sup>3</sup>Pathology and <sup>4</sup>Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

**Running title:** MMPs activity and physical training in asthma.

**Corresponding Author**

Tania F. Salvini. Rodovia Washington Luís, Km 235. CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.

Phone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail: [tania@power.ufscar.br](mailto:tania@power.ufscar.br)

**Acknowledgments**

This project was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brazil (grants n° 05/04413-1 and 05/5474-3). J. L. Q. Durigan and R.P. Vieira were PhD fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); T. L. Russo, S. M. Peviani and A.C Duarte were PhD fellows from FAPESP. The authors are grateful to Tereza F. Piassi for technical assistance.



**ABSTRACT**

This study evaluated the effects of chronic allergic airway inflammation and aerobic training in the metalloproteinases (MMPs) activity in mouse diaphragm muscle. Thirty male animals were divided into 6 groups: 1) control; 2) ovalbumin; 3) treadmill trained at 50% of maximum speed; 4) ovalbumin and trained at 50%; 5) trained at 75%; 6) ovalbumin and trained at 75%. Chronic airway inflammation did not alter MMPs activities in diaphragm muscle, but the aerobic training associated with chronic airway inflammation increases the MMP-2 activity.

**ABBREVIATIONS**

ANOVA: analysis of variance;

CAAI: chronic allergic airway inflammation;

ECM: extracellular matrix;

MMP-1: matrix metalloproteinases 1;

MMP-2: matrix metalloproteinases 2;

MMP-9: matrix metalloproteinases 9;

OA: ovalbumin.

**Key words:** MMPs, aerobic training, asthma, diaphragm, mice.

## INTRODUCTION

Asthmatic patients experience increased resistance of their airways and hyperinflation, which elevated contractile activity and impair diaphragm contractility.<sup>14</sup> Traditionally, diaphragm weakness has been ascribed to hyperinflation-induced diaphragm shortening, which places the muscle at a mechanical disadvantage, with a suboptimal position on its force–length curve.<sup>11</sup> Moreover, it has been recently proposed that oxidative stress and cytokines activates proteolytic machinery and sarcomeric injury, leading to contractile protein wasting and, consequently, loss of force generating capacity of diaphragm fibers in patients with hyperinflation.<sup>11,15</sup> However, little is known regarding the etiology of cellular and molecular changes in the respiratory muscles weakness in asthma.

Metalloproteinases (MMPs) are an outstanding family of zinc-dependent proteolytic enzymes which MMP-2 (or gelatinase A) and MMP-9 (or gelatinase B) are mainly involved in extracellular matrix (ECM) remodeling of skeletal muscle<sup>1</sup> and in various myopathic and inflammatory-induced changes in skeletal muscle.<sup>2,13</sup> In allergic inflammatory diseases such as asthma, MMP-2 and -9 have also a crucial role in the migration of inflammatory cells through endothelial and epithelial basement membranes as well as in the airway hyperresponsiveness in lung.<sup>8,10</sup>

Aerobic training improves the overall physical fitness and health status of asthmatic patients,<sup>7</sup> increasing both respiratory muscle strength and lung function.<sup>6)</sup> Recent evidences also suggest that aerobic physical training provides beneficial anti-inflammatory effects.<sup>36)</sup> Nevertheless, there is limited information regarding the effects of exercise training associated to chronic allergic airway inflammation (CAAI) in MMPs activity of diaphragm muscle. Although these enzymes are expressed by respiratory muscles such as the diaphragm, their expression in asthma remains to be investigated. Based on these statements, the purpose of the present study

was to evaluate either the effect of CAAI or aerobic exercise training in the MMPs activity of diaphragm muscle.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Animals and Experimental Design***

This study was approved by the local ethical committee and it was developed in compliance with the “Guide for care and use of laboratory animals”.<sup>6</sup> Thirty male 4 months-old Balb/c mice ( $28.5 \pm 0.8\text{g}$ ) were randomly and equally divided into 6 groups: (1) control group (Control); (2) ovalbumin (OA) sensitized and non-trained (OA); (3) non-sensitized and physical trained at 50% of maximum speed (PT50%); (4) non-sensitized and physical trained at 75% of maximum speed (PT75%); (5) OA-sensitized and physical trained at 50% of maximum speed (OA+PT50%); and, (6) OA-sensitized and physical trained at 75% of maximum speed (OA+PT75%).

### ***Aerobic exercise treadmill test and exercise conditioning and OA sensitization***

Mice were exercise trained at low or moderate intensities (respectively, 50% or 75% of maximal speed) during 60 minutes a day, 5 days per week for 12 weeks (8 weeks before sensitization + 4 weeks of OA or saline exposure).<sup>36)</sup> The sensitization period started in the 9<sup>th</sup> week of physical training and lasted for 4 weeks. The mice were sensitized by intraperitoneal injection of OA (20  $\mu\text{g}$  per mouse) adsorbed with aluminum hydroxide on days 0 and 14, followed by 4 inhalations with OA (1%) or saline solution as previously described.<sup>36)</sup>

### ***Zymography***

Tissue extraction and zymographic analysis was performed according to current methodology.<sup>12</sup> The molecular mass of gelatinolytic activities was determined by comparison



to a reference protein molecular mass marker (PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario). Activity bands were identified following previously description according their molecular weights.<sup>5</sup> Densitometric quantitative analysis of the protein bands in the zymography was performed using GeneTools v3.06 software (Syngene, Cambridge, UK).

### ***Statistical analysis***

Levene's test was applied first to evaluate the homogeneity of the results. One way ANOVA followed by Tukey test were performed. The significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### ***MMP activity of diaphragm muscle***

Quantitative analysis of band density showed MMP-2 components had their activity elevated in OA+PT50% group, as well as in OA+PT75% group (Fig. 1-A) compared to control and OA ( $P < 0.05$ ). No difference among OA+PT50% and OA+PT75% groups was found ( $P > 0.05$ , Fig. 1-A). Interestingly, the MMP-1 activity was also increased in OA+PT50% and in OA+PT75% groups compared to control and OA ( $P < 0.05$ ). MMP-1 activity was not altered among OA+PT50% and OA+PT75% groups ( $P > 0.05$ , Fig. 1-B).

## **DISCUSSION**

MMP-2 and MMP-9 is involved in myopathic induced by cardiac failure. Carvalho et al.<sup>2</sup> reported an enhanced of MMP-9 and MMP-2 gene expression and activity in diaphragm muscle of rats with heart failure. They suggested that these changes may contribute to the skeletal muscle myopathy during heart failure. Interestingly, ours results demonstrated that asthmatic model used here was not able to alter the MMPs activity in diaphragm muscle of

mouse. These findings are contrary to those reported.<sup>2,13</sup> Probably, these discrepancies could be attributed to variations between the studies, such as disease models and muscle composition. Furthermore, we assessed a respiratory muscle, in contrast of Schiötz's study,<sup>13</sup> which analyzed peripheral muscles. Despite these differences, the absence of changes in MMP-2 activity in present study could suggest that the model of CAAI did not trigger diaphragm muscle myopathy of mice. In addition, the lack of changes in MMPs activity in OA group could also be attributed to short period (4 weeks) of asthma. Maybe, the period assessed was not enough to induce impair in diaphragm function, and as a result to modify the MMPs. However, future investigations will be necessary to test this hypothesis.

Another interestingly finding of this study was that the absence of MMP-9 activity in diaphragm muscle in all experimental groups. These results agree with the viewpoint that MMP-9 is expressed only under extreme or abnormal conditions of muscle activation (i.e. early inflammatory phase or chronic denervation),<sup>1</sup> which could suggest that diaphragm muscle was not injured in OA group and during the treadmill training. This fact also corroborates the hypothesis that CAAI is not involved in diaphragm muscle myopathic.

In fact, our results suggested that enhanced of MMP-2 activity in OA+PT50% and OA+PT75% groups may be related to the workload increase in diaphragm muscle, as previously described by Carvalho et al.<sup>2</sup> during heart failure disease in diaphragm muscle. It was reported that mouse model of CAAI induces parenchyma mechanical dysfunction and lung remodeling; leading to respiratory mechanical changes.<sup>16</sup> Probably, these mechanical changes could increase diaphragm muscle workload during the treadmill training, once it was observed an enhanced in MMP-2 activity only in animals submitted to lung inflammation associated to low and moderate exercise.

Additionally, we have found increased of MMP-1 activity only in OA+PT50% and OA+PT75% groups. MMP-1 activity is also involved to cleavage of an amino-terminal

domain of MMP-2 as latent pro-enzymes.<sup>5</sup> Our data suggest that MMP-1 activity was increase to cleavage and active the MMP-2 pro-enzymes, since we observed an enhanced of activated both the MMP-1 and MMP-2 in same groups.

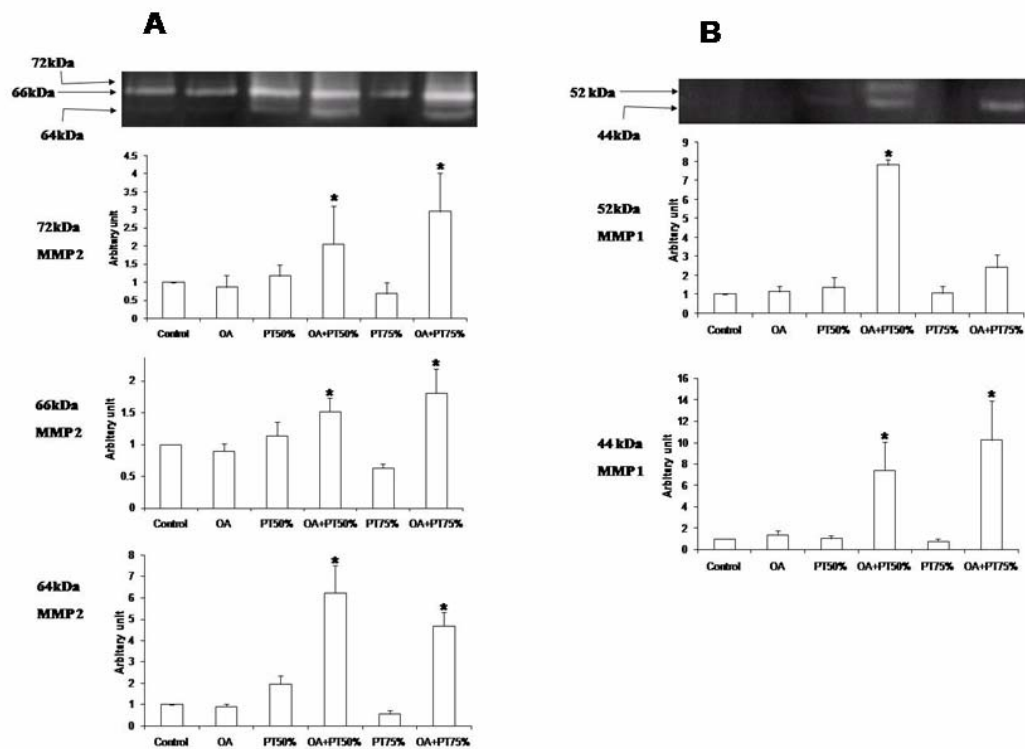
This study indicate that short period of CAAI did not change MMP activity in diaphragm muscle of mouse. Furthermore, the treadmill aerobic training at low and moderate intensities associated with CAAI increases the MMP-2 activity, suggesting changes in overall balance of ECM protein turnover in diaphragm muscle. These findings in animal model are clinically relevant because biopsies from respiratory muscles in asthmatic subjects involve ethical reasons. Therefore, this initial results form the basis for additional research to determine the functional significance of changes in the MMPs activity in respiratory muscles in response to physical training in asthma.

## REFERENCES

1. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004;29(2):191-7.
2. Carvalho RF, Dariolli R, Justulin Junior LA, Sugizaki MM, Politi Okoshi M, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 2006;87(6):437-43.
3. Counil FP, Voisin M. Physical fitness in children with asthma. *Arch Pediatr* 2006;13:1136-41.
4. Garrod R, Lasserson T. Role of physiotherapy in the management of chronic lung diseases: An overview of systematic reviews. *Respir Med* 2007;101(12):2429-36.
5. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533(1-3):133-44.

6. "Guide for care and use of laboratory animals" (NIH publication 85-23, revised 1985).
7. Hallstrand, T. S., P. W. Bates, and R. B. Schoene. Aerobic conditioning in mild asthma decreases the hyperpnea of exercise and improves exercise and ventilatory capacity. *Chest* 2000;118(5):1460-9.
8. Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T, Nagase H, Iwata K, Shirato K. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 1999;162(7):4212-9.
9. McConnell AK. The role of inspiratory muscle function and training in the genesis of dyspnoea in asthma and COPD. *Prim Care Respir J* 2005;14:186–94.
10. Okada, S., H. Kita, T. J. George, G. J. Gleich, and K. M. Leiferman. Migration of eosinophil through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(4):519-28.
11. Ottenheijm CAC, Heunks LMA, Dekhuijzen RPN. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respiratory Research* 2008;24:9-12.
12. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Salvini TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2008;37(5):593-600.
13. Schiøtz Thorud HM, Stranda A, Birkeland JA, Lunde PK, Sjaastad I, Kolset SO, Sejersted OM, Iversen PO. Enhanced matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles of rats with congestive heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(2):389-394.
14. Travaline JM, Sudarshan S, Roy BG, Cordova F, Leyenson V, Criner GJ: Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1567-1571.

15. Vassilakopoulos T, Divangahi M, Rallis G, Kishta O, Petrof B, Comtois A, Hussain SN: Differential cytokine gene expression in the diaphragm in response to strenuous resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:154-161.
16. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa E Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(8):829-37.
17. Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ABG, Perini A, Faria-Neto HCC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CRF. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176: 871-877.



**FIGURE 1.** Quantitative densitometry of zymographic bands of MMP-2 and MMP-1 in diaphragm muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal diaphragm muscle (Control); group sensitized by OA (OA); groups submitted to treadmill training at 50% (PT50%) and 75% (PT75%) of maximum speed; sensitized by OA submitted to treadmill training at 50% (OA+PT50%) and 75% (OA+PT75%) of maximum speed. A- Pro MMP-2 (72 kDa) activity; Intermediary MMP-2 (66 kDa) activity; Active MMP-2 (64 kDa) activity. \* $p < 0.05$ : compared to Control. B- Pro-active MMP-1 (52 kDa) activity; Active MMP-1 (44 kDa) activity. \* $p < 0.05$ : compared to Control.

**APÊNDICE III:** Manuscrito submetido ao periódico *Toxicon*

**EFFECTS OF ALTERNAGIN-C FROM *BOTHROPS ALTERNATUS* ON GENE EXPRESSION AND ACTIVITY OF METALLOPROTEINASES IN REGENERATING SKELETAL MUSCLE**

**Authors:**

João Luiz Quagliotti Durigan<sup>1</sup>, MS; Sabrina Messa Peviani<sup>1</sup>, MS; Thiago Luiz Russo<sup>1</sup>, MS; Gabriel Borges Delfino<sup>1</sup>, PT; Márcia Regina Cominetti<sup>2</sup> MS, PhD; Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo<sup>2\*</sup>, MS, PhD; and Tania Fátima Salvini<sup>1</sup>, MS, PhD.

<sup>1</sup>Department of Physical Therapy and <sup>2</sup>Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

**Mailing Address:** Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo. Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil. Phone: (0055-16) 33518333 / FAX: (0055-16) 33518401. E-mail: [hsaraujo@power.ufscar.br](mailto:hsaraujo@power.ufscar.br)

**Running Head:** ALT-C and skeletal muscle regeneration.

**ABSTRACT**

This study evaluated the effects of Alternagin-C (ALT-C) on mRNA levels of VEGF, MyoD and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and on activity of MMPs in injured tibialis anterior (TA) muscle induced by cryolesioning in rats. Thirty-six Wistar rats (3 months old,  $258.9 \pm 27\text{g}$ ) were divided into five groups: (1) control group; (2) injured TA and analyzed 3 days later; (3) injured TA treated with ALT-C and analyzed 3 days later; (4) injured TA and analyzed 7 days later and (5) injured TA treated with ALT-C and analyzed 7 days later. The injured muscle received  $25\mu\text{l}$  of ALT-C (50nM). The injured and uninjured muscle areas were quantified by light microscopy. The MMP activity was evaluated through zymography, and mRNA of MyoD, VEGF and MMP-2 was assessed by quantitative polymerase chain reaction. ALT-C neither reduced the muscle injury area nor altered the pattern of MyoD and VEGF expression in injured muscles. However, ALT-C reduces both MMP-2 mRNA and gelatinolytic activity in injured muscles. The study indicates that ALT-C, at the tested concentrations, did not improve muscle regeneration process in rats. The effect on MMP-2 mRNA and gelatinolytic activity suggests that ALT-C changes the overall balance of ECM protein turnover during muscle regeneration.

**Key words:** ALT-C, Muscle regeneration, Cryolesion, VEGF, MyoD, MMP-2



**ABBREVIATIONS**

ALT-C: alternagin-C

ECM: extracellular matrix

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

MMP-2: matrix metalloproteinase 2

MMP-9: matrix metalloproteinase 9

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

TA: Tibialis anterior muscle

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

## 1. INTRODUCTION

Skeletal muscle regeneration is a highly orchestrated process that involves the activation of adult muscle satellite cells to proliferate and differentiate (Marsh et al., 1997; Shi and Garry, 2006). The activation of satellite cells is characterized by the rapid upregulation of MyoD and Myf5 (Shi and Garry, 2006), basic helix-loop helix transcriptional activators of the myogenic regulatory factor family (MRF) (Sakuma et al., 1999; Shi and Garry, 2006). MyoD is rapidly expressed within 12 hours post-lesion (Rantanen et al., 1995), whereas its peak of expression is at day 3 post-cryolesion in tibialis anterior (TA) muscle (Warren et al., 2002). Afterward, upregulation of the secondary MRFs (myogenin and MRF4) induces terminal differentiation of myoblasts into myocytes (Charge and Rudnicki, 2004).

Additionally, revascularization plays an important role in the success of muscle regeneration. This event is highly regulated by various angiogenesis-related factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), and matrix metalloproteinases (MMPs) (Prior et al., 2004). VEGF exerts multiple effects on the vascular endothelium including the stimulation of endothelial cell proliferation, rapid induction of microvascular permeability, promotion of endothelial cell survival, stimulation of endothelial cell adhesion and migration, and induction of endothelial cell gene expression (Senger et al., 1993; Olsson et al., 2006). Recently, Wagatsuma (2007) showed that VEGF mRNA began to increase from day 3 and peaked at day 5 post-cryolesion in gastrocnemius muscle of mice, suggesting that VEGF is involved in early skeletal muscle regeneration.

Skeletal muscle fibers are surrounded by a basement membrane composed predominantly of type IV collagen, laminin, fibronectin, and heparan sulfate proteoglycan. There is evidence of extensive remodeling of the extracellular matrix (ECM) of muscle cells during regeneration (Gulati et al., 1983). MMP-2 (or gelatinase A) and MMP-9 (or

gelatinase B) are mainly involved in this ECM remodeling of skeletal muscle (Carmeli et al., 2004). It seems that MMPs have a different pattern of expression during the time course of muscle regeneration. The MMP-2 activity is concurrent with the regeneration of new myofibers probably due to degradation of type IV collagen of the basement membrane during myoblast proliferation, migration, and fusion. Conversely, MMP-9 activation is related to the early inflammatory phase and to the activation of satellite cells (Kherif et al., 1999; Fukushima et al., 2007). MMPs are also required for activity-induced angiogenesis, which are necessary for the process of abluminal capillary sprouting because of their critical roles in basement membrane and interstitial matrix degradation (Carmeli et al., 2004).

Integrins form a family of cell surface adhesion receptors, mediating both cell-cell and cell-matrix interactions. The  $\alpha 2\beta 1$  integrin is a major collagen receptor that plays an essential role in the adhesion of normal and tumor cells to the extracellular matrix (Mariano-Oliveira et al., 2000). Alternagin, a protein purified from the venom of the Brazilian snake *Bothrops alternatus* is synthesized as a precursor form belonging to the PIII class of the snake venom metalloproteinases (SVMP) (Souza et al., 2000). Alternagin has a metalloproteinase domain which is released after proteolytic processing, yielding a form with disintegrin-like and cysteine-rich domains (ALT-C) (Souza et al., 2000). ALT-C competitively interacts with the  $\alpha 2\beta 1$  integrin, thereby inhibiting collagen binding (Selistre-de-Araujo et al., 2005), and induces integrin-mediated signaling and chemotaxis in neutrophils (Mariano-Oliveira et al., 2003). ALT-C also strongly induces human vein endothelial cells (HUVEC) proliferation *in vitro* and *in vivo* by up-regulating the expression of some growth factors and their receptors, including VEGF and VEGFR 2 (Cominetti et al., 2004; Ramos et al., 2007). Furthermore, we observed that ALT-C and ALT-C PEP, a peptide derived from its sequence, were able to induce *in vivo* angiogenesis

in wounded rat skin (unpublished results). ALT-C also increases myoblast proliferation, with gene expression modifications including the pattern of MHC gene expression (unpublished results).

These initial results in skeletal muscle regeneration studies are interesting for the development of therapeutic strategies that may alleviate pathological conditions associated with poor muscle regenerative capacity. If these results are confirmed *in vivo*, ALT-C could be considered a new therapeutic strategy to be investigated for muscle regeneration. Based on these statements, we hypothesized that ALT-C could improve the muscle regeneration process. Therefore, the purpose of the present study was to assess the effects of ALT-C on mRNA levels of VEGF, MyoD, MMP-2 and on MMPs activity in injured TA muscle of rats.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### ***2.1 Animal care and experimental groups***

Thirty six male 3-month-old Wistar rats ( $258.9 \pm 27$ g) were used. The animals were housed in plastic cages in a room with controlled environmental conditions and had free access to water and standard food. The University Ethics Committee approved the experimental procedures and the study was conducted in accordance with national guidelines for the care and use of laboratory animals.

The animals were randomly divided into 6 groups with 6 animals in each one: (1) (control group) animals with no interventions; (2) TA muscle injured and analyzed 3 days after injury (L3); (3) TA muscle injured 3 days and treated with ALT-C (L3+ALT-C); (4) TA muscle injured and analyzed 7 days after injury (L7) and (5) TA muscle injured 7 days and treated with ALT-C (L7+ALT-C).

The rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) during the following procedures: induction of TA muscle injury; application of ALT-C; and muscle removal. The animals were euthanized by an overdose of anesthetic.

## **2.2 Freezing muscle injury**

TA muscle was chosen because almost all fibers cross the middle belly of the muscle and are distributed from tendon to tendon. Additionally, it is a superficial muscle, making the surgery easy. To induce muscle injury on the middle belly of the right TA, the skin around the muscle was trichotomized and cleaned. Then, a transversal skin incision (about 1 cm) over the muscle middle belly was carried out, exposing the TA muscle. A rectangular iron bar (40 x 20 mm<sup>2</sup>) was frozen in fluid nitrogen and then kept for 10s on the muscle belly. The same procedure was repeated two consecutive times with a time interval of 30s. After that, the skin was sutured. Injury by freezing (cryoinjury) is a common procedure used to induce muscle damage (Oliveira et al., 2006; Miyabara et al., 2006).

## **2.3 ALT-C**

ALT-C was purified from *Bothrops alternatus* crude venom by two steps of gel filtration followed by anion exchange chromatography (Souza et al., 2000). After cryoinjury procedure, 25µl of ALT-C (50nM, diluted in PBS buffer) was applied over the exposed TA muscle belly. In L3 and L7 groups 25µl of saline solution was applied. The ALT-C concentration was chosen accordingly to previous assays where modifications on myoblast gene expression and increase in cell proliferation were found (unpublished results).

#### ***2.4 Muscle Evaluation***

The rats were weighed and the right TA muscles carefully removed and weighed. The muscles were then divided into two parts at the middle of the belly, the proximal fragment being used for the histological analysis and the distal one for the mRNA and zymography analysis. For histological evaluation, the muscle fragment was immediately frozen in isopentane, pre-cooled in liquid nitrogen, and stored in a freezer at -80°C (Forma Scientific, Marietta, Ohio). For the mRNA and zymography analysis, the muscle fragment was frozen in liquid nitrogen and also stored at -80°C.

#### ***2.5 Muscle injury area***

Histological serial muscle cross-sections were obtained (one section of 10 µm in each 100 µm) in a cryostat microtome (Microm HE 505, Jena, Germany), along of the TA muscles middle belly. For morphological evaluation by light microscopy (Axiolab, Carl Zeiss, Germany) tissue sections were stained using Toluidine Blue. One histological cross-section of each TA muscle located in the central region of muscle injury was chosen to measure the cross-sectional area of both injured and uninjured muscle area, using light microscope and a software for morphometry (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Germany). For this, pictures of the cross-sections were obtained by light microscopy to reconstruct the total muscle cross-section, which permitted identification and measurement of the injured and uninjured muscle areas. Since the primary injury was standardized for all damaged muscles, possible differences in the final area of injury were considered as a consequence of different extensions in the secondary muscle injury. A double-blind procedure was used for both the selection of the muscle cross-section and the measurements of the injured and uninjured muscle areas.

## ***2.6 RNA Isolation and Analysis***

RNA was isolated from one frozen fragment from the distal ends of each TA muscle using 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was dissolved in tris-HCl and ethylenediaminetetracetic acid (TE) pH 7.6 and quantified by spectrophotometry. The purity was assessed by determining the ratio of the absorbance at 260 nm and 280 nm. All samples had 260/280 nm ratios above 2.0. The integrity of the RNA was confirmed by inspection of ethidium bromide stained 18S and 28S ribosomal RNA under violet ultra light

## ***2.7 Reverse Transcription***

Total RNA was reverse transcribed into cDNA in two steps. First, 1  $\mu$ l of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 9.5  $\mu$ l of water was added to 1  $\mu$ g of total RNA, heated to 70°C for 10 min and quickly cooled on ice. Second, 4  $\mu$ l of 5x reverse transcription buffer, 1  $\mu$ l of a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture containing 0.2mM each of dATP, dCTP, dGTP, and 0.1 M dTTP, 2  $\mu$ l of 0.1M dithiothreitol (DTT) and 0.5  $\mu$ l of M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI) in a total volume of 20  $\mu$ l and it was incubated at 42°C for 60 min for each sample. To minimize variation in the reverse transcription reaction, all RNA samples were reverse transcribed simultaneously.

## ***2.8 Oligonucleotide Primers***

Oligonucleotide primers were designed for GAPDH (AF106860) using the Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Menon et al. (2005)

described the MMP-2 primer sequence. Hill and Goldspink (2003) described myo-D and Asano et al. (2007) reported VEGF primer sequence.

The sequences used were: for rat GAPDH (forward: GATGCTGGTGCTGAGT-ATGTCG; reverse: GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA); MMP-2 (forward: CTGATAACCTGGATGCAGTCGT; reverse: CCAGCCAGTCCGATTTGA); Myo-D (forward: GGAGACATCCTCAAGCGATGC; reverse: GCACCTGGTAAATCGG-ATTG) and VEGF (forward: TGCACCCACGACAGAAGG; reverse: GCACACAG-GACGGCTTGA) genes.

### ***2.9 Analysis by Quantitative Polymerase Chain Reactions (q PCR)***

Detection of mRNA for the different experimental and control samples were performed in a Rotor Gene 3000 (Cobert's, Sydney, Australia). The amplification mixes contained 1 µl of cDNA sample, 25 µl of fluorescent dye SYBR green, Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer in a final volume of 50µl. Thermal cycling conditions to MMP-2, myo-D, VEGF and GAPDH included 10 min at 95°C, and then 40 cycles each of 15 s at 94°C, 30s at 48°C to MMP-2 and Myo-D and at 56°C to VEGF and GAPDH, respectively, and then 1 min at 72°C, finally 10 min at 72°C. For each gene, all samples were amplified simultaneously in duplicate in one assay run. Data were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method. The target gene expression was normalized to GAPDH gene, as performed in accordance with others (Wagatsuma, 2007). In addition, negative controls contained RNA, but no M-MLV RT, ensuring that PCR product was not a result from amplified genomic DNA (Schwartz et al., 2005). A blank with no template sample but just water, primers and SYBR green was also performed.



### ***2.10 Preparation of tissue extracts for zymography***

The current methodology was adapted from Russo et al. 2008. Twenty five milligrams of muscle were washed with cold saline and incubated in 2 mL extraction buffer (10 mM cacodylic acid, pH 5.0, 150 mM NaCl, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM NaN<sub>3</sub>, and 0.01% Triton X-100) at 4°C with continuous mixing for 24 h. Protein concentration was determined by BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce, Rockford, IL), according to manufacture's instruction.

### ***2.11 Zymographic Analysis***

Briefly, equal amounts of total protein (30  $\mu$ g / lane) consisting of a pool of five animals per group (6  $\mu$ g per animal) were subjected to electrophoresis in triplicate. Zymography gels consisted of 10% polyacrylamide impregnated with gelatine at a final concentration of 100 mg/ ml H<sub>2</sub>O in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) under nonreducing conditions. After 2 h of electrophoresis (100 V), the gels were washed twice for 20 min in a 2.5% Triton X-100 solution, and incubated at 37°C for 20 h in a substrate buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.02% NaN<sub>3</sub>). The gels were then stained with Coomassie brilliant blue R-250 for 30 min and stained in methanol and acetic acid for 20 min. Gelatin-degrading enzymes were visualized as clear white bands against a blue back-ground, indicating proteolysis of the substrate protein. The samples were also assayed in presence of 15 mM EDTA that inhibited MMP activity. The molecular mass of gelatinolytic activities was determined by comparison to reference protein molecular mass marker PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON). Activity bands were identified following previously description according to their molecular weights (72 kDa: Pro-MMP-2; 66 kDa: intermediary-MMP-2; 64 kDa: active-MMP-2; 85 kDa: active MMP-9) (Gueders et al., 2006; Fukushima et al., 2007).

### **2.12 Densitometric Analysis**

Densitometric quantitative analysis of the MMPs protein bands in the zymography gels were performed using the Gene Tools version 3.06 software (Syngene, Cambridge, UK).

### **2.13 Statistical analysis**

Levene's test was applied first to evaluate the homogeneity of the results. One way ANOVA was used to identify possibly differences amongst groups. When differences were observed, the Tukey test was performed. Student paired t-test was used for the comparison between TA muscles of the same animals group. For all tests, the significance level was set at 5% ( $P < 0.05$ ).

## **3. RESULTS**

### **3.1 Body, TA Muscle weight and muscle injury area**

No difference was found in the body weight among the groups ( $P > 0.05$ ). All injured groups presented a decline in TA muscle weight compared to control ( $P < 0.05$ , Table 1). The ALT-C did not reduce the injured area 3 and 7 days after muscle lesion ( $P > 0.05$ , Table 1). In addition, the injured area was lower in L7 and L7+ALT-C groups compared to L3 and L3+ALT-C groups, indicating that tissue recovery was in progress.

### **3.2 MyoD, VEGF and MMP-2 Gene Expression by qPCR**

The MyoD mRNA levels were increased in all injured groups compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The highest levels of MyoD were observed 3 days after injury in both L3 and L3+ALT-C groups. Seven days after injury, the mRNA MyoD levels decreased compared to 3th day, but they still remained elevated compared to control values

( $P < 0.05$ ) The ALT-C did not alter the MyoD expression in any group ( $P > 0.05$ , Figure 1).

An increase in VEGF gene expression was found in all groups compared to the control ( $P < 0.05$ ), but no difference was found among them ( $P > 0.05$ , Figure 2).

MMP-2 gene expression was more than 10 times increased 3 days after injury compared to control ( $P < 0.05$ , Figure 3). ALT-C significantly decreased the MMP-2 gene expression in L3+ALT-C compared to L3 ( $P < 0.05$ ), but was still higher than control values ( $P < 0.05$ ). On the 7<sup>th</sup> day after injury, both L7 and L7+ALT-C groups maintained their MMP-2 gene expression elevated compared to control ( $P < 0.05$ ). However, their values were much lower than those from L3 ( $P < 0.05$ ). No difference was found amongst L3+ALT-C, L7 and L7+ALT-C groups ( $P > 0.05$ , Figure 3).

### **3.3 Zymographic Analysis**

The MMP-2 activity was elevated in L3, L3+ALT-C and in L7 groups compared to control (Figure 4). In addition, the active form of MMP-2 (64kDa) in L7 group was significantly higher when compared to all groups ( $P < 0.05$ , Figure 4). Interestingly, the MMP-2 activities of pro (72kDa), intermediary (66kDa) and active (64kDa) forms from L7+ALT-C were similar to control values ( $P > 0.05$ ) and lower than L7 ( $P < 0.05$ , Figure 4). The MMP-9 activity was increased in L3 and in L3+ALT-C groups ( $P < 0.05$ ; Figure 5) compared to control. No differences were observed between control, L7 and L7+ALT-C (Figure 5).

## **4. DISCUSSION**

As far as we know, this is the first demonstration of the influence of a disintegrin-like protein in regenerating skeletal muscle. Our results support that ALT-C treatment of

regenerating skeletal muscle after cryolesions has no effect on VEGF or MyoD expression in the site of injury. However, ALT-C reduces both MMP-2 mRNA and gelatinolytic activity in different time points in TA muscle post-cryolesion.

Previous studies in our laboratory have shown that ALT-C, an  $\alpha 2\beta 1$ -integrin ligand, induces VEGF expression in fibroblasts as well as endothelial cell proliferation (Cominetti et al., 2004). Additionally, ALT-C induces *in vivo* angiogenesis in nude mice and up-regulates the expression of VEGF receptor 2 (VEGFR2, KDR) in HUVEC cells (Ramos et al., 2007). ALT-C also promotes myoblast proliferation in a dose-dependent way, mostly with concentrations ranging from 50 to 100nM (unpublished results). These preliminary results indicate that ALT-C possesses a good potential for tissue regeneration studies.

Surprisingly, our results demonstrated that 50nM ALT-C was not effective in avoiding the reduction of muscle weight, as well as the area of muscle injury. Similarly, ALT-C did not alter the pattern of MyoD expression, suggesting that this protein is not associated with modulation of muscle regulatory genes, such as MyoD, which is involved with the activation of satellite cells during muscle regeneration (Sakuma et al., 1999; Shi and Garry, 2006). Collectively, these results indicate that ALT-C did not improve muscle regeneration processes in rats, at least at the dose tested.

In addition, as it was previously described that ALT-C induces *in vitro* VEGF expression in fibroblasts (Cominetti et al., 2004), we hypothesized that this fact could provide some beneficial effects in muscle regeneration process *in vivo*. However, in the present study VEGF mRNA levels were not altered in both L3+ALT-C and L7+ALT-C groups compared to the control. It seems that this effect may be cell-specific, since in myoblast cell culture VEGF expression was not detected either at mRNA or protein levels (unpublished data). This cell-specific effect could explain the results of the present study,

suggesting that ALT-C is capable of enhancing VEGF expression only in cultured fibroblasts and HUVEC.

The absence of changes in MyoD and VEGF mRNA levels in both L3+ALT-C and L7+ALT-C groups could also be attributed to the type of study, since we study the regenerating process *in vivo*, while Cominetti et al. (2004) showed the effects of ALT-C in different cells *in vitro*. Therefore, future studies would be necessary to evaluate whether a dose-response curve could reveal any beneficial effect of ALT-C in muscle regeneration process *in vivo*, regarding MyoD and VEGF mRNA expression levels.

On the other hand, our qPCR data indicate that rat MMP-2 is extensively up-regulated during the first 3 days following cryolesion injury and the amount of mRNA for this enzyme was reduced at day 7 post-lesion. It was already demonstrated that MMP-2 mRNA levels reach a peak in 3 and 7 days post-lesion, whereas 10 days post-lesion MMP-2 mRNA returns to baseline levels in the skeletal muscle regeneration process (Kherif et al., 1999; Ferré et al., 2007). Similarity, our zymography data clearly show that MMP-2 is activated at day 3 post-injury, with maximal activation at day 7, in accordance with others (Kherif et al., 1999).

It is well established that MMP-2 activity, which is constitutively expressed in uninjured muscles, is simultaneously related with the regeneration of new myofibers possibly due to the degradation of type IV collagen of basement membrane (Kherif et al., 1999; Ohtake et al., 2006; Fukushima et al., 2007). These overall results strongly demonstrate that MMP-2 up-regulation at mRNA and activity levels correlates with muscle regeneration, suggesting that ECM remodeling mediated by MMP-2 and MMP-9 is a key process in skeletal muscle fiber degeneration and regeneration.

Interestingly, our results showed that ALT-C reduced the peak of MMP-2 expression 3 days post-cryolesion, whereas 7 days post-cryolesion ALT-C did not have

this effect. It is well established that MMP gene expression is regulated by numerous stimulatory and suppressive factors, such as phorbol esters, integrin-derived signals, extracellular matrix proteins, cell stress, and changes in cell shape (Kheradmand et al., 1998; Sternlicht and Werb, 2001). However, the cross-talk between the many signaling pathways, nuclear factors, and gene regulatory elements that regulate MMP expression are poorly understood (Sternlicht and Werb, 2001).

In an attempt to achieve a better understanding of the mechanism of action of proteins with disintegrin domains, it was demonstrated that jararhagin, an alternagin homologue from *Bothrops jararaca* venom, affects MMP-1 expression differently in fibroblasts depending on the way the cells were cultured (Zigrino et al., 2002). Jararhagin strongly induced MMP-1 expression at both mRNA and protein levels when fibroblasts were grown in monolayers, but it had no effect on cells growing in collagen lattices, which resemble some aspects of the *in vivo* environment (Zigrino et al., 2002). Fibroblasts may have different gene expression pattern when adhered within three-dimensional matrices compared to cell growing in monolayers, including very different focal adhesion complexes (Cukierman et al., 2001). The collagenous environment triggers  $\alpha_2\beta_1$  integrin-mediated intracellular signaling events that will modify gene expression of several proteins including the MMP set (Zigrino et al., 2002). It is possible that, even *in vivo*, ALT-C affects fibroblast and skeletal muscle gene expression in distinct ways, depending on the receptors involved. Therefore, more studies, such as cDNA arrays and *in vitro* analysis focusing on the interaction between ALT-C and MMPs involving different cell populations, are necessary to address the possibility of cross-talk of signaling pathways. These issues will allow an elucidation of the ALT-C action with induced MMP-2 downregulation.

Regarding the reduction of MMP-2 activity in the L7+ALT-C group, one hypothesis to justify this fact should be related to the interaction between ALT-C and collagen IV which would prevent the binding between MMP-2 and collagen IV. Since MMP-2 activation is enhanced in the presence of collagen IV (Maquoi et al., 2000), it is reasonable to suggest that this interaction would decrease MMP-2 activity. In fact, it was already demonstrated that jararhagin and the recombinant cysteine-rich domain of atrolysin A, other SVMPs homologous to ALT-C, are capable of binding different collagen types, targeting these proteins towards their substrates (Serrano et al., 2005, 2006). Since ALT-C is homologous to these proteins it would be possible to speculate a similar function of this protein in collagen binding and protein targeting.

In addition, the decrease of MMP-2 mRNA in the L3+ALT group could also explain the unchanged pro-MMP-2 activity in L7+ALT group, since the synthesis and activity of MMP-2 is regulated at several levels, such as at the transcription level (Carmeli et al., 2004). Despite the regulatory complexity of MMPs and the difficulty of inferring the spatial and temporal details of MMP activity from RNA-expression patterns (Page-McCaw et al., 2007), it is possible to suggest that the decrease in mRNA content of MMP-2 is related to the decrease of the protein content of pro-MMP-2 and consequently MMP-2 activity (Carmeli et al., 2004; Page-McCaw et al., 2007), as observed in the present study by zymography assay. Moreover, the reduction of the active-MMP-2 activity in L7+ALT group could be consequence of the unchanged pro-MMP-2 activity, and also because of the interaction between ALT-C and collagen IV, which does not allow the binding between MMP-2 and collagen IV.

It is conceivable that MMP-2 plays a key role in skeletal muscle fiber regeneration, and is involved in myoblasts proliferation, migration (Kherif et al., 1999; Ohtake et al., 2006; Fukushima et al., 2007), as well as in the abluminal capillary process

(Carmeli et al., 2004). Therefore, these preliminary results presented here suggest that the reduction of amount of MMP-2 RNA and its activity inherent to ALT-C treatment could provide some impaired effects in muscle regeneration process. However, more studies are necessary to evaluate this hypothesis.

Another interesting finding of this study was the presence of MMP-9 activity in TA muscle in the L3 and L3+ALT-C groups. These results are in agreement with a previous study, which reported that MMP-9 activity is extensively up-regulated during the first 3 days following cardiotoxin injury in TA muscle, whereas after 3 days following injury the amount of MMP-9 mRNA and protein begins to decay (Kherif et al., 1999). Moreover, MMP-9 is localized in inflammatory cells identified as polymorphonuclear leucocytes and macrophages (Kherif et al., 1999). Taken together, these data suggest that MMP-9 might be associated not only with ECM degradation during inflammation, but also during the initiation of muscle regeneration probably activating satellite cells (Fukushima et al., 2007). Surprisingly, our results support that ALT-C treatment did not alter MMP-9 activity in TA muscle post-cryolesion, suggesting that ALT-C has a different action within the same gelatinase family of MMPs. This specificity of ALT-C in altering only MMP-2 activity remains to be elucidated.

In summary, the study indicates that 50nM ALT-C treatment did not improve muscle regeneration process in rats. Nevertheless, ALT-C reduces both MMP-2 mRNA and gelatinolytic activity in TA muscle post-cryolesion, suggesting that ALT-C changes the overall balance of ECM protein turnover during muscle regeneration.



## ACKNOWLEDGMENTS

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), SP, Brazil (grants n° 05/04413-1, 05/5474-3 and 04/06986-6). J. L. Q. Durigan was PhD fellow from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); T. L. Russo and S. M. Peviani were PhD fellows from FAPESP; and G. B. Delfino is Master fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors are grateful to Tereza F. Piassi for the technical assistance.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Asano, T., Kaneko, E., Shinozaki S., Imai, Y., Shibayama, M., Chiba, T., Ai, M., Kawakami, A., Asaoka, H., Nakayama, T., Mano, Y., Shimokado, K., 2007. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. *Circ. J.* 71, 405-11.
- Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A.Z., Coleman, R., 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 29,191-7.
- Charge, S.B., Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209–238.
- Cominetti, M.R., Ribeiro, J.U., Fox, J.W., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 416, 171-9.

- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., Yamada, K.M., 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708-12.
- Ferré, P.J., Liaubet, L., Concordet, D., SanCristobal, M., Uro-Coste, E., Tosser-Klopp, G., Bonnet, A., Toutain, P.L., Hatey, F., Lefebvre, H.P., 2007. Longitudinal analysis of gene expression in porcine skeletal muscle after post-injection local injury. *Pharm. Res.* 24, 1480-9.
- Fukushima, K., Nakamura, A., Ueda, H., Yuasa, K., Yoshida, K., Takeda, S., Ikeda, S., 2007. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC. Musculoskelet. Disord.* 28, 8-54.
- Gueders, M.M., Foidart, J.M., Noel, A., Cataldo, D.D., 2006. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 133-44.
- Gulati, A., Reddi, A., Zaleski, A., 1983. Changes in the basement membrane zone components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration. *J. Cell. Biol.* 97, 957-962.
- Hill, M., Goldspink, G., 2003. Expression and splicing of the insulinlike growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J. Physiol.* 549, 409–418.
- Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z., 1998. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280, 898-902.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.G., Verdière-Sahuqué, M., Fardeau, M., Alameddine, H.S., 1999. Expression of matrix metalloproteinases 2 and

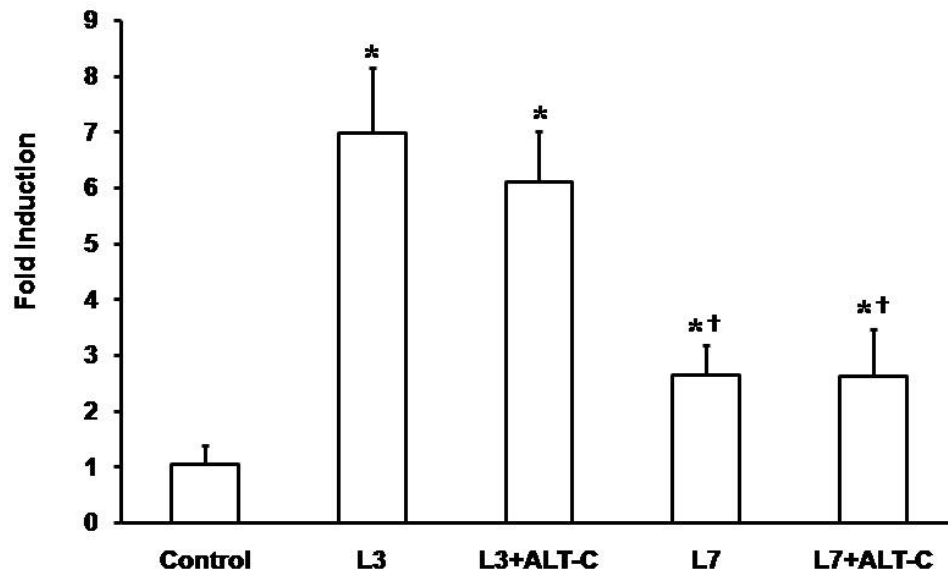
- 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* 205, 158-70.
- Maquoi, E., Frankenne, F., Noël, A., Krell, H.W., Grams, F., Foidart, J.M., 2000. Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. *Exp. Cell. Res.* 261, 348-59.
- Mariano-Oliveira, A., Coelho, A.L., Terruggi, C.H., Selistre-de-Araujo, H.S., Barja-Fidalgo, C., De Freitas, M.S., 2003. Alternagin-C, a non-RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. *Eur. J. Biochem.* 270, 4799-4808.
- Marsh, D.R., Criswell, D.S., Carson, J.A., Booth, F.W., 1997. Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. *J. Appl. Physiol.* 83, 1270-5.
- Menon, B., Singh, M., Singh, K., 2005. Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 289, 168–176.
- Miyabara, E.H., Martin, J.L., Griffin, T.M., Moriscot, A.S., Mestril, R., 2006. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290, 1128-38.
- Ohtake, Y., Tojo, H., Seiki, M., 2006. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *J. Cell. Sci.* 119, 3822-3832.
- Oliveira, N.M.L., Rainero, E.P., Salvini, T.F., 2006. Three intermittent sessions of cryotherapy reduce the secondary muscle injury in skeletal muscle of rat. *J. Sports Sci. Med.* 5, 228-234.
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L., 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359-71.

- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., Werb, Z., 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221-33.
- Prior, B.M., Yang, H.T., Terjung, R.L., 2004. What makes vessels grow with exercise training? *J. Appl. Physiol.* 97, 1119–1128.
- Ramos, O.H., Terruggi, C.H., Ribeiro, J.U., Cominetti, M.R., Figueiredo, C.C., Bérard, M., Crepin, M., Morandi, V., Selistre-de-Araujo, H.S., 2007. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 461. 1-6.
- Rantanen, J., Hurme, T., Lukka, R., Heino, J., Kalimo, H., 1995. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab. Invest.* 72, 341-7.
- Russo, T.L., Peviani, S.M., Durigan, J.L.Q., Salvini, T.F., 2008. Electrical stimulation increases matrix metallo-proteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 37, 593-600.
- Sakuma, K., Watanabe, K., Sano, M., Uramoto, I., Sakamoto, K., Tatsuka, T., 1999. The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428, 284–292.
- Schwartz, P.H., Nethercott, H., Kirov, I.I., Ziaecian, B., Young, M.J., Klassen, H., 2005. Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. *Stem Cells* 23, 1286-94.
- Selistre-de-Araujo, H.S., Cominetti, M.R., Terruggi, C.H., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M.S., Crepin, M., Figueiredo, C.C., Morandi, V., 2005. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates alpha2beta1

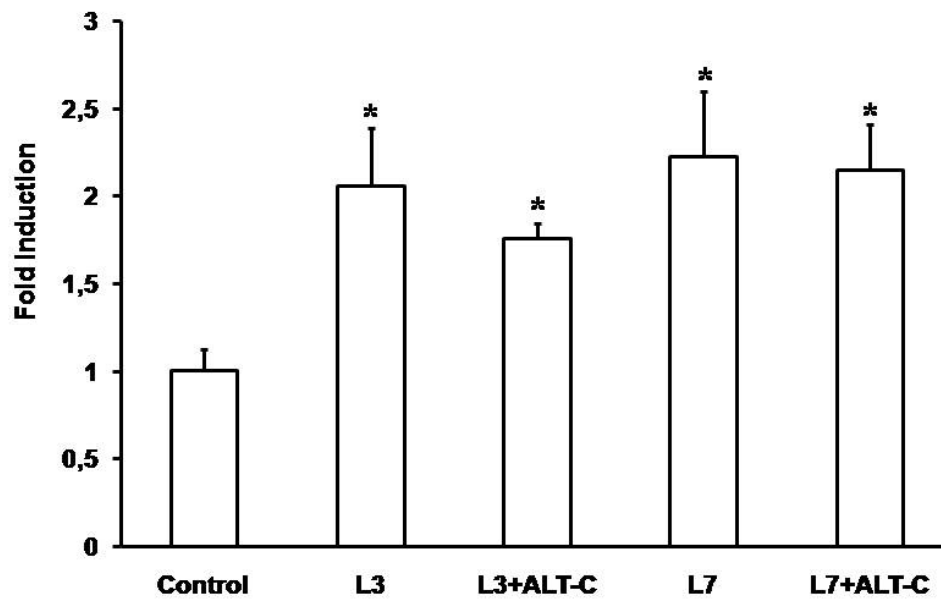
- integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1505-11.
- Senger, D.R., Van de Water, L., Brown, L.F., Nagy, J.A., Yeo, K.T., Yeo, T.K., Berse, B., Jackman, R.W., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., 1993. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 12, 303-324.
- Serrano, S.M., Jia, L.G., Wang, D., Shannon, J.D., Fox, J.W. 2005. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. *Biochem. J.* 391, 69-76.
- Serrano, S.M., Kim, J., Wang, D., Dragulev, B., Shannon, J.D., Mann, H.H., Veit, G., Wagener, R., Koch, M., Fox, J.W., 2006. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *J. Biol. Chem.* 281, 39746-56.
- Shi, X., Garry, D.J., 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20, 1692-708.
- Souza, D.H., Iemma, M.R., Ferreira, L.L., Faria, J.P., Oliva, M.L., Zingali, R.B., Niewiarowski, S., Selistre-de-Araujo, H.S., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 341-50.
- Sternlicht, M.D., Werb, Z., 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463-516.
- Wagatsuma, A., 2007. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Mol. Cell Biochem.* 298, 151-9.
- Warren, G.L., Hulderman, T., Jensen, N., McKinstry, M., Mishra, M., Luster, M.I., Simeonova, P.P., 2002. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 16, 1630-2.

Zigrino, P., Kamiguti, A.S., Eble, J., Drescher, C., Nischt, R., Fox, J.W., Mauch, C., 2002.

The reprotin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 40528-35.

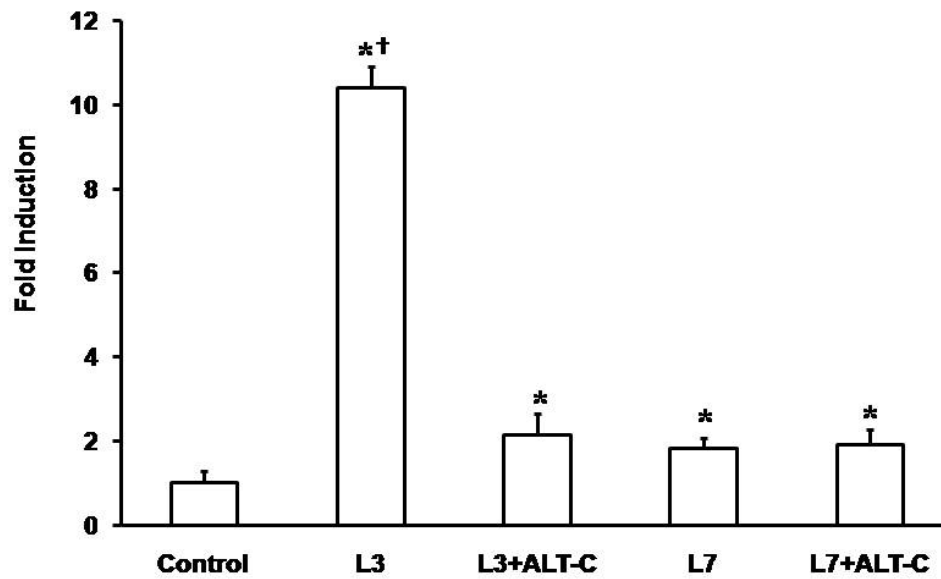


**FIGURE 1.** MyoD mRNA levels in tibialis anterior (TA) of rat muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); 3 days post injury (L3); 3 days post injury treated with ALT-C (L3+ALT-C); 7 days post injury (L7); 7 days post injury treated with ALT-C (L7+ALT-C); \*P < 0.05: compared to control; † P < 0.05: compared to L3 and L3+ALT-C groups.



**FIGURE 2.** VEGF mRNA levels in tibialis anterior (TA) of rat muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); 3 days post injury (L3); 3 days post injury treated with ALT-C (L3+ALT-C); 7 days post injury (L7); 7 days post injury treated with ALT-C (L7+ALT-C); \*P < 0.05: compared to control group.





**FIGURE 3.** MMP-2 mRNA levels in tibialis anterior (TA) of rat muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); 3 days post injury (L3); 3 days post injury treated with ALT-C (L3+ALT-C); 7 days post injury (L7); 7 days post injury treated with ALT-C (L7+ALT-C); \* $P < 0.05$ : compared to control; †  $P < 0.05$ : compared to all groups.

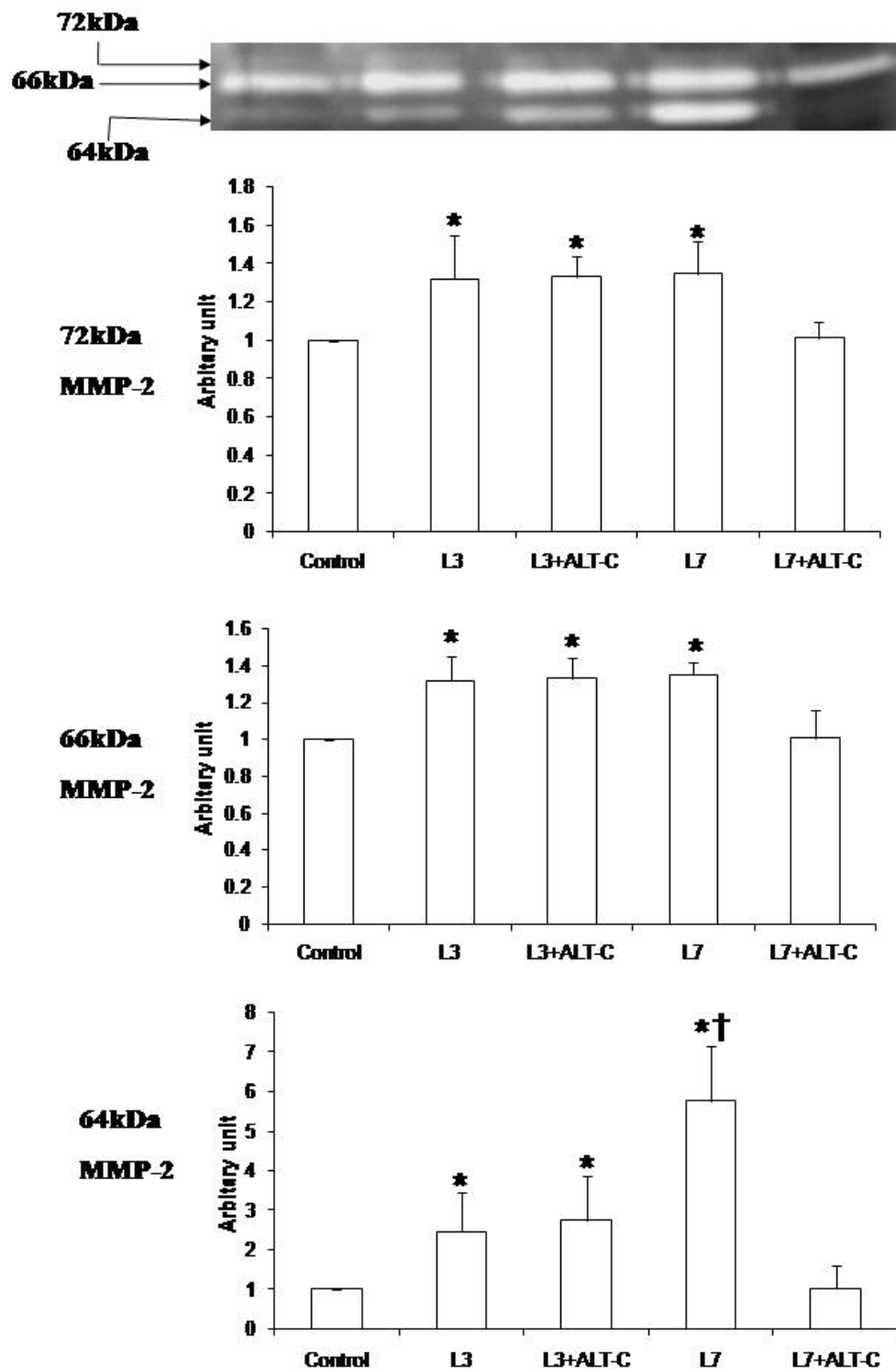
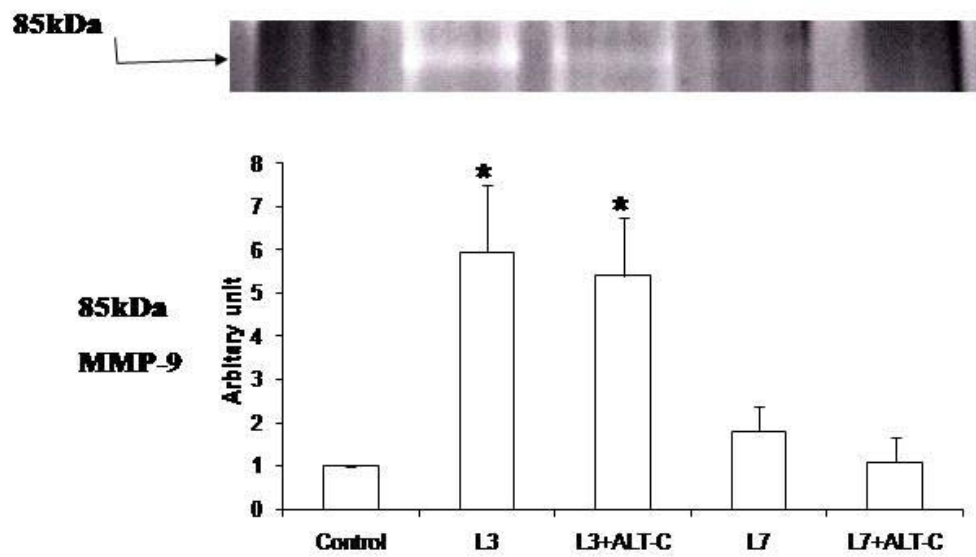


FIGURE 4. Quantitative densitometry of zymographic bands of MMP-2 in arbitrary units in TA muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); 3

days post injury (L3); 3 days post injury treated with ALT-C (L3+ALT-C); 7 days post injury (L7); 7 days post injury treated with ALT-C (L7+ALT-C). Pro MMP-2 (72 kDa); Intermediary MMP-2 (66 kDa) activity; Active MMP-2 (64 kDa) activity. \* $p < 0.05$ : compared to Control. †  $P < 0.05$ : compared to all groups.



**FIGURE 5.** Quantitative densitometry of zymographic bands of MMP-9 in arbitrary units in TA muscle. The data are mean  $\pm$  standard deviation. Normal TA muscle (Control); 3 days post injury (L3); 3 days post injury treated with ALT-C (L3+ALT-C); 7 days post

injury (L7); 7 days post injury treated with ALT-C (L7+ALT-C). Active MMP-9 (85 kDa) activity; \* $p < 0.05$ : compared to Control.

**Table 1:** Muscle weight and injury and uninjured cross-sectional area of TA muscle middle belly

<b>Groups</b>	<b>Muscle Weight (g)</b>	<b>Total Area mm<sup>2</sup></b>	<b>Injured Area mm<sup>2</sup></b>
<b>Control</b>	0.55 ± 0.07	43.04±4.7	-
<b>L3</b>	0.43 ± 0.06*	42.26±4.6	24.13±4.5
<b>L3+ALT-C</b>	0.45 ± 0.04*	44.39±5.1	22.09±4.1
<b>L7</b>	0.44 ± 0.06*	41.76±4.8	16.76±3.6 †
<b>L7+ALT-C</b>	0.46±0.06*	45.84±3.1	15.68±4.0 †

Data are means (±SD). Normal TA muscle (Control); 3 days post injury (L3); 3 days post injury treated with ALT-C (L3+ALT-C); 7 days post injury (L7); 7 days post injury treated with ALT-C (L7+ALT-C); \*P < 0.05: compared to muscle weight of control group. †P < 0.05: compared injured area of injured 3 days groups.