

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TESE DE DOUTORADO

**Toxicidade geral e ação sobre a função respiratória de camundongos
mdx da piridostigmina encapsulada em lipossomas multilamelares**

Gabriela de Cássia Sousa Amancio

Ouro Preto - MG
Novembro de 2017

Gabriela de Cássia Sousa Amancio

Toxicidade geral e ação sobre a função respiratória de camundongos mdx da piridostigmina encapsulada em lipossomas multilamelares

Tese apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor (a) em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Andrea Grabe Guimarães

Coorientadores:

Prof^a. Dr^a Neila Márcia Silva Barcellos

Dr. Olivier Cazorla

Ouro Preto - MG

Novembro de 2017

A522t

Amâncio, Gabriela de Cássia Sousa.

Toxicidade geral e ação sobre a função respiratória de camundongos mdx da piridostigmina encapsulada em lipossomas multilamelares [manuscrito] /

Gabriela de Cássia Sousa Amâncio. - 2017.

100f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Grabe-Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Fármacos - Piridostigmina. 2. Atrofia muscular. 3. Toxicidade - Testes. 4. Músculos - Doenças - Distrofia. 5. Testes funcionais dos pulmões. I. Grabe-Guimarães, Andrea. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 615.1/2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



Sessão de defesa da 12ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas a GABRIELA DE CÁSSIA SOUSA AMANCIO com a defesa da tese intitulada: "Toxicidade geral e ação sobre a função respiratória de camundongos mdx da piridostigmina encapsulada em lipossomas multilamelares", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 15 de dezembro de 2017.

Dr. Marco Aurélio Martins
FIOCRUZ/RJ

Prof. Dr. André Luís Branco de Barros
UFMG

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
UFOP

Prof. Dr. Romulo Leite
UFOP

Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães
UFOP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Experimental da Escola de Farmácia -UFOP e no Laboratório INSERM 1064 - Université de Montpellier 1, França, com o auxílio da FAPEMIG (PPM V 1227), Rede Mineira de Pesquisas em Nanobiotecnologia e CNPq (205897/2014-2).

*Dedico este trabalho a minha família, em especial a
minha mãe Cristina.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar os meus caminhos e colocar pessoas tão especiais em minha vida.

À toda minha família pelo apoio, amor e carinho.

À minha mãe Cristina, meu exemplo de força e fé. Muito obrigada pelo amor incondicional, dedicação, apoio e orações.

Ao meu irmão Guilherme pelo companheirismo e amizade.

À minha irmã Geisa, pessoa iluminada, sempre disposta a ajudar, preocupada com o bem-estar de todos. Muito obrigada pelo apoio, amizade e conselhos.

Ao meu namorado Igor pelo apoio, paciência, companheirismo e ajuda com a tradução do artigo.

À minha orientadora Prof^a. Andrea Grabe Guimarães que além de competência profissional, é exemplo de honestidade, seriedade e gentileza. Muito obrigada pela confiança, apoio, incentivo e ensinamentos.

À minha coorientadora Prof^a. Neila Silva Barcellos pela colaboração, disponibilidade e ensinamentos.

Ao Dr. Olivier Cazorla e a toda equipe do Laboratório INSERM U1064 pela colaboração e ensinamentos. Aos alunos, Haikel e Johan, que me ajudaram com a realização do teste de contratilidade do diafragma.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a Silvia Almeida, Prof. Frank Bezerra e Prof^a Vanessa Mosqueira pelas críticas construtivas, direcionamentos e ensinamentos.

Aos alunos do Laboratório de Farmacologia Experimental Leidiane, Thales, Quênia, Dani, Ana Carolina, Renata, Paula, Taciana, Lidiane e Ana Paula, obrigada pela companhia, amizade, auxílio na realização dos experimentos e análise dos dados.

À Marcela, Liliam e Ana Carolina pela companhia e apoio durante o período do doutorado sanduíche em Montpellier.

À Carolina Morais (Carrol) pela amizade sincera, pelo apoio, conselhos e ajuda com os últimos experimentos e revisão da tese. Muito obrigada!

Aos professores e alunos do Laboratório de Plantas Medicinais pela disponibilização do aparelho de espectrofotometria UV.

À técnica do Laboratório Multiusuários do Cipharma, Patrícia Campelari, pelas orientações em relação a medida do potencial zeta e tamanho dos lipossomas.

Ao LAPAC-UFOP, especialmente a Nayara e Lúcia, pelo auxílio com a realização dos hemogramas e dosagens bioquímicas.

Ao CCA-UFOP e aos técnicos Sr. Wilson e Cristina pelo cuidado e manejo dos animais

Aos colegas e amigos do CiPharma e da UFOP.

À Capes, CNPq e FAPEMIG e a Rede Mineira de Pesquisas em Nanobiotecnologia pelo apoio financeiro.

RESUMO

A piridostigmina encapsulada em lipossomas multilamelares (PIR-Lip) foi desenvolvida com o objetivo de prolongar seu efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase e reduzir seus efeitos colaterais. No presente estudo foram avaliados os efeitos da administração subcutânea (SC) da PIR-Lip sobre a toxicidade geral em camundongos Swiss e sobre a função respiratória de camundongos mdx, modelo murino de distrofia muscular de Duchenne (DMD). PIR-Lip foi avaliada em comparação à PIR livre nos testes de campo aberto, haste girante e aparelho de tração, indicadores da função neumuscular, e parâmetros hematológicos e bioquímicos (função renal e hepática) em camundongos Swiss. Em camundongos machos, o tratamento em doses repetidas com a PIR-Lip (14 dias, 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg) causou redução da atividade locomotora dos animais no campo aberto. Não houve alteração significativa no teste da haste girante, utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio, e no teste de tração, utilizado para avaliar a força muscular. Quanto às alterações bioquímicas, nenhuma alteração foi encontrada em camundongos machos, no entanto nas fêmeas houve aumento significativo de creatinina e TGP nas doses 10, 20 e 40 mg/kg. Na avaliação hematológica após o tratamento com a dose 40 mg/kg de PIR-Lip foram observados aumento do hematócrito e VCM em fêmeas e redução em machos, porém permanecendo em valores dentro da normalidade. Foi avaliado o efeito da administração SC da PIR livre e PIR-Lip sobre a função respiratória de camundongos C57BL10 (animais controle) e camundongos mdx. Os parâmetros respiratórios (VC: volume corrente, VM: ventilação minuto; e FR: frequência respiratória) dos animais foram registrados durante o fluxo de ar ambiente e em condições de hipercapnia (8% CO₂), por pletismografia de corpo inteiro. A pletismografia foi realizada antes e após o tratamento em dose única com a PIR livre (0,1 mg/kg) e PIR-Lip (1 mg/kg e 5 mg/kg). Foi realizado também o teste de contratilidade *in vitro* do diafragma. Após o tratamento em doses repetidas (30 dias, PIR-Lip 5 mg/kg), o músculo foi estimulado eletricamente em diferentes frequências e a contração máxima medida. A PIR livre (1 mg/kg) foi tóxica para os camundongos mdx e os animais morreram após a administração. Não foi observado nenhum desses efeitos nos animais tratados com PIR-Lip em dose única ou doses repetidas. No entanto, a PIR-Lip não apresentou nenhum efeito benéfico sobre os parâmetros respiratórios avaliados. Em síntese, os resultados obtidos indicam um possível efeito da PIR livre e PIR-Lip sobre a atividade locomotora dos animais. A dose 40 mg/kg de PIR-Lip induziu algumas alterações indicativas de toxicidade hematológica, no entanto, a dose 10 mg/kg não apresentou nenhuma alteração relevante e, portanto, é segura para o uso em longo prazo. Para a avaliação de PIR-Lip para a terapêutica de DMD, novos estudos deverão ser realizados.

Palavras-chave: Piridostigmina, lipossoma, toxicidade, Distrofia Muscular de Duchenne, função respiratória.

ABSTRACT

Pyridostigmine encapsulated in multilamellar liposomes (PYR-Lip) has been developed with the aim of prolonging its inhibitory effect on acetylcholinesterase and reducing its side effects. In the present study we evaluated the effects of the subcutaneous administration (SC) of PYR-Lip on the general toxicity in Swiss mice and on the respiratory function of mdx mice, murine model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). PYR-Lip was evaluated in comparison to free PYR in the open field test, rotarod and traction test, indicators of neuromuscular function, and hematological and biochemical parameters (renal and hepatic function) in Swiss mice. In male mice, repeated doses of PYR-Lip (14 days, 10 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg) reduced locomotor activity of mice in the open field test. In the rotarod test, used to assess coordination and balance, and in the traction test, used to assess muscular strength, no significant effects were observed. No biochemical alterations were observed in male mice, however in females, there were increases in creatinine and TGP at doses 10, 20 and 40 mg/kg. Hematological evaluation after treatment with a 40 mg/kg dose of PYR-Lip showed increase in hematocrit and VCM in female, while in males, some reduction was observed, but remained within normal values. The effect of SC administration of free PYR and PYR-Lip on a respiratory function of C57BL10 mice (control animals) and mdx mice was evaluated. The respiratory parameters (TV: tidal volume, MV: minute ventilation, and RR: respiratory rate) of the animals were registered during both ambient air flow and hypercapnia conditions (8% CO₂). Plethysmography was performed before and after treatment with PYR-Lip (1 mg/kg and 5 mg/kg) and free PYR (0.1 mg/kg). In vitro contractility test of the diaphragm was also performed after treatment in repeated doses (30 days, PYR-Lip 5 mg/kg), the muscle was stimulated electrically at different frequencies and the maximum contraction was measured. Free PYR (1 mg/kg) was toxic to the mdx mice and the animals died after administration. No side effects were observed in animals treated with PYR-Lip upon either single or repeated doses. However, PYR-Lip had no beneficial effect on respiratory parameters. In summary, the results indicate a possible effect of free PYR and PYR-Lip on locomotor activity of the animals. The 40 mg/kg dose of PYR-Lip induced haematological toxicity, however, a dose of 10 mg/kg presented no relevant alterations and is therefore safe for use in the long term. For an assessment of PYR-Lip in DMD therapy, further studies should be performed.

Key-words: Pyridostigmine, liposome, toxicity, Duchenne Muscular Dystrophy, respiratory function.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Estrutura química da Piridostigmina	2
Figura 2: Síntese, armazenamento e liberação da ACh	3
Figura 3: Receptores da Acetilcolina.....	4

CAPÍTULO 1: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MULTILAMELARES CONTENDO PIRIDOSTIGMINA E MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE

Figura 1.1: Características estruturais dos lipossomas	10
Figura 1.2: Esquema da distribuição de lipossomas após administração SC	11
Figura 1.3: Dosagem da atividade da AChE no soro de camundongos Swiss machos tratados com PIR na sua forma livre e encapsulada em lipossomas multilamelares.....	17

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL DA PIRIDOSTIGMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS MULTILAMELARES EM CAMUNDONGOS SWISS

Figura 2.1: Protocolo experimental dos testes comportamentais	21
Figura 2.2: Testes comportamentais	24
Figura 2.3: Níveis séricos de ureia e creatinina de camundongos Swiss tratados por 14 dias com piridostigmina	29
Figura 2.4: Níveis séricos de TGP, TGO e fosfatase alcalina de camundongos Swiss tratados por 14 dias com piridostigmina.....	30

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIRIDOSTIGMINA NA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS mdx

Figura 3.1: Esquema do complexo distrofina-glicoproteínas nas células musculares esqueléticas .	37
Figura 3.2: Fotografia do sistema de pletismografia de corpo inteiro	41
Figura 3.3: Fotografia do sistema de transdução de força isométrica	42

Figura 3.4: Caracterização <i>in vivo</i> da função respiratória de camundongos C57BL10 e mdx por pletismografia.....	45
Figura 3.5: Parâmetros respiratórios em resposta ao ar ambiente e 8% CO ₂ em camundongos C57BL10 e mdx tratados com PIR livre e lipossomal (SC).	47
Figura 3.6: Parâmetros respiratórios em resposta ao ar ambiente e 8% CO ₂ em camundongos mdx 17 meses tratados com PIR em lipossomas 5mg/kg (SC).	48
Figura 3.7: Parâmetros respiratórios em resposta ao ar ambiente e 8% CO ₂ em camundongos tratados por 30 dia com PIR em lipossomas 5 mg/kg (SC)	49
Figura 3.8: Efeito do tratamento crônico com piridostigmina (5mg/kg SC) nas propriedades contráteis do diafragma de camundongos mdx 10 meses	50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MULTILAMELARES CONTENDO PIRIDOSTIGMINA E MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE

Tabela 1.1: Parâmetros de caracterização da formulação lipossomal..... 16

Tabela 1.2: Liberação da PIR contida nos lipossomas multilamelares..... 16

Tabela 1.3: Características físico-químicas 1º e 5º dia de preparo da formulação 17

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL DA PIRIDOSTIGMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS MULTILAMELARES EM CAMUNDONGOS SWISS

Tabela 2.1: Número de campos explorados por camundongos Swiss machos tratados por 14 dias com PIR livre e PIR em lipossomas no campo aberto..... 26

Tabela 2.2: Número de movimentos de *rearing* realizados por camundongos Swiss machos tratados por 14 dias com PIR livre e PIR em lipossomas no campo aberto. 27

Tabela 2.3: Número de movimentos de *grooming* realizados por camundongos Swiss machos tratados por 14 dias com PIR livre e PIR em lipossomas no campo aberto 27

Tabela 2.4: Efeito da PIR lipossomal sobre a força muscular de camundongos Swiss machos tratados por 14 dias 28

Tabela 2.5: Parâmetros hematológicos (série vermelha) camundongos Swiss fêmeas 15 dias após o início do tratamento 31

Tabela 2.6: Parâmetros hematológicos (série branca) camundongos Swiss machos 15 após o início do tratamento..... 31

Tabela 2.7: Parâmetros hematológicos (série vermelha) camundongos Swiss machos 15 dias após o início do tratamento 32

Tabela 2.8: Parâmetros hematológicos (série branca) camundongos Swiss machos 15 dias após o início do tratamento 32

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
Ca ²⁺	Cálcio
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CHOL	Colesterol
DEET	N, N-dimetil-meta-toluamida
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DOPC	Dióleil-fosfatidilcolina
DSPC	Distearoil-fosfatidilcolina
DSPE	Distearoil-fosfatidiletanolamina
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino
EEP	Potencial da placa motora
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
HCM	Hemoglobina corpuscular média;
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina,
IC	Insuficiência cardíaca
IV	Intravenoso
JNM	Junção neuromuscular
MEEP	Potencial em miniatura da placa motora
PA	Pressão arterial
PBS	Tampão salina-fosfato
PEG	Polietilenoglicol
PIR	Piridostigmina
PIR-Lip	Piridostigmina encapsulada em lipossomas multilamelares
SC	Subcutâneo
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica

UV	Ultravioleta
VC	Volume corrente
VCM	Volume corpuscular médio;
VM	Volume minuto

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	7

CAPÍTULO 1: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MULTILAMELARES CONTENDO PIR E MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE

1. INTRODUÇÃO	9
2. METODOLOGIA	12
2.1 Animais	12
2.2 Fármacos e reagentes	13
2.3 Preparação dos lipossomas	13
2.4 Determinação do teor de encapsulação	13
2.5 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	14
2.6 Estabilidade da formulação	14
2.7 Determinação da atividade da enzima AChE no plasma dos animais	15
2.8 Análises estatísticas	15
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSSÃO	18

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL DA PIRIDOSTIGMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS MULTILAMELARES EM CAMUNDONGOS SWISS

1. INTRODUÇÃO	20
2. METODOLOGIA	22
2.1 Animais	22
2.2 Protocolo experimental	22
2.3 Testes comportamentais	22
2.3.1 Campo aberto	23
2.3.2 Haste girante	23

2.3.3 Teste de tração	24
2.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	24
2.5 Análises estatísticas	25
3 RESULTADOS	25
4 DISCUSSÃO	32

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIRIDOSTIGMINA NA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS mdx

1. INTRODUÇÃO	37
2. METODOLOGIA	40
2.1 Animais	40
2.2 Avaliação da função ventilatória	40
2.3 Contratilidade <i>in vitro</i> do diafragma.....	41
2.4 Avaliação da toxicidade da piridostigmina em camundongos mdx.....	42
2.5 Protocolos experimentais	42
2.6 Análises estatísticas	42
3. RESULTADOS	44
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÕES GERAIS	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7. ANEXOS	70

Certificado CEUA

Artigo publicado: Effect of pyridostigmine on in vivo and in vitro respiratory muscle of mdx mice.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Piridostigmina (PIR) é um carbamato amônio quaternário inibidor de acetilcolinesterase (AChE) (Figura 1). A fórmula química da PIR foi sintetizada em 1945 pelo laboratório Roche e comercializada desde então, com o nome Mestinon[®]. PIR possui meia vida plasmática de 2 horas e aproximadamente 10 % de absorção gastrointestinal e consequentemente, baixa biodisponibilidade por via oral. PIR é metabolizada no fígado, onde é hidrolisada por colinesterases e excretada pelos rins na sua forma inalterada ou em metabólitos (Aquilonius et al., 1980). A ação da PIR é descrita predominantemente periférica, pois não atravessa a barreira- hematoencefálica (BHE) devido a presença do grupo amônio-quaternário em sua estrutura (Birtley et al., 1966).

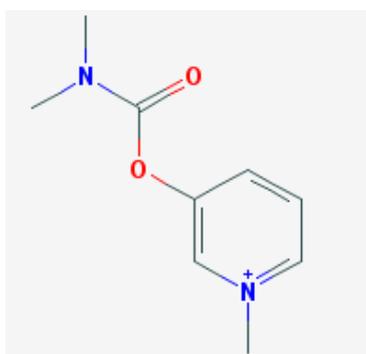


Figura 1: Estrutura química da Piridostigmina (C₉H₁₃BrN₂O₂).

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database

PIR atua inibindo reversivelmente a AChE, enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Sua atividade anticolinesterásica promove o acúmulo de ACh na fenda sináptica, aumentando a estimulação de receptores colinérgicos (Aquilonius et al., 1980). ACh é um importante neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso autônomo (SNA) e da junção neuromuscular (JNM). ACh é sintetizada a partir da colina e da acetil coenzima A (acetil-CoA) pela enzima colina acetiltransferase (ChAT). Após sua síntese, ela é transportada e armazenada em vesículas sinápticas, pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). A exocitose da ACh na fenda sináptica ocorre pela fusão da vesícula sináptica com a membrana plasmática pré-sináptica. Uma vez liberada, a ACh ativa os receptores pós-juncionais induzindo respostas biológicas em órgãos efetores ou a ativação de neurônios. Posteriormente, ACh é hidrolisada em acetato e colina pela enzima AChE, localizada ancorada à membrana pós-sináptica (Taylor et al., 1999) (Figura 2).

AChE pertence a uma família de enzimas denominadas colinesterases, da qual também faz parte a butirilcolinesterase (BuChE). AChE é a principal delas e está expressa nos neurônios no SNC e

SNA, músculo esquelético, músculo cardíaco e liso, glândulas endócrinas e exócrinas, e na membrana dos eritrócitos. A BuChE é encontrada, em sua maioria, no plasma sanguíneo e por isso, é também conhecida como colinesterase plasmática (Massoulié et al., 1993).

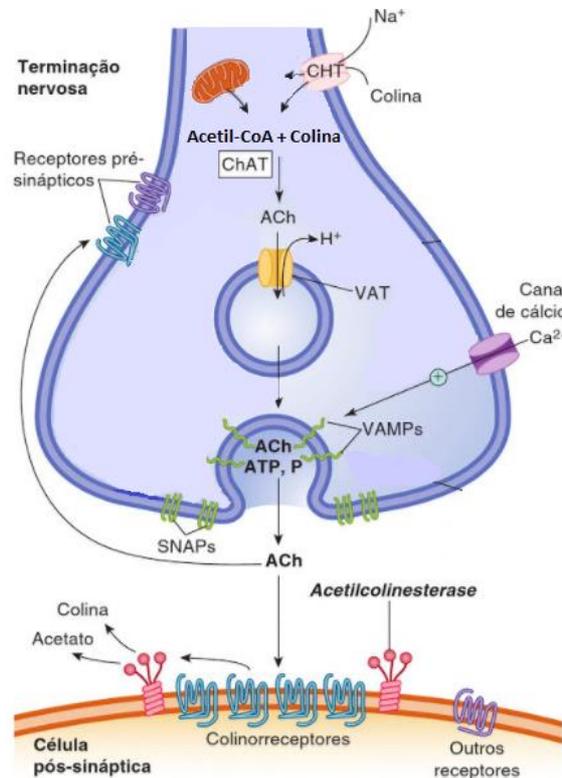


Figura 2: Síntese, armazenamento, liberação e degradação da ACh.

Fonte: Adaptado de Ganong et al., 2012.

ACh atua sobre dois tipos de receptores, muscarínicos e nicotínicos (Figura 3). Receptores muscarínicos são receptores de membrana acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana. Os receptores M₁, M₃ e M₅ estão acoplados a proteínas G responsáveis pela estimulação da fosfolipase C. Por outro lado, os receptores M₂ e M₄ estão acoplados a proteínas G responsáveis pela inibição da adenilil ciclase e ativação dos canais de K⁺ (Caulfield e Birdsall, 1998).

No SNA, os receptores muscarínicos mediam as respostas à ACh em todos os órgãos inervados pelo sistema nervoso parassimpático (SNP). No coração, a ativação dos receptores M₂ reduz a velocidade de condução nos nós sinoatrial e atrioventricular, reduzindo assim a frequência cardíaca (FC) e a força de contração dos átrios (Brodde et al., 2001). No sistema respiratório, os receptores M₃ promovem broncoconstrição e aumento das secreções brônquicas (Olsen et al., 1965; Baker et al., 1985). No sistema urinário aumentam a pressão miccional e o peristaltismo uretral (Chess-Williams, 2002). ACh também aumenta a secreção de todas as glândulas que recebem inervação do SNP ou

simpática colinérgica, via receptores muscarínicos (Caulfield e Birdsall, 1998). No SNC, os receptores muscarínicos estão envolvidos em respostas complexas, como cognição, controle motor, regulação do apetite, nocicepção entre outros (Wess et al., 2007).

Receptores nicotínicos são canais iônicos ativados por ligante, permeáveis aos íons sódio e potássio. Os receptores nicotínicos presentes no músculo esquelético de mamíferos são heteropentâmeros constituídos por subunidades α , β , γ , δ e ϵ e estão divididos em dois subtipos, N_1 e N_2 (Albuquerque et al., 2009). Receptores N_1 ou N_M são os únicos receptores de ACh encontrados na JNM e a estimulação desses receptores promove a despolarização da membrana da fibra muscular levando a contração muscular (Martyn et al. 2009). Receptores N_2 ou N_N desempenham papel fundamental na transmissão de sinais colinérgicos no SNA, eles podem ser encontrados nos gânglios autonômicos colinérgicos e adrenérgicos, também estão presentes na medula adrenal (Tiwari et al., 2013). No SNC, receptores N_2 ou N_N atuam nos processos de cognição, atenção, aprendizagem e desenvolvimento, e modulam a liberação de outros neurotransmissores (Dani et al., 2001).

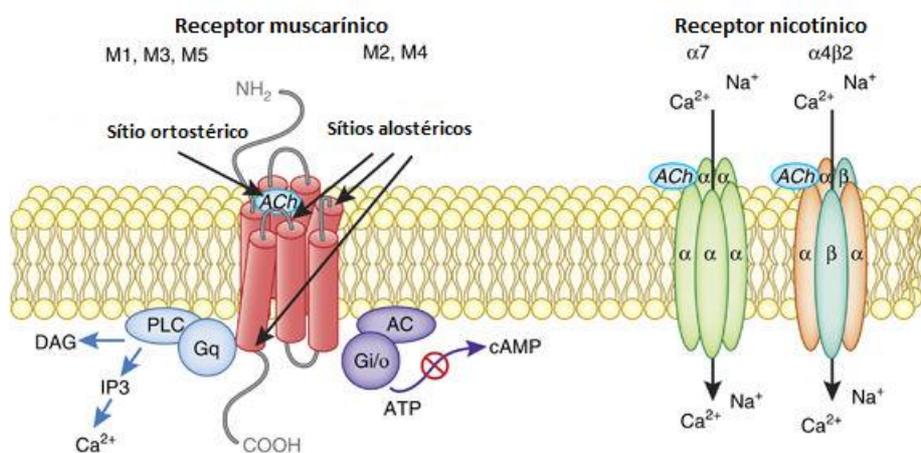


Figura 3: Receptores Acetilcolina.

Fonte: Adaptado de Jones et al., 2012.

Desde a década de 1950, a PIR tem sido o fármaco de escolha para o tratamento da Miastenia gravis, desordem autoimune caracterizada por deficiência de receptores nicotínicos para a ACh na placa motora do músculo esquelético e por fraqueza muscular (Phillips, 2003). A PIR prolonga a ação da ACh sobre os receptores nicotínicos, melhora a transmissão neuromuscular e conseqüentemente, aumenta a força de contração muscular (Maggi et al., 2011).

Além disso, a PIR é um agente promissor na terapêutica das doenças cardiovasculares devido sua influência na função autonômica cardíaca. A desregulação deste sistema nervoso autônomo (SNA) caracterizada por aumento da atividade simpática e redução da atividade parassimpática

contribuiu para a patologia cardiovascular, incluindo hipertensão, doença cardíaca isquêmica, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva (Merz et al., 2015). Uma alternativa terapêutica para contrapor este desequilíbrio é o aumento da atividade parassimpática em nível cardíaco. PIR confere cardioproteção, pois aumenta a atividade da ACh nas sinapses pós-ganglionares parassimpáticas. Em pacientes com isquemia cardíaca, a administração oral de PIR melhorou as respostas autonômicas e hemodinâmicas em repouso (Castro et al., 2004) e durante o exercício (Castro et al., 2006). Na insuficiência cardíaca (IC), além de equilibrar a atividade autonômica (Serra et al., 2009), a PIR reduziu a incidência de arritmias ventriculares (Behling et al., 2003). Estudos experimentais também demonstraram o efeito cardioprotetor da PIR no controle de disfunções do SNA. Em ratos saudáveis, a PIR atenuou o consumo de oxigênio pelo miocárdio evocado pela estimulação simpática central (Grabe-Guimarães et al., 1999) e reduziu o prolongamento do intervalo QT em animais submetidos a hiperestimulação simpática (Vidal et al., 2010); em ratos infartados, melhorou a sensibilidade baroreflexa e aumentou a variabilidade da FC (Sabino et al., 2012; La Fuente et al., 2013).

Entretanto, a PIR apresenta meia vida plasmática curta, baixa biodisponibilidade por via oral (Aquilonius et al., 1980) e efeitos adversos em doses terapêuticas (Pope et al., 2005), fatores que limitam seu uso em longo prazo. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma formulação farmacêutica na qual a PIR foi encapsulada em lipossomas multilamelares, constituída por dioleil-fosfatidilcolina (DOPC) e colesterol (CHOL) (Souza et al., 2013). Esta foi capaz de prolongar a ação da PIR, ampliando o tempo de seu efeito cardioprotetor em ratos anestesiados submetidos à estimulação simpática (Souza, 2013b). No entanto, a toxicidade da PIR em lipossomas ainda não havia sido avaliada em estudos não clínicos, sendo de suma importância para a sua avaliação clínica no futuro. No presente estudo foi avaliada a toxicidade geral em camundongos Swiss utilizando um conjunto de testes neurocomportamentais *in vivo* e avaliações bioquímicas e hematológicas para avaliação da segurança do uso da formulação administrada em doses repetidas.

Considerando a ação da PIR sobre o músculo esquelético, outro objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da PIR em lipossomas em um modelo murino de distrofia muscular de Duchenne (DMD). Esta doença é causada por uma mutação no gene responsável pela expressão da proteína distrofina, cuja ausência leva à inflamação crônica e degeneração de músculos esqueléticos, e consequentemente perda do tônus e força muscular (Hoffman et al., 1987). A insuficiência respiratória, causada pela atrofia dos músculos respiratórios, principalmente o diafragma, é uma das principais causas de morte em pacientes com DMD (Mah et al., 2014). Os músculos distróficos apresentam também alteração da transmissão colinérgica, caracterizada por alterações no padrão de distribuição dos receptores nicotínicos na junção neuromuscular (JNM) (Nagel et al., 1990, Lyons and Slater, 1991) e redução no tamanho do potencial em miniatura da placa motora (MEPP)

(Personius et al., 2006, Pijl et al., 2016). No presente estudo foi avaliado o efeito da PIR em lipossomas sobre a função respiratória *in vivo* e a contratilidade do diafragma *in vitro* de camundinhos mdx.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da PIR encapsulada em lipossomas multilamelares sobre a toxicidade geral em camundongos Swiss e função respiratória em modelo murino de DMD (mdx).

2.2 Objetivos específicos

- Mensurar a atividade da AChE em camundongos Swiss após administração SC de PIR em lipossomas.
- Avaliar a toxicidade da PIR em lipossomas administrada por via SC em doses múltiplas em testes comportamentais, parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos Swiss.
- Avaliar o efeito da PIR sobre a função respiratória, *in vivo* e *in vitro*, de camundongos mdx.

CAPÍTULO 1

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MULTILAMELARES CONTENDO PIR E MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE

1. INTRODUÇÃO

Lipossomas (Figura 1.1) são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos (Bangham et al., 1965), que são utilizadas como vetores no transporte e liberação de fármacos (Zylberberg et al., 2016). Os lipossomas podem ser preparados a partir de misturas de fosfolipídios naturais ou sintéticos e colesterol (Vemuri e Rhodes, 1995). Substâncias hidrossolúveis farmacologicamente ativas podem ser incorporadas no compartimento aquoso interno, e substâncias lipofílicas ou anfifílicas nas bicamadas lipídicas dos lipossomas (Lasic et al., 1998). A encapsulação de fármacos em lipossomas aumenta a estabilidade do fármaco, protegendo-o da eliminação ou degradação rápida, prolongando sua ação biológica (Vidal et al., 2010), além de reduzir a toxicidade da substância encapsulada (Maciel et al., 2010; Leite et al., 2012, Castro et al., 2014). Lipossomas também podem ter sua superfície modificada de modo a apresentar maior especificidade para células e órgãos específicos (Sapra et al., 2003).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho, número de bicamadas (lamelas), constituição lipídica e mecanismo de liberação do fármaco (Lopes et al., 2013). Lipossomas multilamelares (MLV, multilamellar vesicles) possuem várias bicamadas lipídicas e apresentam 400 a 5000 nm de diâmetro. Lipossomas unilamelares possuem apenas uma bicamada lipídica envolvendo o núcleo aquoso, são classificados em 3 subtipos: vesículas unilamelares pequenas (SUV, small unilamellar vesicles), quando apresentam de 20 a 50 nm de diâmetro; vesículas unilamelares grandes (LUV, large unilamellar vesicles) que apresentam o diâmetro maior do que 100 nm; e as vesículas unilamelares gigantes (GUV) com dimensões superiores a 1 μm . (Gregoriadis, 1993).

De acordo com a composição e interação com os sistemas biológicos, os lipossomas são classificados como convencionais, de circulação prolongada, polimórficos e sítio-específicos. (Batista et al., 2007). Lipossomas convencionais possuem baixa estabilidade no trato gastrointestinal, pois são degradados pelos ácidos gástricos, e por fosfolipases e sais biliares do intestino (Rowland et al., 1980). Quando administrados por via IV, os lipossomas são rapidamente removidos da circulação sistêmica por macrófagos do sistema fagocitário mononuclear e se acumulam principalmente, no fígado, baço e medula óssea (Scherphof et al., 1985), reduzindo sua ação em outros órgãos e tecidos. Esta remoção rápida ocorre devido ao processo de opsonização, processo em que as proteínas denominadas opsoninas aderem à membrana lipossomal e fazem com que sejam reconhecidos e fagocitados rapidamente pelos macrófagos (Yan et al., 2005). Uma alternativa para evitar o processo de fagocitose é revestir o lipossoma com polímeros hidrofílicos sintéticos, sendo o mais utilizado o polietilenoglicol (PEG). O revestimento do lipossoma com PEG reduz a ligação de opsoninas

evitando o reconhecimento dos lipossomas por macrófagos, aumentando sua permanência na circulação sistêmica (Torchilin et al., 2005). Lipossomas que possuem PEG em sua composição, são denominados lipossomas de circulação prolongada.

Lipossomas polimórficos são aqueles que se tornam reativos devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática. Um exemplo são os lipossomas pH-sensíveis que têm sido utilizados no tratamento do câncer para liberar fármacos no tecido tumoral, uma vez que, o pH destes tecidos é reduzido em relação ao tecido normal (Leite et al., 2012). Lipossomas sítio-específicos são aqueles que apresentam ligantes específicos acoplados a superfície, estes ligantes são específicos para sítios alvos, permitindo a liberação do fármaco em órgãos e tecidos de interesse (Sapra et al., 2003).

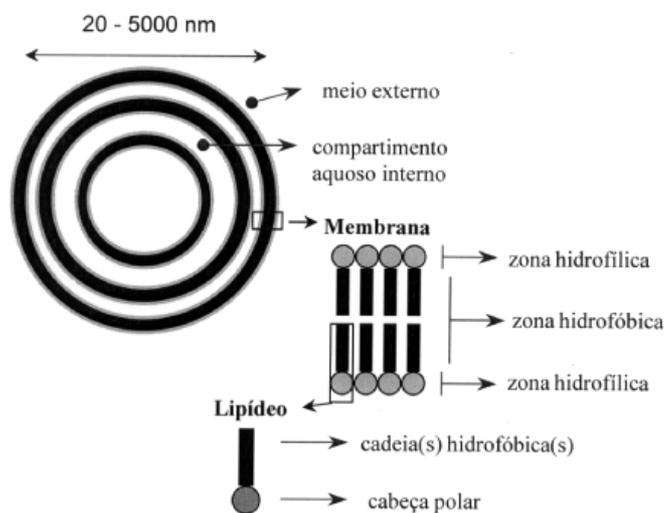


Figura 1.1: Características estruturais de lipossomas.

Fonte: Frézard et al., 2005

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu formulações farmacêuticas nas quais a PIR foi encapsulada em lipossomas unilamelares para a administração IV (Vidal et al., 2010) e multilamelares para a administração por via SC (Souza et al., 2013), com o objetivo de prolongar os efeitos da PIR e reduzir os efeitos colaterais.

Primeiramente, foi desenvolvida formulação onde a PIR foi encapsulada em lipossomas unilamelares de longa circulação constituído de distearoilfosfatidiletanolamina e PEG (DSPE-PEG) (Vidal et al., 2010). O efeito da PIR em lipossomas unilamelares foi avaliado sobre alterações eletrocardiográficas em ratos submetidos à estimulação simpática farmacológica, em comparação aos efeitos da PIR na sua forma livre. Vidal e colaboradores, demonstraram que a PIR encapsulada em

lipossomas unilamelares foi capaz de reduzir o prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma (ECG), parâmetro preditor de arritmias e risco de morte súbita (Shwartz et al., 1978) em até 6 horas após a administração IV, em ratos submetidos à estimulação adrenérgica, efeito este que foi cerca de 3 vezes mais prolongado que o da PIR livre (Vidal et al., 2010).

Em um estudo subsequente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu duas formulações farmacêuticas, nas quais a PIR foi encapsulada em lipossomas multilamelares convencionais, sendo uma constituída por distearoilfosfatidilcolina e colesterol (DSPC: CHOL) e outra por dioleilfosfatidilcolina e colesterol (DOPC: CHOL).

Os lipossomas multilamelares de PIR foram desenvolvidos para a administração SC, uma vez que esta via é de mais fácil manejo e confortável para o paciente que a via IV. Quando administrados por via SC, lipossomas não tem acesso direto a circulação sanguínea, pois a permeabilidade dos capilares sanguíneos é limitada à pequenas moléculas (<16 kDa). Lipossomas menores (< 0.1 μm) são absorvidos pelos vasos linfáticos e os lipossomas maiores, como os multilamelares, ficam retidos no tecido subcutâneo, suas membranas se desestabilizam lentamente e liberam a substância encapsulada para a circulação sanguínea (Figura 2.2) (Oussoren et al., 2001).

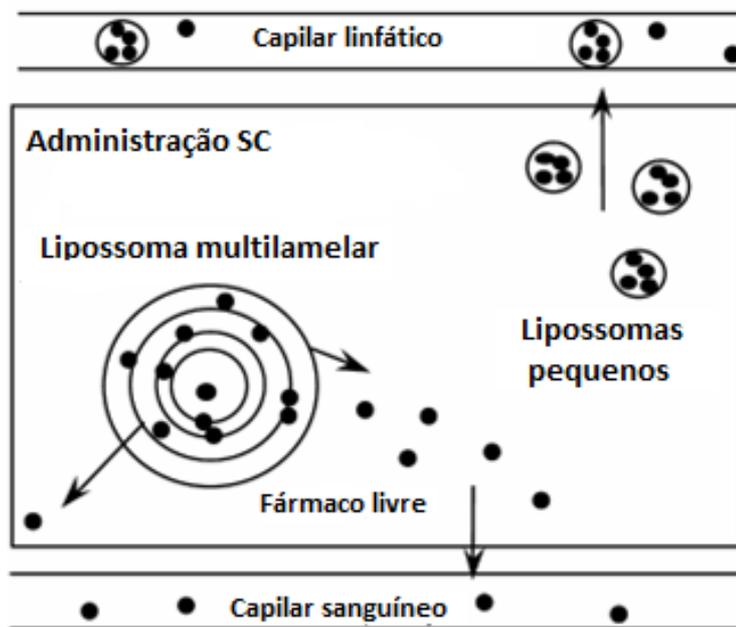


Figura 2.2: Esquema da distribuição de lipossomas após administração SC.

Fonte: Adaptado de Oussoren et al., 2001.

As formulações de PIR em lipossomas DOPC: CHOL e DSPC: CHOL, nas doses 10 mg/kg e 20 mg/kg, foram capazes de reduzir significativamente o intervalo QT em ratos anestesiados submetidos à estimulação adrenérgica, com uma inibição máxima de 76,4% e 73,0%, respectivamente. O efeito da formulação PIR/DOPC foi mais prolongado que com PIR/DSPC, na qual a inibição do prolongamento do QT foi observada em até 24 horas após a administração, enquanto a inibição pela formulação PIR/DSPC persistiu por 12 horas. Ambas as formulações também atenuaram o aumento da pressão arterial dentro de 24 a 12 horas, respectivamente para DOPC e DSPC (Souza, 2013b).

Os lipossomas multilamelares contendo PIR administrados por via SC formam um depósito do fármaco, permitindo sua liberação lenta e sustentada, prolongando seu efeito. Logo, a PIR em lipossomas pode ser uma alternativa terapêutica mais eficaz que sua forma livre. No entanto, avaliações pré-clínicas são de grande importância para avaliar a segurança desta formulação, como a avaliação da estabilidade da formulação, a eficácia na inibição da AChE *in vivo*, e estudos de toxicidade em doses repetidas em roedores.

O presente trabalho teve como objetivo dar continuidade aos estudos com a formulação da PIR em lipossomas multilamelares constituídos de DOPC: CHOL. Esta formulação apresentou resultado mais eficaz em relação à formulação lipossomal com DSPC: CHOL em relação ao teor de encapsulação e prolongamento do efeito da PIR (Souza, 2013b). A formulação lipossomal de PIR foi preparada e caracterizada como descrito por Souza e colaboradores (2013). Adicionalmente, foi avaliada a eficácia da PIR em lipossomas em inibir a atividade da AChE determinada em soro de camundongos Swiss tratados por via SC, realizadas pela primeira vez para esta formulação.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Para a dosagem da atividade da AChE foram utilizados camundongos Swiss machos com peso entre 25 e 30 g. Os animais foram obtidos do biotério central CCA/UFOP e alojados no Laboratório de Farmacologia Experimental da Escola de Farmácia/Cipharma/UFOP durante todo o período de experimentação. Os animais eram mantidos em caixas de polipropileno com acesso *ad libitum* à ração e água. Os protocolos para a utilização de camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto - CEUA/UFOP (2016/27).

2.2 Fármacos e reagentes

Piridostigmina (Sigma Aldrich), Colesterol (Sigma Aldrich), DOPC (Lipoid GmbH), Metanol (Synth), Clorofórmio (Synth) e água Milliq.

2.3 Preparação dos lipossomas multilamelares contendo piridostigmina

Lipossomas convencionais constituídos de DOPC e CHOL na relação molar 5:4 foram preparados conforme descrito por Souza e colaboradores (2013). Resumidamente: os lipídios foram solubilizados em clorofórmio e este evaporado com auxílio de rotavapor (Laborota4000[®], Heidolph Instruments, Alemanha) a 7000 rpm, na temperatura de 60° C. Após completa evaporação do solvente orgânico, o filme lipídico formado na parede do balão, foi hidratado com tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl 0,15 M, fosfato 0,01 M, pH 7,2) ou solução de brometo de piridostigmina (37,0 mg/ml PBS), para obtenção de lipossomas “brancos ou vazios” e lipossomas contendo a substância ativa, respectivamente. As soluções obtidas foram, então, homogeneizadas por 5 minutos e submetidas a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 60 °C. Para separação da substância ativa não encapsulada dos lipossomas foi realizada filtração por diálise quando a solução foi colocada em membrana de celulose de 6 mm de diâmetro (Sigma Aldrich, USA) e mantida em PBS (pH = 7,2) durante 24 horas.

2.4 Determinação do teor de encapsulação

Para a quantificação da porcentagem de PIR encapsulada na preparação de lipossomas, alíquotas da formulação foram retiradas antes e após a diálise. As alíquotas foram solubilizadas em metanol para rompimento da membrana vesicular e consequente liberação da PIR encapsulada. Posteriormente, foram realizados doseamentos, em triplicata, por metodologia de espectrofotometria ultravioleta (UV) (Espectrofotômetro Model B582 Micronal), no comprimento de onda de 270 nm como descrito por Hegazy e colaboradores (2002). O teor de encapsulação foi determinado como o teor de PIR presente na formulação após diálise de 24 horas, em relação ao total encontrado na preparação não submetida à diálise, utilizando a equação:

$$\text{Teor de encapsulação} = \frac{\text{Concentração de PIR nos lipossomas após a diálise} \times 100}{\text{Concentração de PIR antes da diálise}}$$

2.5 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho dos lipossomas, índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK). As formulações lipossomais foram diluídas na proporção de 1:200 em PBS e os parâmetros foram avaliados em triplicata.

2.6 Estabilidade da formulação lipossomal

A formulação lipossomal contendo PIR foi preparada como descrito em 2.2 foi armazenada em geladeira, a 4°C, por 5 dias. Amostras foram avaliadas após 24 horas, 48 horas e 5 dias de armazenamento. Alíquotas de 100 µl da formulação lipossomal foram colocadas em ultrafiltros de celulose (Microcon® 50,000 MWCO) e centrifugados por 30 minutos a 12000rpm, de modo a permitir que a fração livre passasse livremente pela membrana de filtração (filtrado) e a fração encapsulada fosse retida (sobrenadante). Filtrado e sobrenadante foram separadamente solubilizados em metanol e, em seguida, submetidos ao doseamento por espectrofotometria UV (270 nm), sendo os valores obtidos comparados àqueles referentes à preparação inicial. Também foram determinados o tamanho, IP e potencial zeta.

2.7 Determinação da atividade da AChE em soro de camundongos Swiss

Camundongos Swiss machos (peso \pm 30 g) foram tratados por via SC com PIR na sua forma livre (1 mg/kg) e encapsulada em lipossoma multilamelares (10 mg/kg). Posteriormente, os animais foram eutanaziados e o sangue total coletado para posterior obtenção do soro. As amostras de sangue foram coletadas 2, 6 e 24 horas após a administração e armazenadas no freezer -80°C até o dia da dosagem da atividade da enzima.

A atividade da AChE foi determinada indiretamente utilizando-se o kit colorimétrico (MAK119-Sigma Aldrich, USA). Este ensaio é uma versão otimizada do método descrito por Ellman e colaboradores (1961). Resumidamente, a tiocolina originada da hidrólise da ACh pela AChE ao reagir com DTNB (5,5'-ditio-bis-2nitrobenzoato), produz um composto amarelado, que pode ser quantificado à 405 nm (VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader). O composto amarelado formado é

proporcional a atividade da AChE. Uma unidade da AChE catalisa a produção de 1,0 μM de tiocolina por minuto à temperatura ambiente em pH 7,5.

2.8 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Graph Pad Prism® 5.0 (Graph Pad Software, EUA). Os dados foram submetidos a um teste de normalidade Kolmogorov Smirnov. Para analisar os dados da estabilidade foi utilizando o teste *t student* pareado. Para analisar a atividade da AChE foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m), foi utilizado intervalo de confiança de 95 % e as diferenças foram consideradas significativas quando P foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização físico-química da formulação lipossomal

As características físico-químicas da formulação foram avaliadas em relação ao tamanho, IP, potencial zeta e teor de encapsulação (Tabela 1.1). Para esta primeira caracterização, as amostras da formulação foram utilizadas logo após o seu preparo. As medidas de tamanho demonstraram que os lipossomas possuem distribuição de tamanho polidisperso, uma vez que o IP foi superior a 0,3. Além disso, os grandes diâmetros médios obtidos indicam os lipossomas como multilamelares. A formulação exibiu um potencial zeta negativo e a eficiência de encapsulação de PIR nos lipossomas foi semelhante à descrita por Souza e colaboradores (2013).

Tabela 1.1: Parâmetros de caracterização da formulação lipossomal.

	% Encapsulação	Tamanho (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
PIR em lipossomas	17,5 ± 4,8	2556 ± 180	0,49 ± 0,03	-5,0 ± 3,7
Lipossoma vazio	-	1194 ± 72	0,7 ± 0,42	-1,0 ± 0,2

IP: índice de polidispersão. Valores expressos em média ± D.P.

3.2 Estabilidade da formulação

As características físico-químicas da formulação e a concentração de PIR contida nos lipossomas foram avaliadas por 5 dias para determinar a estabilidade da formulação. Após 24 e 48 horas do preparo da formulação, houve liberação de 0,4 % e 7,0 % da PIR dos lipossomas. No 5º dia, a liberação foi 7,7 % do fármaco (Tabela 2). Em relação ao tamanho, IP e potencial zeta foram encontradas alterações significativas entre o 1º e o 5º dia. Os lipossomas contendo PIR e os lipossomas vazios apresentaram um aumento significativo do tamanho e redução do IP. O potencial zeta tornou-se menos negativo nos lipossomas contendo PIR e mais negativo nos lipossomas vazios (Tabela 3).

Tabela 1.2: Liberação da PIR contida nos lipossomas multilamelares.

Tempo	Concentração PIR contida nos lipossomas (mg/ml)	% Liberação
0 horas	4,55	-
24 horas	4,53	0,4
48 horas	4,23	7,0
5 dias	4,20	7,7

Tabela 1.3: Características físico-químicas entre 1º e 5º dia de preparo da formulação.

		Tamanho (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
1º dia	DOPC vazio	1194 ± 58,8	1,0 ± 0,000	-0,9 ± 0,17
	PIR em lipossomas	2191 ± 43,8	0,8 ± 0,008	-7,7 ± 1,2
5º dia	DOPC vazio	1525 ± 98,6*	0,75 ± 0,09*	-4,1 ± 2,0*
	PIR em lipossomas	2907 ± 93,4*	0,5 ± 0,15*	-3,3 ± 0,33*

IP: índice de polidispersão. Valores expressos em média ± D.P. Teste *t* pareado *($p < 0,05$), comparado com o primeiro dia.

3.3 Dosagem da atividade da AChE no soro de camundongos Swiss

A atividade da AChE em soro dos camundongos foi avaliada 2, 6 e 24 horas após o tratamento. Após 2 horas, PIR livre reduziu a atividade da AChE em 47 %, no grupo tratado com PIR em lipossomas foi observada inibição de 49 %. Após 6 e 24 horas, a PIR em lipossomas manteve a inibição da enzima em 48 %, e 46 %, respectivamente. No grupo tratado com PIR livre, a inibição da AChE não foi significativa nestes tempos (Figura 1.3).

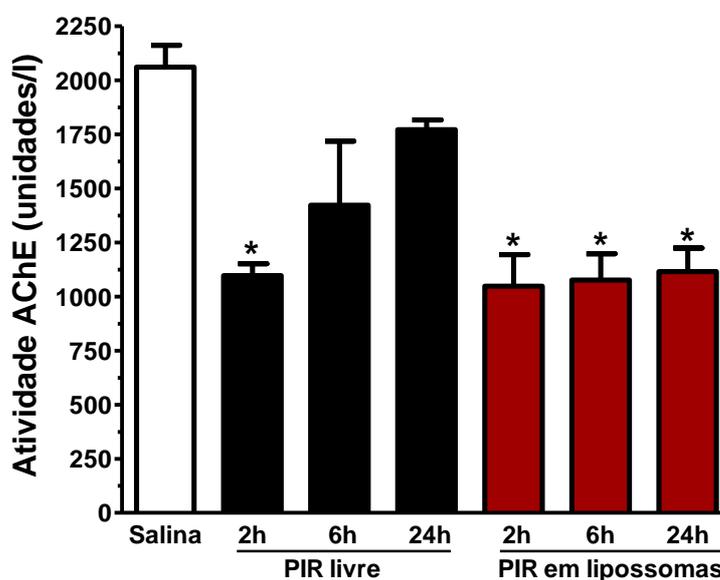


Figura 1.3: Atividade da AChE em soro de camundongos Swiss machos tratados com PIR na sua forma livre (1 mg/kg) e encapsulada em lipossomas multilamelares (10 mg/kg). Valores expressos em média ± E.P.M. * $p < 0,05$, comparado ao grupo salina. One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

A eficiência de encapsulação da PIR em lipossomas foi semelhante à descrita por Souza e colaboradores (2013), assim como todos os parâmetros físico-químicos avaliados - tamanho, IP e potencial zeta. A determinação do tamanho e do IP (superior a 0,3) foi importante para demonstrar que os lipossomas são multilamelares com diâmetro médio grande e polidisperso. Os lipossomas exibiram potencial zeta levemente negativo. O potencial zeta reflete a carga de superfície das vesículas e se relaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão (Heurtault et al., 2003). Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável porque as partículas carregadas se repelem e, assim, evitam a tendência natural de agregação. Em geral, valores de potencial zeta em módulo entre 30 mV e 60 mV são considerados ideais, e potenciais entre 5 mV e 15 mV estão próximos do limiar de agregação (Heurtault et al., 2003).

Em relação a estabilidade da formulação os resultados demonstraram uma perda de aproximadamente 7-8 % da PIR encapsulada após 2 e 5 dias respectivamente demonstrando que esta formulação não tem longa estabilidade quando armazenada em geladeira à 4° C. Em relação ao tamanho, houve aumento do diâmetro dos lipossomas, o que pode indicar agregação das vesículas (Lentz et al., 1985).

No presente estudo foi demonstrado que PIR em lipossomas (10 mg/kg), foi capaz de inibir a atividade da AChE após 2 horas em aproximadamente 50% semelhante à PIR livre (1 mg/kg). Esta porcentagem de inibição da AChE foi similar ao encontrado por Kant e colaboradores (2001) para a PIR livre administrada SC em ratos (1,5 mg/kg/dia) e para a PIR livre (10 mg/kg) administrada por via oral em ratos (Van Haaren et al., 1999).

Adicionalmente, PIR em lipossomas manteve a inibição da enzima até 24 horas após administração em dose única. Lipossomas multilamelares quando administrados por via SC ficam retidos no tecido cutâneo devido ao grande tamanho, suas membranas desestabilizam lentamente e o fármaco é liberado gradualmente na circulação sistêmica (Oussoren et al., 2001). Assim, é possível concluir que a encapsulação da PIR em lipossomas multilamelares ampliou o tempo do efeito inibitório da PIR sobre a AChE, mostrando assim, sua vantagem em relação a forma livre de PIR.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL DA PIRIDOSTIGMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS MULTILAMELARES EM CAMUNDONGOS SWISS

1. INTRODUÇÃO

Nesta etapa, a toxicidade da formulação lipossomal de PIR foi avaliada em camundongos Swiss após tratamento em doses repetidas. Estudos não-clínicos de toxicidade e segurança farmacológica são indispensáveis para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os estudos de toxicidade com doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração de doses diárias em um período mínimo de 2 semanas (ANVISA, 2013).

Geralmente, são avaliadas 3 doses para os testes em doses repetidas. Estas são estabelecidas a partir de estudos de toxicidade aguda ou testes piloto (EMEA, 2010). As doses de PIR foram selecionadas baseado em estudo anterior realizado por Souza e colaboradores (2013), no qual foram utilizadas as doses 10 mg/kg e 20 mg/kg da formulação lipossomal de PIR. Como foi preconizado a utilização de 3 doses para estudos de administração repetida, sugerindo-se intervalos de 2 a 4 vezes entre elas (ANVISA, 2013), selecionamos também a dose 40 mg/kg. O efeito das 3 doses de PIR lipossomal foi comparado a PIR livre (1 mg/kg), dose que não apresenta efeitos adversos quando administrada SC (Bernatova et al., 2003).

Os efeitos colaterais da PIR são, em sua maioria, consequência da hiperestimulação dos receptores colinérgicos periféricos. Efeitos colaterais muscarínicos são caracterizados por miose, bradicardia, hipotensão, distúrbios gastrointestinais (ex.: diarreia), aumento da salivação e das secreções brônquicas, e broncospasmos. Efeitos colaterais nicotínicos na junção neuromuscular do músculo esquelético podem causar fraqueza, fasciculações, tremores e eventualmente paralisia (Pope et al., 2005).

Efeitos adversos em decorrência do uso de inibidores de AChE ocorrem em um terço dos pacientes com Miastenia gravis (Beekman et al., 1997; Punga et al., 2008). Pacientes idosos parecem ser mais sensíveis a PIR que pacientes jovens (Punga et al., 2008). Além disso, uma pequena porcentagem de pacientes miastênicos apresentam um polimorfismo na subunidade catalítica da AChE o que os tornam mais sensíveis aos antiacetilcolinesterásicos (Shapira et al., 2000). Os efeitos adversos muscarínicos são mais comuns que os nicotínicos e precisam ser controlados pela administração de atropina por via oral ou parenteral (Skeie et al., 2006). Por outro lado, doses muito elevadas de PIR causam dessensibilização de receptores nicotínicos na placa motora resultando no aumento da fraqueza muscular, paralisia e insuficiência respiratória, quadro conhecido como *crise colinérgica* (Gold et al., 2008), nestes casos, a medicação deve ser suspensa imediatamente. Apesar dos efeitos colaterais, a PIR é o fármaco mais utilizado no tratamento de todas as formas de Miastenia gravis, principalmente nas formas mais leves e nos estágios iniciais da doença (Maggi et al., 2011).

Outro dado interessante em relação aos efeitos colaterais da PIR é sua correlação com *Síndrome da guerra do Golfo* (SGG) em soldados. Na Guerra do Golfo (1990-1991), a PIR foi utilizada profilaticamente para proteger contra a inativação permanente de AChE por organofosforados (Cook et al., 1992). SGG é caracterizada por fadiga crônica, dor muscular e distúrbios cognitivo-psicológicos, como perda de memória, confusão, incapacidade de concentração, mudanças de humor, especialmente irritabilidade e sonolência (Landrigan et al., 1997). Entretanto, a ação da PIR é predominantemente periférica, uma das hipóteses para a ocorrência de tais efeitos seria a associação da PIR ao estresse (Amourette et al., 2009). A exposição ao estresse pode alterar a permeabilidade do BHE e aumentar a neurotoxicidade de algumas substâncias (Belova et al., 1982). Assim, o envolvimento do estresse durante o tratamento com a PIR permitiria o acesso desta ao SNC e conseqüentemente a inibição da AChE no cérebro (Friedman et al., 1996). No entanto, os estudos são controversos e o mecanismo pelo qual a PIR exerce tais efeitos não está claro.

Nesta etapa, a toxicidade da formulação lipossomal de PIR foi avaliada sobre sinais clínicos de hiperestimulação colinérgica periférica como, aumento da salivação, lacrimação, motilidade intestinal, e micções. Testes comportamentais também foram realizados, com o objetivo de identificar efeitos adversos sobre a locomoção, equilíbrio e coordenação motora, e função muscular.

Além disso, foram avaliados parâmetros bioquímicos, para análise de função renal e hepática. O fígado possui papel central no metabolismo de fármacos, e, portanto, é particularmente suscetível à toxicidade de diferentes fármacos. Entre as alterações hepáticas mais comuns estão alteração da homeostasia do cálcio, que pode levar a lise celular, lesão canalicular, lesão das mitocôndrias e apoptose. A exposição repetida a fármacos tóxicos podem causar inflamação (hepatite), necrose, fibrose e insuficiência hepática (Navarro et al., 2006). O rim também é sensível, a nefrotoxicidade pode manifestar-se como alterações na hemodinâmica renal, lesão e obstrução tubular, nefropatia glomerular e nefrite intersticial o que pode levar a insuficiência renal progressiva (Naughton et al., 2008).

Adicionalmente foram avaliados parâmetros hematológicos. Distúrbios hematológicos são geralmente raros, no entanto, quando presentes podem ser muito graves. As alterações hematológicas induzidas por fármacos podem ser o resultado de toxicidade direta do fármaco ou de seus metabólitos ou uma reação imune. Fármacos tóxicos podem afetar qualquer tipo celular, incluindo glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas, e podem causar diferentes tipos de anemia, agranulocitose (redução de leucócitos) e trombocitopenia (redução de plaquetas) (Rao, 2014).

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Para os testes de toxicidade foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas com peso entre 25 e 30 g. Os animais foram obtidos do biotério central CCA/UFOP e alojados no Laboratório de Farmacologia Experimental da Escola de Farmácia/Cipharma/UFOP durante todo o período de experimentação. Os animais eram mantidos em caixas de polipropileno com acesso *ad libitum* à ração e água. Os protocolos para a utilização de camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto - CEUA/UFOP (número 2014/12).

2.2 Protocolo experimental

A toxicidade da formulação lipossomal de PIR foi avaliada sobre sinais clínicos de hiperestimulação colinérgica periférica como, aumento da salivação, lacrimação, motilidade intestinal, e micções e tremores. Testes comportamentais também foram realizados, com o objetivo de identificar efeitos adversos sobre a locomoção, equilíbrio e coordenação motora, e função muscular. Camundongos Swiss machos foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos experimentais que receberam por via SC dose única diária:

1. Controle Salina (200 µl) (n=6)
2. Lipossoma vazio (200 µl) (n=6)
3. PIR na forma livre 1 mg/kg (n=6)
4. PIR em lipossomas 10 mg/kg (n=6)
5. PIR em lipossomas 20 mg/kg (n=6)
6. PIR em lipossomas 40 mg/kg (n=6)

2.3 Testes comportamentais

A avaliação da toxicidade da PIR foi realizada pela observação e quantificação das alterações comportamentais em camundongos adultos, induzidas pelo fármaco livre ou encapsulado em lipossomas, utilizando os métodos de campo aberto, haste girante e aparelho de tração, para a avaliação da locomoção, equilíbrio e força muscular, respectivamente (Figura 1). Os animais foram tratados por 14 dias e submetidos aos testes antes da administração das formulações, para o registro basal dos comportamentos avaliados 2, 6 e 24 horas após receberem a primeira dose, 6 horas após a sétima dose e 6 horas e 24 horas após a décima quarta dose das formulações. Este protocolo seguiu as orientações do *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança*

farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA).

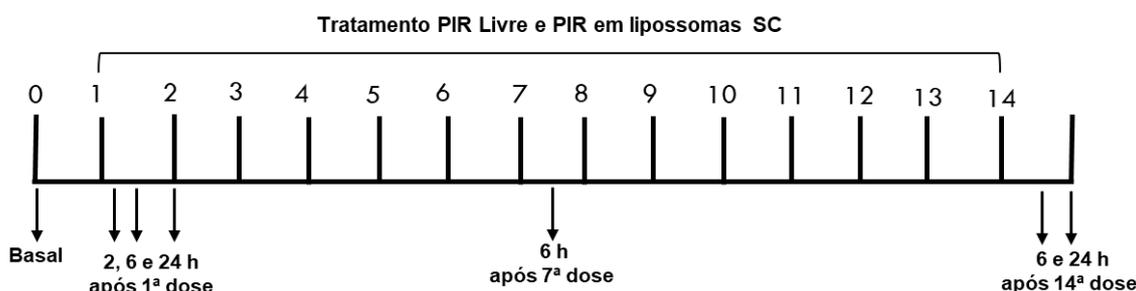


Figura 2.1: Esquema protocolo experimental dos testes neurocomportamentais.

2.3.1 Método campo aberto (*Open Field*)

Para avaliar a atividade locomotora dos animais foi utilizada a técnica de campo-aberto, método proposto por Turner e colaboradores (1972). O campo aberto (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) consiste em uma base de acrílico 100x80 cm, demarcada por 12 campos e cercada por parede circular de acrílico transparente de 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente dentro da câmara e, após 2 minutos de ambientação, a locomoção espontânea foi registrada por 5 minutos. Na análise do comportamento foram contados o número de campos invadidos; o número de vezes que o animal levantou apoiando-se nas patas posteriores (*rearing*), incluindo as vezes em que apoiou na parede lateral do campo aberto; o movimento de limpar (*grooming*), considerado pelos movimentos dirigidos à cabeça, efetuados com as patas dianteiras; e a contagem dos bolos fecais.

2.3.2 Método de haste girante (*Rotarod*)

O método da haste girante foi realizado utilizando o método descrito por Dunham e Miya (1957) com o objetivo de avaliar a coordenação motora e equilíbrio dos animais. A haste (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) consiste em uma barra giratória, dividida por discos intercalados em quatro setores de 10 cm. Os animais foram colocados individualmente num setor por 1 minuto para ambientação e, em seguida, foram colocados novamente por 2 minutos com aceleração progressiva de 5 a 20 rpm. Os experimentos foram filmados e o número e tempo de quedas no tempo experimental foram avaliados.

2.3.3 Método de tração

O método de tração foi realizado de acordo com o método descrito por Rudzik et al. (1973), com o objetivo de detectar alterações do tônus muscular. O aparelho de tração consiste em um fio metálico horizontal estendido a 30 cm de altura, sustentado por duas barras laterais. Foi avaliada a capacidade dos animais de se prender e sustentar no fio de metal com as patas anteriores e, quando livre, colocar uma das patas posteriores no fio em até 5 segundos. Cada animal foi colocado três vezes no aparelho no dia anterior para treinamento.

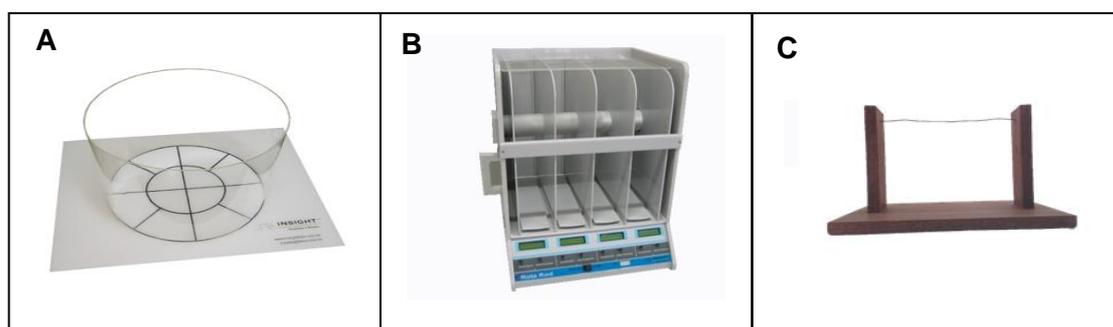


Figura 2.2: Testes comportamentais. A) Campo aberto. B) Rotarod). C) Barra de tração.

2.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

No 15º dia após a primeira dose do tratamento e 24 horas após a última dose, os animais foram anestesiados com ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior. Para a análise hematológica, as amostras foram coletadas em tubos eppendorfs contendo ácido etilenodiamino (EDTA) a 10% e os parâmetros avaliados utilizando aparelho de contagem eletrônica (ABX diagnostics, micros 60).

Para a análise bioquímica foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante, centrifugadas (1000 rpm, 30 minutos) e o soro obtido foi mantido a -4°C. Os níveis séricos de creatinina, uréia, ácido úrico, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina foram avaliados utilizando os kits colorimétricos específicos (Roche, EUA), e dosados em aparelho (Cobas Integra 400). Todas as dosagens foram realizadas no Laboratório Piloto de Análises Clínicas da UFOP (LAPAC-UFOP).

2.5 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Graph Pad Prism® 5.0 (Graph Pad Software, EUA). Os dados foram submetidos a um teste de normalidade Kolmogorov Smirnov. Para analisar os dados obtidos no campo aberto, labirinto em cruz elevado, haste girante, parâmetros bioquímicos e histológicos foi utilizando o teste *t student* pareado. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m), foi utilizado intervalo de confiança de 95 % e as diferenças foram consideradas significativas quando P foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para avaliar o método de tração foi utilizado o teste exato de Fisher e os resultados foram expressos em número de animais que não obtiveram êxito no teste.

3. RESULTADOS

3.1 Sinais clínicos de toxicidade colinérgica

Após o tratamento em doses repetidas por 14 dias com a PIR livre (1 mg/kg) ou PIR em lipossomas (10, 20 e 40 mg/kg), não foi observado nenhum efeito de hiperestimulação colinérgica periférica como, aumento da salivação, lacrimação, motilidade intestinal, e micções e tremores.

3.2 Testes comportamentais

3.2.1 Campo aberto

Para avaliar a atividade locomotora espontânea dos animais foi utilizado o método de campo aberto. Na análise do campo aberto foi observado redução significativa no número de campos explorados (Tabela 2.1) do grupo tratado com lipossomas vazios 6 e 24 horas após a primeira dose e 24 horas após a última dose tratamento.

Os animais tratados com PIR livre e lipossomal apresentaram redução no número de campos explorados (Tabela 2.1), nos movimentos de *rearing* (Tabela 2.2). O grupo tratado com PIR livre 1 mg/kg apresentou reduções no número de campos explorados e *rearings* após a 7^o e 14^o doses e também 24 horas após a última dose. O tratamento com PIR lipossomal 10 mg/kg casou reduções no número de campos explorados e *rearings* observado 6 e 24 horas após a 14^a dose. Na dose 20 mg/kg os animais apresentaram reduções no número de campos explorados após 2 horas e também 6 e 24 horas após a 14^a dose; o número de *rearings* foram reduzidos após 2, 6 e 24 horas após a 1^a dose e também 6 e 24 horas após a 14^a dose. O grupo tratado com PIR em lipossomas 40 mg/kg apresentou redução do número de campos explorados após 6 horas da administração da primeira dose e 24 horas após a 14^a dose.

O efeito do tratamento com PIR livre e PIR em lipossomas sobre o movimento de *grooming* não está claro (Tabela 2.3). No grupo PIR livre 1 mg/kg houve aumento 24 horas após a 14ª dose. Nos animais tratados com PIR em lipossomas 20 mg/kg houve aumento no número de groomings 24 horas após a 14ª dose. No grupo PIR em lipossomas 40 mg/kg houve aumento 24 horas após a primeira dose. Não foram encontradas diferenças significativas no número de bolos fecais entre os grupos avaliados.

Tabela 2.1: Número de campos explorados por camundongos Swiss machos tratados por 14 dias com PIR livre e PIR em lipossomas no campo aberto.

Tempo	Salina	Lipossoma vazio	PIR livre 1 mg/kg	PIR em lipossomas			
				10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	
horas	Basal	67 ± 8,7	62 ± 8,1	59 ± 3,9	88 ± 8,0	86 ± 11,6	78 ± 11,9
	2	62 ± 10,8	55 ± 6,5	51 ± 11,7	72 ± 16,5	73 ± 11,8*	59 ± 12,0
	6	32 ± 9,1*	37 ± 7,4*	41 ± 7,5	66 ± 9,12	71 ± 7,0	47 ± 5,9*
	24	54 ± 8,5	43 ± 7,6*	71 ± 18,2	101 ± 16,1	78 ± 10,5	48 ± 7,4
dias	7	60 ± 12,7	50 ± 16,8	28 ± 5,8*	67 ± 11,4	54 ± 8,3	52 ± 5,7
	14	75 ± 6,9	53 ± 5,9	28 ± 7,4*	53 ± 9,5*	47 ± 13,0*	30 ± 11,2*
	15	64 ± 3,5	31 ± 4,5*	21 ± 5,1*	34 ± 9,0*	37 ± 8,6*	24 ± 8,1*

Tempo: horas após administração da primeira dose; dias se refere a 6 horas após a 7ª e 14ª dose e 15 dias corresponde a 24 horas após a 14ª (última dose). Teste *t student* pareado. * p < 0,05 comparado ao tempo Basal (antes do tratamento). (n=6).

Tabela 2.2: Número de vezes que camundongos Swiss machos tratados por 14 dias com PIR livre e PIR em lipossomas apoiaram o corpo sobre as patas traseiras (*rearing*) no campo aberto.

	Tempo	Salina	Lipossoma vazio	PIR livre 1 mg/kg	PIR em lipossomas		
					10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
horas	Basal	30 ± 3,8	19 ± 4,4	28 ± 4,5	36 ± 4,3	38 ± 2,9	32 ± 5,0
	2	16 ± 1,9*	25 ± 2,9	16 ± 4,6	25 ± 6,3	23 ± 3,8*	22 ± 6,7
	6	12 ± 1,3*	9 ± 3,4	16 ± 5,7	22 ± 5,5	22 ± 3,1*	19 ± 4,3
	24	19 ± 3,7	15 ± 3,7	30 ± 8,8	28 ± 6,3	21 ± 2,5*	18 ± 5,9
dias	7	21 ± 4,3	15 ± 3,7	9 ± 2,7*	28 ± 5,5	24 ± 6,7	14 ± 5,8
	14	21 ± 4,5	13 ± 2,4	7 ± 2,5*	21 ± 3,2*	19 ± 5,5*	9 ± 5,2*
	15	30 ± 2,1	15 ± 4,5	6 ± 1,1*	11 ± 3,2*	21 ± 4,4*	8 ± 4,1*

Tempo: horas após administração da primeira dose; dias se refere a 6 horas após a 7^a e 14^a dose e 15 dias corresponde a 24 horas após a 14^a (última dose). Teste *t student* pareado. * p < 0,05 comparado ao tempo Basal (antes do tratamento). (n=6).

Tabela 2.3: Número de movimentos de limpar (*grooming*) realizados por camundongos Swiss machos tratados por 14 dias com PIR livre e PIR em lipossomas no campo aberto.

	Tempo	Salina	Lipossoma vazio	PIR livre 1 mg/kg	PIR em lipossomas		
					10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
horas	Basal	3 ± 1,4	3 ± 0,9	5 ± 1,6	3 ± 0,8	3 ± 1,3	2 ± 0,6
	2	4 ± 0,6	4 ± 0,5	4 ± 1,2	3 ± 0,7	5 ± 1,6	3 ± 0,6
	6	3 ± 0,8	2 ± 1,2	7 ± 1,7	4 ± 1,5	4 ± 0,8	3 ± 0,8
	24	5 ± 1,7	5 ± 0,9	6 ± 1,7	4 ± 0,7	6 ± 2,7	7 ± 0,1*
dias	7	2 ± 1,0	5 ± 0,8	7 ± 1,6	4 ± 0,9	4 ± 1,2	4 ± 1,1
	14	2 ± 0,7	4 ± 0,9	6 ± 1,6	4 ± 1,2	3 ± 1,3	3 ± 1,4
	15	5 ± 1,8	5 ± 1,1	5 ± 2,5*	4 ± 1,5	6 ± 1,9*	6 ± 1,8

Tempo: horas após administração da primeira dose; dias se refere a 6 horas após a 7^a e 14^a dose e 15 dias corresponde a 24 horas após a 14^a (última dose). Teste *t student* pareado. * p < 0,05 comparado ao tempo Basal (antes do tratamento). (n=6).

3.2.2 Teste coordenação motora e equilíbrio (*Rotarod*)

No teste de coordenação motora e equilíbrio, avaliada pelo método da haste girante, a maioria dos animais tratados com PIR em lipossoma conseguiram permanecer por 2 minutos na haste e não foram encontradas alterações significativas entre os grupos. No grupo tratado com lipossoma vazio, um animal caiu da haste aos 92 segundos no 15º dia. No grupo tratado com PIR livre 1mg/kg, um animal caiu da haste aos 16 segundos após 6 horas de tratamento e aos 111s no teste realizado no 15º dia.

3.2.3 Tração

No teste de força muscular, avaliada pelo método de tração, não foram encontradas alterações significativas na capacidade dos animais em se sustentar o próprio peso no fio metálico após o tratamento com PIR livre ou PIR em lipossomas. Nos grupos tratados com PIR livre 1 mg/kg e PIR em lipossomas 10 mg/kg, 20 mg/kg e 40 mg/kg apenas um animal não conseguiu se sustentar no fio metálico e caiu durante os testes para alguns tempos avaliados (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Efeito do tratamento com PIR livre e PIR lipossomal sobre a força muscular de camundongos Swiss machos por 14 dias

Tempo	Salina	Lipossoma vazio	PIR livre 1 mg/kg	PIR em lipossomas		
				10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
horas	Basal	0	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	1
	6	0	0	1	0	1
	24	0	0	0	1	0
dias	7	0	0	0	0	1
	14	0	0	1	1	0
	15	0	0	1	0	0

Tempo: horas após administração da primeira dose; dias se refere a 6 horas após a 7ª e 14ª dose e 15 dias corresponde a 24 horas após a 14ª (última dose). Os dados representam o número de animais que não passaram no teste de tração por grupo (Teste exato de Fisher). ($n=6$).

3.3 Parâmetros bioquímicos

Os níveis séricos de uréia e creatinina foram dosados para avaliação da função renal (Figura 3.3). Nos camundongos machos, não houve alterações nos níveis de uréia e creatinina em nenhum dos grupos tratados em relação ao controle. Nos camundongos fêmeas, houve aumento de creatinina nos grupos tratados com PIR em lipossomas nas doses 20 mg/kg e 40 mg/kg.

Os níveis séricos de TGP, TGO e fosfatase alcalina foram dosados para avaliar a função hepática (Figura 3.4). Nos camundongos machos houve redução dos níveis de TGO no grupo tratado com PIR livre 1 mg/kg e redução dos níveis séricos de fosfatase alcalina no grupo PIR lipossomal 40 mg/kg. Nos camundongos fêmeas, houve aumento de TGP nos grupos tratados com PIR lipossomal nas doses 10 mg/kg e 40 mg/kg.

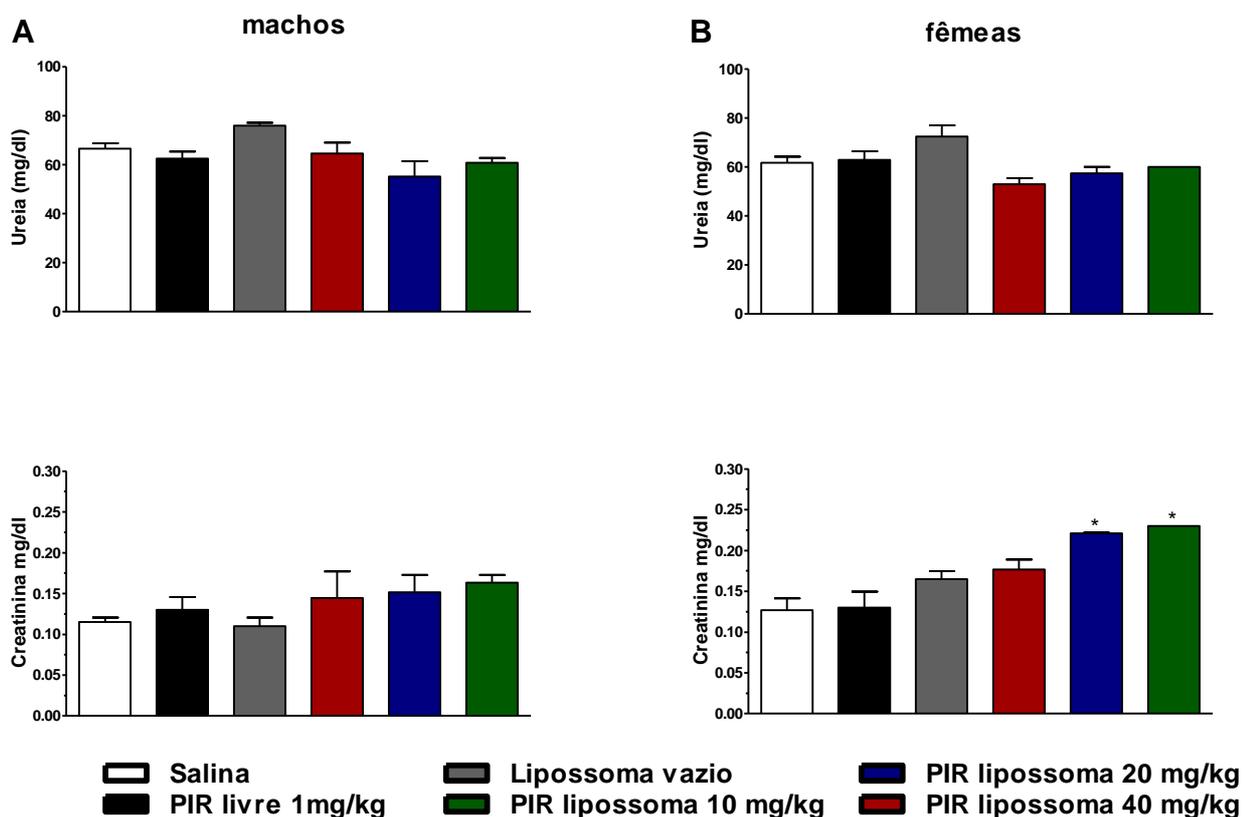


Figura 2.3: Níveis séricos de ureia e creatinina de camundongos Swiss tratados por 14 dias com piridostigmina. A) Camundongos Swiss machos. B) camundongos Swiss fêmeas. Valores expressos em média \pm E.P.M. One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com o grupo Salina (controle).

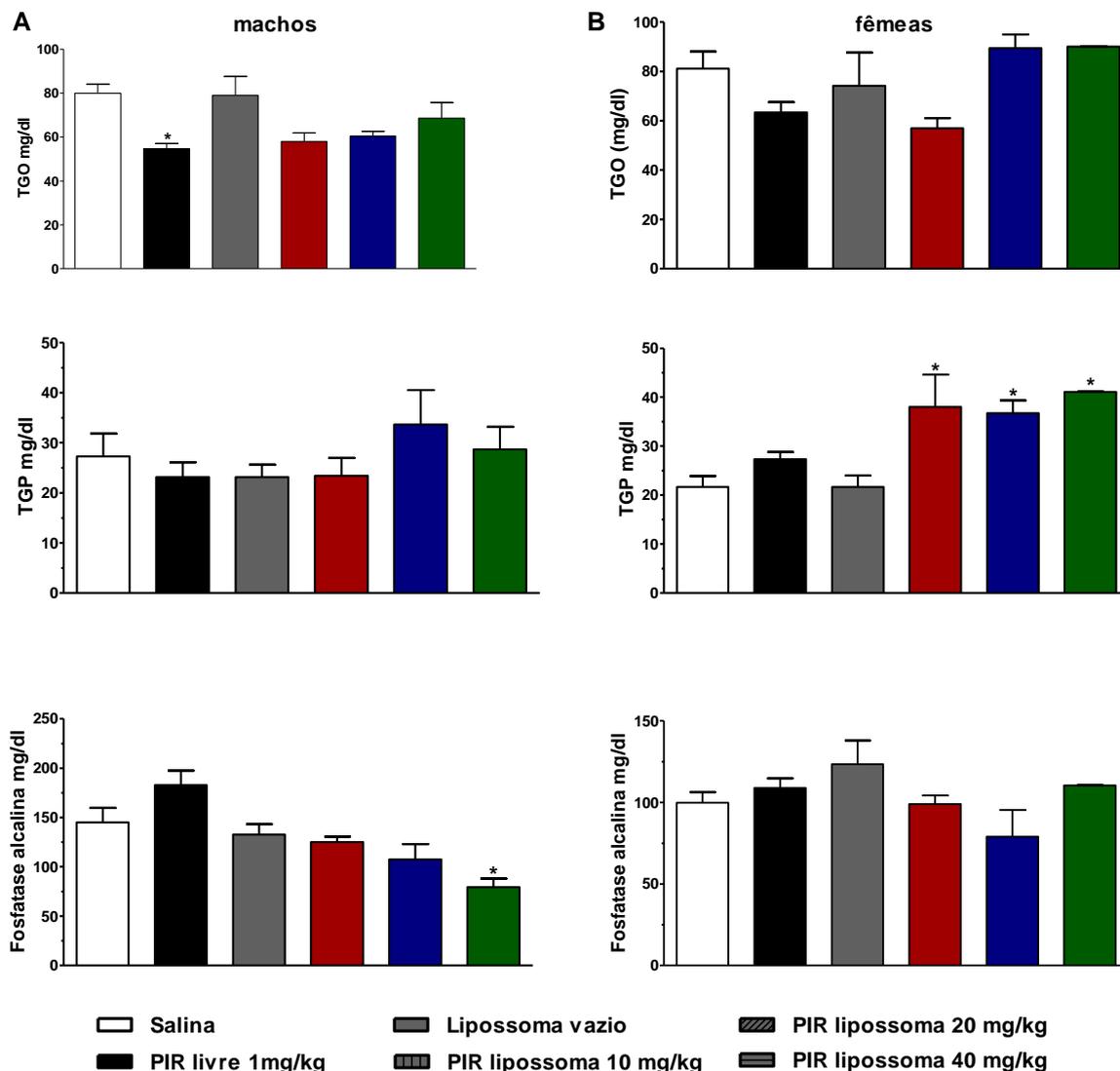


Figura 2.4: Níveis séricos de TGP, TGO e fosfatase alcalina de camundongos Swiss tratados por 14 dias com piridostigmina. A) Camundongos Swiss machos. B) Camundongos Swiss fêmeas. Valores expressos em média \pm E.P.M. One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com o grupo Salina (controle).

3.4 Parâmetros hematológicos

Nas fêmeas, o tratamento por 14 dias com PIR na dose 40 mg/kg aumentou o HCT e o HCM (Tabela 2.5), na série branca foi observado um aumento da % de neutrófilos e redução da % de linfócitos (Tabela 2.6). Nos camundongos machos houve redução no hematócrito, VCM, HCM e aumento de CHCM (Tabela 2.7). Na série branca, houve aumento da % de neutrófilos e redução da % de linfócitos nos animais tratados com a dose 40mg/kg (Tabela 2.8). Camundongos tratados com lipossoma vazio apresentaram redução da % de neutrófilos.

Tabela 2.5: Parâmetros hematológicos (série vermelha) camundongos Swiss fêmeas tratadas com PIR livre e PIR lipossomal por 14 dias.

Grupos	Eritrócitos $10^6/\text{mm}^3$	HGB g/dl	HCT (%)	VCM mm^3	HCM pg	CHCM g/dl
Salina	$7 \pm 0,6$	$10 \pm 2,6$	$32 \pm 3,1$	$47 \pm 0,5$	$14 \pm 3,2$	$31 \pm 6,6$
Lipossoma vazio	$8 \pm 0,1$	$13 \pm 0,2$	$37 \pm 0,3$	$38 \pm 11,2$	$17 \pm 0,3$	$35 \pm 0,7$
PIR livre 1 mg/kg	$8 \pm 0,4$	$13 \pm 0,4$	$39 \pm 1,3$	$51 \pm 2,2$	$17 \pm 0,3$	$30 \pm 3,5$
PIR lipossomas 10 mg/kg	$8 \pm 0,6$	$13 \pm 1,2$	$39 \pm 4,6$	$48 \pm 2,1$	$15 \pm 0,3$	$32 \pm 0,7$
PIR lipossomas 20 mg/kg	$8 \pm 0,2$	$13 \pm 0,3$	$36 \pm 0,7$	$48 \pm 0,7$	$17 \pm 0,3$	$36 \pm 0,8$
PIR lipossomas 40 mg/kg	$8 \pm 0,1$	$14 \pm 0,5$	$43 \pm 1,7^*$	$50 \pm 1,3$	$16 \pm 0,4^*$	$32 \pm 0,7$

One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$. HGB: Hemoglobina, HCT: Hematócrito, VCM: Volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2.6: Parâmetros hematológicos (série branca) camundongos Swiss fêmeas tratadas com PIR livre e PIR lipossomal por 14 dias.

Grupos	Leucócitos $10^3/\text{mm}^3$	Neutrófilos $10^3/\text{mm}^3$	Linfócitos $10^3/\text{mm}^3$	Monócitos $10^3/\text{mm}^3$	Eosinófilos $10^3/\text{mm}^3$	Basófilos $10^3/\text{mm}^3$
Salina	$5,2 \pm 1,7$	$0,6 \pm 0,2$	$4,5 \pm 1,2$	$6 \pm 4,6$	$0,2 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
Lipossoma vazio	$4,3 \pm 1,8$	$0,7 \pm 0,3$	$3,4 \pm 1,4$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$
PIR livre 1 mg/kg	$3,9 \pm 1,6$	$0,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 1,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,5$	$0 \pm 0,1$
PIR lipossomas 10 mg/kg	$8,1 \pm 3,0$	$4,9 \pm 2,5^*$	$2,9 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,1$
PIR lipossomas 20 mg/kg	$8,2 \pm 2,2$	$1,8 \pm 1,2$	$5,5 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$
PIR lipossomas 40 mg/kg	$10,1 \pm 1,7$	$6,5 \pm 1,0^*$	$3,4 \pm 0,4$	$0,0 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Valores expressos em média \pm e.p.m. (One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni). * $p < 0,05$.

Tabela 2.7: Parâmetros hematológicos (série vermelha) camundongos Swiss machos tratados com PIR livre e PIR lipossomal por 14 dias.

Grupos	Eritrócitos $10^6/\text{mm}^3$	HGB g/dl	HCT (%)	VCM mm^3	HCM pg	CHCM g/dl
Salina	$8 \pm 0,2$	$13 \pm 0,3$	$41 \pm 1,5$	$55 \pm 1,5$	$17 \pm 0,2$	$31 \pm 0,9$
Lipossoma vazio	$8 \pm 0,2$	$13 \pm 0,2$	$42 \pm 1,0$	$55 \pm 2,0$	$17 \pm 0,3$	$32 \pm 0,7$
PIR livre 1 mg/kg	$7 \pm 0,3$	$13 \pm 0,3$	$40 \pm 1,6$	$54 \pm 2,0$	$17 \pm 0,4$	$32 \pm 1,2$
PIR lipossomas 10 mg/kg	$7 \pm 0,2$	$12 \pm 0,4$	$38 \pm 0,8$	$53 \pm 2,1$	$17 \pm 0,3$	$33 \pm 1,4$
PIR lipossomas 20 mg/kg	$7 \pm 0,2$	$12 \pm 0,3$	$38 \pm 2,3$	$52 \pm 2,6$	$17 \pm 0,3$	$33 \pm 1,4$
PIR lipossomas 40 mg/kg	$6 \pm 0,4$	$12 \pm 0,6$	$34 \pm 1,9^*$	$47 \pm 0,7^*$	$16 \pm 0,3^*$	$34 \pm 0,4^*$

Valores expressos em média \pm e.p.m. (One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni). * $p < 0,05$.
HGB: Hemoglobina, HCT: Hematócrito, VCM: Volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2.8: Parâmetros hematológicos (série branca) de camundongos Swiss machos tratados com PIR livre e PIR lipossomal por 14 dias.

Grupos	Leucócitos $10^3/\text{mm}^3$	Neutrófilos %	Linfócitos %	Monócitos %	Eosinófilos %	Basófilos %
Salina	$6 \pm 0,9$	$20 \pm 8,1$	$69 \pm 6,4$	$1 \pm 0,3$	$2 \pm 1,1$	$0 \pm 0,0$
Lipossoma vazio	$4 \pm 1,4$	$6 \pm 1,3^*$	$73 \pm 4,4$	$5 \pm 2,0$	$0 \pm 0,3$	$3 \pm 2,0$
PIR livre 1 mg/kg	$5 \pm 1,4$	$17 \pm 8,8$	$78 \pm 8,1$	$1 \pm 0,3$	$0 \pm 0,3$	$0 \pm 0,0$
PIR lipossomas 10 mg/kg	$4 \pm 0,8$	$19 \pm 7,2$	$78 \pm 4,8$	$1 \pm 0,7$	$1 \pm 0,7$	$0 \pm 0,0$
PIR lipossomas 20 mg/kg	$5 \pm 2,0$	$29 \pm 9,5$	$70 \pm 9,7$	$1 \pm 0,6$	$0 \pm 0,2$	$0 \pm 0,1$
PIR lipossomas 40 mg/kg	$6 \pm 0,8$	$48 \pm 3,8^*$	$48 \pm 3,3^*$	$3 \pm 0,9$	$1 \pm 0,4$	$0 \pm 0,0$

Valores expressos em média \pm e.p.m. (One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni). * $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Em nosso estudo foi avaliada a toxicidade geral da formulação lipossomal de PIR sobre sinais clínicos de hiperestimulação colinérgica, parâmetros comportamentais indicativos de função neuromuscular, e parâmetros hematológicos e bioquímicos.

O tratamento crônico por 14 dias com a PIR livre (1 mg/kg) ou PIR em lipossomas (10, 20 e 40 mg/kg), não causou nenhum efeito colateral característico de hiperestimulação colinérgica periférica nos camundongos machos. No estudo realizado por Souza (2013) a administração SC de PIR livre nas doses 3, 5 e 10 mg/kg causou alterações como piloereção, aumento da secreção nasal, aumento da motilidade intestinal, micção e tremores. Apenas na dose de 1 mg/kg de PIR livre por via SC não foi observado tais efeitos colinérgicos. Bernatova e colaboradores (2003) também demonstraram que a PIR livre 1 mg/kg administrada via SC por 7 dias não causou bradicardia ou hipotensão em camundongos. Em nosso estudo foram utilizadas doses de PIR em lipossomas 10 a 40 vezes superiores a PIR livre e nenhum desses efeitos descrito para a hiperestimulação colinérgica foi observado. Por via oral, o tratamento por 14 dias de PIR livre nas doses 10 mg/kg e 20 mg/kg causou hipersalivação, tremores, e a morte de cães (Kluwe et al., 1989). Doses superiores a 5 mg/kg por via SC causam muitos efeitos colaterais em roedores e atropina deve ser utilizada para controlar os sintomas (Richtsfeld et al., 2013). Assim, fica claramente demonstrado que a encapsulação da PIR em lipossomas multilamelares constituídos de DOPC, é capaz de impedir os efeitos tóxicos causados por hiperestimulação colinérgica.

Em relação aos testes comportamentais, os resultados obtidos no campo aberto demonstraram que em todos os grupos avaliados houve redução da atividade locomotora. Todos os camundongos Swiss submetidos ao tratamento com PIR livre 1 mg/kg e PIR em lipossomas (10, 20 e 40 mg/kg) apresentaram redução no número de campos explorados e *rearing* após o tratamento em doses repetidas. Camundongos expostos repetidamente ao teste de campo aberto apresentam redução espontânea na atividade locomotora (Walsh e Cummins, 1975), no entanto, o grupo salina não apresentou redução da atividade locomotora como nos grupos tratados. Logo, os resultados obtidos indicam possível efeito da PIR livre e PIR lipossomal sobre a atividade locomotora dos animais.

A avaliação dos efeitos comportamentais é um componente importante para o rastreamento *in vivo* de fármacos ou compostos potencialmente tóxicos em camundongos (Moser et al., 2011). O campo aberto é utilizado para avaliar a atividade locomotora, ansiedade (Prut et al., 2003) e comportamento exploratório de roedores (Walsh e Cummins, 1976). Locomoção é um comportamento complexo afetado por diferentes regiões cerebrais, incluindo o telencefálico, sistema dopaminérgico e cerebelo, bem como por anormalidades periféricas, por exemplo fraqueza muscular (Karl et al., 2003).

PIR possui uma amina quaternária em sua composição, característica que impede sua passagem através da BHE, limitando seus efeitos sobre o SNC. No entanto, existem evidências de que a PIR causa alterações comportamentais que podem estar associadas ao SNC. Na década de 90, a exposição à PIR, juntamente com outros produtos químicos e/ou estresse crônico foi associada ao desenvolvimento da "Síndrome de Guerra do Golfo" (Haley e Kurt, 1997). Em ratos, foi reportado que a PIR reduz a atividade locomotora sozinha (Wholthius et al., 1984, Hoy et al., 2000) ou em combinação com estresse crônico e inseticidas como DEET e permetrina (Abou-Donia et al., 2004). O estresse combinado a baixas doses de PIR, DEET, permetrina também produziu alterações neuroquímicas como, a redução da atividade de AChE, e neuropatológicas no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, áreas do cérebro, respectivamente, importantes para a manutenção das funções motoras e sensoriais, aprendizagem e memória, marcha e coordenação dos movimentos. Os mecanismos pelos quais tais efeitos são mediados ainda não são conhecidos e uma possível explicação seria que o estresse poderia alterar a permeabilidade da BHE e aumentar a neurotoxicidade de algumas substâncias. No entanto, os estudos a respeito da PIR são contraditórios, pois alguns estudos demonstram que após o estresse, não há nenhuma alteração do efeito de PIR sobre a atividade de AChE no cérebro (Grauer et al., 2000, 2001; Lallement et al., 1998; Telang et al., 1999); por outro lado, outros estudos relatam aumentos da permeabilidade da BHE e inibição da atividade da AChE cerebral após a exposição ao estresse (Friedman et al., 1996).

O campo aberto também tem sido utilizado na avaliação da função neuromuscular (Tatem et al., 2014). Logo, a redução na locomoção observada em nosso estudo pode estar relacionada ao efeito periférico da PIR livre ou em lipossomas sobre a JNM. A excessiva inibição de AChE por doses elevadas de PIR, permite que as moléculas de ACh se liguem a múltiplos receptores nicotínicos, prolongando o tempo de decaimento do potencial da placa motora (EPP), prejudicando a sincronia entre os EPPs e os potenciais de ação muscular, o que pode causar fraqueza, fasciculações, tremores e eventualmente paralisia muscular (Pope et al., 2005). Além disso, alterações morfológicas da JNM foram demonstradas nos músculos do diafragma, extensor longo dos dedos e soleus de ratos tratados com PIR em dose única (Gebbers et al, 1986) e em doses repetidas (Adler et al., 1992). Entretanto, no teste de tração, que permite detectar anormalidades neuromusculares através da avaliação da capacidade dos camundongos em se sustentar em seu próprio corpo, o que requer força muscular (Rudzik et al., 1973), não foram observadas alterações significativas nos animais tratados com PIR livre e PIR em lipossomas em nenhuma das doses utilizadas.

O método rotarod tem sido utilizado tradicionalmente para avaliar a coordenação motora e equilíbrio, e assim como o campo aberto, também é útil para avaliar tanto a função neuromuscular periférica quanto a modulação do SNC sobre estes parâmetros (Deacon et al., 2013). Em nosso

estudo, os animais tratados com PIR em lipossomas, bem como a PIR livre não apresentaram nenhuma alteração no teste rotarod. Abdullah e colaboradores (2012) reportaram que a PIR (1,3 mg/kg) em combinação com estresse e inseticidas altera a coordenação motora e equilíbrio, ratos expostos a estas substâncias por 7 dias, reduzindo na capacidade dos animais em permanecer sobre a haste girante (Abdullah et al., 2012).

Em relação às alterações bioquímicas, a PIR em lipossomas nas doses 10 mg/kg, 20 mg/kg e 40 mg/kg aumentaram os níveis séricos de TGP, indicando possível efeito hepatotóxico. Nas fêmeas, também houve aumento dos níveis de creatinina nas doses 20 e 40 mg/kg, indicando possível efeito tóxico sobre a função renal. Efeitos tóxicos sobre a função hepática e renal foram documentados anteriormente para doses elevadas (45 mg/kg/dia) de PIR livre por via oral em ratos (Bigoniya et al., 2013).

Para os parâmetros hematológicos foram encontradas alterações na série vermelha de camundongos machos e fêmeas após o tratamento com a dose 40 mg/kg de PIR em lipossomas. Os resultados encontrados são opostos, enquanto nas fêmeas houve aumento de HCT e HCM, nos machos houve redução destes parâmetros acompanhado de um aumento de CHCM. O significado biológico destas alterações não está claro.

A dose 40 mg/kg também induziu alteração na série branca, com aumento da porcentagem de neutrófilos e redução na porcentagem de linfócitos em ambos os grupos. Efeitos sobre parâmetros hematológicos também foram documentados para doses elevadas de PIR livre (45 mg/kg/dia), caracterizada por redução da contagem global de hemácias e aumento da contagem global de leucócitos, com significativo aumento de eosinófilos (Bigoniya et al., 2013).

Em síntese, os resultados obtidos indicam um possível efeito da PIR livre e PIR em lipossomas sobre a atividade locomotora dos animais. As doses 20 mg/kg e 40 mg/kg de PIR em lipossomas apresentaram alguns indicativos de toxicidade renal, hepática e hematológica, no entanto, a dose 10 mg/kg não apresentou nenhuma alteração relevante e, portanto, é segura para o uso em longo prazo.

CAPÍTULO 3
**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIRIDOSTIGMINA NA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA
DE CAMUNDONGOS mdx**

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossomo X, caracterizada por degeneração muscular progressiva e fraqueza muscular generalizada, que afeta 1 em cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (Dooley et al., 2010). A DMD é causada por mutações no gene que codifica a distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X, locus Xp21 (Hoffman et al., 1987). As mutações provocam a expressão truncada da proteína (não funcional) ou impedem a expressão da mesma nas células musculares estriadas, células endoteliais e células do SNC (Mendell et al., 1995; Van den Bergh et al., 1995; Mehler, 2000).

A distrofina possui função estrutural, sendo um componente importante para manutenção da integridade da fibra muscular e a estabilidade do sarcolema (Kapsa et al., 2003). Ela se liga a actina e a um complexo de glicoproteínas, denominado complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), e conecta o citoesqueleto à matriz extracelular (Figura 3.1). A distrofina limita o estresse mecânico sarcolemal desenvolvido durante ciclos repetidos de contração-relaxamento muscular (Petrof et al., 1993).

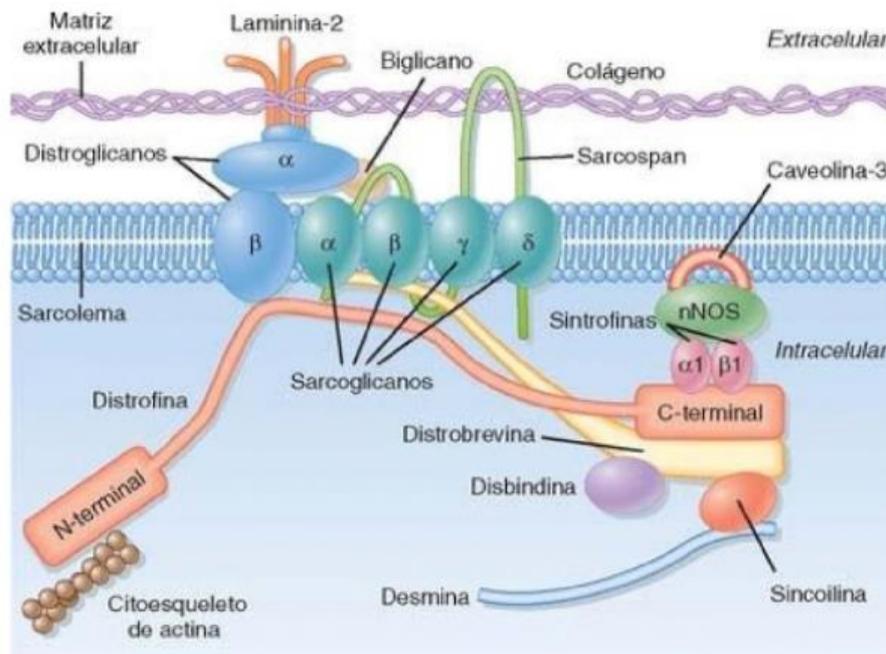


Figura 3.1: Esquema do complexo distrofina-glicoproteínas nas células musculares esqueléticas.

Fonte: Berne e Levy, 2009.

Na musculatura estriada, a ausência da distrofina desorganiza os componentes do CDG deixando o sarcolema instável durante os ciclos de contração-relaxamento, levando à lesão do sarcolema, degeneração da miofibra, inflamação e fibrose (Hoffman et al., 1988). A distrofina também está envolvida em cascatas de sinalização celular, regulando proteínas associadas à

membrana, incluindo canais iônicos, e indiretamente via segundos mensageiros como Ca^{+2} e óxido nítrico (Mosqueira et al., 2013b). A ausência da proteína afeta a permeabilidade da membrana causando aumento do influxo de Ca^{+2} (Matsumura et al., 2011). O aumento das concentrações de Ca^{+2} intracelular aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (Netthery et al., 2000) e ativa proteases (Matsumura et al., 2011), contribuindo para os processos de necrose e inflamação muscular.

Na DMD, a ausência da distrofina também está associada à alterações na morfologia da JNM e na transmissão sináptica. Os músculos distróficos apresentam alteração no padrão de distribuição dos receptores nicotínicos de ACh na JNM da membrana pós-sináptica. Os receptores são distribuídos em numerosas ilhas, diferentemente do padrão normal em “braços contínuos” característicos da JNM adulta (Nagel et al., 1990, Lyons and Slater, 1991). AChE está redistribuída da mesma forma que os receptores (Olivier et al., 1992). A ausência de distrofina também provoca a desestabilização, aumenta a internalização e a degradação de receptores nicotínicos (Xu et al., 1997; Di Angelantonio et al., 2011; Ghedini et al., 2012) e conseqüentemente afeta a transmissão colinérgica (Personius et al., 2006). Alguns estudos demonstraram uma redução no tamanho do potencial em miniatura da placa motora (MEPP), que representa a despolarização da membrana em resposta a liberações espontâneas de ACh, em camundongos mdx (Nagel et al., 1990; Lyons and Slater, 1991; Carlson and Roshek, 2001, Pijl et al., 2016). No entanto, ainda não está claramente compreendido, qual a contribuição efetiva das alterações na JNM para a redução do tônus muscular e fraqueza na DMD.

Pacientes com DMD apresentam os primeiros sintomas da doença no início da infância aos 2 a 5 anos de idade. Inicialmente são observadas alterações na postura e marcha da criança, acompanhado do déficit motor da cintura pélvica e escapular. Posteriormente, outros músculos são afetados de maneira progressiva e generalizada. As crianças perdem a capacidade de andar por volta dos 9-12 anos de idade (Ciafaloni et al., 2009; Bushby et al., 2010; Verma et al., 2010). Com a evolução da doença, os músculos respiratórios e cardíacos também são afetados. As insuficiências cardíaca e respiratória são as principais causas de morte em portadores de DMD (Mah et al., 2014).

A insuficiência cardíaca em pacientes com DMD é causada pela substituição progressiva das fibras musculares cardíacas por tecido conjuntivo e adiposo, causando arritmias ventriculares, dilatação do ventrículo esquerdo e conseqüente disfunção sistólica (Finsterer et al., 2003). Os pacientes também apresentam disfunção do SNA, com aumento da atividade simpática e redução do tônus parassimpático (Inoue et al., 2009).

Os problemas respiratórios estão relacionados à degeneração do diafragma, músculos intercostais e acessórios. Os pacientes apresentam hipoventilação, redução da expansibilidade pulmonar, que conseqüentemente podem causar hipoxemia e hipercapnia durante o sono (Smith et

al., 1988; Smith et al., 1989; Toussaint et al., 2007) e, com a progressão da doença, durante o período de vigília (Hukins e Hillman, 2000). Os pacientes com DMD também apresentam tosse ineficiente, o que conseqüentemente os tornam mais susceptíveis a infecções pulmonares e obstrução das vias aéreas respiratórias (Szeinberg et al., 1988).

O camundongo mdx é o modelo animal utilizado para o estudo da fisiopatologia da DMD (McGreevy et al., 2015). Estes animais apresentam uma mutação pontual espontânea no exon 23 do gene da distrofina, que introduz um códon de paragem prematuro, levando a expressão de distrofina com comprimento incompleto (Sicinski et al., 1989). A distrofia muscular nos camundongos mdx não é tão grave quanto em humanos, a regeneração do tecido muscular é bastante eficiente e sua funcionalidade é mantida até a senescência dos animais. O diafragma é o músculo mais afetado, apresentando um padrão de degeneração similar aos pacientes com DMD (Coirault et al., 2003), o músculo não é capaz de manter os ciclos repetidos de degeneração e regeneração, ocorrendo excessiva produção de tecido conjuntivo com progressiva perda de função contrátil e enfraquecimento muscular. Por esta razão, a avaliação da função contrátil do diafragma é um alvo importante para o estudo de novas terapias para a DMD.

Sinais de disfunção do diafragma aparecem nos animais ainda jovens entre 6-10 semanas de idade, caracterizada por redução da função contrátil *in vitro* (Stedman et al., 1991). Em animais mais idosos, a disfunção do sistema respiratório, que depende em parte da função dos músculos respiratórios, também pode ser avaliada *in vivo*, parâmetros ventilatórios como frequência respiratória (RR), volume corrente (VC) e ventilação minuto (VM), bem como a resposta a hipóxia e hipercapnia, podem ser avaliados por pletismografia de corpo inteiro (Gosselin et al., 2003; Matecki et al., 2005; Gayraud et al., 2007, Mosqueira et al., 2008, Mosqueira et al., 2013a, Burns et al., 2015, Burns e O'Hororan, 2016).

Atualmente, as terapias existentes para a DMD incluem o uso de corticosteróides, ventilação artificial, cirurgias ortopédicas e fisioterapia. Os corticosteróides mais utilizados são prednisona/prednisolona e deflazacort. Estudos clínicos demonstraram que pacientes tratados com estes fármacos apresentaram melhora na função muscular, ambulação, e função cardíaca e respiratória (Bonifati et al., 2000; Escobar et al., 2011; Moxley et al., 2010). No entanto, eles também têm efeitos adversos importantes, como alterações do peso corporal, fraturas vertebrais, hipertensão, imunossupressão e problemas gastrointestinais (Beytía et al., 2012).

Considerando então que não está claramente demonstrado que a redução na transmissão colinérgica contribui efetivamente para fraqueza muscular na DMD, no presente estudo, nós hipotetizamos que as alterações colinérgicas da transmissão neuromuscular no JNM participam ativamente da progressão da DMD e que fármacos conhecidos por potencializar a neurotransmissão

no JNM, como a PIR, podem melhorar a função muscular respiratória *in vivo* em camundongos mdx. Para verificar esta hipótese, avaliamos se o tratamento com PIR melhoraria a função muscular respiratória *in vivo e in vitro* devido à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de ACh na placa motora. Além disso, a PIR possui ação anti-inflamatória (Rocha et al., 2016; De Cuba et al., 2014) e efeito antifibrótico (Liu et al., 2015), o que poderia contribuir para prevenir ou reduzir a degeneração do diafragma e conseqüentemente, melhorar a força muscular em camundongos mdx. Adicionalmente, avaliamos também a PIR em lipossomas, a fim de fornecer a inibição da AChE por tempo prolongado em dose única diária.

O presente estudo foi baseado na hipótese que as alterações da transmissão na JNM podem contribuir para a progressão da DMD. Para verificar esta hipótese, nós avaliamos se o tratamento com PIR melhoraria a função muscular respiratória *in vivo e in vitro* em camundongos mdx, devido à sua capacidade em aumentar a disponibilidade de ACh na placa motora e conseqüentemente a força de contração muscular. Além disso, avaliamos para futuras aplicações clínicas, a eficácia da PIR encapsulada em lipossomas no mesmo modelo.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL10 (C57BL/10ScSnJ) e mdx (C57BL/10ScSnDmdmdx/J). Os camundongos foram fornecidos pelo biotério IGMM CNRS UMR5535 (Montpellier, França) e mantidos no biotério do laboratório INSERM 1064 (Montpellier, França) durante todo o período experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas e alojados em temperatura ambiente, com acesso *ad libitum* à ração e água, em ambiente com ciclos claro e escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais francesas (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Languedoc-Roussillon, n° CEEA-LR-12078).

2.2 Avaliação da função respiratória *in vivo*

A função respiratória dos camundongos foi avaliada por pletismografia de corpo inteiro. Para isso foi utilizado pletismógrafo constituído de quatro câmeras individuais (EMKA, Technologies, Paris, França) que permite avaliar a função pulmonar em camundongos conscientes e em livre movimentação (Figura 3.2). Os animais foram colocados aleatoriamente nas câmaras e as alterações do volume de ar correspondentes à respiração espontânea foram obtidas usando um transdutor de pressão. Este sinal de pressão foi utilizado para calcular os parâmetros ventilatórios, como descrito

por Drorbaugh e Fenn (1955). Para a análise dos dados foi utilizado o software iox2 (EMKA, Technologies, Paris, França). Os parâmetros ventilatórios analisados foram:

- Volume corrente (VC), volume de ar que é inspirado e expirado numa respiração normal;
- Frequência respiratória (FR), respirações por minuto;
- Volume minuto (VM), quantidade total de ar novo que entra nas vias respiratórias a cada minuto. ($V_M = V_T \times FR$)



Figura 3.2: Fotografia do sistema de pletismografia de corpo inteiro (EMKA, Technologies, FR).

2.3 Contratilidade *in vitro* do diafragma

Para o teste de contratilidade *in vitro* foram utilizados camundongos mdx entre 10 a 11 meses de idade no início do experimento. Os animais foram tratados por 30 dias com PIR em lipossomas na dose 5 mg/kg ou com lipossomas vazios. Ao final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e o diafragma removido cirurgicamente, como descrito anteriormente por Matecki e colaboradores (2005).

Resumidamente, o diafragma foi removido juntamente com as costelas e mergulhado em placa de petri contendo solução Krebs (NaCl , KCl , MgSO_4 , KH_2PO_4 , CaCl , NaHCO_3) oxigenada incubada à 28°C. Uma tira transversal do músculo (2 mm de largura) foi retirada, a região costal foi fixada a um suporte de plástico e o tendão foi conectado a um transdutor de força isométrica (Aurora Scientific Instruments, EUA) (Figura 3.3). Para obter a força de contração máxima, a tira foi estimulada em diferentes frequências 20, 30, 50, 60, 80, 100 e 120 Hz, com 2 minutos de intervalo entre cada estimulação. Os valores foram normalizados em relação à área total da tira muscular e expressos em Newton por centímetro quadrado (N/cm^2).

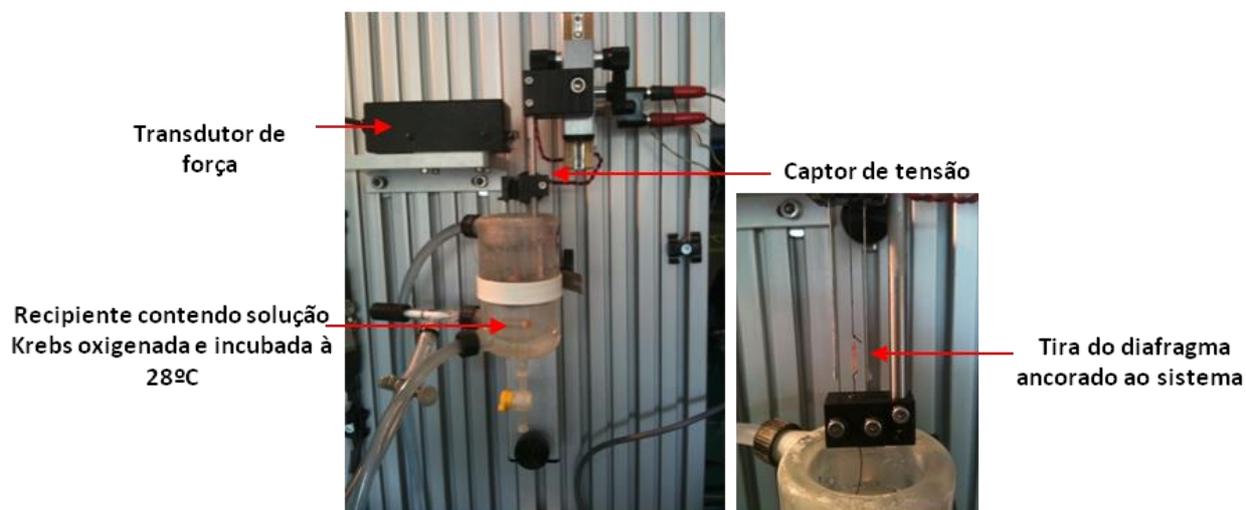


Figura 3.3: Fotografia do sistema de transdução de força isométrica.

2.4 Avaliação da toxicidade da PIR em camundongos mdx.

A toxicidade da PIR na sua forma livre foi avaliada afim de definir a dose a ser utilizada em camundongos mdx. Sintomas característicos de toxicidade do SNA parassimpático como aumento da lacrimação, salivação, defecação e urina, causados pela hiperestimulação parassimpática (Pope et al., 2005) foram observados qualitativamente. Foram utilizados camundongos de 17 meses de idade e seus controles (mdx, n=17 e C57BL10, n=10). Foi observada também a mortalidade para a doses avaliadas. Os camundongos foram tratados com as doses 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg ou 1 mg/kg de PIR livre por via SC. A dose 0,1 mg/kg foi selecionada para a avaliação da função respiratória pois, não apresentou nenhum sinal de toxicidade e mortalidade.

2.5 Protocolos Experimentais

2.5.1 Caracterização da função respiratória dos camundongos mdx

A função respiratória foi avaliada *in vivo* por pletismografia de corpo inteiro em camundongos C57BL10 e mdx com diferentes idades: 6 meses (C57BL10, n=12; mdx, n=10); 17 meses (C57BL10, n=10; mdx, n=17); 22 meses (C57BL10, n=3; mdx, n=3).

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de quatro e colocados nas câmeras para ambientação. Após 1 hora, com os animais em repouso, os parâmetros ventilatórios basais foram registrados em fluxo de ar ambiente. Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia com fluxo de ar contendo 8% CO₂, e novamente, o registro foi realizado nos animais em repouso. A duração de cada registro foi de aproximadamente 15 minutos.

2.5.1 Avaliação do efeito da PIR livre e PIR lipossomal sobre os parâmetros respiratórios de camundongos mdx após dose única

Camundongos C57BL10 e mdx com 17 meses de idade foram tratados com: A) PIR livre (0,1 mg/kg); B) PIR em lipossomas (1 mg/kg); C) PIR em lipossomas (5 mg/kg). A função respiratória foi avaliada por pletismografia, conforme protocolo descrito no item 2.5.1.

2.5.2 Avaliação do efeito PIR lipossomal sobre os parâmetros respiratórios e contratilidade do diafragma de camundongos mdx após doses repetidas

Camundongos mdx com 10 meses de idade foram tratados por 30 dias com PIR em lipossomas na dose 5 mg/kg ou lipossomas vazios. A função respiratória *in vivo* foi avaliada antes (basal) e após o tratamento nos tempos 2, 6, e 24 horas após a primeira dose, e no 15º e 30º dias por pletismografia, conforme protocolo descrito no item 2.5.1. Ao final, os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical, o diafragma foi removido e a contratilidade mensurada *in vitro*, como descrito no item 2.3.

2.6 Análises estatísticas

Para a análise estatística foi utilizando o *software GraphPad Prism 5.0*. Os dados obtidos na pletismografia foram avaliados pelos testes One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni ou Teste *t student* pareado, e para a contratilidade do diafragma foi utilizado análise de variância (Two-way ANOVA) e pós-teste Bonferroni. Foi adotado intervalo de confiança de 95%, sendo as diferenças consideradas significativas quando o valor P for menor que 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da função respiratória dos camundongos mdx

A influência da idade nos parâmetros da função respiratória foi avaliada em camundongos C57BL10 e mdx em condições normais (ar ambiente) e de hipercapnia (8% de CO₂) (Figura 3.4). Os experimentos foram realizados em animais adultos (6 meses de idade) e idosos (17 e 22 meses de idade).

Nos camundongos de 6 meses de idade não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros ventilatórios basais, VC ($0,23 \pm 0,01$ vs. $0,2 \pm 0,02$ μ l), VM ($30,3 \pm 2,5$ vs. $39,3 \pm 2,4$ ml/min) e FR (137 ± 4 vs. 159 ± 5 bpm) entre camundongos mdx e C57BL10, respectivamente. Durante a condição de hipercapnia também não foram observadas diferenças entre os grupos. Em ambos os grupos, houve aumento significativo de VC ($0,41 \pm 0,03$ vs. $0,39 \pm 0,02$ μ l), VM ($126,1 \pm 10,4$ vs. $112,3 \pm 9,8$ ml/min), e FR (302 ± 6 vs. 298 ± 13 bpm) em comparação aos valores obtidos durante o fluxo de ar ambiente.

Nos camundongos mdx de 17 meses, em condições de normocapnia, houve redução do VC ($0,24 \pm 0,01$ vs. $0,35 \pm 0,03$ μ l) e aumento de FR (178 ± 6 vs. 148 ± 8 bpm), em relação aos camundongos C57BL10 de mesma idade (Figura 3.4). Durante a hipercapnia, houve redução significativa do VC ($0,46 \pm 0,03$ vs. $0,63 \pm 0,03$ μ l), VM ($131,9 \pm 7,6$ vs. $172,9 \pm 10,6$ ml/min), e FR (259 ± 3 vs. 276 ± 7 bpm) em relação aos camundongos C57BL10 de 17 meses (Figura 4).

Os camundongos de 22 meses de idade apresentaram redução de VC em condições de normocapnia ($0,24 \pm 0,03$ vs. $0,42 \pm 0,03$ μ l) e hipercapnia ($0,38 \pm 0,02$ vs. $0,58 \pm 0,07$ μ l), e redução de VM ($102,2 \pm 7,7$ vs. $156,8 \pm 15,1$ ml/min) apenas sob hipercapnia em relação ao C57BL10 de mesma idade. Não foram observadas alterações no FR em relação ao C57BL10 de 22 meses.

Assim, esses primeiros resultados mostram a presença de alterações na função respiratória dependentes da idade, caracterizada por redução do VC sob normocapnia e hipercapnia, e MV apenas sob hipercapnia em mdx de 17 e 22 meses de idade.

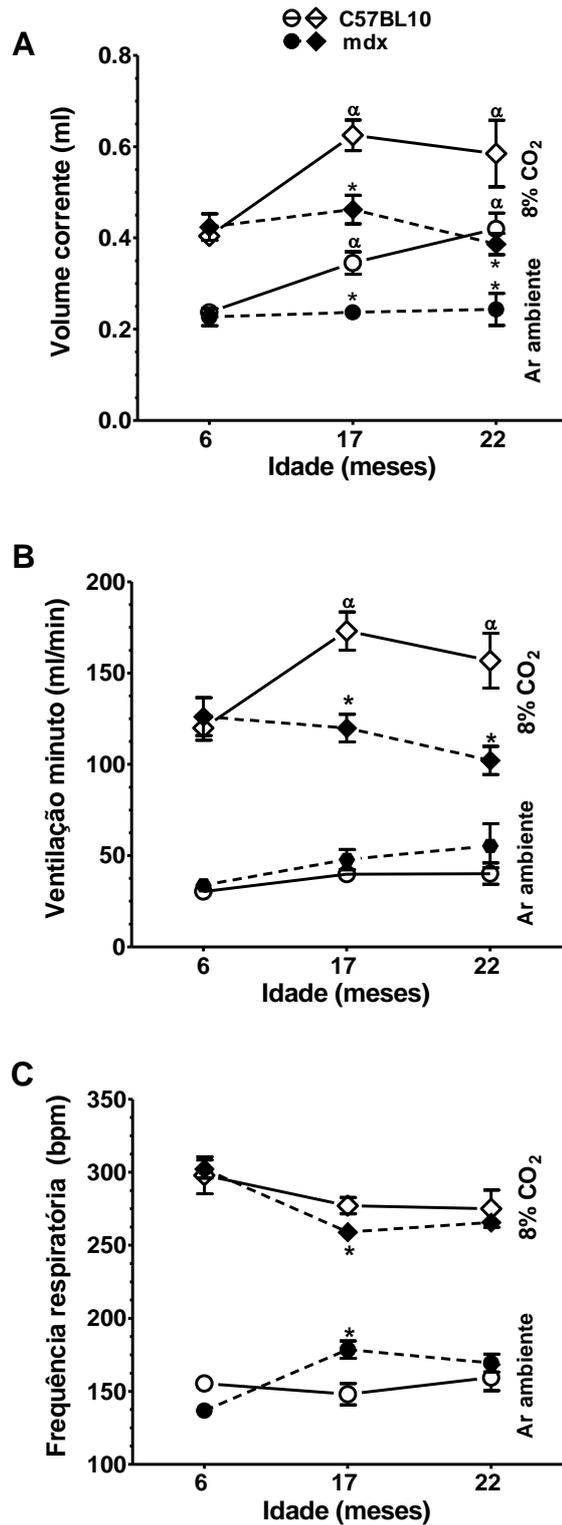


Figura 3.4: Caracterização *in vivo* da função respiratória de camundongos C57BL10 e mdx por pletismografia. C57BL10 6 meses (n=12), C57BL10 17 meses (n=10), C57BL10 22 meses (n=3) mdx 6 meses (n=10), mdx 17 meses (n=17) e mdx 22 meses (n=3). Teste *t student* não pareado. *P<0,05 camundongos C57BL10 comparados aos mdx de mesma idade.

3.4 Determinação da dose não tóxica de PIR a ser utilizada em camundongos mdx

Não foi observado efeitos tóxicos em camundongos C57BL10 de 17 meses de idade tratados com 0,01 mg/kg (n=10), 0,1 mg/kg (n=9) e 1 mg/kg (n=7) de PIR livre. Por outro lado, a PIR livre foi tóxica e letal para camundongos mdx de 17 meses. Dois camundongos morreram após a administração da dose 0,01 mg/kg (n = 10), um camundongo mdx morreu com a dose 0,1 mg/kg (n=9) e todos os camundongos mdx tratados com PIR livre 1 mg/kg (n=6) vieram a óbito. Para esta última dose, foi observado tremor, aumento da salivação e defecação, e sudorese. Considerando estes resultados, selecionamos a dose de 0,1 mg/kg como a dose mais segura para realizar testes *in vivo* com a PIR livre.

Com o objetivo de avaliar se a formulação lipossomal seria capaz de reduzir os efeitos tóxicos da PIR livre, foram avaliadas duas doses de PIR em lipossomas. Primeiramente, a dose 1 mg/kg que na sua forma livre foi letal para camundongos mdx. A PIR em lipossomas (1 mg/kg) não induziu efeitos adversos ou morte nesta dose (n=6). Posteriormente, uma dose mais elevada de PIR em lipossomas foi testada, a dose 5 mg/kg. Esta também não induziu quaisquer efeitos adversos ou morte (n=5) nos camundongos mdx ou C57BL10.

3.5 Efeito do tratamento em dose única com PIR livre e PIR lipossomal sobre os parâmetros respiratórios de camundongos mdx

Nos camundongos mdx de 17 meses nenhuma alteração foi observada após o tratamento com PIR livre 0,1 mg/kg em dose única (Figura 3.5), em condições normais ou de hipercapnia.

Considerando que a PIR livre é hidrolisada rapidamente e que a dose de 1 mg/kg foi tóxica para camundongos mdx, foi avaliado o efeito da PIR em lipossomas em dose única 1 mg/kg. A PIR em lipossomas não alterou nenhum parâmetro respiratório durante o fluxo de ar ambiente ou durante a hipercapnia, pois os parâmetros avaliados se mostraram iguais antes e após o tratamento (Figura 3.5).

Nos camundongos mdx de 17 meses tratados com 5 mg/kg de PIR em lipossomas, também não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 3.6).

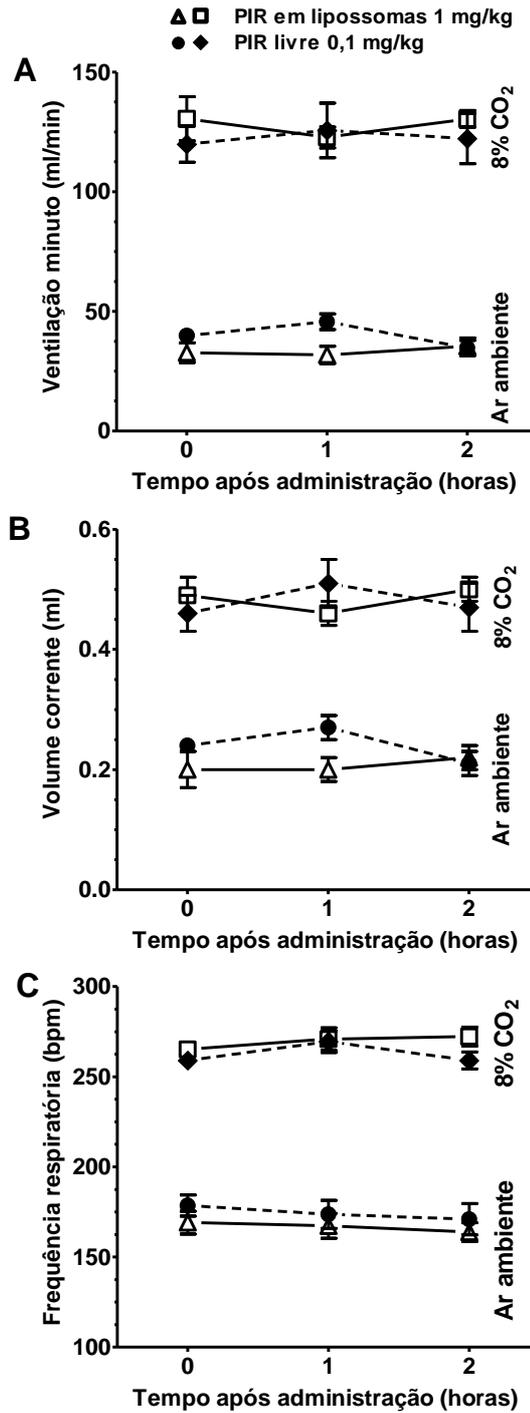


Figura 3.5: Parâmetros respiratórios em resposta ao ar ambiente e 8% CO₂ em camundongos C57BL10 e mdx tratados com PIR livre e em lipossomas por via SC. Test *t student* pareado. **p*<0,05: Camundongos mdx após tratamento comparado ao basal para os mesmos animais.

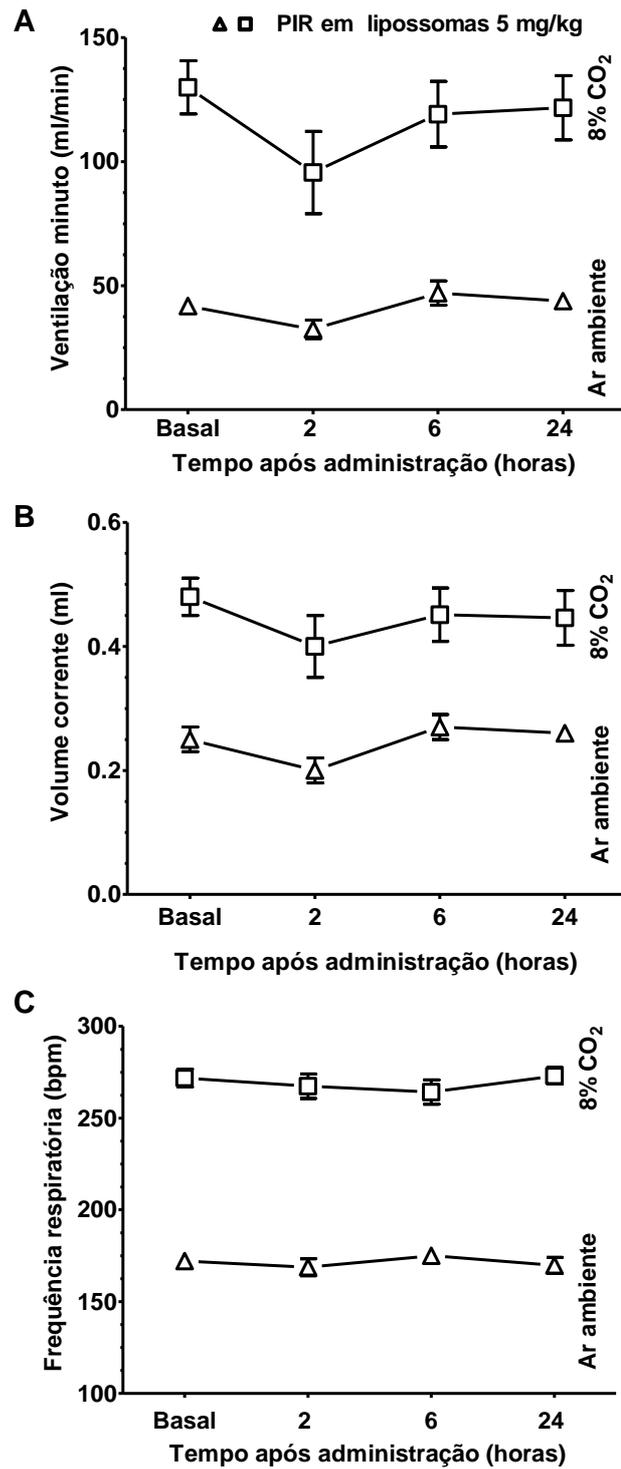


Figura 3.6: Parâmetros respiratórios em resposta ao ar ambiente e 8% CO₂ em camundongos mdx de 17 meses de idade tratados com PIR em lipossomas 5 mg/kg por via SC. Teste *t student* pareado.

3.6 Efeito do tratamento em doses repetidas com PIR em lipossomas multilamelares sobre os parâmetros respiratórios em camundongos mdx

Camundongos mdx de 10 meses de idade foram tratados por 30 dias com PIR em lipossomas na dose 5 mg/kg. Nenhuma alteração dos parâmetros respiratórios avaliados em relação aos valores basais foi observada após o tratamento, observado nos tempos 2, 6 e 24 horas após a primeira dose, no 15º e 30º dias após x horas da administração das formulações (Figura 3.7).

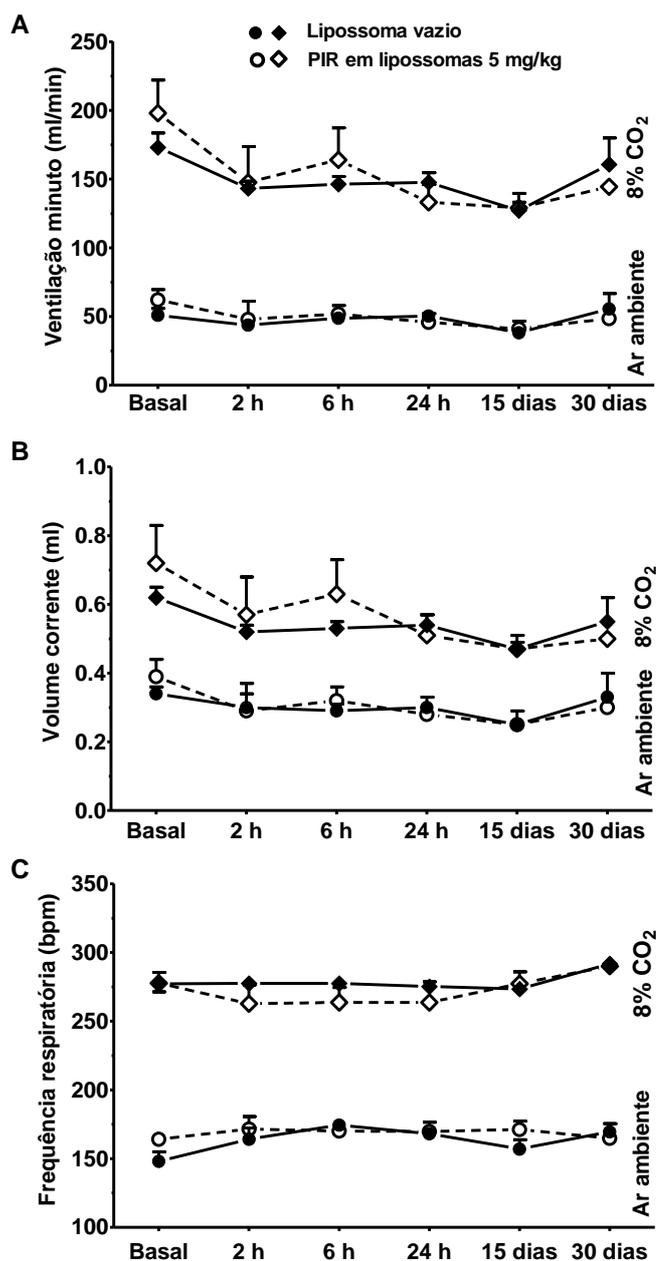


Figura 3.7: Parâmetros respiratórios em resposta ao ar ambiente e 8% CO₂ em camundongos tratados por 30 dias com PIR em lipossomas 5 mg/kg por via SC. Teste *t student* pareado entre mdx 10 meses basal e mdx 10 meses tratado.

3.6.1 Efeito tratamento em doses repetidas da PIR em lipossomas sobre a contratilidade do diafragma

Camundongos mdx de 10 meses de idade tratados por 30 dias com PIR em lipossomas na dose 5 mg/kg não apresentaram nenhuma alteração na força de contração em relação aos valores basais após estímulo em frequências crescentes. Também não foi observado alterações no grupo tratado com lipossoma vazio (Figura 3.8).

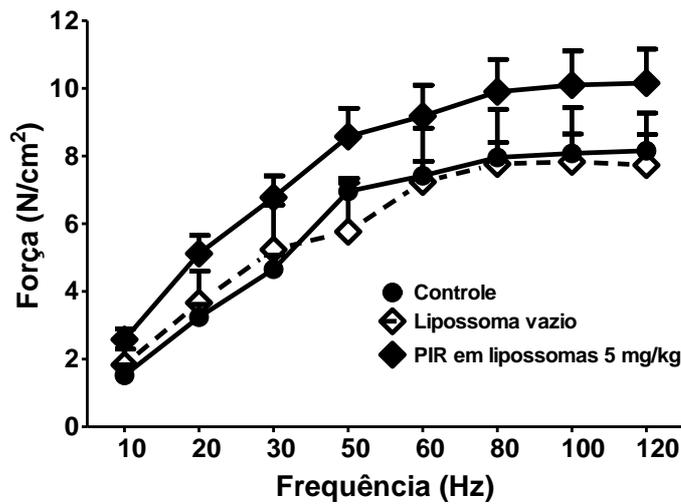


Figura 3.8: Efeito do tratamento com PIR em lipossomas (5 mg/kg, SC) em doses repetidas sobre a força de contração do diafragma de camundongos mdx com 10 meses de idade. Two-way ANOVA, Pós-teste de Bonferroni.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a administração SC de PIR não teve nenhum efeito sobre o sistema respiratório e a função contrátil do diafragma em camundongos mdx.

Em relação a influência da idade sobre a função respiratória *in vivo*, observamos que camundongos mdx com 6 meses de idade apresentam função respiratória normal. Nesta idade, o diafragma apresenta um grau expressivo de degeneração e perda da função contrátil (Steldman et al., 1991), no entanto, os músculos respiratórios acessórios, como os músculos intercostais, não estão tão afetados, o que ameniza a disfunção do diafragma, impedindo um maior comprometimento da função ventilatória (Gayraud et al., 2007). Por outro lado, com a progressão da doença, que afeta todos os músculos, incluindo os músculos intercostais, camundongos mdx mais velhos (17 e 22 meses de idade) apresentaram alterações na função ventilatória, caracterizada por redução do VC sob normocapnia e hipercapnia, e MV apenas sob hipercapnia em ambos os mdx de 17 e 22 meses de idade.

Sob condições de normocapnia, para evitar uma diminuição de VM e assim manter a homeostase do dióxido de carbono no sangue, camundongos mdx de 17 meses de idade aumentam a FR para compensar a baixa VC devido ao comprometimento da função contrátil dos músculos respiratórios (Gayraud et al., 2007). Este padrão de respiração especial, denominado respiração superficial rápida, tem sido claramente observado no paciente com DMD, devido ao aumento da carga elástica do sistema respiratório associada à presença de fraqueza muscular respiratória (Misuri et al., 2000). Curiosamente, com a progressão da doença, este mecanismo compensatório não é mais eficiente, camundongos mdx de 22 meses de idade que apresentaram o mesmo nível de FR em relação aos camundongos controle C57BL10. Sob condições de hipercapnia, esses mecanismo compensatório de aumento da FR também não foi observado nos camundongos mdx de 17 meses.

A resposta à hipercapnia é resultado da força muscular dos músculos respiratórios e da sensibilidade dos quimiorreceptores respiratórios às variações de pressão de CO₂ e O₂. Nos camundongos mdx, os quimiorreceptores periféricos localizados no corpo carotídeo têm menor sensibilidade ao aumento da pressão de O₂ (Mosqueira et al., 2013a), o que contribui, pelo menos parcialmente, para as alterações respiratórias observadas em camundongos mdx. No entanto, considerando que o corpo carotídeo não é o principal responsável pela resposta ventilatória ao dióxido de carbono (Pan, 1995; Bernards, 1966; Coles, 2002; Gautier, 1979; Dejourns, 1963) e camundongos mdx de 6 meses de idade apresentaram resposta ventilatória similar ao C57BL10 de mesma idade, poderíamos considerar que a diferença na resposta ventilatória observada foi principalmente devido à progressão da degeneração muscular.

No presente estudo, nós hipotetizamos que as alterações da transmissão neuromuscular na JNM podem contribuir parcialmente para a progressão da DMD. De fato, a distrofina é importante para a maturação e estabilização dos receptores nicotínicos no músculo (Kong et al., 1999; Grady et al., 2000; Jacobson et al., 2001). Nos músculos distróficos, os receptores nicotínicos têm uma densidade reduzida na membrana pós-sináptica (Nagel et al., 1990), taxas de degradação aumentadas (Xu et al., 1997), e regulação positiva na membrana extrajuncional (Ghedini et al., 2008). Além disso, camundongos mdx apresentam disfunção na transmissão neuromuscular, caracterizada por redução da amplitude de MEPP, indicando uma perda da sensibilidade pós-sináptica para ACh (Nagel et al., 1990, Pijl et al., 2016). Esta redução na amplitude de MEPP é acompanhada por aumento da liberação de ACh pré-sináptica, provavelmente como efeito compensatório (Carlson et al., 2001). Esse aumento compensatório homeostático na liberação de ACh também ocorre na myasthenia gravis, onde anticorpos reduzem os receptores nicotínicos na placa motora (Plomp et al., 1995).

Assim, primeiramente, avaliamos se o tratamento com PIR livre poderia melhorar a função respiratória e a força contrátil diafragma dos camundongos mdx, devido à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de ACh na placa motora muscular. No entanto, o efeito da PIR livre 0,1 mg/kg na função respiratória de camundongos mdx de 17 meses, avaliado por pletismografia de corpo inteiro, foi negativo. Não observamos nenhuma modificação de MV, VC e FR, tanto em condições de normocapnia, quanto de hipercapnia.

Por outro lado, a dose PIR livre 1 mg/kg foi tóxica e os animais morreram após a administração subcutânea do fármaco. A mesma dose não foi tóxica para camundongos C57BL10. Assim, esta observação indica fortemente que camundongos mdx são mais sensíveis à sobrecarga ACh do que os C57BL10. A morte provavelmente deveu-se à superestimulação dos receptores muscarínicos. No trato respiratório, ACh modula o tônus broncomotor e a secreção de muco pelas glândulas submucosas nas vias aéreas (Colebatch et al., 1963; Baker et al., 1985). Assim, as possíveis causas da morte de camundongos mdx podem ter sido broncoconstrição e/ou aumento da secreção de muco (Taylor et al., 2001), o que pode agravar a disfunção respiratória já presente em camundongos mdx. No entanto, não são conhecidas quaisquer alterações na morfologia ou função dos receptores muscarínicos nas vias aéreas de camundongos mdx.

Com o objetivo de avaliar se a formulação lipossomal de PIR seria capaz de reduzir os efeitos colaterais da PIR livre, testamos o efeito da formulação lipossomal PIR na dose 1 mg/kg em mdx de 17 meses de idade. Nenhum efeito colateral foi observado nos camundongos mdx tratados com esta dose. No entanto, a PIR lipossomal não teve nenhum efeito benéfico na função respiratória dos camundongos mdx.

Finalmente, para avaliar se o aumento crônico de ACh endógena na JNM poderia apresentar um melhor efeito sobre a função muscular em comparação com a dose única, camundongos mdx de 10 meses de idade foram tratados com PIR lipossomal 5 mg/kg ou com lipossomas vazios durante 30 dias. Entretanto, nenhum dos parâmetros ventilatórios foram afetados no 1º, 15º ou 30º dia de tratamento com PIR em comparação com valores basais. No final do protocolo, a contratilidade do diafragma foi avaliada *in vitro* e nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

Juntos, esses resultados mostraram que o aumento das concentrações de ACh não foi suficiente para melhorar a função muscular respiratória. Camundongos mdx com idade superior a 10 meses apresentam diafragma com extensa mionecrose com áreas de infiltrado inflamatório, que progressivamente vai sendo substituída por tecido fibroso (Steldman et al., 1991; Gosselin et al., 2003; Gayraud et al., 2007). Logo, o aumento das concentrações de ACh e conseqüentemente, aumento da força de contração, seja insuficiente para melhorar a função muscular devido ao grau avançado de degeneração muscular.

Por outro lado, embora não tenha sido observado nenhum benefício na função respiratória, a ausência total de efeitos adversos observados qualitativamente e nenhuma morte, mesmo após dose PIR em lipossomas 5 mg/kg, indicam que a encapsulação de PIR em lipossomas foi eficaz em reduzir os efeitos tóxicos deste fármaco. A PIR lipossomal é mais segura do que a PIR livre porque a PIR encapsulada em lipossomas é liberada gradualmente e de forma sustentável na corrente sangüínea, reduzindo os efeitos adversos.

Apesar do resultado da contratilidade do diafragma não ser positivo, o efeito da PIR na inflamação muscular deve ser avaliado em estudo futuro. Estudo recente demonstrou que a ativação de receptores nicotínicos de ACh pode reduzir a inflamação de células musculares em camundongos mdx (Leite et al., 2010; Leite et al., 2014). Além do seu efeito excitatório no músculo esquelético, ACh liberada a partir das terminações sinápticas vagais inibe a secreção de TNF- α , IL-1 β e uma série de outros mediadores inflamatórios por macrófagos (Tracey, 2002). A ação anti-inflamatória da PIR foi demonstrada em outras espécies, como em ratos submetidos a doença cardíaca isquêmica, quando o aumento da modulação colinérgica por PIR induziu o recrutamento de células antiinflamatórias (Rocha et al., 2016).

Em resumo, podemos concluir que a PIR livre (1 mg/kg) foi tóxica para camundongos mdx, ao contrário da PIR em lipossomas, que não mostrou nenhum efeito relacionado ao acúmulo de ACh, confirmando que o encapsulamento em lipossomas é eficaz na redução dos efeitos tóxicos deste fármaco. O tratamento com PIR em lipossomas, em dose única ou múltiplas doses, não mostrou nenhum efeito benéfico na função respiratória desse modelo experimental de DMD.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho foi realizado para dar continuidade à avaliação da formulação de PIR em lipossomas para a administração SC. A mesma formulação foi desenvolvida e caracterizada em trabalho anterior de nosso laboratório (Souza et al., 2013) com o objetivo inicial de melhorar a potencial atividade cardioprotetora da PIR, o que foi avaliado pela capacidade em reduzir o prolongamento do intervalo QT do ECG induzido por noradrenalina em ratos quando administrado por via IV como lipossomas unilamelares (Vidal et al., 2010) e por via SC em duas formulações de lipossomas multilamelares (Souza et al., 2013). Assim, foram apresentados aqui os resultados da mesma formulação de lipossomas multilamelares de PIR para administração SC com características físico-químicas equivalentes aquela já validada, e adicionalmente foi realizada avaliação da estabilidade da formulação quando armazenada a 4 °C por 5 dias, fator importante para a avaliação de uma potencial produção futura para o uso clínico.

Outra realização do presente trabalho foi a avaliação da inibição da atividade da AChE em camundongos, esta análise foi essencial para verificar se a encapsulação em lipossomas, de fato, prolonga a atividade inibitória da PIR sobre a AChE. Esta atividade foi questionada, por exemplo, quando a formulação não produziu efeito na função respiratória e contratilidade do diafragma nos camundongos mdx. No entanto, esta de fato existe e demonstra que todos os efeitos observados se devem realmente à PIR liberada a partir dos lipossomas.

Mais especificamente, para a avaliação da PIR no modelo mdx de DMD, o presente trabalho foi capaz de deixar sua contribuição quanto à melhor caracterização temporal, relativo às idades dos camundongos avaliados, quanto aos parâmetros respiratórios avaliados por pletismografia *in vivo* e as diferenças comparadas ao camundongo sem a presença de DMD, o camundongo C57BL10. Nossa hipótese inicial de que o maior acúmulo de ACh poderia contribuir para melhoria da função respiratória dos mdx ou mesmo impedir a progressão da doença não foi demonstrada, mas acreditamos que novos protocolos e modelos devem ser avaliados, pois a hipótese ainda não foi descartada. No entanto, ficou claramente demonstrado que os mdx apresentam grande sensibilidade ao acúmulo de ACh, pois a administração de PIR livre levou rapidamente ao óbito em doses que não o fazem em roedores saudáveis. Foi demonstrado ainda que a PIR em lipossomas, provavelmente por sua liberação controlada e mais lenta, mesmo em doses altas, não produziu os efeitos característicos da estimulação aumentada de receptores muscarínicos, responsáveis por grande parcela dos efeitos colaterais dos inibidores de AChE. Se considerarmos este achado em conjunto com os dados já obtidos de cardioproteção, podemos supor ainda que provavelmente a PIR em lipossomas terá este efeito na DMD, o que seria de grande valor, visto que a DMD tem como característica de seu desenvolvimento a insuficiência cardíaca.

Prosseguindo o estudo de avaliação da formulação de PIR em lipossomas, foi realizado estudo de sua toxicidade assim como dos lipossomas sem o fármaco, já que a sua composição em lipídeos poderia não ser totalmente inerte ou desprovida de efeitos. Assim, partindo do pressuposto que a dose utilizada com benefícios será a de 10 mg/kg de PIR em lipossomas, avaliamos os efeitos desta dose, de seu dobro (20 mg/kg) e o dobro desta (40 mg/kg) comparadas à dose de 1 mg/kg de PIR livre, dose eficaz na cardioproteção (Souza, 2013b) e isenta de efeitos adversos. No conjunto de dados obtidos nas avaliações de comportamento e das toxicidades hematológica, renal e hepática, estas duas avaliadas por parâmetros bioquímicos, podemos afirmar que a formulação de PIR em lipossomas apresenta ótima segurança terapêutica.

Todos os resultados até o momento obtidos nos encorajam a continuar com o estudo e afirmar que PIR em lipossomas deve ser levada a estudos clínicos.

CONCLUSÕES

- A formulação de PIR em lipossomas multilamelares (DOPC: CHOL) quando administrada SC libera lentamente a PIR para a circulação sanguínea prolongando seu efeito sobre a inibição de AChE e reduzindo seus efeitos colaterais.
- A PIR em sua forma livre ou encapsulada em lipossomas não foi capaz de melhorar a função respiratória de camundongos mdx.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLAH L, Evans JE, Bishop A, Reed JM, Crynen G, Phillips J, Pelot R, Mullan MA, Ferro A, Mullan CM, Mullan MJ, Ait-Ghezala G, Crawford FC. Lipidomic profiling of phosphocholine-containing brain lipids in mice with sensorimotor deficits and anxiety-like features after exposure to Gulf War agents. *Neuromolecular Med*, 14(4):349-61, 2012.
2. ABOU-DONIA MB, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Abdel-Rahman A, Bullman SL, Khan WA. Co-exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and/or permethrin causes sensorimotor deficit and alterations in brain acetylcholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav*, 77(2): 253-62, 2004.
3. ADLER M, Deshpande SS, Foster RE, Maxwell DM, Albuquerque EX. Effects of subacute pyridostigmine administration on mammalian skeletal muscle function. *J Appl Toxicol*, 12:25-33, 1992.
4. ALBUQUERQUE EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 89 (1): 73-120, 2009.
5. AMOURETTE C, Lamproglou I, Barbier L, Fauquette W, Zoppe A, Viret R. Gulf War illness: Effects of repeated stress and pyridostigmine treatment on blood–brain barrier permeability and cholinesterase activity in rat brain. *Behav Brain Res*, 203:207-214, 2009.
6. ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.
7. AQUILONIUS SM, Eckernäs SA, Hartvig P, Lindström B, Osterman PO. Pharmacokinetics and oral bioavailability of pyridostigmine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 18:(5):423–428, 1980.
8. BAKER B, Peatfield AC, Richardson PS. Nervous control of mucin secretion into human bronchi. *J Physiol*, 365: 297–305, 1985.
9. BANGHAM AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellar of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 13:.238-25, 1965.
10. BATISTA CM, Moraes C, Carvalho B De, Santos NS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm*, 43:167-179, 2007.
11. BEEKMAN R, Kuks JB, Oosterhuis HJ. Myasthenia gravis: diagnosis and follow-up of 100 consecutive patients. *J Neurol*, 244 (2): 112-8, 1997.
12. BEHLING A, Moraes RS, Rohde LE, et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J*, 146:494-500, 2003.

13. BELOVA I, Jonsson G Blood-brain barrier permeability and immobilization stress. *Acta Physiol Scand*, 116(1):21-9, 1982.
14. BERNARDS JA, Dejours P, Lacaille MA. Ventilatory effects in man of breathing successively CO₂-free CO₂-enriched and CO₂-free gas mixtures with low, normal or high oxygen concentration. *Respir Physiol*, 1: 390-397, 1966.
15. BERNATOVA I, Dubovicky M, Price WA, Grubbs RD, Lucot JB, Morris M. Effect of chronic pyridostigmine bromide treatment on cardiovascular and behavioral parameters in mice. *Pharmacology, Pharmacol Biochem Behav*, 74:901-907, 2003.
16. BEYTÍA MA, Vry J, Kirschner J. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myol*. 31 (1): 4–8, 2012
17. BIGONIYA P, Singh AK, Bigoniya D, Gopalan N. Pyridostigmine Bromide and Potassium Iodate: Subacute Oral Toxicity and Stability. *J Drug Metab Toxicol*, 4:145, 2013.
18. BIRTLEY RD, Roberts JB, Thomas BH, and Wilson A. Excretion and metabolism of ¹⁴C-pyridostigmine in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 26, 393–402, 1966.
19. BONIFATI DM, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, Lanzi G, Angelini C. A multicenter double-blind randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 23: 1344–1347. 2000.
20. BRODDE OE1, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol*, 96(6):528-38, 2001.
21. BURNS DP, Edge D, O'Malley D, O'Halloran KD, Malley DO, Halloran KDO. Respiratory control in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Adv Exp Med Biol* 860: 239–244, 2015.
22. BURNS DP, O'Halloran KD. Evidence of hypoxic tolerance in weak upper airway muscle from young mdx mice. *Respir Physiol Neurobiol*, 226: 6875, 2016.
23. BUSHBY K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 9:77-93. 2010.
24. CARLSON CG, Roshek D. Adult dystrophic (mdx) endplates exhibit reduced quantal size and enhanced quantal variation. *Euro J Physiol*, 442 (3): 369-375, 2001.
25. CASTRO RAO, Silva-barcellos NM, Licio CSA, et al. Association of Liposome-Encapsulated Trivalent Antimonial with Ascorbic Acid : An Effective and Safe Strategy in the Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 9(8): e104055, 2014.

26. CASTRO RR, Porphirio G, Serra SM, Nobrega AC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects against exercise induced myocardial ischaemia. *Heart*, 90:1119-1123, 2004.
27. CASTRO RR, Serra SM, Porphirio G, et al. Pyridostigmine reduces QTc interval during recovery from maximal exercise in ischemic heart disease. *Int J Cardiol*, 107:138-139, 2006.
28. CAULFIELD M, Birdsall N. International Union of Pharmacology XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev*, 50(2):279-290, 1998.
29. CHESS-WILLIAMS R. Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol*. 22(3): 133-45, 2002.
30. CIAFALONI E, Fox DJ, Pandya S, et al. Delayed diagnosis in Duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr*, 155:380-385. 2009.
31. COIRAULT C, Pignol B, Cooper RN, Butler-Browne G, Chabrier P-E, Lecarpentier Y. Severe muscle dysfunction precedes collagen tissue proliferation in mdx mouse diaphragm. *J Appl Physiol*. 94:1744-1750, 2003.
32. COLEBATCH HJH, Halmagyi DFJ. Effect of vagotomy and vagal stimulation on lung mechanics and circulation. *J Appl Physiol*, 18: 881-887, 1963.
33. COLES SK, Miller R, Huela J, Wolken P, Schlenker E. Frequency responses to hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated conscious rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 130: 113-120, 2002.
34. COOK JE, Kolka MA, Wenger CB. Chronic pyridostigmine bromide administration: side effects among soldiers working in a desert environment. *Mil Med*, 157:250. 1992.
35. DANI JA. Overview of Nicotinic Receptors and Their Roles in the Central Nervous System. *Biol Psychiatry*, 49:166-174, 2001.
36. DE CUBA MB, Ribeiro-Machado MP, Farnesi TS, et al. Effects of cholinergic stimulation with pyridostigmine bromide on chronic chagasic cardiomyopathic mice. *Mediators Inflamm*. 2014:475946, 2014.
37. DE LA FUENTE R, Rodrigues B, MORAES-SILVA I, et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. *Clin Exp Phar Physiol*, p. 1440-1681, 2013.
38. DEACON, R.M. Measuring Motor Coordination in Mice. *J. Vis. Exp*, 75: e2609, 2013.
39. DEJOURS P. Control of respiration by arterial chemoreceptors. *Ann NY Acad, Sci*. 109: 682-695, 1963.

40. Di ANGELANTONIO S, De Stefano ME, Piccioni A., Lombardi L, Gotti C, Paggi P. Lack of dystrophin functionally affects alpha3beta2/beta4-nicotinic acetylcholine receptors in sympathetic neurons of dystrophic mdx mice. *Neurobiology of disease* 41, 528-537. 2011.
41. DOOLEY J, Gordon KE, Dodds L, MacSween J. Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study. *Clin Pediatr (Phila)*, 49: 177-179. 2010.
42. DRORBAUGH JE, Fenn WO. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16:81-87, 1955.
43. DUNHAM M; Miya T. A note of a simple apparatus detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of American Pharmaceutical Science* 46:208-109, 1957
44. ESCOBAR, DM, Hache, LP, Clemens PR, Cnaa A, McDonald CM, Viswanathan V, Kornberg AJ, Bertorini TE, Nevo Y, Lotze T, et al. Randomized, blinded trial of weekend vs. daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 77: 444-452, 2011.
45. EUROPEAN MEDICINE AGENCY (EMA). Guideline on repeated dose toxicity. 2010 CPMP/SWP/1042/99. 2010. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf. Acesso em: 10 novembro 2017.
46. FINSTERER J, Stöllberger C. The Heart in Human Dystrophinopathies. *Cardiology*, 99:1-19. 2003.
47. FRÉZARD F, Mg BH, Rocha OGF. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quim Nova*, 28(3):511-518, 2005.
48. FRIEDMAN A, Kaufer D, Shemer J, Hendler I, Soreq H, Tur-Kaspa I. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nat Med*, 2(12):1382-5, 1996.
49. GANONG WF, Barman SM, Barrett KE, Brooks HL, Boitano S. *Ganong's review of medical physiology*. 24 ed; 2012. New York.
50. GAUTIER H, Bonora, M. Effects of carotid body denervation on respiratory pattern of awake cats. *J Appl Physiol*, 46: 1127-1131, 1979.
51. GAYRAUD J, Matécki S, Hnia K, Mornet D, Préfaut C, Mercier J, Michel A, and Ramonatxo M. Ventilation during air breathing and in response to hypercapnia in 5 and 16 month old mdx and C57 mice. *J Muscle Res Cell Motil*. 28(1): 29-37. 2007.
52. GEBBERS JO, Lotscher M, Kobel W, Portmann R, Laissue JA. Acute toxicity of pyridostigmine in rats: histological findings. *Arch Toxicol*, 58:271-5, 1986.

53. GHEDINI PC, Avellar MC, De Lima, TC, Lima-Landman MT, Lapa AJ, Souccar C. Quantitative changes of nicotinic receptors in the hippocampus of dystrophin-deficient mice. *Brain research* 1483, 96-104. 2012.
54. GHEDINI PC, Viel TA, Honda L, Avellar MC, Godinho RO, Lima-Landman MT, Lapa AJ, Souccar C. Increased expression of acetylcholine receptors in the diaphragm muscle of mdx mice. *Muscle Nerve*, 2008.
55. GOLD R, Hohlfeld R, Toyka K V. Progress in the treatment of myasthenia gravis. *Ther Adv Neurol Disord*, 1(2): 99-114, 2008.
56. GOSSELIN LE, Barkley JE, Spencer MJ, et al. Ventilatory dysfunction in mdx mice: Impact of tumor necrosis factor alpha deletion. *Muscle Nerve*. 28:336–343. 2003.
57. GRABE-GUIMARÃES A, ALVES LM. Pyridostigmine blunts the increases in myocardial oxygen demand elicited by the stimulation of the central nervous system in anesthetized rats. *Clinical Auton Res*, 9:83-89, 1999.
58. GRADY RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron*, 839 (2), 298-304, 2000.
59. GRAUER E, Alkalai D, Kapon J, Cohen G, Raveh L. Stress does not enable pyridostigmine to inhibit brain cholinesterase after parenteral administration. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1;164(3):301-4, 2000.
60. GREGORIADIS G. Liposome preparation and related techniques. In *Liposome Technology*, v.1,2a Ed., 1993.
61. HALEY RW, Kurt TL, Hom J. Is there a Gulf War Syndrome? Searching for syndromes by factor analysis of symptoms. *JAMA*, Jan 15;277(3): 215-22, 1997.
62. HAMELMANN E, Schwarze J, Takeda K, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*.156:766–775, 1997.
63. HEGAZY N, Demirel M, Yazan Y. Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. *Int J Pharm*, 242: 171–174, 2002.
64. HEURTAULT B, Saulnier P, Pech B, Proust J, Benoit J. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24:4283-4300, 2003.
65. HOFFMAN EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51:919–928. 1987.

66. HOFFMAN EP, Fischbeck K, Brown R, Johnson M, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with duchenne's or becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 26, 318(21): 1363-8, 1988.
67. HOY JB, Cornell JA, Karlix JL, Schmidt CJ, Tebbett IR, van Haaren F. Interactions of pyridostigmine bromide, DEET and permethrin alter locomotor behavior of rats. *Vet Hum Toxicol*, 42:65– 71. 2000.
68. HUKINS CA, Hillman DR. Daytime predictors of sleep hypoventilation in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 166–170, 2000.
69. INOUE M, Mori K, Hayabuchi Y, Tatara K, Kagami S. Autonomic function in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pedia Inter*, 51:1:33–40, 2009.
70. JACOBSON C, Côté PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol*, 152 (3): 435-450, 2001.
71. JONES CK, Byun N, Bubser M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 37: 16–42, 2012.
72. KANT GJ, Bauman RA, Feaster SR, Anderson SM, Saviolakis GA, Garcia GE. The combined effects of pyridostigmine and chronic stress on brain cortical and blood acetylcholinesterase, corticosterone , prolactin and alternation performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 70:209-218, 2001.
73. KAPSA R, Kornberg AJ, Byrne E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol*, 2:299-310, 2003.
74. KARL T, Pabst R, Von Hörsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol*, 55:69-83, 2003.
75. KLUWE WM, Page JG. Pharmacological and toxicological evaluation of orally administered pyridostigmine in dogs. *Tox Scie*, 14:40-53, 1989.
76. KONG J, Anderson JE. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Res*, 839 (2): 298-304, 1999.
77. LALLEMENT G, Foquin A, Baubichon D, Burckhart MF, Carpentier P, Canini F Heat stress, even extreme, does not induce penetration of pyridostigmine into the brain of guinea pigs. *Neurotoxicology*, 19(6):759-66, 1998.
78. LANDRIGAN PJ. Illness in Gulf War veterans. Causes and consequences. *JAMA*, 15;277(3):259-61, 1997.
79. LASIC DD. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol*, 16(7): 307-21, 1998.

80. LEITE EA, Souza CM, Carvalho-júnior ÁD, Cassali GD. Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. *Int J Nanomedicine*, 7: 5259-5269, 2012.
81. LEITE PEC, Lagrota-Candido J, Moraes L, et al. Nicotinic acetylcholine receptor activation reduces skeletal muscle inflammation of mdx mice. *Journal of Neuro*, 227:1-2:44–51, 2010.
82. LEITE PEC, Gandía L, de Pascual R, Nanclares C, Colmena I, Santos WC, Lagrota-Candido J, Quirico-Santos T. Selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR $\alpha 7$) inhibits muscular degeneration in mdx dystrophic mice. *Brain Res*, 1573:27-36, 2014.
83. LENTZ BR, Carpenter T, Alford DR. Spontaneous fusion of phosphatidylcholine small unilamellar vesicles in the fluid phase. *Biochemistry*, 26:5389–97, 1985.
84. LIU JJ, Huang N, Lu Y, Zhao M, Yu XJ, Yang Y, Yang YH, Zang WJ. Improving vagal activity ameliorates cardiac fibrosis induced by angiotensin II: in vivo and in vitro. *Sci. Rep.* 24(5): 17108, 2015.
85. LOPES SCA.; Giuberti CS; Rocha TGR.; Ferreira DS; Leite EA.; Oliveira MC. Liposomes as carriers of anticancer drugs. In: Letícia Rangel. (Org.). *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. 1ed. Rijeka, Croácia: InTech, 1: 85-124, 2013.
86. LYONS PR, Slater CR. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J Neurocytol*, 20:969-981, 1991.
87. MACIEL NR, Reis PG, Kato KC, et al. Reduced cardiovascular alterations of tartar emetic administered in long-circulating liposomes in rats. *Toxicol Lett*, 199(3): 234-238, 2010.
88. MAGGI L, Mantegazza R. Treatment of myasthenia gravis: Focus on pyridostigmine. *Clin Drug Investig*, 31(10): 691-701, 2011.
89. MAH JK, Korngut L, Dykeman J, Da. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 24(6): 482-491, 2014.
90. MARTYN JAJ, Fagerlund JM and Eriksson LI. Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia*. 64 (1): 1–9, 2009.
91. MASSOULIÉ J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallente F. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41:31-91, 1993.
92. MATECKI S, Rivier F, Hugon G, et al. The effect of respiratory muscle training with CO₂ breathing on cellular adaptation of mdx mouse diaphragm. *Neuromuscul Disord.* 15:427–436. 2005.

93. MATSUMURA CY, Taniguti APT, Pertille A, Santo-Neto H, Marques MJ. Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. *Am J Physiol*, 301:6:1344–50, 2011.
94. McGREEVY JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*, 8(3): 195–213, 2015.
95. MEHLER MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Rev* 32(1): 277-307, 2000.
96. MENDELL JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R, et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 333(13): 832-8. 1995.
97. MERZ CNB, Elboudwarej O, Mehta P. The Autonomic Nervous System and Cardiovascular Health and Disease: A Complex Balancing Act. *J Am Coll Cardiol*, 3(5):5-7, 2015.
98. MISURI G, Lanini B, Gigliotti F, Landelli I, Pizzi A, Bertolini MG, Scano, G. Mechanism of CO₂ retention in patients with neuromuscular disease. *Chest*, 117(2):447-453, 2000.
99. MOSER V. Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicol Pathol*, 39:36-45, 2011.
100. MOSQUEIRA M, Baby SM, Lahiri S, Khurana TS. Ventilatory chemosensory drive is blunted in the mdx mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *PLoS One*, 2013a.
101. MOSQUEIRA M.; Zeiger U, Moritz F, Brinkmeier H, Fink RHA. Cardiac and Respiratory Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy and the Role of Second Messengers. *Med Res Rev*, 5:1174-1213, 2013b.
102. MOSQUEIRA MM, Baby SM, Budak M, Bogdanovich S, Willmann G, Lahiri S, Khurana T. Role of hypoxia in muscle function and muscular dystrophy. *FASEB J*. 22 (1224.12), 2008.
103. MOXLEY RT, Pandya S, Ciafaloni E, Fox, DJ, Campbell K. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: Implications for management. *J. Child Neurol*, 25: 1116–1129. 2010
104. NAGEL A, Lehmann-Horn F, Engel AG. Neuromuscular transmission in the mdx mouse. *Muscle Nerve*, 13(8): 742-749, 1990.
105. NAUGHTON CA. Drug-Induced Nephrotoxicity. *Am Fam Physician*, 78:743-750, 2008.
106. NAVARRO V, Senior J. Drug-Related Hepatotoxicity. *new Engl J Med Rev*, 731-739, 2006.
107. NAYAR R, HOPE MJ, CULLIS PR. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochim Biophys Acta*, 986: 200–206, 1989.
108. OLIVER LJ, Chatel JM, Massoulié J, Vigny M, Vallette FM. Molecular forms of acetylcholinesterase in dystrophic (mdx) mouse tissues. *Neuromuscul Disord*, 2: 87-97, 1992.

109. OLSEN C, Colebatch H, Mebel P, Nadel J, Staub N. Motor control of pulmonary airways studied by nerve stimulation. *J Appl Physiol*, 20:202–208, 1965.
110. OUSSOREN C, Storm G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous. *Adv Drug Deliv Rev*, 50(1-2):143-156, 2001.
111. PAN LG, Forster HV, Ohtake PJ, Lowry TF, Korducki MJ, Forster AL. Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing during ventrolateral medullary cooling in goats. *J Appl Physiol*, 79: 1120-1128, 1995.
112. PERSONIUS KE, Sawyer RP. Variability and failure of neurotransmission in the diaphragm of mdx mice. *Neuromuscul Disord.*, 2006.
113. PETROF BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(8): 3710–3714, 1993.
114. PHILLIPS 2nd LH. The epidemiology of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*; 998: 407-12, 2003.
115. PIJL EM, Van Putten M, Niks EH, Verschuuren JJGM, Aartsma-Rus A, Plomp JJ, Maccaferri G. Characterization of neuromuscular synapse function abnormalities in multiple Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Euro J Neurosci*, 43(12): 1623-1635, 2016.
116. PLOMP JJ, Van Kempen GT, De Baets MB, Graus YM, Kuks JB, Molenaar PC. Acetylcholine release in myasthenia gravis: regulation at single end-plate level. *Ann Neurol*. 1995 May;37(5):62. 7-36.
117. POPE C, Karanth S, Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Envir Toxicol Pharm*, v. 19, n. 3, p. 433–46, 2005.
118. PRUT L, Belzung C: The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 463: 3–33, 2003.
119. PUNGA AR, Sawada M, Stalberg EV. Electrophysiological signs and the prevalence of adverse effects of acetylcholinesterase inhibitors in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 37 (3): 300-7, 2008.
120. RAO KV. eChapter 24. Drug-Induced Hematologic Disorders. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey L. editos. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 9 ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2014.
121. RICHTSFELD M, Yasuhara S, Ph D, Fink H, Blobner M, Martyn JAJ. Neuromuscular Function with and without Down- regulation of Acetylcholine Receptors. *Anesthesiology*, 119(2): 412-421, 2013.

122. ROCHA JA, Ribeiro SP, Franca CM, Coelho O, Alves G, Lacchini S, Kallás EG, Irigoyen MC, Consolim-Colombo FM. Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 10(1): R697-R706, 2016.
123. ROWLAND R. N, Woodley JF. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Lipids Lipid Metab.* 1980, 620, 400–409.
124. RUDZIK A; Hester J; Tang A; STaw R; Friis W. *The Benzodiazepines.* New York: Raven Press 285-297,. 1973.
125. SABINO JP, da Silva CA, Giusti H, Glass ML, Salgado HC, Fazan R Jr. Parasympathetic activation by pyridostigmine on chemoreflex sensitivity in heart-failure rats. *Auton Neurosci.*, 2013.
126. SAPRA P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res*, 42:439-462, 2003.
127. SCHERPHOF GL, Dijkstra J, Spanjer HH, Derksen JT, Roerdink FH. Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat Kupffer cells in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 446:368-84.
128. SCHWARTZ PJ, Wolf S. QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* 57 (6), 1074–1077, 1978
129. SERRA SM, Costa RV, De RRT, Xavier SS, Claudio A, Da L. Cholinergic Stimulation Improves Autonomic and Hemodynamic Profile During Dynamic Exercise in Patients With Heart Failure. *J Card Fail* , 15(2):124-129, 2009.
130. SHAPIRA M, Tur-Kaspa I, Bosgraaf L, et al. A transcriptionactivating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Hum Molec Genet*, 9 (9): 1273-8, 2000.
131. SICINSKI P, Geng, Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG. and Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244:1578-1580. 1989.
132. SKEIE GO, Apostolski S, Evoli A, et al. Guidelines for the treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol*, 13 (7): 691-9, 2006.
133. SMITH PEM, Calverley PMA, Edwards RHT. Hypoxemia during sleep in Duchenne muscular dystrophy. *Am Rev Respir Dis*, 137: 884–888, 1988.
134. SMITH PEM, Edwards RH, Calverley PM. Ventilation and breathing pattern during sleep in Duchenne muscular dystrophy. *Chest* 96: 1346–1351, 1989.

135. SOUZA AC, Grabe-guimarães A, Souza J, Botacim WE, Almeida TM, Frézard FJ, Silva Barcellos NM. Development and characterization of multilamellar liposomes containing pyridostigmine. *Pharm Dev Technol*,19(4): 454-9, 2013.
136. SOUZA, ACM. Avaliação da atividade cardioprotetora da piridostigmina veiculada em lipossomas multilamelares administrados por via subcutânea. 87 f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013 b.
137. STEDMAN HH, Sweeney HL, Shrager JB, et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 352:536–539. 1991.
138. STEDMAN, HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Kelly AM. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352 (6335), 536–539, 1991.
139. SZEINBERG A, Tabachnik E, Rashed N, McLaughlin FJ, England S, Bryan CA, Levison H, Cough capacity in patients with muscular dystrophy. *Chest* 94; 1232–1235, 1988.
140. TATEM KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *J. Vis. Exp*, 91: e51785, 2014.
141. TAYLOR P . Anticholinesterase Agents. In: Goodman AG , Gillman IS , Rail TW , Murad F, editors. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10 ed. New York, 2001.
142. TAYLOR P, Brown JH. Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
143. TELANG FW, Ding YS, Volkow ND, Molina PE, Gatley SJ. Pyridostigmine, a carbamate acetylcholinesterase AChE inhibitor and reactivator, is used prophylactically against chemical warfare agents. *Nucl Med Biol*, 26(2):249-50, 1999.
144. TIWARI P, Dwivedi S, Singh MP, Mishra R, Chandy A. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 3(5): 413-420, 2013.
145. TORCHILIN VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev*. 4: 145-160, 2005.
146. TOUSSAINT M, Steens M, Soudon P. Lung function accurately predicts hypercapnia in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Chest*, 131: 368-375, 2007.
147. TRACEY KJ. The inflammatory reflex. *Nature*, 420:19-26. 2002.
148. TURNER R. Screening procedures in pharmacology. New York: Academic Press 99 p. 1972.
149. VAN DEN BERGH PY, Tome FM and Fardeau M. Etiology and pathogenesis of the muscular dystrophies. *Acta Neurol Belg* 95(3): 123-41.1995.

150. VAN HAAREN F, Jongh RDE, Hoy JB, et al. The Effects of Acute and Repeated Pyridostigmine Bromide Administration on Response Acquisition with Immediate and Delayed Reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav*, 62(2): 389-394, 1999.
151. VEMURI S, Rhodes CT Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv*, 70(2):95-111, 1995.
152. VERMA S, Anziska Y, Cracco J. Review of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) for the Pediatricians in the Community. *Clin Pediatr*, 49:1011, 2010.
153. VIDAL AT, Guimarães HN, Paula DCC, Frézard F, Silva-barcellos NM, Grabe-Guimarães A. Prolonged cardioprotective effect of pyridostigmine encapsulated in liposomes. *Life Sci*, 86:17-23, 2010.
154. WALSH RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 83(3):482-504, 1976.
155. WESS J, Eglen RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev*, 6:721-733, 2007.
156. XU R, Salpeter MM. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *The Journal of Neuroscience*, 21:8194-8200. 1997.
157. YAN X, Scherphof LG, Kamps JAAM. Liposome Opsonization. *Journal of Liposome Research*, 15:109–139, 2005.
158. ZYLBERBERG C, Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv*, 23(9): 3319–3329, 2016.

7. ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 055/2014, de 16 de julho de 2014

Ilustríssima Senhora

Professora Doutora Andrea Grabe Guimarães

DEFAR/EF/UFOP

Senhora Pesquisadora,

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo “*Avaliação da toxicidade e efeitos cardioprotetores da piridostigmina veiculada em lipossomas multilamelares em camundongos*”.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do *site* da CEUA.

Atenciosamente,

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/12, intitulado "*Avaliação da toxicidade e efeitos cardioprotetores da piridostigmina veiculada em lipossomas multilamelares em camundongos*", que tem como responsável o/a Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 31/08/2017.

Ouro Preto, 16 de julho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 126/2016, de 4 de agosto de 2016

Ilustríssimo(a) Senhor(a)

Professor(a) Doutor(a) Andrea Grabe Guimarães

CIPHARMA/EF/UFOP

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo nº. **2016/27**, intitulado “**Avaliação da toxicidade geral da piridostigmina encapsulada em lipossomas DOPC em camundongos Swiss**”.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do *site* da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais n.º. **2016/27**, intitulado “**Avaliação da toxicidade geral da piridostigmina encapsulada em lipossomas DOPC em camundongos Swiss**”, que tem como responsável o/a **Prof(a). Dr(a). Andrea Grabe Guimarães**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Camundongos Swiss	168	6 semanas	Fêmea	Biotério - CCA/UFOP
Camundongos Swiss	281	6 semanas	Macho	Biotério - CCA/UFOP

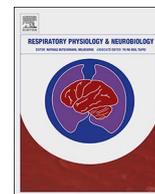
Restrição de dieta: () sim (X) não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 07/08/2017

Ouro Preto, 4 de agosto de 2016.

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP



Effect of pyridostigmine on *in vivo* and *in vitro* respiratory muscle of mdx mice



Gabriela de Cássia Sousa Amancio^a, Andrea Grabe-Guimarães^{a,*}, Dridi Haikel^b, Johan Moreau^b, Neila Marcia Silva Barcellos^a, Alain Lacampagne^b, Stefan Matecki^{b,1}, Olivier Cazorla^b

^a Laboratory of Experimental Pharmacology, CiPharma, Pharmacy School, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^b PHYMEDEXP, INSERM U1046, CNRS UMR9214, Université de Montpellier, CHRU Montpellier, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Pyridostigmine bromide
Duchenne muscular dystrophy
Respiratory function
Pletysmography
Diaphragm contractility
Liposome

ABSTRACT

The current work was conducted to verify the contribution of neuromuscular transmission defects at the neuromuscular junction to Duchenne Muscular Dystrophy disease progression and respiratory dysfunction. We tested pyridostigmine and pyridostigmine encapsulated in liposomes (liposomal PYR), an acetylcholinesterase inhibitor to improve muscular contraction on respiratory muscle function in mdx mice at different ages. We evaluated *in vivo* with the whole-body plethysmography, the ventilatory response to hypercapnia, and measured *in vitro* diaphragm strength in each group. Compared to C57BL10 mice, only 17 and 22 month-old mdx presented blunted ventilatory response, under normocapnia and hypercapnia. Free pyridostigmine (1 mg/kg) was toxic to mdx mice, unlike liposomal PYR, which did not show any side effect, confirming that the encapsulation in liposomes is effective in reducing the toxic effects of this drug. Treatment with liposomal PYR, either acute or chronic, did not show any beneficial effect on respiratory function of this DMD experimental model. The encapsulation in liposomes is effective to abolish toxic effects of drugs.

1. Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a recessive hereditary disorder linked to X chromosome (Hoffman et al., 1987), resulting of the lack of dystrophin (427 kDa) expression in all muscles and neurons (Van Den Bergh et al., 1995; Mehler, 2000). Dystrophin is cytoskeleton protein that limits sarcolemmal mechanical stresses developed during repeated cycles of muscle contraction-relaxation (Petrof et al., 1993). Dystrophin deficiency causes progressive muscle damage resulting in necrosis, fibrosis and muscle strength loss (Hoffman et al., 1988). Consequently, patients present ambulation loss, motor skills and gradually develop cardiac and respiratory failure (McDonald et al., 1995). Respiratory failure is the most common cause of death in DMD patients (Mah et al., 2014). Diaphragm degeneration leads to lung compliance reduction, nocturnal hypoventilation, hypoxemia and hypercapnia (Smith et al., 1988; Smith et al., 1989; Toussaint et al., 2007) progressing to hypoventilation during wakefulness (Hukins and Hillman, 2000). DMD patients also exhibit inefficient cough, which consequently makes them more susceptible to pulmonary infections and airway obstruction (Szeinberg et al., 1988).

Few pharmacological treatments for DMD exist. Glucocorticoids

such as prednesone and deflazacort (Beytía et al., 2012) are the only one, which have some beneficial effects on cardiac and respiratory functions of patients (Eagle et al., 2007; Markham et al., 2008; Moxley et al., 2010). They however have also important adverse effects such as body weight changes, vertebral fractures, hypertension, immunosuppression and gastrointestinal problems (Beytía et al., 2012) that limit considerably their prescription.

Among natural rodent and canine animal models of DMD, the mdx mouse model is the most commonly studied (McGreevy et al., 2015). The diaphragm of mdx mice is the only muscle, which exhibits degeneration pattern, fibrosis and severe dysfunction similar to human patients (Stedman et al., 1991). Signs of diaphragm dysfunction appear early in 6–10 weeks young animals as indexed by a force generation decrease evaluated *in vitro* (Stedman et al., 1991). However, this *in vitro* parameter only represents sarcomeric contractile function of the diaphragm fiber. Respiratory system dysfunction caused in part by respiratory muscle damage, can be also assessed by measuring *in vivo* using a plethysmograph, ventilatory parameters [respiratory rate (RR), tidal volume (VT) and minute ventilation (MV) as well as integrity of hypoxic and hypercapnic-ventilatory reflexes (HVR and HCVR, respectively) (Gosselin et al., 2003; Matecki et al., 2005; Gayraud et al.,

* Corresponding author at: Escola de Farmácia, Campus Morro do Cruzeiro, Universidade Federal de Ouro Preto, s/n, Bauxita, Ouro Preto, 35400-000, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: aguiamar@gmail.com, grabe@ef.ufop.br (A. Grabe-Guimarães).

¹ Equal contribution of the authors.

2007; Mosqueira et al., 2008; Mosqueira et al., 2013; Burns et al., 2015; Burns and O'Halloran, 2016). These parameters integrate breathing pattern control, electric signal transmission, ventilatory mechanics and respiratory muscle contractile properties, which represent more clinically relevant deficits to be considered as main end-point for evaluating the efficacy of various therapies for muscular dystrophy.

However, this non-invasive *in vivo* approach has a lower discriminative power than *in vitro* evaluation of maximal diaphragm strength. Indeed, only old mdx mice present a blunted ventilation response to hypercapnia (Gayraud et al., 2007) or hypoxia (Mosqueira et al., 2013; Burns et al., 2015; Burns and O'Halloran, 2016) compared to control mice. The evolution of *in vivo* respiratory system dysfunction with age in mdx mice is not yet fully described. This is however important because numerous factors may contribute to respiratory system dysfunction in DMD and mdx mice, which are not considered by *in vitro* assessment of diaphragm strength.

Among them, alterations at neuromuscular junction (NMJ) may participate to DMD disease progression in addition to intrinsic muscle contractile property deficit (Pijl et al., 2016). Indeed, dystrophic muscles have altered nicotinic acetylcholine receptor (nAChRs) distribution pattern at postsynaptic membrane of NMJ (Nagel et al., 1990; Lyons and Slater, 1991). Evidences indicate that dystrophin absence could cause neuromuscular transmission defects at NMJ (Personius and Sawyer, 2006). Some studies showed decrease of miniature endplate potentials, that corresponds to depolarizations resulting from spontaneously single acetylcholine (ACh) quanta released in dystrophic muscle (Nagel et al., 1990; Lyons and Slater, 1991; Carlson and Roshek, 2001; Pijl et al., 2016), indicating a possible reduction of post-synaptic sensitivity to ACh. It is unknown whether this reduction participate to muscular weakness in DMD and whether drugs known to potentiate the neurotransmission at the NMJ such as cholinesterase inhibitors may improve *in vivo* respiratory muscle function in mdx mice.

Pyridostigmine (PYR) is an acetylcholinesterase (AChE) inhibitor used to improve muscular contraction for diseases with a deficit in neurotransmission such as Myasthenia gravis (Maggi and Mantegazza, 2011). AChE is an enzyme found at NJM and cholinergic synapses responsible for ACh hydrolysis (Quinn, 1987). PYR promotes increase of endogenous ACh with a beneficial effect on muscular tonus and strength (Adler et al., 1992) and may be efficient to limit muscular weakness in DMD, additionally PYR has anti-inflammatory (Rocha et al., 2016; De Cuba et al., 2014) and antifibrotic effect (Liu et al., 2015), which could be contribute to prevent or reduced diaphragm damage and consequently, improve muscle force on mdx mice. However, PYR has a short half-life and, it is poorly absorbed from the gastrointestinal tract, which results in a low oral bioavailability (Aquilonius et al., 1980). Additionally, PYR induces side effects and toxicity, due to its parasympathic effects. Muscarinic side effects include diarrhea, nausea, hypersalivation, urinary incontinence, increased bronchial secretion, miosis, and lacrimation. Nicotinic side effects are muscle cramps, fasciculations, and weakness (Pope et al., 2005). Such side effects and weak bioavailability may be reduced by a different formulation, encapsulated in liposomes and injected intravenously (Vidal et al., 2010) or subcutaneously (S.C.) (Souza et al., 2013). Liposomes are lipid bilayer vesicles composed of an aqueous compartment able to encapsulate hydrophilic and hydrophobic substances in their internal water compartment or into the membrane, respectively (Bangham et al., 1974). Liposomes confer sustained drug release (Blume and Cevc, 1990), increase drug effects and/or reduce its toxicity (Lasic, 1998). We already demonstrated that liposomal PYR formulation increases the duration of the PYR cardioprotective effects and prevent cardiovascular disturbances resulting from sympathetic hyperactivity in Wistar rats (Vidal et al., 2010).

We hypothesized that neuromuscular transmission defects at NMJ participate to DMD disease progression. To verify this hypothesis, we evaluated whether PYR treatment would improve *in vivo* respiratory muscle function due to its ability to increase ACh availability at

endplate. Furthermore, we hypothesized that if the cholinergic nicotinic receptors at endplate under long-term overstimulation could be increase in vitro muscle force. We also verified for future clinical application if PYR availability could be optimized by testing the efficacy of PYR encapsulated in liposomes.

Thus, the first aim was to verify the discriminative power of *in vivo* respiratory muscle function assessment, by plethysmography, between control and mdx mice at different stage of muscular disease to select the best age of mdx mice, to be treated with PYR. The second aim was to evaluate in mdx mice at the selected age the effect of free PYR and liposomal PYR on *in vivo* respiratory muscle function. Moreover, to individualize the specific effect of PYR on the diaphragm, *in vitro* studies were performed on isolated diaphragm fiber.

2. Material and methods

2.1. Drugs and reagents

Pyridostigmine bromide was purchased from Sigma Aldrich France. Distearoyl phosphatidylcholine (DOPC) and cholesterol (CHOL) were purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). The solvents were analytical grade and all other chemicals were commercially available. Water was purified by reverse osmosis (Simplicity System 185, Millipore, USA).

2.2. Liposomes preparation and characterization

For the free PYR formulation pyridostigmine bromide was dissolved the salt in phosphate buffered saline. Liposomal PYR formulation was prepared according to our previously described protocol (Souza et al., 2013). In summary, multilamellar liposomes were composed of DOPC and CHOL at a molar ratio 5:4. PYR encapsulation was carried out by freeze-thaw method proposed by Nayar et al. (1989). Empty liposomes were prepared using only PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate, pH 7.2). Analysis by UV spectrophotometry (270 nm; Model B582, São Paulo, Brazil) was performed to evaluate encapsulation efficiency as described by Souza et al., 2013; final concentration of pyridostigmine in liposomal formulation was about 6.5 mg/ml. Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of liposomes were determined using Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK).

2.3. Animals

Male wild-type (C57BL/10ScSnJ) and mdx mice (C57BL/10ScSnDmdmdx/J) were purchased at 6 month-old from Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME). Animal were housed conventionally in controlled humidity and temperature, operating on 12 h of light and dark cycle with food and water available *ad libitum*. All investigations conformed to the European Parliament Directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Languedoc-Roussillon, n° CEEA-LR-12078).

2.4. Plethysmography

As already performed in our lab (Gayraud et al., 2007; Matecki et al., 2005), the respiratory function in conscious and unrestrained mice was measured using whole body plethysmography and signal was analyzed by iox2 software (EMKA Technologies, Paris, France). All mice were randomly placed into individual chamber. After one hour stabilisation, each animal was visually monitored and ventilatory parameters were recorded during inactive phase for 15 min under two experimental conditions. First, each animal was submitted to 100% room airflow (air breathing). Second, each animal was exposed to hypercapnia with 8% CO₂-enriched airflow (8% CO₂ breathing) to challenge respiratory function.

Air volume changes corresponding to spontaneously breathing were

obtained using a pressure transducer (EMKA Technologies, Paris, France). This pressure signal was used to calculate the ventilatory parameters: tidal volume (TV), respiratory rate (RR) and minute volume (MV).

2.5. Diaphragm isometric contractile measurement

In vitro diaphragm contractility was measured as previously performed in our lab in mdx mice (Pauly et al., 2012). Mice were euthanized and diaphragm together with the ribs was surgically removed. Briefly, the diaphragm was dipped into a petri dish containing Krebs solution (NaCl, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, NaHCO₃) oxygenated and incubated at 28 °C. A transverse strip muscle (2 mm) was isolated and connected to an isometric force transducer (Aurora Scientific Instruments, USA). The force–frequency relationship was determined by sequentially stimulating the muscles for 600 ms at 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100, and 120 Hz with 2 min between each stimulation train. Forces were normalized by muscle strip cross-sectional area determined by dividing muscle weight by its length and tissue density (1.056 g/cm³) and expressed in Newton per square centimeter (N/cm²).

2.6. Experimental protocols

Firstly, respiratory system was evaluated *in vivo* using whole body plethysmography under air and 8% CO₂ in C57BL10 and mdx mice at different ages, 6 month-old (C57BL10, n = 12; mdx, n = 10), 17 month-old (C57BL10, n = 10; mdx, n = 17), 22 month-old (C57BL10, n = 3; mdx, n = 3).

Secondly, in a preliminary experiment, we tested the dose-dependent toxicity of free PYR in 17 month-old animals. Some common symptoms used to characterized autonomic nervous system toxicity are lacrimation, salivation, defecation and urination, caused by excessive secretory stimulation at parasympathetic end organs (Pope et al., 2005). After single dose injection of PYR, the presence or absence of these adverse effects was qualitatively observed, as well as mortality rate. C57BL10 mice and mdx mice, both 17 month-old were then treated, subcutaneously (S.C.), with 0.01, 0.1 or 1 mg/kg of free PYR. The highest doses without any adverse effect concerning autonomic signs of toxicity and mortality were selected for evaluated the respiratory function.

Then, 17 month-old mdx mice (n = 6) were treated with free PYR (0.1 mg/kg) and compared to C57BL10 mice (n = 9) similarly treated. To evaluate the efficacy of liposomal PYR formulation compared to free PYR treatment, a third group of mdx mice (n = 5) were treated with liposomal PYR (1 mg/kg) and compared to the mdx group (n = 6) treated with free PYR (0.1 mg/kg). We also evaluated liposomal PYR (5 mg/kg) (n = 5).

Finally, a group of 10 month-old mdx mice were treated during 30 days with liposomal PYR (5 mg/kg, n = 6) or empty liposome (n = 5). *In vivo* respiratory function was evaluated before and after treatment at 2, 6, and 24 h, and days 15 and 30 by plethysmography. At the end of the protocol, animals were euthanized by cervical dislocation for *in vitro* measurement of isometric diaphragm contractile properties as previously described (Matecki et al., 2016).

2.7. Statistical analysis

All parameters are expressed as mean ± S.E.M. Data were statistically compared using two-way ANOVA (age and disease) or One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. Value of P < 0.05 was considered statistical significant for all tests.

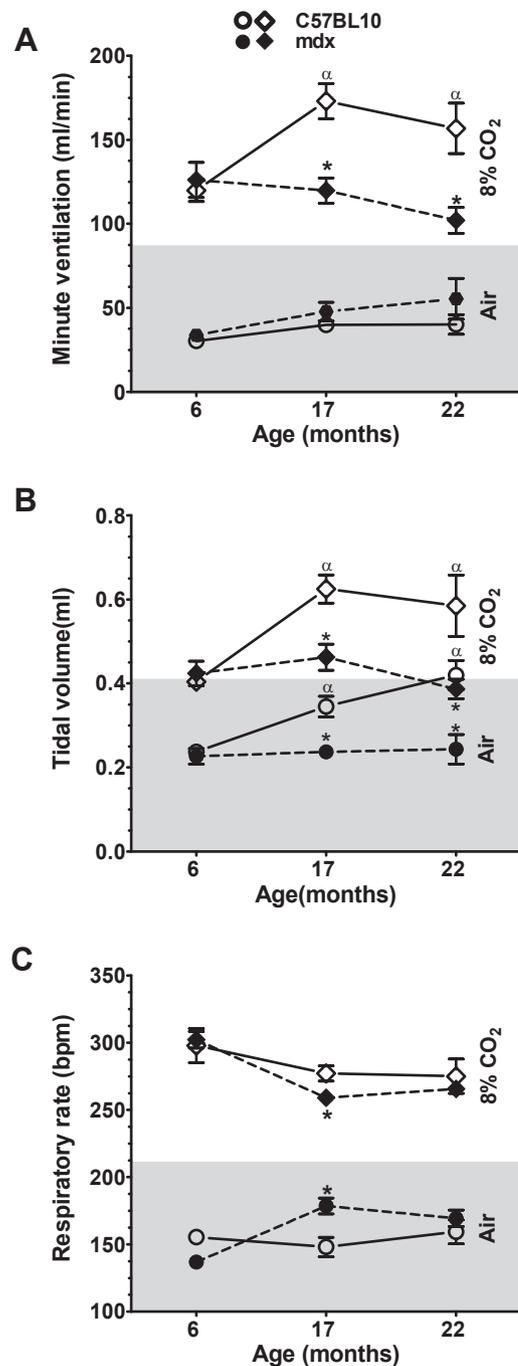


Fig. 1. *In vivo* characterization of respiratory function of C57BL10 and mdx mice by plethysmography at different ages. 6 month-old (C57BL10, n = 12; mdx, n = 10), 17 month-old (C57BL10, n = 10; mdx, n = 17), 22 month-old (C57BL10, n = 3; mdx, n = 3). C57BL10: air breathing, white circle; 8% CO₂, white diamond. Mdx: air breathing, black circle; 8% CO₂, black diamond. * P < 0.05: Significant difference between C57BL10 and mdx mice (ANOVA two-way). F values interaction (age x mutation) were 0.53, 6.00, 10.08, respectively for MV, TV and RR at air breathing and 6.53, 5.90, 1.21 for the same parameters at 8% CO₂. ^α P < 0.05: Significant difference compared to 6 month-old C57BL10 (ANOVA one-way). F values was 3.65, 14.08, 0.72, respectively for MV, TV and RR at air breathing and 9.88, 17.30, 1.24 for the same parameters at 8% CO₂.

3. Results

3.1. Respiratory function characterization of mdx mice

We tested the effect of age on respiratory function parameters in C57BL10 and mdx mice in normal conditions *i.e.* air breathing (Fig. 1). The respiratory function has been also evaluated under reduced O₂

environment (8% CO₂). Experiments have been performed in adult (6-month old) and old animals (17-month old). Very old animals of 22 month-old have been tested to test whether the respiratory declines dramatically at the end life of the mice. At 6 month-old mdx and C57BL10 mice had similar ventilatory response to both normocapnia (air breathing) and hypercapnia (8% CO₂) conditions (Fig. 1).

Under normocapnia condition, 17 and 22 month-old mdx mice present similar MV to age related C57BL10 mice (Fig. 1A) but with a different breathing pattern. Indeed, compared to age related control mice, the 17 and 22 month-old mdx mice present a reduced TV (p < 0.001; p < 0.01, respectively) (Fig. 1B) associated with a significant increase of RR (p = 0.0003) only for 17 month old mdx mice (Fig. 1C). The 22 month-old mdx mice presented similar RR to control mice.

Under hypercapnia, 17 and 22 month-old mdx mice had a reduced MV compared to age related C57BL10 mice (p < 0.01) which is underlined, compared to control mice, by a decrease of TV (p < 0.01) for both mdx mice groups, and RR (p < 0.01) only for 17 month-old mdx mice. The 22 month-old mdx mice presented similar RR than control mice.

Thus, these first results show the presence of an age dependent alteration of respiratory function, mostly characterized by a lower TV under normocapnia and hypercapnia, and MV only under hypercapnia in both 17 and 22 month-old mdx mice. Those 3 parameters were chosen as endpoint to evaluate the effect of PYR treatment on *in vivo* respiratory function.

3.2. Determination of nontoxic PYR dose

No toxic effect was observed in C57BL10 mice treated with 0.01 mg/kg (n = 10), 0.1 mg/kg (n = 9), and 1 mg/kg (n = 7) of free PYR. On the contrary, free PYR was toxic and lethal in mdx mice just after the injection. Two mdx 17 month-old animals died soon after 0.01 mg/kg free PYR (n = 10), one mdx with 0.1 mg/kg (n = 9) and all mdx mice treated with free PYR 1 mg/kg (n = 6). For this last dose, tremor, salivation, defecation, and sweating, preceding death were observed. We considered that acetylcholinesterase inhibition with free PYR was mortal for mdx mice that already presented cardiac failure and respiratory dysfunction at that age. Considering these results, we selected the dose 0.1 mg/kg as the safest dose to perform *in vivo* tests with free PYR.

To test the beneficial effect of liposomal formulation, we first tested liposomal PYR at 1 mg/kg that was lethal concentration for mdx mice when administrated free. Liposomal PYR did not induce any adverse effects or death at 1 mg/kg (n = 6). A higher dose of liposomal PYR was tested at 5 mg/kg. This 5 mg/kg dose administrated free PYR is known to cause muscarinic side effects in Sprague-Dawley rats (Richtsfield et al., 2013). Liposomal PYR at 5 mg/kg did not induce any adverse effects or death (n = 5) to mdx mice or C57BL10 mice.

3.3. Effect of PYR single-dose on 17 month-old mice *in vivo* respiratory function

We observed, as showed in Fig. 2A and 2B, that free PYR (0.1 mg/kg) has no effect on the 3 main endpoints. Indeed, in 17 month-old mice, one and two hours after free PYR single-dose compared to baseline, under normo and hypercapnia, TV did not significantly increase, neither MV under hypercapnic condition.

We did not observe also any effect in RR under normo and hypercapnic conditions, neither MV under hypercapnic solution between baseline and one or two hours after free PYR injection. This was an expected result considering that these 3 parameters were not discriminant (Fig. 2C).

Considering that, free PYR is rapidly hydrolyzed and that the dose 1 mg/kg was toxic for mdx mice, we tested the effect of a single dose injection of its liposomal formulation at 1 mg/kg in 17 month-old mdx

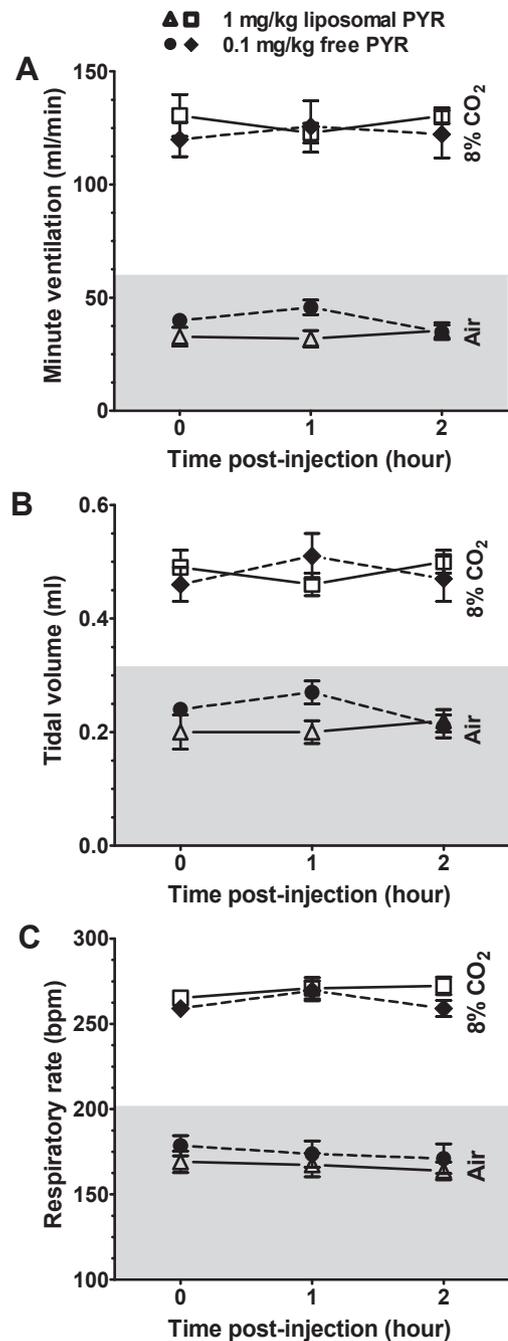


Fig. 2. Ventilatory parameters in response to air and 8% CO₂ breathing of 17 month old mdx mice treated with S.C. single dose of free PYR and liposomal PYR. 0.1 mg/kg free PYR (n = 6): air breathing, black circle; 8% CO₂, black diamond. 1 mg/kg liposomal PYR (n = 5): air breathing, white triangle; 8% CO₂, white square. One way-ANOVA. F values for dose comparison: 8.68, 2.0, 1.68 for MV, TV, RR, respectively at air breathing and 6.69, 3.55, 2.12 for the same parameters at 8% CO₂.

Table 1

Physicochemical parameters of liposomal PYR formulation (mean ± SD).

	EE (%)	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
Liposomal PYR	17.5 ± 4.8	2556 ± 180	0.49 ± 0.03	-5.0 ± 3.7
Empty liposome	-	1194 ± 72	0.7 ± 0.42	-1.0 ± 0.2

PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency.

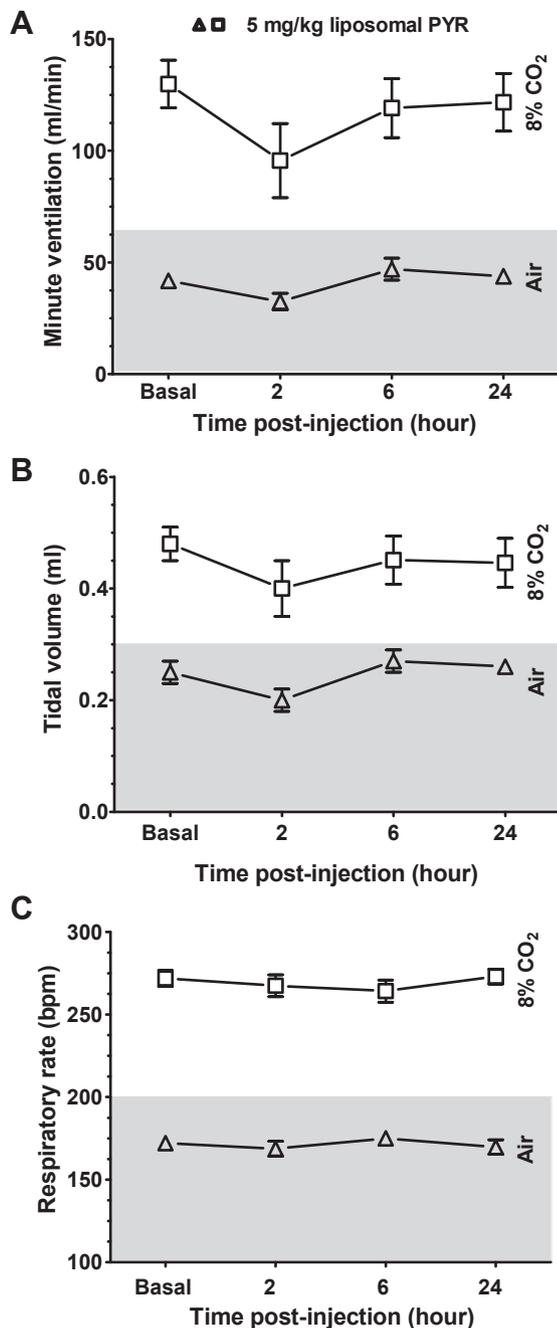


Fig. 3. Ventilatory parameters in response to air and 8% CO₂ breathing of 17 month-old mdx mice treated with S.C. single dose of liposomal PYR 5 mg/kg. Air breathing, (white triangle), 8% CO₂ (white square), n = 5. One way-ANOVA. F values for dose comparison: 10.34, 11.97, 3.79 respectively for MV, TV, RR at air breathing and 4.30, 8.24, 3.90 for the same parameters at 8% CO₂.

mice.

Physiochemical characteristics of liposomal PYR formulation were determined before *in vivo* use (Table 1). A liposomal formulation for subcutaneous administration was developed to permit a gradual release of the drug into systemic circulation (Souza et al., 2013). PDI determination (superior to 0.3) was important to demonstrate that it was obtained multilamellar liposomal PYR with large and polydisperse mean diameter. Formulation exhibited a negative zeta potential and PYR encapsulation efficiency in liposomes was similar to that described by Souza et al. (2013). Liposomal PYR formulation presents appropriate physiochemical characteristics for S.C. administration.

Similarly to free PYR treatment, none of the respiratory parameters

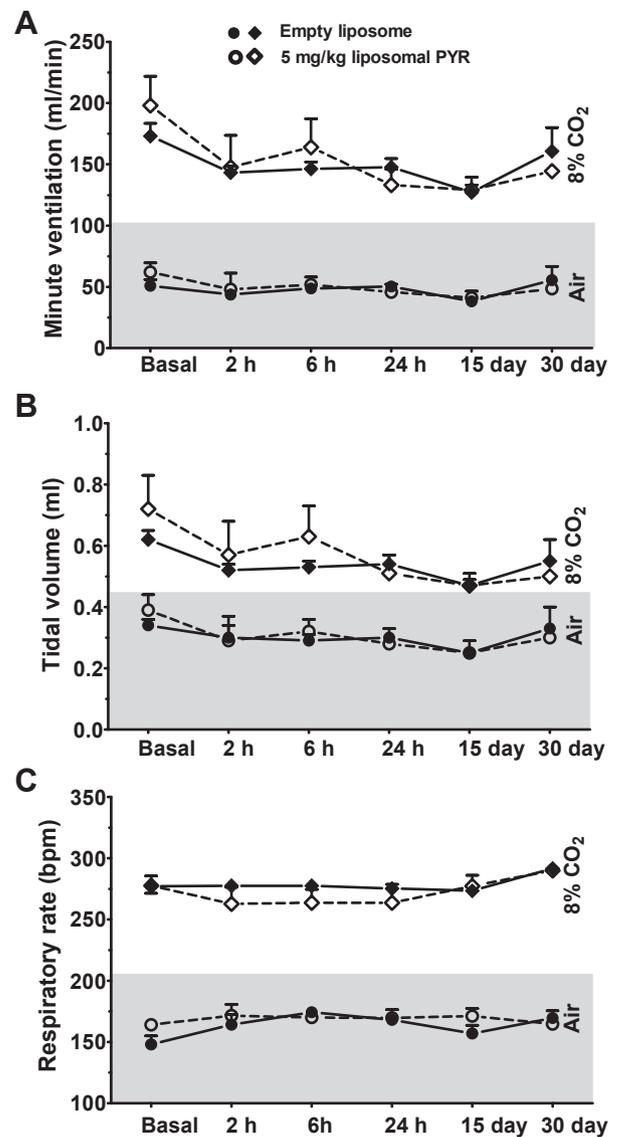


Fig. 4. Ventilatory parameters in response to air and 8% CO₂ breathing of 10 month-old mdx mice after 30 days of S.C. treatment with liposomal PYR. Empty liposome, n = 5 (air breathing, black circle; 8% CO₂, black diamond). 5 mg/kg liposomal PYR, n = 6 (air breathing, white circle; 8% CO₂, white diamond). One way-ANOVA. F values for dose comparison: 0.83, 0.63, 0.67 respectively for MV, TV, RR at air breathing and 1.47, 1.25, 2.65 for the same parameters at 8% CO₂.

were affected by a single dose injection of 1 mg/kg liposomal PYR (Fig. 2). Then, we tested a highest dose of liposomal PYR (5 mg/kg), but this dose had no effect either (Fig. 3).

3.4. Effect of liposomal PYR repeated doses on 10 month-old mdx mice *in vivo* and *in vitro* respiratory function

None of respiratory parameters were affected after first dose or 15 and 30 days of treatment of liposomal PYR (5 mg/kg) or liposome empty injection compared to basal values ($p > 0.05$) (Fig. 4). No difference was observed between the liposomal PYR or liposome empty groups.

The same treatment did not improve the diaphragm contractile force at any stimulation frequency used, since there was no difference between treated compared to non-treated groups ($p > 0.05$) (Fig. 5).

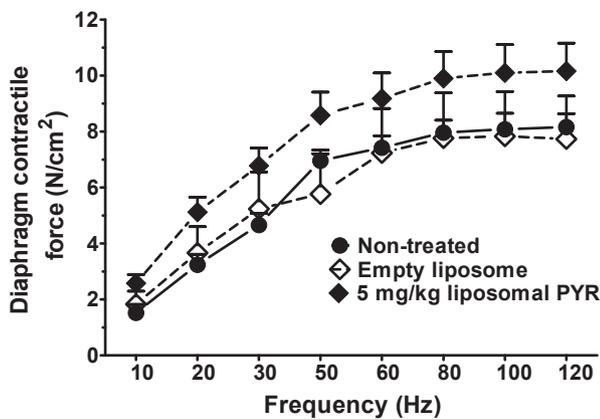


Fig. 5. Diaphragm contractile specific force-frequency relationships of 11 month-old mdx mice after 30 days of S.C. treatment with liposomal PYR. Non-treated mdx, $n = 5$ (black circle). Empty liposome, $n = 3$ (white diamond). 5 mg/kg liposomal PYR, $n = 6$ (black diamond). Two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. F values for treatment 14.93 and frequency 27.22.

4. Discussion

In this study, using both *in vivo* and *in vitro* techniques, we demonstrated that PYR injection did not have any effect on the respiratory system and diaphragm contractile function in mdx mice.

Although we observed that mdx mice have *in vivo* normal respiratory function at 6 month-old, at this age, their diaphragm present already significant histological muscle fiber degeneration and loss of contractile force evaluated *in vitro* (Steldman et al., 1991). Those results are consistent with previous study showing that their respiratory intercostal muscles, which are less affected may compensate the diaphragm weakness to prevent respiratory system impairment evaluated *in vivo* (Gayraud et al., 2007). However, with the muscular disease progression, which affects all the muscle including intercostal muscles, we observed in older mdx animals (17 and 22 month-old) a blunted ventilatory pattern under normo and hypercapnia, compare to age related control mice.

In both conditions, due to the metabolic control of breathing, when carbon dioxide accumulate in the blood, MV increase to reestablish its baseline level, by increasing VT (Mosqueira et al., 2013). The decreased VT observed in both conditions with our 17 and 22 month-old mdx mice, is the result of an increase muscular weakness due to age related disease progression. To prevent a MV decrease and thus maintain blood carbon dioxide level homeostasis, 17 month-old mdx mice are able to increase at rest their RR to compensate their low VT due to respiratory muscle contractile defect. This particular breathing pattern, so called rapid shallow breathing have been clearly observed in DMD patient, due to an increase of respiratory system elastic load associated to presence of respiratory muscle weakness (Misuri et al., 2000). Indeed, the breathing pattern generator is predominantly influenced by ventilatory mechanics change to propose the best economical breathing pattern minimizing the work of breathing necessary to maintain a constant level of carbon dioxide (Younes et al., 1988).

Interestingly, with disease progression, under air, this compensatory mechanism is not any more efficient in 22 month-old mdx mice, which present the same level of RR compared to age related control mice. Indeed, considering their constant decline in VT with age, which decreased the ventilatory efficiency, 22 month old mdx mice, to correctly compensate their low VT should have increase their MV and their RR, with higher value compared to age related control mice.

Those defects of compensatory mechanism are accentuated under hypercapnic condition and thus can be detected earlier. Indeed, in our 17 month mdx mice, VT is lower compared to age related control mice, but on contrary to air ambient, we also observed a lower MV due to their inaptitude to sufficiently increase their RR which is lower than

control group.

The response to hypercapnia is a result of both muscular strength of respiratory muscles and sensitivity of the respiratory chemoreceptors to CO_2 and O_2 pressure variations. In mdx mice, the peripheral chemoreceptors located in carotid body have less sensitivity to O_2 pressure decrease (Mosqueira et al., 2013), which contributes, at least partially, to alterations observed on mdx mice. However, considering that carotid body are not mainly responsible for ventilatory response to carbon dioxide (Pan et al., 1995; Bernardis et al., 1966; Coles et al., 2002; Gautier and Bonora, 1979; Dejourn, 1963), and our 6 month-old mdx mice presented similar ventilatory response than age related control mice, we could consider that the difference in ventilatory response we observed was mainly due to muscular disease progression.

In this study, we wanted to ascertain if functional deficit at NMJs may aggravate muscle dysfunction and participate in this progressive degeneration of muscle fiber which is the main cause of muscle weakness in patients with DMD. ACh augmentation at muscle endplate of Myasthenia gravis muscle with PYR, which present some similarities with dystrophin deficient muscle, improve contractile function (Maggi and Mantegazza, 2011). Indeed, dystrophin is important to maturation and stabilisation of nAChR at muscle (Kong and Anderson, 1999; Grady et al., 2000; Jacobson et al., 2001). Dystrophic muscles have reduced density of nAChR at postsynaptic membrane of motor endplates (Nagel et al., 1990), increased degradation rates of nAChR (Xu and Salpeter, 1997) and upregulation of extrajunctional nAChR (Ghedini et al., 2008). Mdx mice present neuromuscular synaptic dysfunction, characterized by reduction of postsynaptic neurotransmitter sensitivity, demonstrated by reduced MEPP amplitudes (Nagel et al., 1990; Pijl et al., 2016), increased presynaptic ACh release, probably as a compensatory effect (Carlson et al., 2001).

Thus, we firstly hypothesized that treatment with free PYR could improve respiratory function and contractile force of diaphragm mdx mice, due to its ability to increase the availability of ACh at muscle endplate of 17 month old mdx mice.

We choose this age, because at this level of muscular disease progression, all parameters of ventilatory response to hypercapnia was able to discriminate from age related control mice.

However, the effect of (0.1 mg/kg) free PYR on 17 month-old mdx mice respiratory function measured by whole body plethysmography method was negative. Indeed, we did not observe any modification of MV, VT and RR, in both condition (ambient air and 8% CO_2) between baseline and 1 or 2 h after injection free PYR injection.

To ascertain that this negative effect was not simply due to an insufficient level of free PYR administration, we firstly tested higher dose (1 mg/kg), which induced mdx mice death, observed after S.C. administration. However, similar dose in control age related mice was never toxic. Thus, this observation strongly indicates that mdx mice are more sensitive to ACh overload than C57BL10 mice. The death probably was due to the overstimulation of muscarinic receptors. At respiratory tract, ACh has effects on bronchomotor tone and mucus secretion from airway submucosal glands regulation (Colebatch and Halmagyi, 1963; Baker et al., 1985). Thus, the possible causes of mdx mice death could be bronchoconstriction and/or increase of mucus secretion (Taylor, 2001), which may aggravate respiratory dysfunction already present in mdx mice. Though, any alterations of number, morphology or function of muscarinic receptors of mdx mice airways are known.

Multilamellar liposomes of PYR was developed for S.C. administration since it is more comfortable than intravenous route, generally used for unilamellar liposomes (Vidal et al., 2010). Liposomal PYR is safer than free PYR because PYR encapsulated in liposomes is gradually and sustainably release into the blood compartment, reducing the adverse effects and prolonging its effect, as demonstrated for the PYR cardioprotective effect when intravenously administered (Vidal et al., 2010).

Thus, to decrease side effect of higher dose of PYR and increase the

duration of delivery and action we tested the effect PYR liposomal formulation at 1 mg/kg single dose on 17 month-old mdx mice respiratory system. Indeed, considering that no side effect was observed in mdx treated with this dose, we hypothesized a potential benefit effect for this formulation on muscular function. However, single dose of liposomal PYR did not have any beneficial effect on respiratory function of 17 month-old mdx mice.

Finally, to evaluate a chronic increase of endogenous acetylcholine at NMJs which may have a better effect on muscular function compared to single dose, we finally, in a group of mdx mice of 10 month-old, injected a daily liposomal PYR 5 mg/kg dose or with empty liposomes during 30 days. As showed in Fig. 3, none of the ventilatory parameters were affected by 1, 15 and 30 days of treatment of PYR or empty liposomal injection compared to basal values. At the end of the protocol, contractile properties in isometric condition was determined, and no difference was observed between groups (Fig. 5).

Taking together, these results showed that increase of ACh concentrations is not sufficient to improve respiratory muscle function. These negative results could be due to advanced degree of muscle degeneration present in old mdx mice (Steldman et al., 1991. Gayraud et al., 2007). Future *in vitro* diaphragm contractile evaluation should be carried out with higher doses of liposomal PYR on younger mdx mice and the electrical activity of the membrane should be measures to ascertain that neuromuscular transmission defects at NMJ may not participate to DMD disease progression.

Moreover, although no benefit was observed on respiratory function, the total absence of adverse effects observed qualitatively and no death even after higher dose of PYR (5 mg/kg) indicate its potential for further therapeutic evaluation and even for mechanism studies on mdx mice.

Despite the result on the contractility of the diaphragm not being positive, the effect of PYR on muscle inflammation should be evaluated in future study. A recent study demonstrated that activation of nicotinic ACh receptors can reduce inflammation of muscle cells in mdx mice (Leite et al., 2014). Furthermore, the excitatory effect on skeletal muscle, ACh released from the vagal synaptic endings inhibits the secretion of TNF- α , IL-1 β , and a host of other inflammatory mediators by macrophages (Tracey, 2002). The PYR anti-inflammatory action has been demonstrated in other species, as in rats subjected to ischaemic heart disease, when increased cholinergic modulation by PYR induced recruitment of anti-inflammatory cells (Rocha et al., 2016).

In summary, we can conclude that free PYR (1 mg/kg) was toxic to mdx mice, unlike liposomal PYR, which did not show any side effect, confirming that the encapsulation in liposomes is effective in reducing the toxic effects of this drug. Treatment with liposomal PYR, either acute or chronic, did not show any beneficial effect on respiratory function of these DMD experimental model.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to Franck Bezerra, PhD (UFOP). This work was supported by FAPEMIG grants Rede NanobioMG and PPM V 1227; CNPq scholarship 205897/2014-2, CAPES, UFOP, INSERM and CNRS.

References

Adler, M., Deshpande, S.S., Foster, R.E., Maxwell, D.M., Albuquerque, E.X., 1992. Effects of subacute pyridostigmine administration on mammalian skeletal muscle function. *J. Appl. Toxicol.* 12 (1), 25–33. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2550120107>.

Aquilonius, S.M., Eckernäs, S.Å., Hartvig, P., Lindström, B., Osterman, P.O., 1980. Pharmacokinetics and oral bioavailability of pyridostigmine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 18 (5), 423–428. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00636797>.

Baker, B., Peatfield, A.C., Richardson, P.S., 1985. Nervous control of mucin secretion into

human bronchi. *J. Physiol.* 365, 297–305. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015773>.

Bangham, A.D., Hill, M.W., Miller, N.G.A., 1974. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: Korn, E.D. (Ed.), *Methods in Membrane Biology*, First ed. Plenum, New York, pp. 1–68.

Bernards, J.A., Dejours, P., Lacaille, M.A., 1966. Ventilatory effects in man of breathing successively CO₂-free CO₂-enriched and CO₂-free gas mixtures with low, normal or high oxygen concentration. *Respir. Physiol.* 1, 390–397. [http://dx.doi.org/10.1016/0034-5687\(66\)90006-5](http://dx.doi.org/10.1016/0034-5687(66)90006-5).

Beytia, M.A., Vry, J., Kirschner, J., 2012. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myol.* 31 (1), 4–8.

Blume, G., Cevc, G., 1990. Liposomes for the sustained drug release *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1029 (1), 91–97. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90440-y](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(90)90440-y).

Burns, D.P., O'Halloran, K.D., 2016. Evidence of hypoxic tolerance in weak upper airway muscle from young mdx mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 226, 6875. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-18440-1-27>.

Burns, D.P., Edge, D., O'Malley, D., O'Halloran, K.D., Malley, D.O., Halloran, K.D.O., 2015. Respiratory control in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 860, 239–244. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-18440-1-27>.

Carlson, C.G., Roshek, D., 2001. Adult dystrophic (mdx) endplates exhibit reduced quantal size and enhanced quantal variation. *Euro. J. Physiol.* 442 (3), 369–375. <http://dx.doi.org/10.1007/s004240100561>.

Colebatch, H.J.H., Halmagyi, D.F.J., 1963. Effect of vagotomy and vagal stimulation on lung mechanics and circulation. *J. Appl. Physiol.* 18, 881–887.

Coles, S.K., Miller, R., Huela, J., Wolken, P., Schlenker, E., 2002. Frequency responses to hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated conscious rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 130, 113–120.

De Cuba, M.B., Ribeiro Machado, M.P., Farnesi, T.S., et al., 2014. Effects of cholinergic stimulation with pyridostigmine bromide on chronic chagasic cardiomyopathic mice. *Mediators Inflamm.* 2014, 475946. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/475946>.

Dejours, P., 1963. Control of respiration by arterial chemoreceptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 109, 682–695. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1963.tb13497.x>.

Eagle, M., Bourke, J., Bullock, R., Gibson, M., Mehta, J., Giddings, D., Straub, V., Bushby, K., 2007. Managing Duchenne muscular dystrophy – the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord.* 17, 470–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2007.03.002>.

Gautier, H., Bonora, M., 1979. Effects of carotid body denervation on respiratory pattern of awake cats. *J. Appl. Physiol.* 46, 1127–1131.

Gayraud, J., Matecki, S., Hnia, K., Mornet, D., Prefaut, C., Mercie, J., Ramonatzio, M., 2007. Ventilation during air breathing and in response to hypercapnia in 5 and 16 month-old mdx and C57 mice. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 28 (1), 2937. <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-007-9101-1>.

Ghedini, P.C., Viel, T.A., Honda, L., Avellar, M.C.W., Godinho, R.O., Lima-Landman, M.T.R., Souccar, C., 2008. Increased expression of acetylcholine receptors in the diaphragm muscle of MDX mice. *Muscle Nerve* 38 (6), 1585–1594. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.21183>.

Gosselin, L.E., Barkley, J.E., Spencer, M.J., McCormick, K.M., Farkas, G.A., 2003. Ventilatory dysfunction in mdx mice: impact of tumor necrosis factor- α deletion. *Muscle Nerve* 28 (3), 336–343. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.10431>.

Grady, R.M., Zhou, H., Cunningham, J.M., Henry, M.D., Campbell, K.P., Sanes, J.R., 2000. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron* 25 (2). [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80894-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80894-6). (279293).

Hoffman, E.P., Brown, R.H., Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: the protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51 (6), 919928. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90579-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(87)90579-4).

Hoffman, E., Fischbeck, K., Brown, R., Johnson, M., et al., 1988. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with duchenne's or becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 318 (21). <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198805263182104>. (13631368).

Hukins, C.A., Hillman, D.R., 2000. Daytime predictors of sleep hypoventilation in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 166–170. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.161.1.9901057>.

Jacobson, C., Côté, P.D., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Carbonetto, S., 2001. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J. Cell Biol.* 152 (3), 435–450. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.152.3.435>.

Kong, J., Anderson, J.E., 1999. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Res.* 839 (2), 298–304. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01737-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01737-0).

Lasic, D.D., 1998. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 16 (7), 307–321. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7).

Leite, P.E.C., Gandía, L., De Pascual, R., Nanclares, C., Colmena, I., Santos, W.C., Lagrotta-Candido, J., Quirico-Santos, T., 2014. Selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR $\alpha 7$) inhibits muscular degeneration in mdx dystrophic mice. *Brain Res.* 1573, 27–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.004>.

Liu, J.J., Huang, N., Lu, Y., Zhao, M., Yu X.J., Yang Y., Yang, Y.H., Zang, W.J., 2015. Improving vagal activity ameliorates cardiac fibrosis induced by angiotensin II: *in vivo* and *in vitro*. *Sci. Rep.* 24 (5), 17108. <http://dx.doi.org/10.1038/srep17108>.

Lyons, P.R., Slater, C.R., 1991. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J. Neurocytol.* 20 (12), 969–981.

Maggi, L., Mantegazza, R., 2011. Treatment of myasthenia gravis: focus on pyridostigmine. *Clin. Drug Investig.* 31 (10), 691–701. <http://dx.doi.org/10.2165/11593300-000000000-00000>.

Mah, J.K., Korngut, L., Dykeman, J., Da, L., 2014. A systematic review and meta-analysis

- on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 24 (6), 482–491. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2014.03.008>.
- Markham, L.W., Kinnett, K., Wong, B.L., Woodrow Benson, D., Cripe, L.H., 2008. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 18, 365–370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2008.03.002>.
- Matecki, S., Rivier, F., Hugon, G., Koechlin, C., Michel, A., Prefaut, C., Mornet, D., Ramonaxto, M., 2005. The effect of respiratory muscle training with CO₂ breathing on cellular adaptation of mdx mouse diaphragm. *Neuromuscul. Disord.* 15 (6), 427–436. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2005.01.014>.
- Matecki, S., Dridi, H., Jung, B., Saint, N., Reiken, S.R., Scheuermann, V., Mrozek, S., Santulli, G., Umanskaya, A., Petrof, B.J., Jaber, S., Marks, A.R., Lacampagne, A., 2016. Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (32), 9069–9074. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1609707113>.
- McDonald, C.M., Abresch, R.T., Carter, G.T., Fowler Jr., W.M., Johnson, E.R., Kilmer, D.D., Sigford, B.J., 1995. Profiles of neuromuscular diseases: duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 74 (5), 7092.
- McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., Duan, D., 2015. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model Mech.* 8 (3), 195–213. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.018424>.
- Mehler, M.F., 2000. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res. Rev.* 32 (1), 277–307. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00090-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00090-9).
- Misuri, G., Lanini, B., Gigliotti, F., Landelli, I., Pizzi, A., Bertolini, M.G., Scano, G., 2000. Mechanism of CO₂ retention in patients with neuromuscular disease. *Chest* 117 (2), 447–453. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.117.2.447>.
- Mosqueira, M.M., Baby, S.M., Budak, M., Bogdanovich, S., Willmann, G., Lahiri, S., Khurana, T., 2008. Role of hypoxia in muscle function and muscular dystrophy. *FASEB J.* 22 (1224.12).
- Mosqueira, M., Baby, S.M., Lahiri, S., Khurana, T.S., 2013. Ventilatory chemosensory drive is blunted in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy (DMD). *PLoS One* 8 (7), e69567. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069567>. (29).
- Moxley, R.T., Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D.J., Campbell, K., 2010. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J. Child Neurol.* 25 (9), 1116–1129. <http://dx.doi.org/10.1177/0883073810371004>.
- Nagel, A., Lehmann-Horn, F., Engel, A.G., 1990. Neuromuscular transmission in the mdx mouse. *Muscle Nerve* 13 (8), 742–749. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880130813>.
- Nayar, R., Hope, M.J., Cullis, P.R., 1989. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochim. Biophys. Acta* 986, 200–206. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90468-9](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(89)90468-9).
- Pan, L.G., Forster, H.V., Ohtake, P.J., Lowry, T.F., Korducki, M.J., Forster, A.L., 1995. Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing during ventrolateral medullary cooling in goats. *J. Appl. Physiol.* 79, 1120–1128.
- Pauly, M., Daussin, F., Burelle, Y., et al., 2012. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am. J. Pathol.* 181 (2), 583–592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.004>.
- Personius, K.E., Sawyer, R.P., 2006. Variability and failure of neurotransmission in the diaphragm of mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 16 (3), 168–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2006.01.002>.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., Sweeney, H.L., 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (8), 3710–3714.
- Pijl, E.M., Van Putten, M., Niks, E.H., Verschuuren, J.J.G.M., Aartsma-Rus, A., Plomp, J.J., Maccaferri, G., 2016. Characterization of neuromuscular synapse function abnormalities in multiple Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Euro. J. Neurosci.* 43 (12), 1623–1635. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.13249>.
- Pope, C., Karanth, S., Liu, J., 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 433–446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.048>.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87 (5), 955–979. <http://dx.doi.org/10.1021/cr00081a005>.
- Richtsfeld, M., Yasuhara, S., Fink, H., Blobner, M., Martyn, J.A.J., 2013. Prolonged administration of pyridostigmine impairs neuromuscular function with and without down-regulation of acetylcholine receptors. *Anesthesiology* 119, 412–421. <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e318291c02e>.
- Rocha, J.A., Ribeiro, S.P., Franca, C.M., Coelho, O., Alves, G., Lacchini, S., Kallás, E.G., Irigoyen, M.C., Consolim-Colombo, F.M., 2016. Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 10 (1), R697–R706. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00328.2015>.
- Smith, P.E.M., Calverley, P.M.A., Edwards, R.H.T., 1988. Hypoxemia during sleep in Duchenne muscular dystrophy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 884–888. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/137.4.884>.
- Smith, P.E., Edwards, R.H., Calverley, P.M., 1989. Ventilation and breathing pattern during sleep in Duchenne muscular dystrophy. *Chest* 96, 1346–1351. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.96.6.1346>.
- Souza, A.C.M., Grabe-Guimarães, A., Souza, J., Botacim, W.E., Almeida, T.M., Frézard, F.J.G., Silva Barcellos, N.M., 2013. Development and characterization of multi-lamellar liposomes containing pyridostigmine. *Pharm. Dev. Technol.* 19 (4), 454–459. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2013.795166>.
- Stedman, H.H., Sweeney, H.L., Shrager, J.B., Maguire, H.C., Panettieri, R.A., Petrof, B., Kelly, A.M., 1991. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352 (6335), 536–539. <http://dx.doi.org/10.1038/352536a0>.
- Szeinberg, A., Tabachnik, E., Rashed, N., McLaughlin, F.J., England, S., Bryan, C.A., Levison, H., 1988. Cough capacity in patients with muscular dystrophy. *Chest* 94, 1232–1235. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.94.6.1232>.
- P. Taylor . Anticholinesterase Agents A.G. Goodman , I.S. Gillman , T.W. Rail , F. Murad , The Pharmacological Basis of Therapeutics Tenth ed. 2001; 175-191 New York
- Toussaint, M., Steens, M., Soudon, P., 2007. Lung function accurately predicts hypercapnia in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Chest* 131 (368375). <http://dx.doi.org/10.1378/chest.06-1265>.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01321>.
- Van Den Bergh, P.Y., Tome, F.M., Fardeau, M., 1995. Etiology and pathogenesis of the muscular dystrophies. *Acta Neurol. Belg.* 95 (3), 123–141.
- Vidal, A.T., Guimarães, H.N., de Paula, D.C.C., Frezard, F., Silva-Barcellos, N.M., Grabe-Guimarães, A., 2010. Prolonged cardioprotective effect of pyridostigmine encapsulated in liposomes. *Life Sci.* 86 (1–2), 17–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.011>.
- Xu, R., Salpeter, M.M., 1997. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *J. Neurosci.* 17 (21), 81948200.
- Younes, M., Heger, B., Wilhelm, K.P., Siegers, C.P., 1988. Enhanced *in vivo*-lipid peroxidation associated with halothane hepatotoxicity in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 63 (1), 52–56. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0773.1988.tb00909.x>.