

LETÍCIA MONTANHOLI APOLINÁRIO

**“ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO x DEFLAZACORTE:
MECANISMOS DE AÇÃO E COMPARAÇÃO DE EFEITOS
NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS *MDX*”**

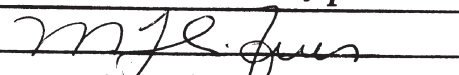
**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA MONTANHOLI APOLINÁRIO

**“ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO X DEFLAZACORTE:
MECANISMOS DE AÇÃO E COMPARAÇÃO DE EFEITOS
NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS *MDX*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Letícia Montanholi Apolinário

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural, na
área de Anatomia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Julia Marques

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Apolinário, Leticia Montanholi, 1988-

Ap43a Ácido eicosapentaenóico x deflazacorte: mecanismos de ação e comparação de efeitos no tratamento de camundongos *mdx* / Leticia Montanholi Apolinário. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Julia Marques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido eicosapentaenóico. 2. Deflazacorte. 3. Camundongo *mdx*. 4. Distrofia muscular de Duchenne. I. Marques, Maria Julia, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Eicosapentaenoic acid x deflazacort: mechanisms of action and effects in the dystrophic *mdx* mice

Palavras-chave em Inglês:

Eicosapentaenoic acid

Deflazacort

Mdx mice

Duchenne muscular dystrophy

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Julia Marques [Orientador]

Luis Garcia Alonso

Robson Francisco Carvalho

Data da defesa: 31-08-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

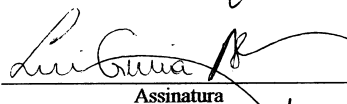
Campinas, 31 de Agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Maria Julia Marques (**Orientadora**)


Assinatura

Prof. Dr. Luis Garcia Alonso


Assinatura

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho


Assinatura

Prof. Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

DEDICATÓRIA

AOS AMORES DE MINHA VIDA

MEUS PAIS, NEUSA E JOÃO:

“Hoje, completo mais uma etapa e alcanço mais um de meus objetivos. A vocês devo as minhas conquistas até hoje. Mãe, obrigada por fazer de meus desejos, os seus sonhos; de minhas batalhas, sua guerra e de minhas realizações, a sua vitória. Obrigada por me ensinar a ter cautela e não, medo e por me dar asas para voar toda vez que mantém meus pés no chão. Pai, obrigada por me mostrar desde cedo que chorar não resolve e que se preocupar com o que não se pode resolver, é uma perda de tempo. Obrigada por desafiar-me a modificar as coisas que podem ser alteradas e encorajar-me a desbravar o mundo. Sou-lhes eternamente grata por abdicarem de si próprios e por não pouparem esforços para me oferecer o que não tiveram. Obrigada por acreditarem que eu seria capaz!”

AOS MEUS AVÓS (*in memoriam*), “VÔ ÍPE E VÓ CIDA”:

“Para estar junto não é preciso estar perto, e sim do lado de dentro.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

A Deus, por conceder-me saúde para superar obstáculos e lutar por meus sonhos e por sempre colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

Aos meus pais, **Neusa e João**, minha eterna gratidão pelo amor único e infinito; fraterno, amigo e confidente que incentiva, zela e se oferece por inteiro.

Aos meus tios, **José e Ivone** pela torcida, apoio e incentivo durante mais uma etapa da minha vida.

À **Profa. Dra. Maria Julia Marques**, pelos conhecimentos, respeito, colaboração e aprendizado durante a realização deste trabalho. Pela confiança e por ter dirigido meus passos, visando aprimoramento didático e científico.

Ao amigo **Prof. Dr. Wagner José Fávaro**, pelo exemplo de dedicação, conselhos, incentivo e ombro amigo. *“Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.” Carlos Drummond de Andrade*

À **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, pela amizade, respeito, apoio e conhecimentos transmitidos desde a graduação em Biologia; por ter me apresentado a “Anatomia” e pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel**, mestre admirável durante a graduação, pela amizade, conhecimentos transmitidos, pelas pertinentes considerações no exame de qualificação e pela disponibilidade em participar da banca de defesa.

Ao **Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho** e ao **Prof. Dr. Luis Garcia Alonso**, pelas considerações na pré-banca e pela disponibilidade em participar da banca de defesa.

Ao **Prof. Dr. Katashi Okoshi**, pelos conhecimentos transmitidos, pela imensa atenção e disponibilidade. Muito obrigada pela receptividade e dedicação na realização de ecocardiografia dos camundongos *mdx*.

Aos **Professores Doutores e Amigos Cintia Y. Matsumura, Renato Ferretti, Ana Paula T. Taniguti, Adriana Pertille e Wilson Romero Nakagaki** pelo acolhimento desde a iniciação científica e bons momentos compartilhados; pela troca de experiências, orientação acadêmica e companhia de todas as horas. Muito obrigada por todo o apoio, dedicação e principalmente pela paciência, imprescindíveis para meu crescimento pessoal e profissional. *“Eu aprendi que para se crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu.” William Shakespeare*

Aos meus amigos e companheiros de laboratório **Adriana Fogagnolo Maurício, Drielen de Oliveira Moreira, Érica Benjamim da Silva, Isabel Cristina Chagas Barbin, Juliano Alves Pereira, Luis Henrique Rapucci, Matheus Bersan Rovere, Natália da Costa Pinheiro, Paula Spanopoulos Perez, Rafael Ventura Machado e Tereza Cristina Pessoa Albuquerque** pela amizade, apoio e aprendizagem diária ao longo desses anos.

Aos amigos da Pós-Graduação, **Amanda Cia Hetzl, André Luis Bombeiro, Cristiano Vieira, Eduardo M. Cândido, Gustavo F. Simões, Larissa A. Kido, Leslie C. Pinto, Raísa Mistieri, Renata Zanon e Sheila C. Victorio** pela amizade, convivência e por transformarem o local de trabalho em um ambiente agradável e prazeroso.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural**, pelo incentivo à pesquisa e ao aprimoramento acadêmico de seus alunos.

À **Sra. Liliam Alves Senne Panagio**, pela competência com que desenvolve seu trabalho e pela amizade, carinho e atenção dispensada durante todo o Mestrado.

Ao **Marco Aurélio Ribeiro de Paula** e ao **Norivaldo Celestino**, técnicos do laboratório, pela amizade, apoio e colaboração nos procedimentos experimentais deste trabalho.

Aos **Docentes** do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Humberto Santo-Neto, José Angelo Camilli, Elaine Minatel, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, pelo aprendizado compartilhado durante as disciplinas e pela colaboração para minha formação como educadora.

Aos **Funcionários** do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, por contribuírem, direta ou indiretamente, para a execução deste projeto.

Aos veteranos e amigos da Bio 05 diurno, **Fábio Montico** (meu pai), **Janice** (minha mãe), **Sílvio Consonni**, **Raffinha Ignarro**, **Adilson**, **Karina**, **Larissa Rizzo** e **Carlos** pelo acolhimento nos primeiros anos da graduação e por compartilharem comigo as mesmas experiências, aflições e alegrias desde a entrada na universidade até o presente.

A todos os meus amigos e familiares, que mesmo de longe acompanharam toda a caminhada até a realização desta conquista.

À **CAPES/PROEX** e ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro, e à **FAPESP**, pela concessão da bolsa de mestrado (2010/14750-3) e do projeto de auxílio à pesquisa (2011/52697-6), os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento e finalização desta dissertação.

“Aprender é mudar posturas.” Platão

LISTA DE ABREVIATURAS

- BB** – músculo bíceps braquial
- CDG** – complexo distrofina-glicoproteínas
- CK** – creatina quinase
- DFZ** – Deflazacorte
- DIA** – músculo diafragma
- DMD** – distrofia Muscular de Duchenne
- EPA** – ácido eicosapentaenóico
- GAPDH** – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- NC** – núcleo central
- NP** – núcleo periférico
- NF- κ B** – fator nuclear kappa B
- QF** – músculo quadríceps femoral
- REG** - regeneração
- RS** – retículo sarcoplasmático
- sCSQ** – calsequestrina esquelética
- TNF- α** - fator de necrose tumoral α
- Utr** – utrofina

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne	1
1.2 Camundongos <i>mdx</i>	2
1.3 A distrofina e o Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG)	4
1.4 Fatores envolvidos na degeneração da fibra distrófica: inflamação e regulação do cálcio	7
1.5 Terapia farmacológica da DMD	11
2. Objetivos	13
3. Materiais e métodos	14
3.1 Animais	14
3.2 Grupos experimentais	14
3.3 Análise histopatológica	15
3.4 Determinação da Creatina quinase (CK)	18
3.5 Medida da força de tração	19
3.6 Immunoblotting	19
3.7 Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1 Peso corporal	23
4.2 Medida da força de tração	24
4.3 Níveis plasmáticos de creatina quinase (CK)	25
4.4 Análise histopatológica qualitativa dos músculos BB e DIA	25
4.5 Análise histopatológica qualitativa do músculo QF	27
4.6 Análise histopatológica quantitativa dos músculos BB e DIA	29
4.7 Análise histopatológica quantitativa do músculo QF	30
4.8 Immunoblotting	31
4.8.1 Quantificação do NF- κ B	31
4.8.2 Quantificação do TNF- α	33
4.8.3 Quantificação da sCSQ	35
4.8.4 Quantificação da Utr	37

5. Discussão	39
5.1 Peso corporal	40
5.2 Níveis Plasmáticos de Creatina Quinase e Força de tração	41
5.3 Efeitos do EPA e DFZ sobre a mionecrose dos músculos BB e DIA	43
5.4 Efeitos do EPA e DFZ sobre a regeneração do músculo QF	43
5.5 Efeitos do EPA e DFZ sobre a inflamação (NF- κ B e TNF- α)	44
5.6 Efeitos do EPA e DFZ sobre o tamponamento de cálcio (sCSQ)	46
5.7 Efeitos do EPA e DFZ sobre a estabilidade do sarcolema (Utr)	49
5.8 EPA x DFZ	50
6. Conclusão	52
7. Referências Bibliográficas	53
Anexo: Certificado do Comitê Ética e Experimentação Animal CEEA/Unicamp	60

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X. Os glicocorticoides são amplamente utilizados para o tratamento da DMD, entretanto os efeitos colaterais decorrente de seu uso contínuo motivam a busca por novas terapias farmacológicas. Ácidos graxos poli-insaturados têm sido empregados para o tratamento de várias doenças, exercendo seus efeitos através de mecanismos pouco conhecidos. No presente trabalho, comparamos os efeitos do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do glicocorticoide deflazacorte (DFZ) nos músculos bíceps braquial (BB), diafragma (DIA) e quadríceps femoral (QF) de camundongos *mdx*. O grupo *mdx* tratado com EPA recebeu 300 mg/kg de EPA diluído em óleo mineral, via gavagem, diariamente, do 14° ao 30° dia de vida. O grupo *mdx* tratado com DFZ recebeu dose diária de deflazacorte (1,2 mg/kg) diluído em água, pela mesma via e período. Camundongos *mdx* e C57BL/10ScCr/PasUnib não tratados receberam óleo mineral pela mesma via e período. Embora o EPA tenha se mostrado mais eficaz que o DFZ em aumentar a força muscular e em reduzir os níveis de creatina quinase no *mdx*, de modo geral os efeitos protetores obtidos com o EPA foram comparáveis aos do DFZ. O EPA e o DFZ diminuíram os níveis de fatores inflamatórios (NF- κ B e TNF- α) envolvidos na degeneração das fibras distróficas. Ambos os fármacos podem estar envolvidos, ainda que indiretamente, no tamponamento do cálcio, embora apenas o EPA tenha reduzido os níveis da calsequestrina esquelética. Tanto o EPA quanto o DFZ podem atuar na estrutura molecular do complexo distrofina-glicoproteínas e assim contribuir para a manutenção da estabilidade do sarcolema.

Palavras-chave: ácido eicosapentaenóico (EPA), deflazacorte, DMD, camundongo *mdx*, distrofia muscular.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked recessive disease that leads to myonecrosis and cardiorespiratory failure. Glucocorticoids are so far the choice treatment for DMD. However their side effects due to continuous use motivate the search for new therapies. Polyunsaturated fatty acids have been used for the treatment of various diseases, through mechanisms poorly understood. In this study, we compared the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and the glucocorticoid deflazacort (DFZ) in the biceps brachii (BB), diaphragm (DIA) and quadriceps femoris (QF) of *mdx* mice. *Mdx* mice received EPA (300 mg / kg) diluted in mineral oil, by gavage, daily, from 14th to 30th day of life. Some *mdx* received DFZ (1.2 mg / kg) diluted in water by the same route and period. Control *mdx* mice and C57BL/10ScCr/PasUnib received mineral oil by the same route and period. Although EPA was more effective than DFZ in improving muscle force and in reducing the levels of creatine kinase, overall the protective effects of EPA were comparable to those of DFZ. Both drugs decreased the levels of inflammatory factors (NF- κ B and TNF- α) involved in the degeneration of dystrophic fibers. EPA also reduced the levels of calsequestrin, suggesting a possible role in calcium buffering. Furthermore, the increased levels of utrophin observed with EPA and DFZ also suggest that these drugs, in addition to their anti-inflammatory properties, can affect the molecular structure of the dystrophin-glycoprotein complex and therefore contribute to the stability of the sarcolemma.

Key words: EPA, deflazacort, DMD, dystrophy, NF- κ B, TNF- α

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD; OMIN 310200), descrita em 1861 por Gillaume Benjamin Amand Duchenne, é a mais comum das distrofias musculares humanas, afetando uma a cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. Os indivíduos acometidos pela DMD apresentam sarcopenia e são diagnosticados clinicamente através da observação dos primeiros sinais da doença, como quedas frequentes, dificuldade para subir escadas, pseudo-hipertrofia dos músculos tríceps sural e deltoide e a realização da manobra de Gower, na qual o paciente se levanta apoiando as mãos nos diferentes segmentos dos membros inferiores, sucessivamente de baixo para cima, como se ascendesse sobre si mesmo. O prognóstico da doença é variável; em média, o paciente fica confinado a cadeira de rodas na pré-adolescência e levado a óbito por comprometimento cardiorrespiratório em torno da segunda ou terceira década de vida (ENGEL et al., 1994; PETROF, 1998; BIGGAR et al., 2006).

A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, causada por mutação do gene responsável pela proteína distrofina. Devido ao seu tamanho e complexidade, o gene da distrofina apresenta frequência elevada de mutações, deleções ou duplicações que alteram a transcrição gênica e a codificação normal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (SEIXAS et al., 1997).

A distrofina associa-se a glicoproteínas para formar o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), que atravessa o sarcolema conectando o citoesqueleto à matriz extracelular da fibra muscular (PETROF, 2002; SPENCER; MELLGREN, 2002). Essa

conexão é prejudicada pela ausência da distrofina, que também desorganiza outros componentes do CDG, tornando o sarcolema instável e propenso a rupturas durante os ciclos de contração e relaxamento que levam a degeneração da fibra muscular (GROUNDS et al., 2005a).

A análise histopatológica do músculo distrófico revela fibras em degeneração e a presença de células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos. A regeneração muscular é notada pela presença de fibras menores com núcleo central, que se originam das células satélites (SCHMALBRUCH, 1984), as quais estão presentes entre a lâmina basal e o sarcolema e proporcionam o crescimento e a regeneração muscular na vida pós-natal. No entanto, a capacidade regenerativa das células satélites diminui com a progressão da doença; assim, as fibras musculares que degeneram são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo e adiposo (HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005).

1.2 Camundongos *mdx*

A linhagem de camundongos denominada C57BL10 *mdx*: “x chromosome-linked muscular dystrophy, descrita em 1984, surgiu por mutação espontânea da linhagem C57BL10/ScSn (BULFIELD et al, 1984). Uma única substituição de base nitrogenada no exon 23 do gene da distrofina causa uma parada prematura da cadeia polipeptídica dessa proteína, permitindo que o *mdx* seja utilizado para estudos dos mecanismos fundamentais da distrofinopatia e para ensaios sobre novas abordagens terapêuticas (CARBERRY et al, 2012).

O camundongo *mdx* apresenta perda da isoforma Dp427 da distrofina, redução de outras glicoproteínas a ela associadas, elevados níveis plasmáticos de creatina quinase indicando reduzida integridade da fibra muscular e grau variável de degeneração muscular, apresentando músculos minimamente afetados, como extraoculares e laríngeos e músculos com mionecrose severa, como o diafragma. Adicionalmente, as fibras musculares apresentam alta suscetibilidade ao choque osmótico e anormalidade no tamponamento de cálcio (CARBERRY et al, 2012).

A degeneração muscular nesses animais tem início por volta dos vinte dias de vida pós-natal, provavelmente devido ao aumento da atividade muscular nesse período (TANABE et al., 1986; CULLEN; JARROS, 1988; DISATNIK et al., 1998). Diferentemente dos pacientes afetados pela DMD, o camundongo *mdx* na fase adulta não apresenta fibrose intensa, uma vez que os músculos regeneram sucessivamente após a necrose (PASTERNAK et al., 1995). O pico de mionecrose ocorre dos trinta e cinco aos noventa dias de vida e após o quarto mês, a presença de fibras necróticas é reduzida (TANABE et al., 1986). Com o envelhecimento, há redução da capacidade regenerativa, provavelmente devido à redução da quantidade e do potencial de proliferação das células satélites (LUZ et al., 2002) e os animais passam então a apresentar fraqueza muscular, perda de fibras musculares e cifose, características patológicas semelhantes às aquelas observadas em humanos distróficos (LEFAUCHEUR et al., 1995).

1.3 A distrofina e o Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG)

A identificação da distrofina e subsequente caracterização do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) foi o primeiro passo para o esclarecimento da patogênese molecular inerente a distrofia muscular. O complexo distrofina-glicoproteínas é composto por várias glicoproteínas que conectam o citoesqueleto a matriz extracelular (COHN & CAMPBELL, 2000) e apresenta três domínios, sendo: um extracelular, um transmembranico e outro submembrana (BROWN & DPHIL, 1997).

O domínio extracelular é composto por lamininas e distroglicanas. A laminina da fibra muscular é um heterodímero composto pelas subunidades $\beta 1$, $\gamma 1$ e $\alpha 2$ que se ligam a distroglicana na superfície da célula muscular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993). A distroglicana é composta por duas subunidades (clivadas a partir de um precursor comum): α (156 kDa) e β -distroglicana (43 kDa) (YOSHIDA et al., 1994). A α -distroglicana se localiza na interface entre a matriz extracelular e o sarcolema, enquanto a β -distroglicana atravessa o sarcolema; essas duas unidades se unem para formar um complexo heterofilo que conecta a matriz extracelular (via $\alpha 2$ -laminina) ao sarcolema (BROWN & DPHIL, 1997).

O domínio transmembranico é constituído pela β -distroglicana e pelo complexo sarcoglicana. As proteínas denominadas α (50 kDa), β (43 kDa), γ (35 kDa), δ (35 kDa) e ϵ (25 kDa)-sarcoglicanas se associam intimamente para formar o complexo sarcoglicana, que encontra-se fracamente ligado a β -distroglicana. Assim como a distrofina, α e γ -sarcoglicanas são expressas exclusivamente nos músculos estriados e liso (ROBERDS et al., 1993, NOGUCHI et al, 1995), contrastando com o padrão da β -sarcoglicana e das

distroglicanas, expressas em múltiplos tecidos (BÖNNEMANN et al., 1995, LIM et al., 1995) Acredita-se que o complexo de sarcoglicanas atravesse o sarcolema e interaja com a distrofina na face citoplasmática do sarcolema (YOSHIDA et al., 1994, SUZUKI et al., 1994).

O domínio submembrana do CDG é composto pela distrofina e pelas sintrofinas. A distrofina é uma proteína do citoesqueleto, de 427 kDa, presente na face citoplasmática do sarcolema e que pode ser encontrada em diversos tipos celulares, como as células musculares, as células da glia, as células de Purkinje e de Schwann (ENGEL et al., 1994). Essa proteína é composta por quatro domínios distintos: uma extremidade amino-terminal (N-terminal), um longo domínio central em forma de haste contendo sítios para ligação com a espectrina, um domínio rico em resíduos de cisteína e uma extremidade carboxi-terminal (C-terminal) (RIBAKOVA et al., 1996). Os sítios para ligação com a F-actina se localizam na região N-terminal e no domínio central, o qual confere flexibilidade à molécula. A cauda citoplasmática da β -distroglicana se liga a região rica em cisteína da distrofina pelo subdomínio WW, enquanto os sítios para ligação com sintrofinas e α -distrobrevina se localizam na extremidade C-terminal (CARMIGNAC & DURBEEJ, 2012).

As sintrofinas são proteínas de 60 kDa, codificadas por diversos genes e que se ligam à região C-terminal da distrofina. A expressão da α -sintrofina é restrita ao músculo esquelético enquanto β 1 e β 2 sintrofinas estão presentes em outros tecidos (ADAMS et al., 1993).

Uma importante função do CDG é conferir estabilidade ao sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento da fibra muscular (PETROF et al., 1993). Além dessa função estrutural e mecânica, o CDG também participa de mecanismos de defesa e da regulação de processos vitais da fibra muscular, tendo a ele associadas moléculas como a calmodulina, a Grb2 e a óxido nítrico sintase (NOS) para revisão ver RANDO, 2001; GAILLY, 2002 e MARQUES, 2004.

A completa perda da distrofina em pacientes com DMD e em camundongos *mdx* perturba a composição estrutural do CDG, reduzindo outros de seus componentes, como a β -dístroglicana e as sarcoglicanas (COHN & CAMPBELL, 2000). Além disso, mutações que afetam as demais proteínas do CDG podem causar formas diferentes de distrofia muscular com herança autossômica (ERVASTI et al., 1990).

O mecanismo através do qual alterações do CDG causam degeneração da fibra muscular não está totalmente elucidado. Acredita-se que a DMD esteja relacionada à fragilidade do sarcolema, ao estresse mecânico e ao maior influxo de cálcio (Ca^{+2}) resultante da disfunção de canais iônicos ou da descontinuidade do sarcolema das fibras distróficas (MOKRI; ENGEL, 1975). Ainda, a alteração da sinalização celular (RANDO, 2001), o aumento do estresse oxidativo e a resposta inflamatória envolvendo o fator de necrose tumoral α (TNF- α), entre outras citocinas, também podem ser relacionados à mionecrose (WHITEHEAD, 2006).

A utrofina (Utr) é uma proteína de 395 kDa, homóloga a distrofina, cujo padrão de expressão difere da distrofina cronológica e topograficamente. Durante o desenvolvimento muscular, a utrofina é expressa pelos mioblastos. No músculo adulto, ela é encontrada em

células satélites e nas junções neuromusculares e miotendíneas (ENGEL et al., 1994). Diferentemente de humanos e camundongos normais, os níveis de utrofina estão elevados em pacientes com DMD e nos camundongos *mdx*, sendo a Utr observada ao longo de todo o sarcolema (KHURANA et al., 1991; PONS et al., 1993). Como a utrofina compartilha muitas propriedades estruturais com a distrofina, ela foi apontada como alternativa terapêutica no tratamento da DMD (MATSUMURA et al., 1992; TINSLEY et al., 1996). De acordo com alguns autores, níveis elevados de Utr poderiam compensar a ausência da distrofina e desta forma proteger o músculo distrófico da degeneração (MATSUMURA et al., 1992).

Considerando-se que alterações moleculares do CDG contribuem para a mionecrose, verificaremos se o ácido eicosapentaenóico (EPA), tal como relatado para o corticóide deflazacorte (DFZ), pode aumentar os níveis de utrofina no sarcolema distrófico, colaborando para a sua estabilidade.

1.4 Fatores envolvidos na degeneração da fibra distrófica: inflamação e regulação do cálcio

A degeneração muscular no camundongo *mdx* é causada pela ausência da distrofina e consequente desorganização do CDG. Essa desorganização fragiliza o sarcolema que sofre microrupturas transitórias causadas pela força contrátil dos sarcômeros durante a contração e relaxamento da fibra (PETROF et al., 1993, GROUNDS et al., 2005). Rupturas da membrana plasmática são evidenciadas pela liberação de conteúdo intracelular para o meio extracelular, como a enzima creatina quinase (CK). Além disso, devido à ausência da

integridade do sarcolema, ocorre entrada de proteínas e íons para o meio intracelular, tais como albumina e íons cálcio (STRAUB et al., 1997, AMTHOR et al., 2004).

O dano à fibra muscular aciona uma resposta inflamatória fundamental para a progressão da mionecrose. Entretanto, essa resposta também é necessária para que ocorra reparo muscular e regeneração através da ativação e proliferação de células satélites (TIDBALL, 2005).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória de particular importância para a mionecrose cujos níveis encontram-se elevados nos pacientes com DMD e nos camundongos *mdx* (GROUNDS, 2008). A ligação do TNF- α ao seu receptor ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B, quando inativo, é encontrado no citoplasma e é composto por três subunidades: p50, p65 e I κ B α (subunidade regulatória). Quando fosforilado, I κ B α sofre degradação proteolítica, permitindo que o NF- κ B entre no núcleo e se ligue a sequências específicas da região promotora de seus genes alvos. Alguns desses genes, como MuRF-1 (muscle ring finger 1), se relacionam com a atrofia muscular e são chamados atrogenes; muitos outros codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, enzimas que geram mediadores da inflamação e moléculas de adesão que desempenham importante papel de recrutamento inicial de leucócitos para os sítios de inflamação. Dentre essas citocinas inflamatórias encontra-se o TNF- α , cujos níveis intracelulares podem ser elevados graças a uma alça de retroalimentação positiva (BARNES et al., 1997).

A atividade do NF- κ B é elevada em camundongos *mdx* (ACHARYYA et al., 2007). De fato, o estresse mecânico em músculos esqueléticos pode ativar a via do NF- κ B,

elevando seus níveis no camundongo *mdx* antes mesmo do início da degeneração muscular, aumentando os níveis de TNF- α e IL-1 β (KUMAR et al., 2003).

Além da inflamação, fatores relacionados à regulação do cálcio intracelular também colaboram para a necrose do músculo distrófico. Camundongos *mdx* apresentam alteração da sinalização dependente de cálcio (ALLEN et al., 2010), elevada concentração de cálcio intracelular, bem como em outros compartimentos celulares, como no retículo sarcoplasmático (RS) e na mitocôndria (MALLOUK et al., 2000). O cálcio bombeado para o RS se liga a calsequestrina (CSQ), principal proteína de tamponamento e estocagem de Ca²⁺ desta organela. Nos músculos distróficos verifica-se redução dos níveis de CSQ e da sua capacidade de se ligar ao Ca²⁺ (CULLIGAN et al., 2002).

O aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular citoplasmático [Ca²⁺]_i ativa calpaínas, resultando em proteólise dos constituintes celulares e ativação da fosfolipase A₂. Esta enzima compromete a integridade da membrana, favorecendo a produção de espécies reativas ao oxigênio. Isto causa peroxidação lipídica e aumento na concentração de Ca²⁺ na mitocôndria (para revisão ver GISSEL, 2005 e WHITEHEAD et al., 2006). Estabelece-se assim um ciclo vicioso em que o acúmulo de cálcio na mitocôndria favorece a produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez estimulam a peroxidação lipídica, causando assim mais danos ao sarcolema da fibra distrófica (GISSEL, 2005) e ativando o NF- κ B (KUMAR et al., 2003) (Figura 1).

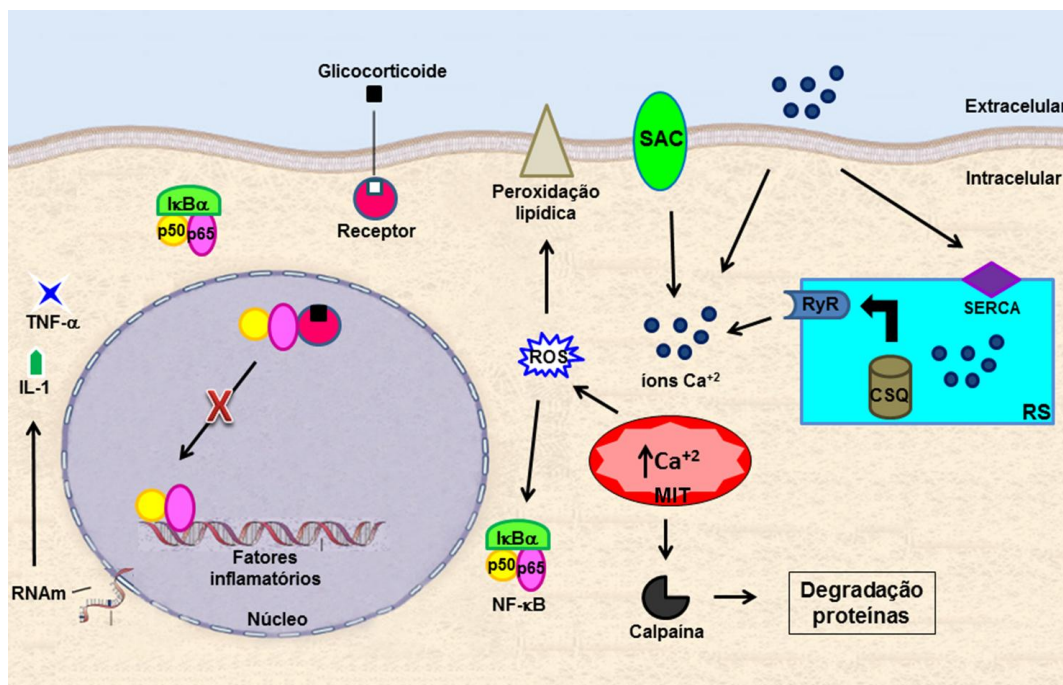


Figura 1. Esquema ilustrando como a via da inflamação e o tamponamento de cálcio se relacionam com a degeneração da fibra muscular distrófica. O estresse mecânico aumenta os níveis de NF-κB (p50, p65 e IκBα) que é translocado para o núcleo, ativando a transcrição de outros fatores inflamatórios, como TNF-α e IL-1, agravando a mionecrose. Essa transcrição pode ser bloqueada pelos glicocorticoides. Além da inflamação, o aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular citoplasmático [Ca^{2+}]_i através dos canais ativado por estiramento (SAC) e microrupturas na membrana, ativa calpaínas, resultando em proteólise dos constituintes celulares e ativação da fosfolipase A_2 . Esta enzima compromete a integridade da membrana, favorecendo a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Isto causa peroxidação lipídica e aumento na concentração de Ca^{2+} na mitocôndria (MIT) e retículo sarcoplasmático (RS). No RS, o influxo e efluxo de cálcio é regulado por receptores rianodina (RyR) e bombas Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA). O cálcio no RS se liga a calsequestrina (CSQ) que contribui para o tamponamento de cálcio no RS.

Assim, considerando que EPA e DFZ melhoram a mionecrose e que esta, por sua vez, é causada tanto pela inflamação quanto por alterações no tamponamento do cálcio intracelular, verificaremos se estes fármacos atuam no fator transcripcional NF-κB (inflamação) e na calsequestrina (tamponamento de cálcio).

1.5 Terapia farmacológica da DMD

Glicocorticoides, como o deflazacorte e a prednisona, são anti-inflamatórios amplamente utilizados para o tratamento da DMD. Eles promovem a manutenção da função muscular (MANZUE et al., 2004) e retardam a evolução da doença. Sugere-se que um dos mecanismos de ação dos glicocorticoides é o aumento da utrofina, proteína homóloga a distrofina, protegendo assim contra a mionecrose (ST-PIERRE et al., 2004). Outro mecanismo é a inibição do influxo de cálcio para o citoplasma das células musculares, o que também contribuiria para reduzir a mionecrose (MOKRI & ENGEL, 1975). Entretanto, o uso contínuo de glicocorticoides promove efeitos colaterais importantes, tais como ganho de peso, síndrome de Cushing, hipocaliemia e osteoporose (TALIM et al., 2002). Na tentativa de encontrar fármacos que possam ser utilizados por tempo prolongado, sem efeitos colaterais, outras drogas são estudadas em modelos experimentais de distrofia (ARCHER et al., 2006; PAYNE et al., 2006).

Ácidos graxos poli-insaturados são constituintes importantes das células. Eles mantêm a fluidez da membrana plasmática, regulam a sinalização celular, a expressão gênica e a função celular (CALDER et al., 2004). Há duas famílias de ácidos graxos poli-insaturados: n-6 (omega-6) e n-3 (omega-3). Os omega-6, como o ácido linoleico, são essenciais para a produção do ácido araquidônico, o qual é metabolizado originando os eicosanóides (prostaglandinas e a prostaciclina). Os eicosanóides são mediadores e reguladores da inflamação (CALDER et al., 2004). Os eicosanóides produzidos a partir de ácidos graxos ômega-6 estimulam a inflamação e a angiogênese tumoral; os produzidos a partir de ácidos graxos ômega-3 são anti-inflamatórios e antiangiogênicos (HARDMAN

WE, 2004). O ácido eicosapentaenóico (ácido *all-cis-5, 8, 11, 14,17*-eicosapentaenóico - EPA) é um ácido graxo poli-insaturado ômega-3 encontrado em grande quantidade em óleo de peixes. Estudos realizados em humanos e em modelos experimentais mostraram grande potencial terapêutico do ômega-3 na prevenção e tratamento de várias doenças, como epilepsia (YUEN et al., 2005), artrite reumatoide (CASTILLERO et al., 2009) e câncer (SPENCER et al., 2009). A incorporação do EPA na membrana plasmática altera a composição e a atividade de seus ácidos graxos (BABCOCK et. al., 2000).

Estudos *in vitro* demonstraram que o EPA diminui a produção de TNF- α por macrófagos, provavelmente por atuar na via de sinalização que envolve o NF- κ B (LO et al., 1999). Assim, o EPA pode reduzir ou inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias e do ácido araquidônico, atuando, portanto, nas vias das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (BABCOCK et. al., 2002), importantes mediadores da inflamação. Em estudo anterior em nosso laboratório demonstramos que o tratamento de camundongos distróficos com EPA reduziu os níveis de TNF- α e protegeu as fibras musculares distróficas da degeneração (MACHADO et al., 2011).

No presente trabalho, realizaremos um estudo comparativo dos efeitos do EPA e do glicocorticoide DFZ. Adicionalmente, aprofundaremos o estudo dos mecanismos de ação destas drogas que concorrem para a proteção contra a mionecrose no camundongo *mdx*, abordando aspectos relacionados ao NF- κ B e às proteínas envolvidas no tamponamento de cálcio e na estabilidade do sarcolema.

2. OBJETIVOS

1. Realizar um estudo comparativo dos efeitos do ácido eicosapentaenóico e do glicocorticoide deflazacorte nos seguintes eventos relacionados à mionecrose em camundongos distróficos:

- a) Inflamação: através dos níveis do TNF- α e do NF- κ B;
- b) Tamponamento de cálcio: através dos níveis da sCSQ;
- c) Estabilidade da membrana: através dos níveis da Utr;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib (*mdx*) e C57BL/10ScCr/PasUnib (controle) obtidos a partir do acasalamento de animais mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, UNICAMP. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), UNICAMP. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas padrão em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo nº 2231-1 da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA-IB-UNICAMP).

3.2 Grupos Experimentais

Grupo *mdx* tratado: composto por animais da linhagem *mdx* (n=32), com tratamento do 14º ao 30º dia de vida pós-natal. Este grupo tem por objetivo observar a ação do DFZ ou do EPA em camundongos *mdx*. Para isso, ele foi subdividido:

Grupo *mdx* (EPA) (n=16): grupo que recebeu 300 mg/Kg/dia de EPA (ácido all-cis-5, 8, 11, 14,17-eicosapentanóico, 98,5% de EPA na composição; densidade do óleo 0,943 g/ml, Fluka/Sigma-Aldrich®) diluído em óleo mineral (Nujol, petrolado líquido para uso via oral

em humanos, Mantecorp, SP, Brasil), via gavagem, no volume de 0.01 ml/gavagem, do décimo quarto ao trigésimo dia de vida.

Grupo *mdx* (DFZ) (n=16): grupo que recebeu dose diária de deflazacorte (1,2 mg/Kg) diluído em água, do décimo quarto ao trigésimo dia de vida pós-natal, via gavagem, no volume de 0.01 ml/gavagem (KEELING et al., 2007).

Grupo *mdx* (*mdx*) (n=16): composto por animais da linhagem *mdx* tratados apenas com óleo mineral via gavagem, da mesma forma que os tratados. Este grupo tem por objetivo observar o nível de progressão da doença, sem o tratamento.

Grupo controle - CTRL (n=16): composto por animais da linhagem C57BL/10ScCr/PasUnib. Este grupo servirá de comparativo aos demais, por não apresentar miopatia.

3.3 Análise Histopatológica

A regeneração foi avaliada através da quantificação de fibras com núcleo central coradas com hematoxilina-eosina (HE). Os valores de regeneração estão expressos em porcentagem do número total de fibras.

Retirada e Processamento dos Músculos - No 30º dia de vida pós-natal, os animais dos grupos *mdx* (n=8), *mdx* EPA (n=8), *mdx* DFZ (n=8) e controle (C57BL/10ScCr/PasUnib; n=8) foram sacrificados com anestesia intraperitoneal de cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg). Os músculos bíceps braquial (BB), diafragma (DIA) e quadríceps femoral (QF) foram retirados e mantidos em solução fisiológica durante

todo o procedimento. Para o congelamento os músculos foram fixados em suportes de madeira com tragacanth gum, imersos em n-hexano (J. T. Baker) à -100°C por 45s e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram armazenados em Biofreezer à -80°C. Para obtenção de cortes em criostato (Microm-HS505E), os músculos foram seccionados transversalmente na espessura de 7µm, à -25°C e colocados quatro cortes por lâmina. Para a contagem de núcleos centrais e periféricos foi realizada coloração de HE. As lâminas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 30s em temperatura ambiente, lavadas em água corrente por 10min, imersas em solução de eosina por 15s, sendo retirado o excesso de eosina em água corrente. As lâminas foram desidratadas em seqüência de álcoois e xilol e montadas com Entellan (Merck).

Observação dos músculos - As lâminas com coloração de HE foram observadas ao microscópio de luz binocular (Carl Zeiss), acoplado a uma objetiva com retículo quadrilátero com 100 pontos. Para a quantificação das fibras musculares utilizou-se um contador manual. As contagens foram feitas às cegas. Para o músculo bíceps braquial, os valores de fibras com NC estão expressos em porcentagem em relação ao número total de fibras. Para o músculo diafragma, a contagem de fibras com NC foi realizada em cinco campos aleatórios por corte e os valores também estão expressos em relação ao número total de fibras.

Na análise qualitativa, o músculo QF apresentou característica histopatológica distinta dos demais músculos estudados, característica esta representada por um aumento aparente da quantidade de fibras em processo de regeneração (Figura 6), tornando-o particularmente interessante para a análise dos efeitos dos fármacos estudados sobre a regeneração muscular das fibras distróficas. Adicionalmente, devido ao expressivo número

total de fibras musculares em um corte (cerca de 7000 – 7500 fibras) quando comparado aos demais músculos (cerca de 1800 no bíceps braquial e 6000 no diafragma), realizamos análise morfométrica das seguintes áreas: 1. áreas com fibras em regeneração; 2. áreas com fibras completamente regeneradas (fibras com núcleo central - NC) e 3. áreas com fibras que ainda não sofreram o processo degenerativo (fibras com núcleo periférico - NP). Estas áreas foram expressas em relação à área total do corte e os dados obtidos em relação ao QF serão, sempre que necessário, discutidos separadamente.

Escolha dos músculos – O músculo BB foi escolhido por representar um músculo dos membros anteriores, o que permitira correlacionar suas características histopatológicas com os dados de força de tração, obtidos dos membros anteriores. O DIA, por apresentar patologia severa com degeneração progressiva, similar à progressão da DMD em humanos, torna-se um modelo ideal para verificar os efeitos de terapias para a DMD. Acredita-se que esta característica seja devida ao trabalho contínuo do músculo para a respiração (STEDMAN et al., 1991) e a diminuição da sua capacidade de regeneração após dano muscular (MATECKI et al., 2004). Em relação ao QF, sabe-se que a degeneração neste músculo inicia-se anteriormente aos demais músculos da pata (MUNTONI et al., 1993). Entretanto, frente à escassa literatura do mdx sobre este músculo, o QF é interessante para estudos comparativos da evolução da doença.

3.4 Determinação de Creatina quinase (CK)

A quantificação de CK no plasma sanguíneo é um dos parâmetros utilizados para o estudo da degeneração muscular. Quando ocorre lesão no músculo esquelético ocorre liberação de CK na corrente sanguínea.

A creatina quinase (CK) é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo fosfato entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP). Os produtos desta reação são a creatina, que pode ser reaproveitada pela célula, e a adenosina trifosfato (ATP), que se encontra disponível para reações dependentes de energia na célula. O ATP reage com a glicose na presença da enzima hexoquinase formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato, na presença da glicose-6-fosfato-desidrogenase, é oxidada a 6-fosfogluconato e reduz o NAD à NADH, aumentando a absorvância em 340nm ou 365nm proporcionalmente à atividade da CK na amostra. Para observar a ação do tratamento sobre a degeneração muscular, realizamos a quantificação de CK nos grupos *mdx* (n=8), *mdx* EPA (n=8), *mdx* DFZ (n=8) e controle (C57BL/10ScCr/PasUnib; n=8) dos mesmos animais que foram utilizados para a técnica de Immunoblotting. No trigésimo dia de vida pós-natal, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg) e o sangue coletado por punção cardíaca. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 939g e 4°C por 10 minutos. O plasma foi separado e utilizado para quantificação de CK (kit comercial de CK-NAC – Bioclin). As absorvâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro UV com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

3.5 Medida da força de tração

Oito camundongos de cada grupo foram utilizados para medida de força dos membros anteriores no início (14° dia de vida) e final (30° dia de vida) do tratamento. Foi utilizado um aparelho de medida de força horizontal (Newprimer®, São Paulo, Brasil). Os animais foram estabilizados pela cauda e estimulados a segurar uma tela de nylon ligada a um transdutor, que transmite a força de tração dos membros anteriores para o aparelho. Foram realizadas cinco medidas de força para cada animal. Os valores assim obtidos foram normalizados pelo peso e utilizados para composição da média de cada animal, sendo o resultado final expresso em g/g (TANIGUTI et al., 2011).

3.6 Immunoblotting

Para verificar se os tratamentos com EPA e DFZ alteram os níveis de fatores inflamatórios, de proteínas do CDG e de proteínas reguladoras de cálcio foi realizada a técnica de immunoblotting para quantificação do TNF- α (22 kDa), do NF- κ B (65 kDa), da sCSQ (72 kDa) e da Utr (395 kDa).

Anticorpos primários:

1. Rabbit anti-mouse tumor necrosis factor-alfa polyclonal antibody - TNF-alfa Anticorpo (Millipore).
2. Rabbit anti-mouse nuclear factor – NF- κ B p65 (Rel A) Anticorpo Rockland.
3. Rabbit anti-mouse Calsequestrin (monoclonal VIIIID12, Affinity BioReagents).

4. Mouse Anti-mouse Utrophin (DRP2-CE-S), Novocastra.
5. Rabbit anti-mouse Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase GAPDH; rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia.

Anticorpos secundários:

1. Anti-mouse IgG (whole molecule) FITC Conjugate antibody developed in goat; F-0257; Sigma.
2. Anti-rabbit IgG (whole molecule) developed in goat; 04-15-06, Sigma.

Preparação de Extrato Total - Os músculos foram retirados como descrito previamente. Em seguida, foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente em tampão Tris-HCl 100mM pH 7,4 contendo Triton X-100 1%, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/mL de aprotinina, a 4°C com homogeneizador do tipo Polytron PTA 20S (PT 10/35; Brinkmann Instruments) operado em velocidade máxima por 30s. Os extratos foram centrifugados a 12581g a 4°C por 20min e o sobrenadante utilizado. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

Quantificação das proteínas por Immunoblotting - As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão fosfato de sódio 1 M pH 7,0 contendo azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50% e SDS 10% e ditiotretitol 100mM (LAEMMLI, 1970), aquecidas a 100°C por 5min em banho seco. Em seguida, 30µg ou 60µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida em aparelho para eletroforese mini-Protean (Bio-Rad). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90min a 120V (constante) em

aparelho de transferência. As membranas foram incubadas com solução basal (Tris 10mM, contendo cloreto de sódio 150mM, Tween-20 0,02% e 5% de leite desnatado), por 1h em temperatura ambiente para reduzir as ligações inespecíficas de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário diluído em solução basal contendo 3% de leite desnatado em temperatura ambiente, *overnight*, em agitador mecânico. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30min com solução basal e incubadas com anticorpo secundário diluído em solução basal contendo 3% de leite desnatado por 90min em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30min com solução basal. As diluições dos anticorpos primários e secundários foram definidas para cada proteína de acordo com a marcação obtida.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimiluminescência (Pierce) por 5min e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Maryland-USA). As densidades das bandas foram quantificadas pelo software de análise GeneTools (Syngene, Maryland-USA).

Após captação das imagens da proteína de interesse, as membranas foram lavadas com solução basal (3x10 minutos) e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7.5; β -Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1h, a 60°C. Em seguida, realizou-se incubação em Tris-HCl 1M pH 7.5 por 30min para neutralizar o *stripping*. As membranas foram lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes

condições fisiológicas. As bandas marcadas com GAPDH foram utilizadas para normalização das bandas das demais proteínas.

3.7 Análise estatística

O estudo da comparação entre grupos foi realizado através das variáveis: peso corporal (g), força de tração (g/g), níveis plasmáticos de creatina quinase (U/L), porcentagem de fibras com núcleo central, periférico e área de fibras em regeneração e comparação dos níveis proteicos de NF- κ B, TNF- α , sCSQ e Utr determinados pelo Immunoblotting. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey. Todas as análises foram realizadas com nível de significância menor ou igual a 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal

No início do tratamento, não houve diferença significativa de peso corporal entre os grupos estudados. Houve aumento significativo de peso ao final do tratamento dentro de cada grupo estudado. Ao final do tratamento, o peso dos animais do grupo tratado com EPA foi 35,5% menor que o peso dos animais do grupo *mdx* ($p < 0,01$). O peso final dos animais do grupo tratado com DFZ foi semelhante ao peso final do grupo *mdx*. O peso final dos animais do grupo *mdx* EPA foi 23,7% menor que o peso final do grupo *mdx* DFZ ($p < 0,01$) (Figura 2).

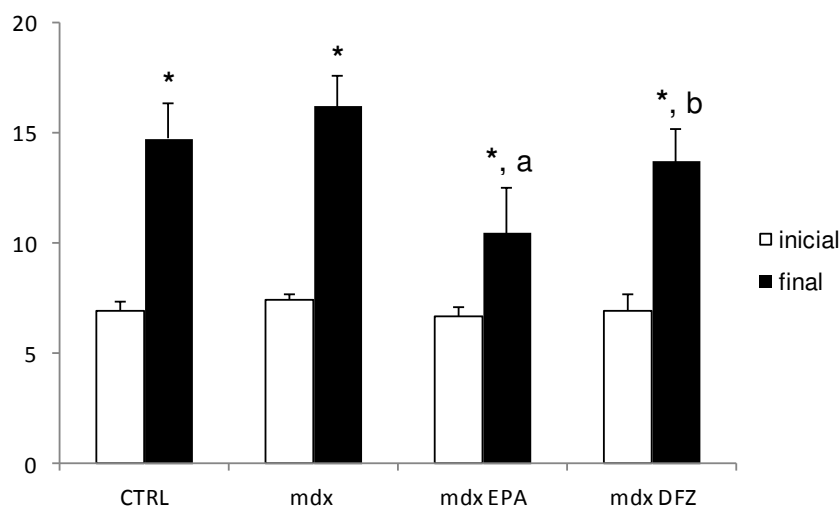


Figura 2: Peso (g) no início e término do tratamento. Diferença significativa do início do tratamento (*), do grupo *mdx* (a) e do grupo *mdx* EPA(b); ($p \leq 0,05$, ANOVA).

4.2 Medida da Força de tração

O tratamento com EPA aumentou a força de tração ($2,69 \pm 0,71$) de camundongos *mdx* de 30 dias em comparação aos *mdx* não tratados ($2,21 \pm 0,21$; $p < 0,01$); o que não foi observado no tratamento com DFZ ($1,88 \pm 0,57$). Adicionalmente, a força de tração dos animais do grupo *mdx* EPA ao final do tratamento foi maior em comparação a força dos animais do grupo *mdx* DFZ ($p < 0,01$). O tratamento com EPA foi capaz de aumentar a força de tração dos animais *mdx* para níveis comparáveis aos dos animais CTRL ($2,74 \pm 0,43$) (Figura 3).

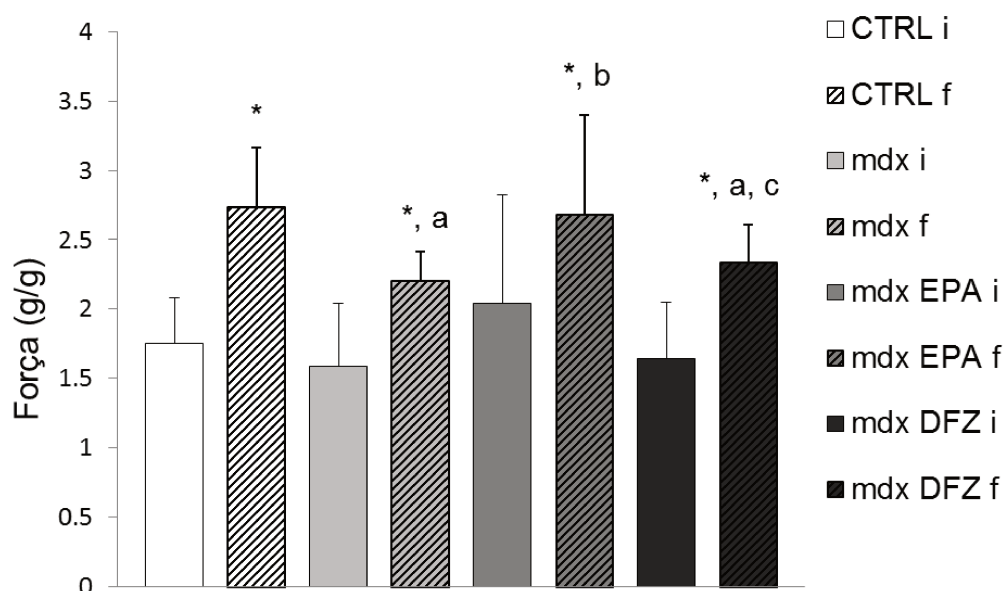


Figura 3. Efeito do tratamento com EPA e DFZ na força de tração dos membros torácicos. Diferença significativa do valor inicial (*), diferença significativa do CTRL f (a), diferença significativa do *mdx* f (b), e diferença significativa do *mdx* EPA f (c); $p \leq 0,05$, ANOVA).

4.3 Níveis plasmáticos de CK

Animais *mdx* apresentaram níveis de CK quatro vezes maiores que os animais controle. O tratamento com EPA reduziu em 56% os níveis de CK em comparação ao grupo *mdx* não tratado ($p < 0,01$). O tratamento com DFZ reduziu a CK em 24%, mas essa redução não foi estatisticamente significante (Tabela 1).

Tabela 1: Média dos valores de CK (U/L) de camundongos de 30 dias dos grupos CTRL, *mdx*, *mdx* EPA e *mdx* DFZ, Média \pm desvio padrão (dp). Diferença significativa do grupo CTRL (a), do grupo *mdx* (b) e do grupo *mdx* EPA (c).

	média \pm dp
CTRL	334,59 \pm 108,60
<i>mdx</i>	1481,76 ^a \pm 175,93
<i>mdx</i> EPA	648,58 ^b \pm 437,13
<i>mdx</i> DFZ	1127,23 ^c \pm 293,98

4.4 Análise Histopatológica Qualitativa dos músculos BB e DIA

Os músculos BB (Figura 4) e DIA (Figura 5) de animais controles apresentaram fibras musculares eosinófilas, de formato poligonal e com núcleo periférico, justapostas a outras fibras de mesma característica.

Nos animais *mdx*, os músculos estudados apresentaram áreas de inflamação, inflamação/regeneração, fibras com núcleo periférico e fibras completamente regeneradas (com núcleo central). Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, cromatina condensada, citoplasma eosinófilo e diâmetro próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico. Fibras em degeneração e intenso infiltrado inflamatório

foram observadas mais frequentemente no camundongo *mdx* (Figura 4, *mdx*). Áreas de inflamação/regeneração apresentaram pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade (Figura 4, *mdx* EPA e *mdx* DFZ).

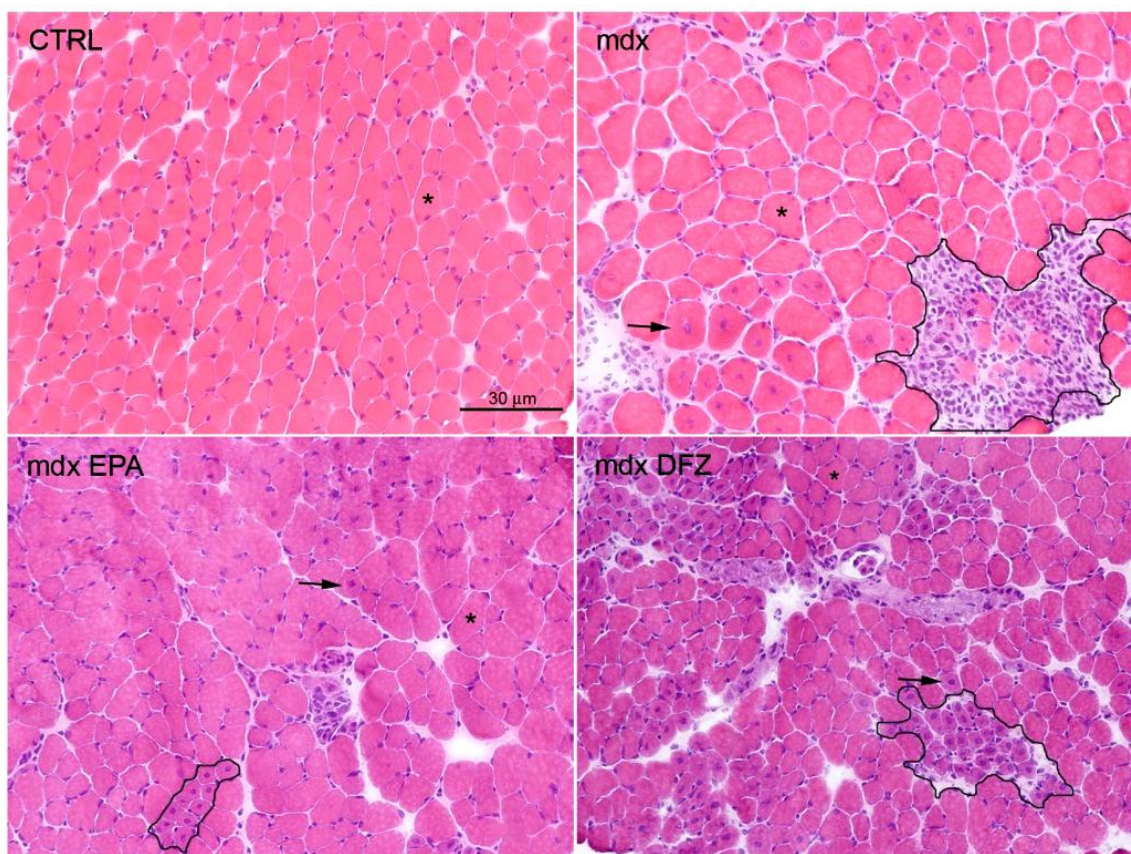


Figura 4: Histopatologia do músculo bíceps braquial. Secções transversais do músculo bíceps braquial de camundongos controle C57BL/10ScCr/PasUnib (CTRL), *mdx* tratados com nujol (*mdx*), *mdx* tratados com ácido eicosapentanóico (*mdx* EPA) e com deflazacorte (*mdx* DFZ). (*) Fibras com núcleo periférico. Setas: Fibras com núcleo central. Áreas circundadas: área de inflamação/regeneração. H&E.

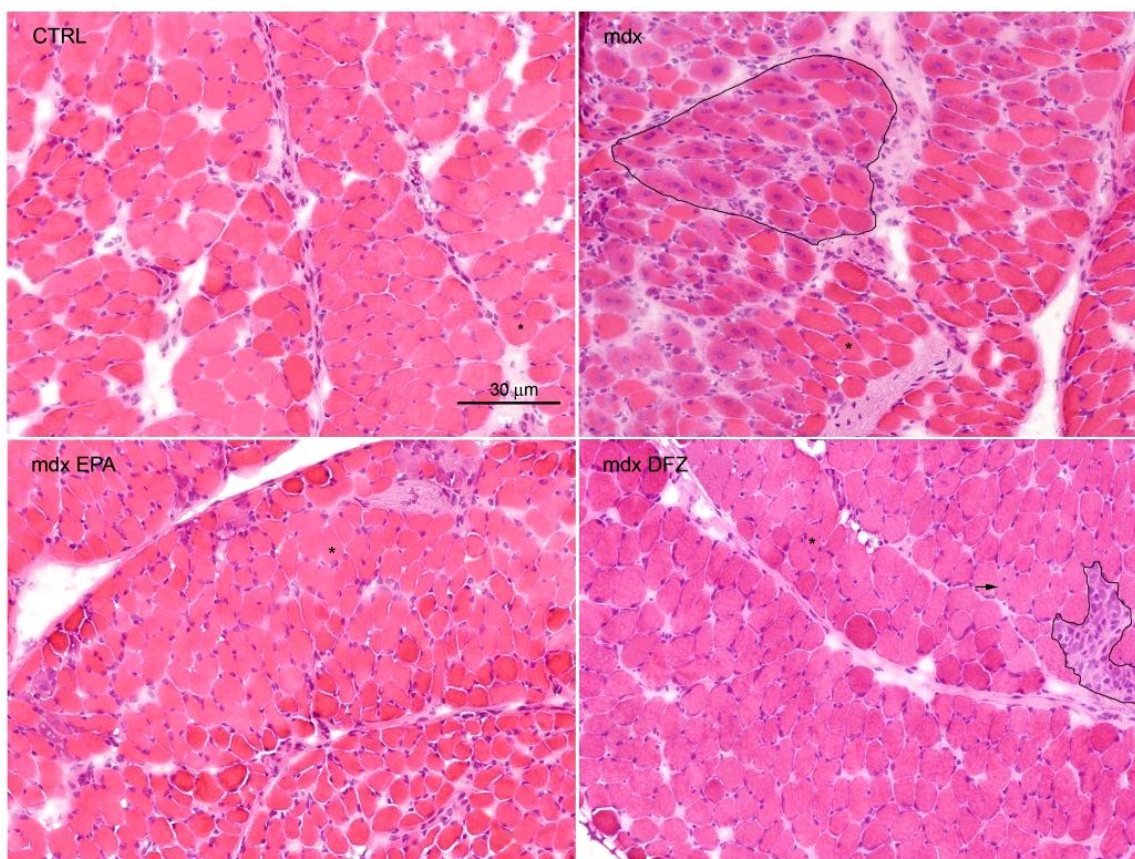


Figura 5: Histopatologia do músculo diafragma. Secções transversais do músculo diafragma de camundongos C57BL/10ScCr/PasUnib (CTRL), *mdx* tratados com nujol (*mdx*), tratados com ácido eicosapentanóico (*mdx* EPA) e com deflazacorte (*mdx* DFZ). (*) Fibras com núcleo periférico. Setas: Fibras com núcleo central. Áreas circundadas: área de inflamação/regeneração. H&E.

4.5 Análise Histopatológica Qualitativa do músculo QF

O músculo QF do grupo controle apresentou fibras de formato poligonal, com núcleo periférico e citoplasma eosinófilo, justapostas a outras fibras com características semelhantes. Já no grupo *mdx*, notamos áreas de inflamação, grandes áreas de inflamação/regeneração, fibras com NP e fibras completamente regeneradas (com NC).

Fibras em degeneração e intenso infiltrado inflamatório foram observadas mais frequentemente no grupo *mdx* (Figura 6, *mdx*). Grandes áreas de fibras com NC foram observadas no grupo *mdx* EPA (Figura 6, *mdx* EPA).

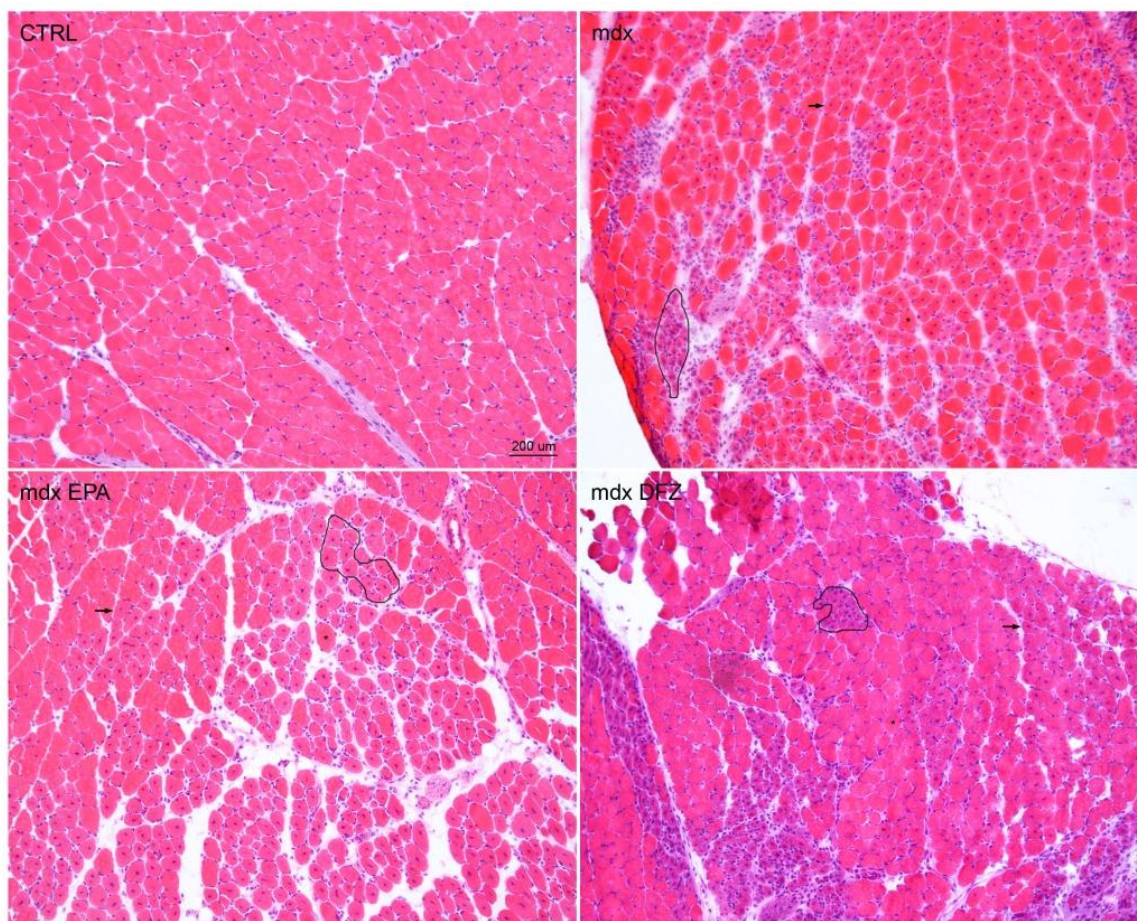


Figura 6. Histopatologia do músculo quadríceps femoral (QF). Secções transversais do músculo QF de camundongos C57BL/10ScCr/PasUnib (CTRL), *mdx* tratados com nujol (*mdx*), tratados com ácido eicosapentanoico (*mdx* EPA) e com deflazacorte (*mdx* DFZ). (*) Fibras com núcleo periférico. Setas: Fibras com núcleo central. Áreas circundadas: área de inflamação/regeneração. H&E.

4.6 Análise Histopatológica Quantitativa dos músculos BB e DIA

Para análise quantitativa dos músculos BB e DIA foram utilizados os seguintes parâmetros: número total de fibras musculares, porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP) e porcentagem de fibras com núcleo central (%NC). Os resultados são apresentados na tabela 2.

O BB e o DIA de camundongos controles praticamente não apresentaram fibras com NC. Aproximadamente, 20% das fibras do músculo BB e 12% das fibras do músculo DIA apresentaram NC no grupo *mdx*.

Os tratamentos com ácido eicosapentaenóico (EPA) e deflazacorte (DFZ) reduziram em 45,5% e 36,5%, respectivamente, a porcentagem de fibras com NC do músculo BB. Para o músculo DIA, a redução na porcentagem de fibras com NC foi de 93% (EPA) e 55,5% (DFZ).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão das porcentagens de fibras com núcleo central (%NC), núcleo periférico (%NP) e do número total de fibras dos músculos distróficos bíceps braquial (BB) e diafragma (DIA) dos grupos CTRL, *mdx*, *mdx* EPA e *mdx* DFZ; diferença significativa do grupo CTRL (a), do grupo *mdx* (b) e do grupo *mdx* EPA (c).

		% NP	% NC	Total
BB	CTRL	99,50 \pm 0,15	0,50 \pm 0,15	1663 \pm 274,49
	<i>Mdx</i>	79,43 ^a \pm 7,86	20,57 ^a \pm 7,86	896 \pm 121,69
	<i>mdx</i> EPA	88,92 ^b \pm 5,15	11,08 ^b \pm 5,15	1226 \pm 368,74
	<i>mdx</i> DFZ	86,98 ^b \pm 3,03	13,02 ^b \pm 3,03	1276 \pm 386,63
DIA	CTRL	100,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	6000 \pm 0,00
	<i>mdx</i>	88,28 ^a \pm 3,70	11,72 ^a \pm 3,70	6000 \pm 0,00
	<i>mdx</i> EPA	99,19 ^b \pm 0,60	0,81 ^b \pm 0,60	6000 \pm 0,00
	<i>mdx</i> DFZ	94,79 ^{b,c} \pm 1,16	5,21 ^{b,c} \pm 1,16	6000 \pm 0,00

4.7 Análise Histopatológica Quantitativa do músculo QF

Para análise quantitativa do músculo QF foram utilizados os seguintes parâmetros: áreas com fibras em regeneração, áreas com fibras completamente regeneradas (fibras com núcleo central - NC) e áreas com fibras que ainda não sofreram o processo degenerativo (fibras com núcleo periférico - NP). Os resultados são apresentados na tabela 3.

O músculo QF dos animais controle apresentou 100% de fibras com núcleo periférico. No QF do grupo *mdx*, as áreas contendo fibras com NC, NP e em regeneração foram de 8,5%, 70,28% e 15,70%, respectivamente. O tratamento com DFZ não alterou essas porcentagens. O tratamento com EPA reduziu o NP em 53,8% ($p < 0,01$) e aumentou a regeneração em 240% ($p < 0,01$).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão das áreas contendo fibras com núcleo central (%NC), núcleo periférico (%NP) e em regeneração (%REG) do músculo quadríceps femoral (QF) dos grupos CTRL, *mdx*, *mdx* EPA e *mdx* DFZ. Diferença significativa ($p \leq 0,05$, ANOVA) do grupo CTRL (a) e do grupo *mdx* (b).

		% NP	% NC	% REG
QF	CTRL	100,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	<i>mdx</i>	70,28 ^a \pm 6,46	8,51 ^a \pm 5,81	15,70 ^a \pm 7,03
	<i>mdx</i> EPA	32,47 ^b \pm 9,00	9,81 \pm 4,87	53,46 ^b \pm 8,70
	<i>mdx</i> DFZ	67,50 \pm 4,45	3,77 \pm 1,80	22,58 \pm 2,54

4.8 Immunoblotting

4.8.1 Quantificação do NF- κ B

Os níveis de NF- κ B do músculo BB de camundongos *mdx* foram 85,5% maiores que os de animais controle. Os tratamentos com EPA e DFZ reduziram os níveis de NF- κ B em 41,7% e 73,5%, respectivamente (Figura 7).

Os níveis de NF- κ B do músculo QF de animais controle e *mdx* foram semelhantes. Os tratamentos com EPA e DFZ reduziram os níveis de NF- κ B em 35,8% e 31%, respectivamente (Figura 7).

O músculo DIA de camundongos *mdx* apresentou níveis de NF- κ B 42,5% maiores que os animais controle. Os tratamentos com EPA e DFZ reduziram os níveis de NF- κ B em 31,5% e 31%, respectivamente (Figura 7).

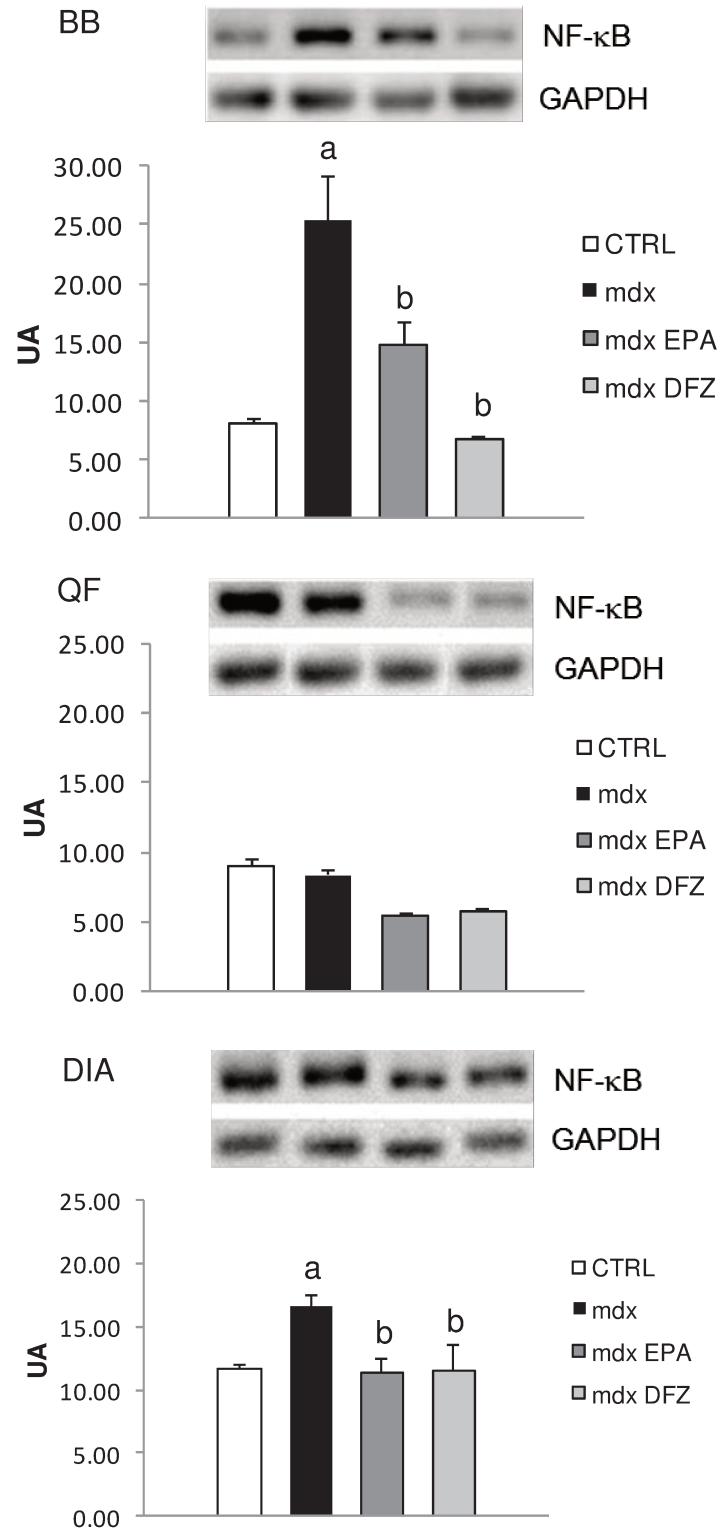


Figura 7. Análise por imunoblotting dos níveis de NF-κB nos músculos bíceps braquial (BB), quadríceps femoral (QF) e diafragma (DIA) dos grupos controle CTRL, *mdx*, EPA e DFZ. Diferença significativa do grupo CTRL (a) e do grupo *mdx* (b); $p \leq 0,05$; ANOVA). UA: unidades arbitrárias.

4.8.2 Quantificação do TNF- α

Os níveis de TNF- α do músculo BB de camundongos *mdx* foram 56,7% maiores que os de animais controle. Apenas o tratamento com EPA reduziu os níveis de TNF- α em 44,8% (Figura 8).

Os níveis de TNF- α do músculo QF dos animais *mdx* foram 48,6% maiores em comparação aos animais controle. O tratamento com DFZ reduziu os níveis desse fator em 20% em comparação aos animais *mdx* não tratados. O EPA não alterou os níveis de TNF- α neste músculo (Figura 8).

O músculo DIA de camundongos *mdx* apresentou um aumento de 22,5% nos níveis de TNF- α comparado ao dos animais controle. Houve redução de 25% nos níveis desse fator nos grupos tratados com EPA e DFZ em comparação aos animais *mdx* não tratados (Figura 8).

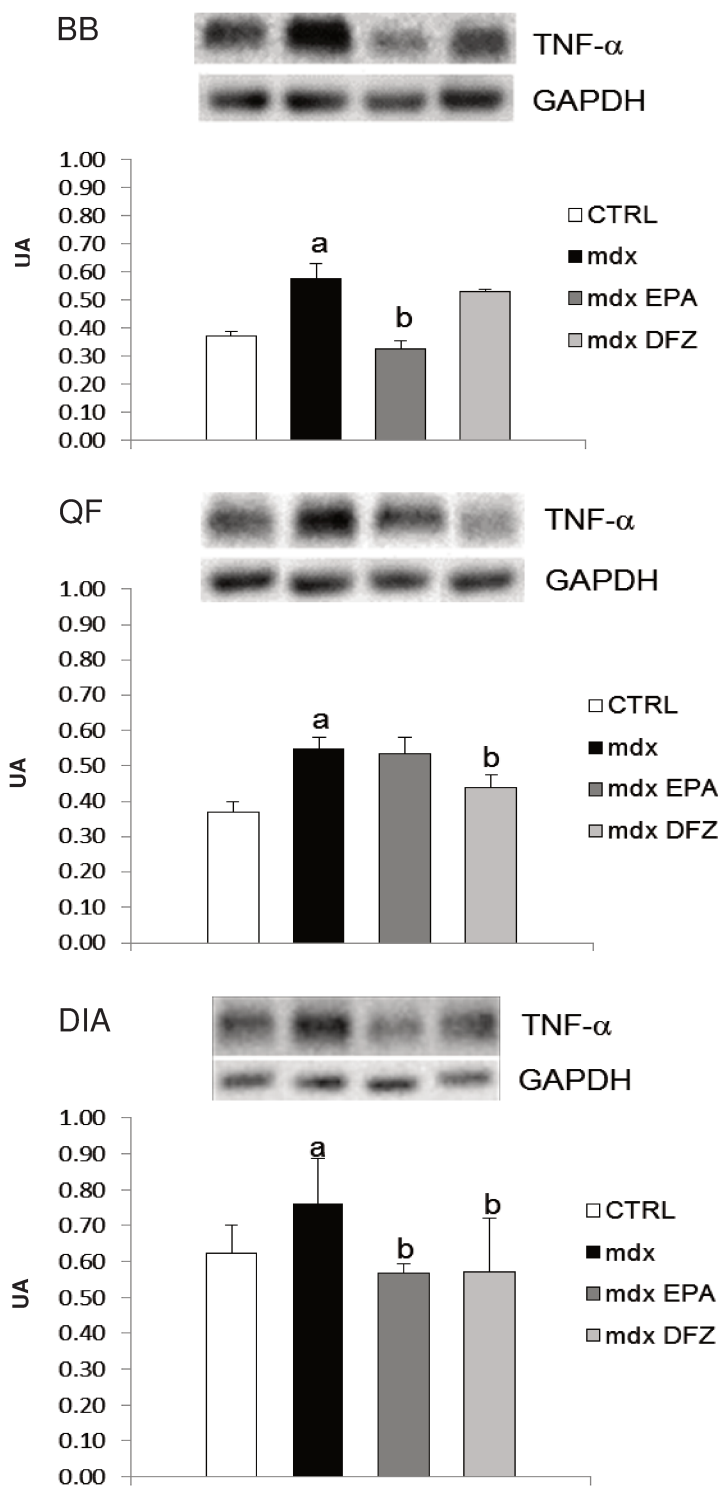


Figura 8. Análise por imunoblotting dos níveis de TNF- α no músculo bíceps braquial (BB), quadríceps femoral (QF) e diafragma (DIA) dos grupos controle CTRL, *mdx*, EPA e DFZ. Diferença significativa do grupo CTRL (a) e do grupo *mdx* (b); ($p \leq 0,05$; ANOVA). UA: unidades arbitrárias.

4.8.3 Quantificação da Calsequestrina esquelética (sCSQ)

Os músculos BB, DIA e QF dos grupos CTRL e *mdx* apresentaram níveis semelhantes de sCSQ. O tratamento com DFZ não alterou os níveis de sCSQ em nenhum dos músculos estudados. O tratamento com EPA reduziu os níveis dessa proteína em 59,5% apenas no músculo DIA ($p < 0,01$) (Figura 9).

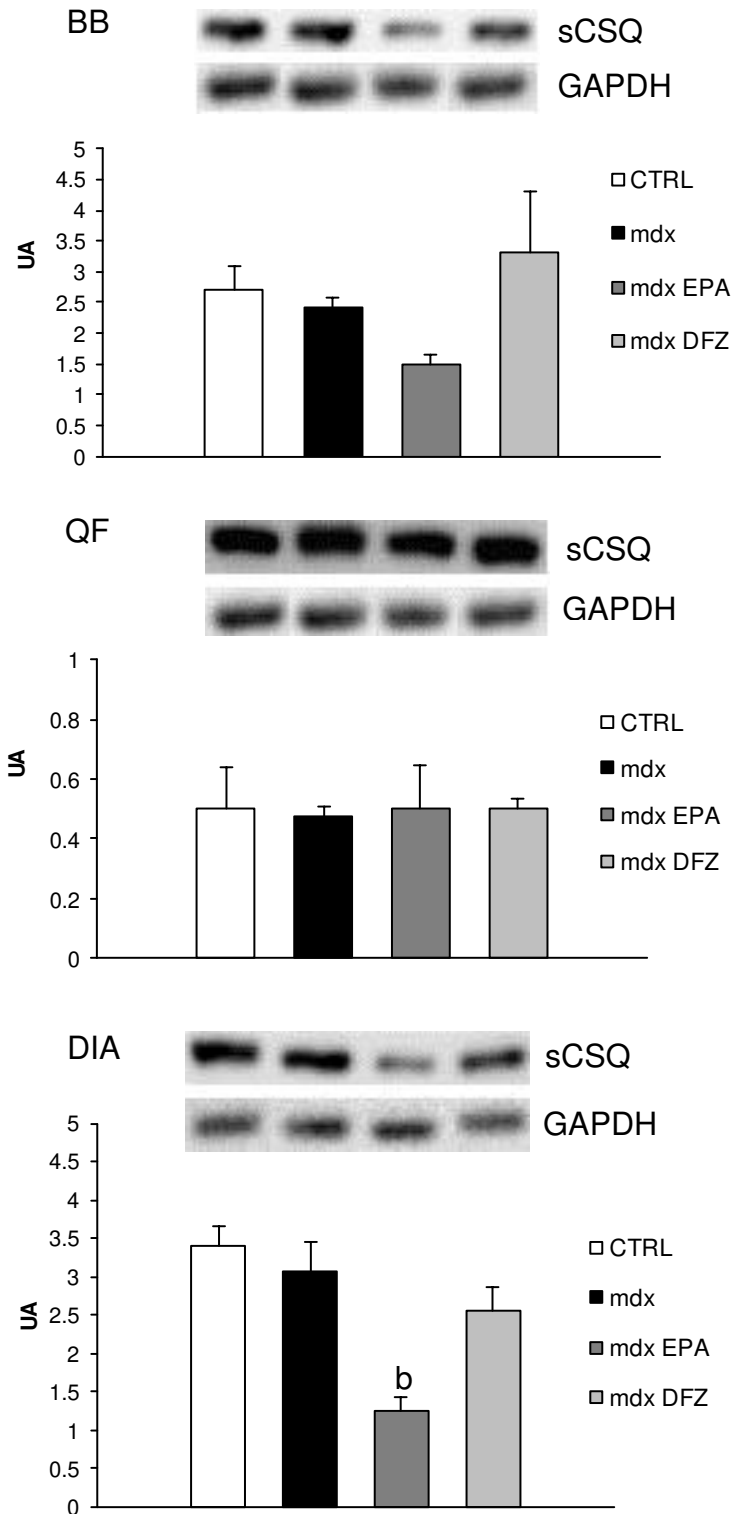


Figura 9. Análise por imunoblotting dos níveis de sCSQ nos músculos bíceps braquial (BB), quadríceps femoral (QF) e diafragma (DIA) dos grupos controle CTRL, *mdx*, EPA e DFZ. Diferença significativa do grupo *mdx* (b); ($p \leq 0,05$; ANOVA). UA: unidades arbitrárias.

4.8.4 Quantificação da Utr

A análise da Utr indicou que os músculos BB, QF e DIA do grupo CTRL e *mdx* apresentaram níveis semelhantes desta proteína. Os tratamentos com EPA e DFZ aumentaram os níveis dessa proteína em 79,7% ($p=0,01$) e 157,9% ($p<0,001$), respectivamente apenas no músculo DIA (Figura 10).

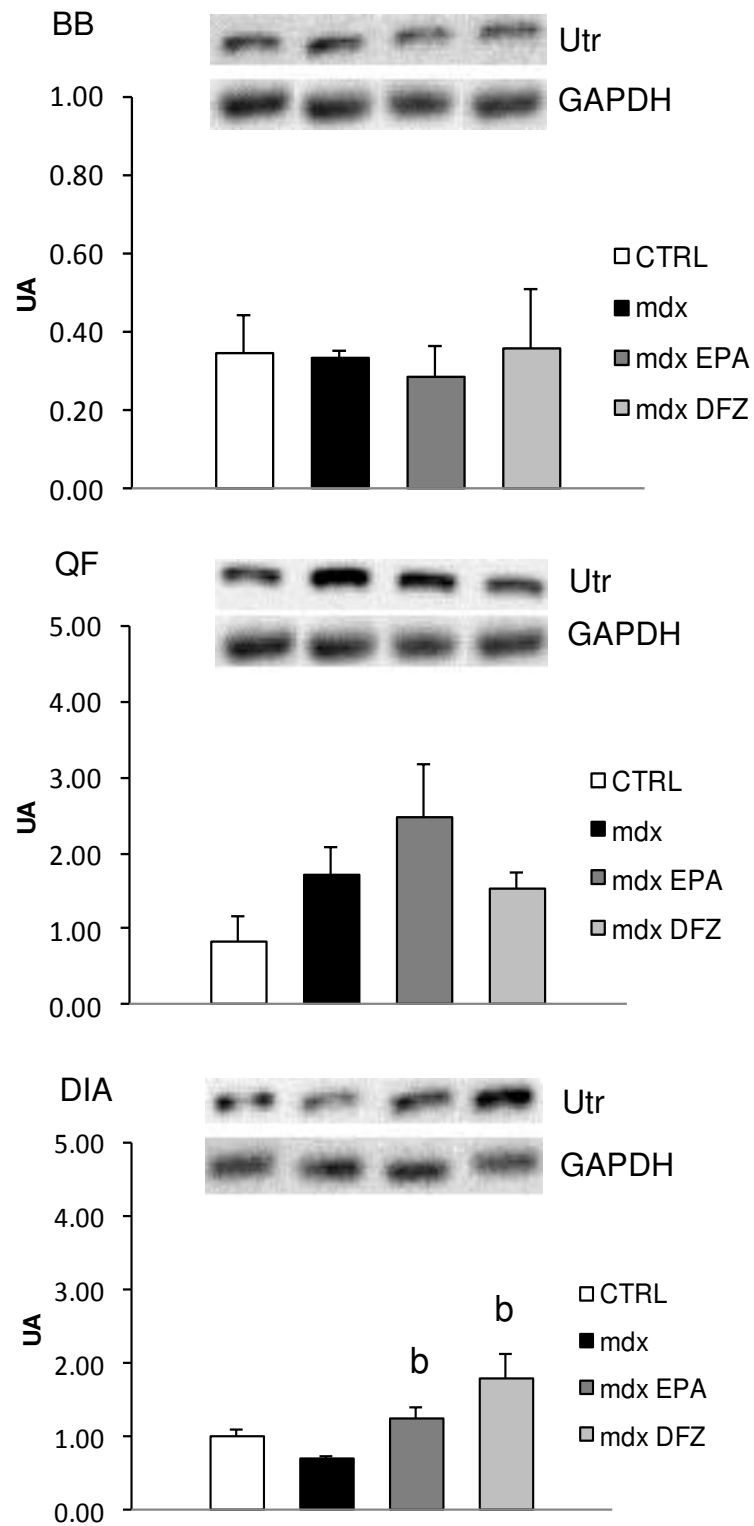


Figura 10. Análise por imunoblotting dos níveis de Utr nos músculos bíceps braquial (BB), quadríceps femoral (QF) e diafragma (DIA) dos grupos controle CTRL, *mdx*, EPA e DFZ. Diferença significativa do grupo *mdx* (b); $p \leq 0,05$; ANOVA). UA: unidades arbitrárias.

5. DISCUSSÃO

Anti-inflamatórios esteroides como a prednisolona são amplamente utilizados como terapia para a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), mas o seu uso prolongado provoca efeitos colaterais significativos (DESILVA et al., 1987). Com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, como ganho de peso e a perda óssea, o glicocorticoide deflazacorte, derivado da prednisolona, começou a ser usado amplamente no tratamento da DMD. Entretanto, seus mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos (ANGELINI C., 2007). Algumas hipóteses incluem redução da degeneração (GAUD et al., 2004), da mionecrose e da inflamação, modulação da resposta celular à inflamação e aumento da proliferação de células precursoras miogênicas ou mioblastos, aumentando, portanto a regeneração (PASQUINI et al., 1995; RIFAI et al., 1995).

Muitos estudos demonstraram efeitos benéficos do ácido eicosapentaenóico (EPA) no tratamento de algumas doenças como epilepsia (SCHLANGER et al., 2002) e doenças cardiovasculares (HARPER et al., 2006). O EPA é um agente anti-inflamatório não hormonal encontrado em concentração elevada em óleo de peixes (BABCOCK et. al., 2000; CALDER et. al., 2004) que reduz citocinas pró-inflamatórias (BABCOCK et. al., 2000) envolvidas na resposta inflamatória e que acentuam a mionecrose dos músculos esqueléticos dos *mdx* (TIDBALL, 2005).

Para compararmos adequadamente a potência dos fármacos utilizados neste estudo (EPA e DFZ), seria importante empregarmos, para ambos, doses equivalentes e mínimas necessárias que promovessem, por exemplo, diminuição da CK. Adicionalmente, efeitos colaterais também deveriam ser analisados, o que nos forneceria um quadro mais completo

desta análise comparativa. Entretanto, no presente trabalho optamos por doses padronizadas na literatura e classicamente utilizadas em nosso laboratório, bem como em trabalhos de outros pesquisadores: EPA (300 mg/kg/dia) (MACHADO et al., 2011) e de DFZ (1,2 mg/kg/dia) (KEELING et al., 2007). Esta conduta nos permitiu comparar dados por nós obtidos anteriormente, bem como de outros trabalhos publicados na área. Ademais, como as doses aqui utilizadas exercem seu efeito protetor no tratamento de camundongos *mdx*, nosso estudo comparativo não fica invalidado. Quanto aos efeitos colaterais, entendemos que seria difícil tecer comparação com os possíveis efeitos em humanos, visto as diferenças de metabolismo e evolução da doença, mas seria um enfoque importante em estudos futuros.

5.1 Peso corporal

Camundongos distróficos tratados com 300mg/kg de EPA apresentaram menor peso corporal ao final do tratamento quando comparados aos camundongos *mdx* que receberam apenas óleo mineral. Essa diferença, entretanto, não foi observada no grupo tratado com DFZ. Esses dados diferem da literatura, que não relata alteração na taxa crescimento de camundongos *mdx* tratados com EPA pela mesma via, período e dose (MACHADO et al., 2011). Alguns trabalhos na literatura relatam que o tamanho da ninhada pode interferir na taxa de alimentação e ganho de peso da prole (PLAGEMANN et al., 1999). Durante todo o tratamento (14° ao 30° dia de vida), os animais foram mantidos com a mãe, uma vez que o desmame ocorre por volta do 20° ao 25° dia de vida. Portanto, como o tamanho da ninhada

no grupo tratado com EPA foi de oito filhotes, é possível que isso tenha interferido no ganho de peso dos animais, visto que nos demais grupos as ninhadas tinham de quatro a cinco animais.

Estudos anteriores relataram ganho de peso em pacientes distróficos tratados com DFZ somente a partir dos seis meses de tratamento (BONIFATI et al., 2000). Provavelmente devido ao curto período de tratamento, não observamos ganho excessivo de peso corporal no grupo tratado com DFZ.

5.2 Níveis Plasmáticos de Creatina quinase e Força de tração

A creatina quinase (CK) é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo fosfato entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP), produzindo creatina, que pode ser reaproveitada pela célula e adenosina trifosfato (ATP), que se encontra disponível para reações dependentes de energia na célula.

Os valores de CK no soro podem sofrer alterações em caso de lesão muscular aguda ou esforço muscular intenso e seus níveis encontram-se altos após realização de atividade física e em indivíduos portadores de doenças neuromusculares, como miosite e distrofia muscular (KATIRJI, 2001). Os níveis de CK apresentam considerável variação individual e assim devem servir apenas como análise complementar para o diagnóstico e monitoramento da evolução das doenças neuromusculares.

A CK encontra-se de cinquenta a cem vezes acima dos limites superiores dos valores de referência em pacientes distróficos (ENGEL et al., 1994) e também se mostra elevada durante toda a vida dos animais *mdx* (YOSHIDA et al., 2006).

Nossos resultados demonstram que os animais dos grupos tratados com EPA e DFZ apresentaram diminuição dos valores de CK quando comparados ao *mdx*. Estes achados estão de acordo com a literatura, que relata proteção contra a mionecrose em camundongos tratados com EPA (MACHADO et al., 2011) e com DFZ (MESSINA et al., 2009; ARCHER et al., 2006). Adicionalmente, o EPA mostrou-se mais eficaz que o DFZ, pois reduziu os níveis plasmáticos de CK em 56%, enquanto que a redução com o DFZ foi de 24%, $p < 0,05$.

De acordo com a literatura, o tratamento de pacientes distróficos com 0,9 mg/kg de deflazacorte foi capaz de retardar a perda de deambulação e aumentar a força muscular (HOUDE et al., 2008). Não há relato na literatura de que o tratamento com EPA possa aumentar a força muscular. De acordo com nossos dados, apenas o EPA aumentou a força de tração de camundongos *mdx* de 30 dias, $p < 0,01$).

Concluindo, estes dados mostram que o EPA, na dose de 300mg/kg/dia, foi mais eficaz que o DFZ, na dose de 1,2 mg/kg/dia, em reduzir a CK e melhorar a força muscular de camundongos distróficos, sugerindo que o EPA possa ser uma alternativa para a terapia das distrofinopatias.

5.3 Efeitos do EPA e DFZ sobre a mionecrose dos músculos BB e DIA

Os tratamentos com EPA e DFZ aumentaram a porcentagem de fibras com NP (fibras que não sofreram degeneração) e reduziram a porcentagem de fibras com NC (fibras regeneradas) quando comparadas ao grupo *mdx*. O EPA e o DFZ reduziram de modo semelhante em 45,5% e 36,5%, respectivamente, a porcentagem de fibras com NC do músculo BB. Para o músculo DIA, a redução na porcentagem de fibras com NC foi de 93% (EPA) e 50,8% (DFZ) e houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$). Esses dados histológicos refletem a redução da degeneração muscular, indicada pelos valores de creatina quinase e o ganho de força de tração observado nos grupos tratados.

5.4 Efeitos do EPA e DFZ sobre a regeneração do músculo QF

Até o momento, a literatura é relativamente escassa quanto à histopatologia do músculo quadríceps femoral (MUNTONI et al., 1993). No presente trabalho, fornecemos dados interessantes sobre este músculo, que contribuem para o melhor entendimento do grau de acometimento dos diferentes músculos esqueléticos distróficos.

A porcentagem da área do QF com fibras em REG foi de 15,7% para o grupo *mdx*. Esses valores estão de acordo com (MUNTONI et al., 1993) e permitem-nos sugerir que os primeiros sinais de degeneração nesse músculo apareçam antes dos vinte dias de vida quando é relatado o início da degeneração nos músculos esqueléticos (TANABE et al., 1986; GROUNDS et al., 2008; DISATNIK et al., 1998) e/ou que esse músculo seja acometido em maior grau pela mionecrose. Sendo assim, a inflamação pode não ser um

fator importante para a mionecrose do QF, mas sim o stress mecânico (aumento da deambulação do animal) e por isso o EPA não protegeu o QF contra a degeneração.

O tratamento com EPA reduziu o NP em 53,8% ($p < 0,001$) e aumentou a regeneração em 240% ($p < 0,001$). Uma das possibilidades para explicar este achado é a de que o EPA possa ter diminuído a apoptose das células satélites musculares, aumentando o pool disponível para regeneração (MAGEE et al., 2008). De acordo com a literatura, o glicocorticoide dexametasona também é capaz de proteger contra a mionecrose e aumentar a proliferação de células precursoras miogênicas (PASQUINI et al., 1995; RIFAI et al., 1995). Entretanto, o tratamento com DFZ parece não ter interferido na sobrevivência das células satélites, pois não alterou a regeneração dos camundongos *mdx*.

5.5 Efeitos do EPA e DFZ sobre a inflamação (NF- κ B e TNF- α)

O NF- κ B (fator nuclear kappa B) é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes, especialmente aqueles envolvidos na resposta inflamatória e no stress agudo (KARIN & DELHASE., 2000). O NF- κ B é mantido no citoplasma na sua forma inativa através da interação com proteínas inibitórias, I-kappaB (I- κ B). Quando fosforilada, a I- κ B sofre degradação proteolítica e permite que o NF- κ B entre no núcleo e controle os genes alvos (SENFTLEBEN & KARIN., 2002). Alterações na sinalização do NF- κ B estão presentes na DMD e em camundongos *mdx* (MONICI et al., 2003; ACHARYYA et al., 2007). Segundo KUMAR et al., 2003, músculos esqueléticos de camundongos *mdx*

apresentam ativação do NF- κ B antes mesmo do estabelecimento da distrofia, o que aumentaria os níveis de TNF- α e IL-1 β .

O TNF- α é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos e células musculares e de grande importância para a mionecrose das células musculares distróficas (VASSALLI, 1992). Pacientes com DMD e camundongos *mdx* apresentam níveis elevados de TNF- α (GROUNDS et al., 2008). Terapias farmacológicas que reduzem o infiltrado inflamatório (HODGETTS et al, 2006) e inibem mecanismos sinalizadores dependentes de TNF- α (WATERS et al., 2010) melhoram o quadro distrófico, demonstrando o papel da inflamação e do TNF- α na progressão da distrofia muscular.

De acordo com nossos dados, os músculos bíceps braquial (BB) e diafragma (DIA) de camundongos *mdx* de 30 dias apresentaram maiores níveis de NF- κ B e também de TNF- α . Maiores níveis de TNF- α no DIA do que no BB de camundongos *mdx* podem estar relacionados a uma menor porcentagem de fibras com NC (11,7%) neste músculo, em comparação aos 19,3% de fibras com NC do BB ($p=0,04$), indicando que a maioria das fibras do diafragma ainda não sofreu mionecrose.

O músculo QF do grupo *mdx*, por sua vez, apresentou níveis de NF- κ B semelhantes aos do grupo controle. O estudo da atividade do NF- κ B no músculo gastrocnêmio de animais controles e *mdx* dos 6 aos 49 dias de vida pós-natal, revelou que os *mdx* apresentaram maior atividade de NF- κ B aos 6, 25 e 49 dias de vida pós-natal, enquanto animais controles apresentaram progressiva redução na atividade desse fator para o mesmo período. Se esperarmos um mesmo padrão de atividade no músculo QF, por ser também um

músculo da pata, o aumento de NF- κ B também pode ter ocorrido antes dos 30 dias, quando então deve ter se iniciado a mionecrose. Isto explicaria os menores níveis de NF- κ B, bem como o aumento da regeneração, em comparação ao grupo controle e aos demais músculos distróficos analisados, no período aqui estudado.

Segundo modelo proposto por KUMAR & BORIEK, 2003, o estiramento mecânico induz atividade do NF- κ B pela via canônica através da geração de radicais livres. A estimulação persistente causada pelo stress mecânico ou pela alça de retroalimentação positiva envolvendo citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, levaria a um aumento exacerbado de NF- κ B que resultaria na distrofia muscular. No presente trabalho, demonstramos que os tratamentos com EPA e DFZ foram eficazes em proteger contra mionecrose através da redução dos fatores inflamatórios TNF- α e NF- κ B, ainda que essa redução não tenha sido significativa em alguns músculos. Entretanto, como o NF- κ B também faz parte de outras vias de sinalização, ressaltamos a importância do melhor entendimento do papel do NF- κ B na via de inflamação, antes de explorá-la com novas terapias farmacológicas.

5.6 Efeitos do EPA e DFZ sobre o tamponamento de cálcio (sCSQ)

Sabendo que a entrada de íons cálcio na mitocôndria pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio e que estas, por sua vez, aumentam a ativação do NF- κ B e do TNF- α , levantamos a hipótese de que a redução desses fatores nos grupos tratados com

EPA e DFZ poderia estar relacionada a um melhor tamponamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (RS). Para testar nossa hipótese, quantificamos os níveis de calsequestrina esquelética.

A calsequestrina é uma proteína responsável pela estocagem de Ca^{2+} no RS de músculos esqueléticos, localizando-se no lúmen do RS. Existem duas formas de calsequestrina: a esquelética e a cardíaca, sendo que a forma esquelética é expressa nas fibras de contração rápida e de contração lenta e é ausente no coração (ARAI et al., 1992; BIRALD et al., 1992; DAMIANI; MARGRETH, 1994). A sinalização dependente de cálcio está alterada nos camundongos *mdx* (ALLEN et al., 2010) que também apresentam elevada concentração de cálcio intracelular e dentro de outros compartimentos celulares, como o RS e mitocôndria (MALLOUK et al., 2000). O cálcio bombeado para o RS se liga a calsequestrina, cuja capacidade de se ligar ao Ca^{2+} está reduzida nos músculos distróficos (CULLIGAN et al., 2002). Vários estudos indicam que a calsequestrina está envolvida no processo de liberação de cálcio.

Não encontramos diferença significativa entre os níveis de sCSQ de músculos normais e distróficos, embora tenha ocorrido uma tendência a menores valores desta proteína no grupo *mdx*. Esses dados estão de acordo com os estudos de CULLIGAN e colaboradores (2002) que observaram redução nas proteínas semelhantes à calsequestrina CLP-150, CLP-170 e CLP-220 no *mdx*, mas não encontraram diferença entre a calsequestrina de músculos normais e distróficos. A redução de proteínas semelhantes à CSQ pode prejudicar o processo de sequestro de cálcio pelo RS.

Glicocorticoides são capazes de reduzir o influxo de cálcio para o meio intracelular (PASSAQUIN et al., 1998). Embora não tenhamos avaliado a concentração de cálcio intracelular, é razoável supor que o tratamento com o glicocorticoide DFZ tenha diminuído o influxo de cálcio para o meio intracelular, diminuindo a captação desse íon pelo RS e justificando a inalteração dos níveis de sCSQ observada no grupo tratado com DFZ.

O tratamento com EPA parece interferir no tamponamento de cálcio ao reduzir os níveis da sCSQ nos músculo DIA. Embora não há relato na literatura de que o ácido eicosapentaenóico possa interferir no tamponamento de cálcio, é possível que o EPA tenha se incorporado ao sarcolema da fibra distrófica, aumentando sua estabilidade e reduzindo o influxo desse íon. Com isso, uma menor concentração de cálcio intracelular estaria disponível para captação pelo RS, justificando a redução dos níveis da sCSQ.

Uma vez que alterações no influxo de cálcio podem estar relacionadas a mudanças em outras proteínas do RS relacionadas ao cálcio, como a SERCA1, a regucalcina e o receptor de rianodina (BEARD et al., 2002), seria interessante investigar se o EPA também pode afetar os níveis dessas proteínas.

Concluindo, sugerimos que a proteção contra mionecrose conferida pelo EPA e pelo DFZ pode estar relacionada a um melhor tamponamento de cálcio intracelular, que indiretamente pode ter afetado os níveis da sCSQ no interior do RS. Entretanto, estudos posteriores sobre os níveis do cálcio intracelular, bem como de outras proteínas envolvidas no tamponamento do cálcio, seriam necessários para aprofundar este mecanismo.

5.7 Efeitos do EPA e DFZ sobre a estabilidade do sarcolema (Utr)

A utrofina é uma proteína de 430 kDa, que compartilha 80% de homologia com a distrofina (TINSLEY et al., 1992). Ela está presente no espaço submembrana das células musculares normais durante a embriogênese, mas encontra-se restrita a junção neuromuscular após o nascimento (PONS et al., 1991). Músculos distróficos de humanos adultos e de camundongos *mdx* apresentam maiores níveis de Utr do que músculos normais, estando a utrofina presente ao longo de todo o sarcolema (THI MAN et al., 1991). Entretanto, o exato mecanismo que causa o aumento dessa proteína nos músculos distróficos ainda é desconhecido.

Alguns autores afirmam que a Utr pode compensar funcionalmente a falta da distrofina, pois ambas as proteínas se associam ao mesmo complexo sarcolemal de glicoproteínas (MATSUMURA et al., 1992) e assim, a sua superexpressão poderia melhorar o quadro distrófico (TINSLEY et al., 1998). Para investigar se a proteção contra mionecrose nos grupos tratados com EPA e DFZ poderia estar relacionada a uma maior estabilidade do sarcolema, conferida pelo aumento da utrofina, quantificamos os níveis desta proteína.

O músculo QF do grupo *mdx* apresentou uma tendência a maiores níveis de Utr em comparação ao grupo controle, embora os valores não tenham sido estatisticamente significantes. Fibras em estágio inicial de regeneração apresentam maior intensidade de imunomarcção para a utrofina; essa marcação diminui, gradualmente, conforme a fibra se torna madura (SHIM et al., 2003). Assim, o aumento de utrofina observado no QF dos *mdx*

(tratados e não tratados) talvez possa ser explicado pela maior quantidade de fibras em regeneração observadas nestes grupos. Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos, visto que alguns trabalhos sugerem que o aumento de Utr em músculos distróficos ocorre independentemente do processo de regeneração (WEIR et al., 2004).

Sabe-se que a dexametasona é capaz de aumentar os níveis de utrofina de células musculares em cultura, atuando posteriormente a transcrição do RNA mensageiro (PASQUINI et al., 1995). De fato, no presente estudo observamos aumento da Utr no DIA in vivo, após tratamento com o DFZ e com o EPA. Até o presente momento, não há relato na literatura de que o EPA possa interferir em proteínas estruturais do CDG.

Concluindo, estes dados sugerem que o EPA e o DFZ possam atuar na estrutura molecular do CDG (aumento da utrofina) e assim contribuir, pelo menos em parte, para o aumento da estabilidade do sarcolema, protegendo contra a mionecrose.

5.8 EPA x DFZ

De modo geral, nossos resultados indicam que os efeitos protetores obtidos com o EPA foram comparáveis aos do DFZ. Se tomarmos como base o músculo diafragma, que será o mais prejudicado pela distrofinopatia e levará o paciente a morte por falência respiratória, nossos resultados permitem sugerir que o EPA é tão ou mais eficaz que o DFZ para o tratamento da DMD, pois reduz citocinas inflamatórias (NF- κ B e TNF- α) e aumenta os níveis de utrofina. No entanto, com o avanço dos estudos sobre técnicas de ventilação mecânica e treinamento respiratório, as mortes por comprometimento cardíaco tornaram-se frequentes, afetando cerca de 40% dos portadores de DMD (BAXTER, 2006). Assim,

estudos posteriores de longo prazo, que avaliem os efeitos colaterais e os efeitos do EPA sobre a musculatura cardíaca seriam interessantes e necessários para estabelecimento da terapia com ácidos graxos no tratamento da DMD.

A análise do músculo quadríceps femoral nos permitiu observar alguns efeitos do EPA sobre a regeneração muscular. Aparentemente, o EPA promoveu a regeneração do músculo quadríceps. Entretanto, seriam necessários estudos posteriores para melhor avaliar os efeitos do EPA na regeneração, tais como a interferência desse ácido graxo na sobrevivência de células satélites, ou seus efeitos em moléculas envolvidas com a regeneração muscular, tais como a MyoD e a miogenina.

6. CONCLUSÃO

Os tratamentos com EPA e DFZ diminuíram os níveis de importantes fatores inflamatórios (NF- κ B e TNF- α) envolvidos na degeneração das fibras musculares distróficas. Isto sugere que o EPA, tal como os corticoides anti-inflamatórios, modula a inflamação através da inibição da via inflamatória mediada pelo NF- κ B.

O EPA parece interferir, ainda que indiretamente, no tamponamento de cálcio no músculo diafragma ao reduzir os níveis da sCSQ.

Tanto o EPA quanto o DFZ parecem atuar na estrutura molecular do CDG (aumentando a utrofina) e desta forma podem contribuir, pelo menos em parte, para o aumento da estabilidade do sarcolema, protegendo contra a mionecrose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) 6023.

ACHARYYA, S., VILLALTA, S.A., BAKKAR, N., BUPHA-INTR, T., JANSSEN, P.M., CARATHERS, M., LI, Z.W., BEG, A.A., GHOSH, S., SAHENK, Z., WEINSTEIN, M., GARDNER, K.L., RAFAEL-FORTNEY, J.A., KARIN, M., TIDBALL, J.G., BALDWIN, A.S., GUTTRIDGE, D.C. Interplay of IKK/NF kappa β signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **J. Clin. Investig.** v. 117, p.889–901, 2007.

ADAMS, M. E., BUTLER, M.H., DWYER, T.M., PETERS, M.F., MURNANE, A.A., FROEHNER, S.C. Two forms of mouse syntrophin, a 58kD dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. **Neuron.** v. 11, p. 531–540, 1993.

ALLEN, D.G., GERVASIO, O.L., YEUNG, E.W., WHITEHEAD, N.P. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 88, p.83-91, 2010.

AMTHOR, H., EGELHOF, T., MCKINNELL, I., LADD, M.E., JANSSEN, I., WEBER, J., SINN, H., SCHRENK, H-H., FORSTING, M., VOIT, T., STRAUB V. Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI. **Neuromuscul Disord.** v. 14, p.791-796, 2004.

ARCHER, J. D., VARGAS, C. C., ANDERSON, J. E. Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. **FASEB Journal**, 2006.

BABCOCK, T. A., HELTON, W. S., JOSEPH ESPAT, N. Eicosapentaenoic Acid (EPA): An Antiinflammatory Omega-3 Fat With Potential Clinical Applications. **Nutrition** v. 16, p.1116-1118, 2000.

BABCOCK, T.A., HELTON, W. S., HONG, D. AND JOSEPH ESPAT, N. Omega-3 Fatty Acid Lipid Emulsion Reduces LPS-Stimulated Macrophage TNF-alpha Production. **Mary Ann Liebert, Inc.** 3, Number 2, 2002.

BARNES, P.J., KARIN, M. Nuclear factor-kB – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New Engl.J. Med.** v. 336, p.1066–1071, 1997.

BAXTER, P. Treatment of the heart in Duchenne muscular dystrophy. **Dev Med Child Neurol.** 48:163, 2006.

BEARD, N. A., SAKOWSKA, M. M., DULHUNTY, A. F., LAVER, D. R. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. **Biophys. J.** v. 82, p.310-320, 2002.

BIGGAR, D.W. Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatr Rev.** v. 401, p.83-88, 2006.

BÖNNEMANN, C., MODI, R., NOGUCHI, S., MIZUNO, Y., YOSHIDA, M., GUSSONI, E., MCNALLY, E.M., DUGGAN, D.J., ANGELINI, C., HOFFMAN, E.P., OZAWA, E., KUNKEL, L.M. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. **Nature Genet.** v. 11(3), p. 266–73, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analy Biochem.** 72:248-254, 1976.

BROWN, R.H., DPHIL, J. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. **Ann. Rev. Med.** v. 48, 457-466, 1997.

BULFIELD, G., SILLER, W.G., WIGHT, P.A.L., MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 81, p.1189-1192, 1984.

CALDER, P. C., BURDGE, G. C. FATTY ACIDS, IN: NICOLAOU, A., KOKOTOS, G. (EDS.), *Bioactive Lipids*, **The Oily Press, Bridgewater**, pp. 1-36, 2004.

CARBERRY, S., ZWEYER, M., SWANDULLA, D., OHLENDIECK, K. Proteomics reveals drastic increase of extracellular matrix proteins collagen and dermatopontin in the aged mdx diaphragm model of Duchenne muscular dystrophy. **Int J Mol Med.** v. 29, 2012.

CARMIGNAC, V., DURBEEJ, M. Cell-matrix interactions in muscle disease. **J.Pathol.** v. 226, p. 200-218, 2012.

CASTILLERO, E., MARTÍN, A. I., MENDUIÑA, M. L., VILLANÚA, M. A., CALDERÓN, A. L. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogin-1 and myogenic regulatory factors. **Am. J. Physiol. Regul. Comp. Physiol** 297: R1322-R1331, 2009.

COHN, R.D., CAMPBELL, K.P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle & Nerve.** v. 23, 1456-1471, 2000.

CULLEN, M.J., JARROS, E. Ultrastructure of the muscle in the X-chromosome linked dystrophic (mdx mouse). Comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathol.** v. 77, p.69-81, 1988.

CULLIGAN, K., BANVILLE, N., DOWLING, P., OHLENDIECK, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. **J Appl Physiol.** v. 92, p.435-445, 2002.

DISATNIK, M.H., DHAWAN, J., YU, Y., BEAL, M.F., WHIRL, M.M., FRANCO, A.A., RANDO, T.A. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **J Neurol Sci.** v.161, p.77-84, 1998.

ENGEL, A.G., YAMAMOTO, M., FISCHBECK, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, AG, Franzini-Armstrong, C, editors **Myology**. New York: McGraw-Hill; v.2, p.1133-1187, 1994. ISBN 0070195595.

ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D., GAVER, M.G., CAMPBELL, K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**. v. 345, p.315-319, 1990.

ERVASTI J, CAMPBELL K. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J. Cell. Biol.** v. 122, p.809–823, 1993.

GAILLY, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. **Biochim Biophys Acta**. v. 1600, p.38-44, 2002.

GISSEL, H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1066, p.166-180, 2005.

GROUNDS, M.D., SOROKIN, L., WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scand J Med Sci Sports**. v. 15, p.381-391, 2005.

GROUNDS, M.D., RADLEY, H.G., GEBSKI, B.G., BOGOYEVITCH, M.A., SHAVLAKADZE, T. Implications of cross-talk between tumor necrosis factor and insulin-like growth factor-1 signaling in skeletal muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 35, p.846–851, 2008.

HARDMAN WE. ω -3 fatty acids and cancer therapy. **J. Nutr.** 134:3427S–30S, 2004.

HOLTERMAN, C.E., RUDNICK, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. **J Biophys Biochem Cytol** v.9, p.575-584, 2005.

HOUDE, S., FILIATRAULT, M., FOURNIER, A., DUBÉ, J., D'ARCY, S., BÉRUBÉ, D., BROUSSEAU, Y., LAPIERRE, G., VANASSE, M. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: An 8-year follow-up. **Pediatr. Neurol.** v. 38, p.200-206, 2008.

KEELING, R.M., GOLUMBEK, P.T., STREIF, E.M., CONNOLLY, A. M. Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. **Muscle & Nerve**. v. 35, p.43–48, 2007.

KHURANA, T.S., WATKINS, S.C., CHAFEY, P., CHELLY, J., TOME, F.M.S., FARDEAU, M. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin relates protein in skeletal muscle. **Neuromusc. Disord.** v.1, p.185-194, 1991.

KUMAR, A. & BORIEK, A.M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappa B pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **FASEB J**. v. 17, p.386–396, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.277, p. 680-685, 1970.

LEFAUCHEUR, J.P., PASTORET, C., SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec**. v. 242, p.70-76, 1995.

LIM, L., DUCLOS, F., BROUX, O., BOURG, N., SUNADA, Y., ALLAMAND, V., MEYER, J., RICHARD, I., MOOMAW, C., SLAUGHTER, C., TOMÉ, F.M.S., FARDEAU, M., JACKSON, C.E. BECKMAN, J.S., CAMPBELL, K.P. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. **Nature Genet**. v. 11 (3) p. 257–265, 1995.

LO, C. J., CHIU, K. C., FU, M., LO, R., HELTON, S. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. **J. Surg. Res**. v. 82, p.216, 1999.

LUZ, M., MARQUES, M., NETO, H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. **Braz J Med Biol Res**. v. 35(6), p.691-695, 2002.

MACHADO, R. V., MAURICIO, A. F., FERRETTI, R., SANTO-NETO, H., MARQUES, M.J. The Omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid, decreases TNF- α and protects dystrophin-deficient muscle fibers of *mdx* from degeneration. **J. Neuroimmun**. v. 232, p.145-150, 2011.

MALLOUK, N., JACQUEMOND, V., ALLARD, B. Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺ activated K⁺ channels. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 97, p. 4950-4955, 2000.

MANZUE AY, KUNTZER T, PIKE M, SWAN A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Syst Rev** (1): 2008.

MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Braz J Morphol Sci**. v. 21(3), p.145-152, 2004.

MATECKI, S., GUIBINGA, G.H., PETROF, B.J. Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.287, p.R961–R968, 2004.

MATUSUMURA, K., ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D., CAMPBELL, K.P. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. **Nature**. v. 360, 588-591, 1992.

MOKRI, B., ENGEL, A.G., Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. **Neurology**. v. 25, p.1111-1120, 1975.

MUNTONI, F., MATEDDU, A., MARCHEI, F., CLERK, A., SERRA, G. Muscular weakness in the mdx mouse. **J. Neurol. Sciences** v.120, p.71-77, 1993.

NOGUCHI S, MCNALLY, E. M., OTHMANE, K. B., HAGIWARA, Y., MIZUNO, Y., YOSHIDA, M., YAMAMOTO, H., BÖNNEMANN, C. G., GUSSONI, E., DENTON, P.H., KYRIAKIDES, T., MIDDLETON, L., HENTATI, I., HAMIDA, M.B., NONAKA, I., VANCE, J.M., KUNKEL, L.M., OZAWA, E. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. **Science** v. 270 (3), p.819–22, 1995.

PASTERNAK, C., WONG, S., ELSON, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. **J Cell Biol.** v. 128(3), p.355-361, 1995.

PAYNE, E. T., YASUDA, N., BOURGEOIS, J. M., DEVRIES, M. C., RODRIGUEZ, M. C., YOUSUF, J., TARNOPOLSKY, M. A. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in *mdx* mice. **Muscle & Nerve**, 33 (1):66-77, 2006.

PETROF, B.J., SHRAGER, J.B., STEDMAN, H.H., KELLY, A.M., SWEENEY, H.L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:3710–3714, 1993.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Mol Cell Biochem.** v. 179, n.1-2, p.111-123, 1998.

PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. **Am J Phys Med Rehabil.** v. 81 (Suppl), p.S162–S174, 2002.

PLAGEMANN A, HARDER T, RAKE A, VOITS M, FINK H, ROHDE W, DÖRNER, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Res.** v. 836, p.146-55, 1999.

PONS, F., NICHOLSON, L.V., ROBERT, A., VOIT, T., LEGER, J.J. Dystrophin and dystrophin-related protein (utrophin) distribution in normal and dystrophin-deficient skeletal muscles. **Neuromusc. Disord.** v. 3, p. 507-514, 1993.

RADLEY, H.G., GROUNDS, M.D., 2006. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiol. Dis.** v. 23, p. 387–397, 2006.

RANDO, T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve.** v. 24, p.1575-1594, 2001.

ROBERDS S. L., ANDERSON, R. D., IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., CAMPBELL, K.P. Primary structure and muscle-specific expression of the 50kd dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). **J. Biol. Chem.** v. 268 (32), p.23739–23742, 1993.

RYBAKOVA, I.N., AMANN, K.J., ERVASTI, J.M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. **J Cell Biol.** v. 135, p.661–672, 1996.

SCHMALBRUCH, H. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: A serial section study. **Neurology.** v.34, p.60-65, 1984.

SEIXAS, S.L., CÂNDIDO, J.L., SARINO, W., QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo mdx na fisiologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 55 (3-B), p.610-617, 1997.

SHIM, J.Y., KIM, T.S. Relationship between utrophin and regenerating muscle fibers in Duchenne Muscular Dystrophy. **Yonsei Med. J.** v. 44(1), p. 15-23, 2003.

SPENCER, M.J., MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. **Hum Mol Genet.** v. 11(21), p.2645-2655, 2002.

SPENCER, L., MANN, C., METCALFE, M., WEBB, M., POLLARD, C., SPENCER, D., BERRY, D., STEWARD, W., DENNISON, A. The effect of omega-3 FAs on tumor angiogenesis and their therapeutic potential. **European Journal of Cancer**, 45: 2077-2086, 2009.

STEDMAN, H.H., SWEENEY, H.L., SHRAGER, J.B., MAGUIRE, H.C., PANETTIERI, R.A., PETROF, B., NARUSAWA, M., LEFEROVICH, J.M., SLADKY, J.T., AND KELLY, A.M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature.** v.352, p.536–539, 1991.

ST-PIERRE, S. J. G., CHAKKALAKAL, J. V., KOLODZIEJCZYK, S. M., KNUDSON, J. C., JASMIN, B. J., MEGENEY, L. A. Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. **FASEB Journal.** 18:1937-1939, 2004.

STRAUB, V., RAFAEL, J.A., CHAMBERLAIN, J.S., CAMPBELL, K.P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. **J Cell Biol.** v. 139(2), p.375-385, 1997.

SUZUKI, A., YOSIJIDA, M., HAVASHI, K., MIZUNO, Y., HAGIWARA, Y., OZAWA, E. Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. **Eur. J. Biochem.** v. 220(2), p283-292, 1994.

TALIM, B., MALAGUTI, C., GNUDI, S., POLITANO, L., MERLINI, L. Vertebral compression in Duchenne muscular dystrophy following deflazacort. **Neuromuscul Disord.** v12, p. 294–295, 2002.

TANIGUTI, A.P.T., PERTILLE, A., MATSUMURA, C.Y., SANTO NETO, H., MARQUES, M.J. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- β 1 blocker. **Muscle & Nerve.** v. 43(1), p. 82-87, 2011.

TIDBALL, J.G. Inflammatory process in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 288(2), p. R345-R353, 2005.

TANABE, Y., ESAKI, K., NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathol.** v.69(1-2), p.91-95, 1986.

TINSLEY, J.M., POTTER, A.C., PHELPS, S.R., TRICKETT, J.I., DAVIES, K.E. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. **Nature.** v. 384, p. 349-353, 1996.

WEIR, A.P., MORGAN, J.E., DAVIES, K.E. A-utrophin upregulation in mdx skeletal muscle is independent of regeneration. **Neuromusc. Disord.** v. 14, p.19-23, 2004.

WHITEHEAD, N.P., YEUNG, E.W., ALLEN, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 33, p.657-662, 2006.

YOSHIDA, M., SUZUKI, A., YAMAMOTO, H., NOGUCHI, S., MIZUNO, Y., OZAWA, E. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups in by n-octyl beta-D-glucoside. **Eur. J. Biochem.** v. 222 (3), p. 1055-1061, 1994.

YUEN, A. W. C., SANDER, J. W., FLUEGEL, D., PATSALOS, P. N., BELL, G. S., JOHNSON, T., KOEPP, M. J. Omega-3 fatty acid supplementation in patients with chronic epilepsy: a randomized Trial. **Epilepsy and Behavior** 7: 253-258, 2005.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2231-1, sobre "Ácido eicosapentanóico x deflazacorte: mecanismos de ação e comparação de efeitos no tratamento de camundongos mdx", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Júlia Marques / Letícia Montanholi Apolinário, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 30 de setembro de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2231-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 30, 2010.

Campinas, 30 de setembro de 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva