



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**RAFAEL VENTURA MACHADO**

**EFEITO DO ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO NA NECROSE E  
INFLAMAÇÃO DOS MÚSCULOS DISTRÓFICOS DE  
CAMUNDONGOS *MDX***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Rafael Ventura Machado  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques**

Campinas, 2011

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

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M18e | <p>Machado, Rafael Ventura, 1977-<br/>Efeito do ácido eicosapentaenoico na necrose e inflamação dos músculos distróficos de camundongos <i>mdx</i> / Rafael Ventura Machado. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Maria Julia Marques.<br/>Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Ácido eicosapentaenóico. 2. Camundongo <i>mdx</i>.<br/>3. Distrofia muscular de Duchenne. 4. Fator de necrose tumoral alfa. 5. Mionecrose. I. Marques, Maria Julia, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Effects of eicosapentaenoic acid on myonecrosis and inflammation in dystrophin-deficient muscles of the *mdx* mice

**Palavras-chave em Inglês:**

Eicosapentaenoic acid

*Mdx* mice

Duchenne muscular dystrophy

Tumoral necrosis factor-alpha

Myonecrosis

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Maria Julia Marques [Orientador]

Rosana Almada Bassani

Robson Francisco Carvalho

Ricardo Noboro Isayama

Renata Graciele Zanon

**Data da defesa:** 15-12-2011

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

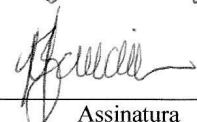
**Campinas, 15 de dezembro de 2011.**

**BANCA EXAMINADORA**

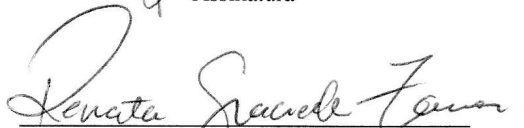
Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

  
Assinatura

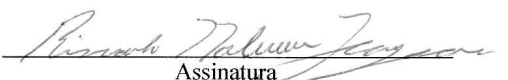
Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

  
Assinatura

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

  
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Noboro Isayama

  
Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

\_\_\_\_\_  
Assinatura

***Dedico....***

*Aos meus pais Sebastião e Beth pela essência da existência e pelo apoio e conforto dado aos seus filhos nas escolhas da vida. Aos meus irmãos Gustavo e Fábio, pelo exemplo de pessoas dignas e batalhadoras. À Carol, linda, pelo amor, respeito e dedicação ao longo de todos esses anos juntos. Te amo!*

*Agradeço...*

*A Deus, todos os dias da minha vida, por oferecer-me os desafios de acordo com as minhas escolhas.*

*"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta." (Chico Xavier)*

***Agradecimento especial..***

*À Professora Dra. Maria Júlia Marques, que me abriu as portas desta universidade e pela capacidade de extrair o melhor daquilo que tive condições de dar. Muito obrigado!*

### *Agradecimentos...*

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela contribuição no desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** pela contribuição durante a formação e pelas sugestões compartilhadas durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Angelo Camilli** pelas considerações no exame de qualificação ao doutorado.

À **Profa. Dra. Elaine Minatel** pelas considerações no exame de qualificação ao doutorado e por disponibilizar gentilmente seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À **Profa. Dra. Adriana Pertille**, pela amizade, oportunidade de crescimento profissional, auxílio nos experimentos e considerações no exame de qualificação ao doutorado.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira** e **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, que gentilmente abriram as portas de seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

À **Profa. Dra. Maria Cristina Ramos Costa** pelas considerações na pré-banca de doutorado.

Ao **Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho** pelas considerações na pré-banca de doutorado.

À **Profa. Dra. Rosana Almada Bassani** pelas considerações na pré-banca de doutorado.

À **Sra. Lílían Alves Senne Panagio** pela atenção, dedicação e auxílio durante o doutorado.

Ao **Ms. Renato Ferretti** pela amizade e imensa colaboração em todas as etapas do doutorado.

À **Dra. Ana Paula Tiemi Taniguti**, **Ms. Cintia Yuri** e as **mestrandas (os) Adriana Fogagnolo Maurício, Samara Camaçari de Carvalho, Juliano Pereira Alves e Letícia Montanholi Apolinário** pela amizade e auxílio na realização de experimentos.

Aos **Srs. Norivaldo Celestino** e **Marco Aurélio Ribeiro de Paula** pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais realizados neste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima** pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Aos **Srs. Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos e Toni Donizeti dos Santos** pela prestatividade durante o doutorado.

À **CAPES, FAEPEX-UNICAMP, CNPq e FAPESP** pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

A todos os docentes, funcionários, colegas e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”*

*(Isaac Newton)*

## SUMÁRIO

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abreviaturas .....                                                                      | x         |
| Resumo .....                                                                            | xi        |
| Abstract .....                                                                          | xii       |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                              | <b>1</b>  |
| 1.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD) .....                                          | 2         |
| 1.2 Distrofina e o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) .....                       | 4         |
| 1.3 Camundongo <i>mdx</i> .....                                                         | 4         |
| 1.4 Necrose e regeneração no músculo distrófico .....                                   | 6         |
| 1.5 Ácido Eicosapentaenóico .....                                                       | 9         |
| <b>2. OBJETIVO .....</b>                                                                | <b>11</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                     | <b>13</b> |
| 3.1 Animais .....                                                                       | 14        |
| 3.2 Grupos experimentais e tratamento com ácido eicosapentaenóico .....                 | 14        |
| 3.3 Procedimento cirúrgico para retirada dos músculos .....                             | 15        |
| 3.4 Análise histopatológica .....                                                       | 15        |
| 3.5 Análise da mionecrose pela técnica do azul de Evans .....                           | 17        |
| 3.6 Imunohistoquímica para F4/80 .....                                                  | 18        |
| 3.7 Quantificação do fator de necrose tumoral-alfa pela técnica de Western blotting ... | 19        |
| 3.8 Determinação de creatinoquinase (CK) no plasma sanguíneo .....                      | 21        |
| 3.9 Medida da força .....                                                               | 22        |
| 3.10 Análise estatística .....                                                          | 22        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                              | <b>23</b> |
| 4.1 Análise da massa corporal dos animais .....                                         | 24        |
| 4.2 Análise histopatológica .....                                                       | 24        |
| 4.3 Análise quantitativa .....                                                          | 27        |
| 4.4 Quantificação do fator de necrose tumoral-alfa .....                                | 28        |
| 4.5 Níveis plasmáticos de creatinoquinase (CK) .....                                    | 29        |
| 4.6 Medida da força .....                                                               | 29        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                               | <b>30</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                               | <b>36</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                              | <b>38</b> |

**Abreviaturas**

**AA** – ácido araquidônico

**AE** – azul de Evans

**BB** – músculo bíceps braquial

**CDG** – complexo distrofina-glicoproteínas

**CK** – enzima creatino-quinase

**CTRL** – camundongo *mdx* controle

**CXMD** – beagle canine-based X-linked muscular dystrophy

**DIA** – músculo diafragma

**EPA** – ácido eicosapentaenóico

**ERO** – espécie reativa de oxigênio

**DABCO** – 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano

**DMD** – distrofia muscular de Duchenne

**GRMD** – golden retriever muscular dystrophy

**HE** – hematoxilina-eosina

**HFMD** – hypertrophic feline muscular dystrophy

*mdx* - X chromosome-linked muscular dystrophy

**NF- $\kappa$ B** – fator nuclear kappa B

**NOS** – óxido nítrico sintase

**nNOS** – óxido nítrico sintase neuronal

**PBS** – tampão fosfato-salino

**PUFA** – ácido graxo poliinsaturado

**STN** – músculo esternomastóideo

**TA** – músculo tibial anterior

**TACE** – TNF-alpha converting enzyme

**TNF-alfa** – fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

Na distrofia muscular de Duchenne e no camundongo *mdx* a proteína distrofina está ausente ou é expressa de forma não funcional. Com isso, o complexo distrofina-glicoproteínas se desorganiza, a fibra muscular se torna frágil durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, as concentrações intracelulares de cálcio e radicais livres se elevam, resultando em necrose da célula. A inflamação mediada por células do sistema imunológico e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-alfa, é um evento importante diretamente relacionado com a progressão da doença. O ácido eicosapentaenóico (EPA) é um ácido graxo poli-insaturado ômega-3 que promove benefícios em doenças inflamatórias em humanos. No presente trabalho analisamos os efeitos do EPA no estágio inicial da distrofinopatia do camundongo *mdx*. Camundongos *mdx* com 14 dias de idade receberam 300 mg/kg/dia de EPA por 16 dias. Os grupos controle *mdx* e C57BL10 receberam óleo mineral. EPA diminuiu a mionecrose, os níveis séricos da enzima creatinoquinase e o TNF-alfa em músculos esqueléticos distróficos. Sugere-se que o EPA tenha utilidade terapêutica nas distrofinopatias.

Palavras-Chave: ácido eicosapentaenóico, camundongo *mdx*, distrofia muscular de Duchenne, fator de necrose tumoral-alfa, mionecrose.

## **ABSTRACT**

In Duchenne muscular dystrophy (DMD) and in the mdx murine model of DMD, lack of dystrophin leads to myonecrosis and cardiorespiratory failure. The intense inflammatory reaction, mediated by immune cells and TNF-alpha, contributes to the progressive myonecrosis. The eicosapentaenoic acid (EPA) is an omega-3 fatty acid that shows beneficial effects in inflammatory diseases. In the present study, we examined the effects of EPA on the early stages of dystrophy in mdx mice. Mdx mice (14 days old) received EPA at 300 mg/kg EPA for 16 days, while the control mdx mice and C57BL10 received vehicle. EPA treatment decreased creatine kinase and TNF-alpha levels and reduced myonecrosis. The present results support further studies with EPA as a potential therapy for dystrophinopathies.

**Keywords:** Duchenne muscular dystrophy, eicosapentaenoic acid, mdx mice, myonecrosis, tumoral necrosis factor-alpha.

## **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

O termo “distrofinopatia” é utilizado para designar um grupo de doenças genéticas de caráter degenerativo e progressivo nas quais uma proteína muscular específica está ausente ou expressa de forma não funcional. Dentre todas as distrofias musculares conhecidas, a distrofia muscular de Duchenne, descrita em 1868 pelo neurologista francês Guillaume Duchenne, é a forma mais frequente e severa com incidência entre 1:3.500 meninos nascidos vivos (Engel *et al*, 1994; Fairclough *et al*, 2011).

Os primeiros sinais clínicos da DMD são comumente observados entre dois e cinco anos de idade quando quedas frequentes, dificuldades em correr e subir escadas, levantar-se do chão da posição deitada para a bípede com o apoio das mãos sobre os membros inferiores (manobra de Gowers), chamam a atenção para o desenvolvimento motor anormal (Engel *et al*, 1994).

A investigação clínica mostra que tanto os níveis séricos da enzima creatinoquinase (CK), quanto da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase estão elevados, sugerindo alteração na permeabilidade da membrana celular. A análise histopatológica confirma a ausência da proteína distrofina, processo inflamatório intenso, degeneração de fibras musculares e depósito de tecido fibroadiposo no perimísio (Percy *et al*, 1979; Bushby *et al*, 2010). O estudo genético indica mutações na sequência de nucleotídeos no *locus* p21.2 do cromossomo X. A distrofina está ausente também no músculo estriado cardíaco e em algumas células do sistema nervoso central levando ao comprometimento da função cardíaca e, em alguns casos, à disfunção cognitiva (Hoffman *et al*, 1987). A DMD é hereditária em 70% dos casos e em 30% é provocada por mutação espontânea do cromossomo X (Bobo *et al*, 2009).

Os músculos proximais dos membros inferiores são os primeiros acometidos pela fraqueza progressiva, seguida pelas retrações miotendíneas, pseudohipertrofia das panturrilhas e perda da marcha por volta dos 13 anos de idade. A disfunção dos músculos axiais resulta em

alteração das curvaturas fisiológicas da coluna vertebral, enquanto que a fraqueza dos membros superiores leva à incapacidade em realizar as atividades da vida diária. Dificuldade na deglutição devido a degeneração dos músculos da faringe também faz parte da evolução da doença (Parreira *et al*, 2007). A necrose e fibrose do miocárdio resultam em cardiomiopatia dilatada e arritmia, e a fraqueza dos músculos respiratórios leva o indivíduo ao óbito por volta da terceira década de vida (Engel *et al*, 1994; Bobo *et al*, 2009).

A inflamação após dano celular é um evento importante e está diretamente relacionada com o avanço da doença. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) pelas células do sistema imunológico e pelas próprias miofibrilas lesadas, contribui para a intensificação da necrose em músculos distróficos (Chen *et al*, 2000). A capacidade regenerativa muscular é limitada e dependente da ativação de células satélites e sua diferenciação em mioblastos. Nos músculos distróficos prevalece a formação de um tecido cicatricial fibroadiposo sem função contrátil, justificando-se a fraqueza muscular progressiva nesses indivíduos (Grounds *et al*, 2004).

A terapia com antiinflamatórios esteróides, como a prednisona e o deflazacort, retarda a evolução da DMD, sendo a única terapia farmacológica utilizada com resultados positivos. Entretanto, o tratamento prolongado com corticóides provoca efeitos colaterais prejudiciais ao organismo, tais como ganho de peso, perda de massa óssea, imunossupressão, involução da glândula adrenal, retardo da puberdade e edema (Manzur *et al*, 2008). Outros fármacos sem os efeitos colaterais indesejáveis dos corticosteroides e outras terapias, tais como as gênicas e celulares, são estudados na tentativa de minimizar a progressão da doença, porém seus resultados ainda são insatisfatórios ou estão em fase pré-clínica (Carre-Pierrat *et al*, 2011; Goyenville *et al*, 2011).

## 1.2 Distrofina e o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG)

A distrofina é uma proteína estrutural localizada no subsarcolema da fibra muscular estriada. Tem peso molecular de 427 kDa e 3685 aminoácidos. A molécula é dividida em quatro domínios: o primeiro liga-se à alfa-actina, o segundo à espectrina, o terceiro à ancarina e o último interage a alfa2-laminina e alfa-distroglicana via beta-distroglicana (Engel *et al*, 1994). Também se liga direta ou indiretamente com glicoproteínas da membrana como as sarcoglicanas (alfa, beta e gama-SG), distroglicana (beta-DG), sintrofinas e sarcospana para formar o CDG (Spencer e Mellgren, 2002; Bogdanovich *et al*, 2004). Outras proteínas extra e intracelulares estão firmemente associadas ao CDG, tais como a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), distrobrevina, caveolina-3 e laminina-2 (Allamand e Campbell, 2000).

A distrofina é fundamental para a integridade do CDG e do sarcolema durante a transferência para o meio extracelular da força de contração gerada pelas proteínas contráteis (Rando, 2001). Esta proteína parece modular a homeostase dos íons cálcio na fibra muscular (Whitehead *et al*, 2006). A ausência da distrofina desorganiza o CDG e torna a fibra muscular frágil durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, o que permite o influxo de elevada quantidade de íons cálcio, resultando em mionecrose (Grounds *et al*, 2005a).

## 1.3 Camundongo *mdx*

Desde a identificação do camundongo isógeno *mdx* por Bulfield e seus colaboradores em 1984, o animal tem sido vastamente utilizado como modelo experimental da DMD, pois mostra alteração genética na sequência de nucleotídeos da banda Hq Bpa do cromossomo X, estrutura correspondente ao *locus* p21.2 do cromossomo X humano, o que resulta em ausência da distrofina nos músculos esquelético e cardíaco desses animais (Bulfield *et al*, 1984; Khurana e Davies, 2003). Outros modelos animais, tais como os cães GRMD (*golden retriever muscular*

*dystrophy*) e CXMD (*beagle canine-based X-linked muscular dystroph*), o felino HFMD (*hypertrophic feline muscular dystrophy*) e o peixe-zebra (*zebrafish*) também não expressam a distrofina e são utilizados para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos e terapêuticos da DMD (Muller *et al*, 2001; Sasaoka *et al*, 2003; Nakamura e Takeda, 2011).

Embora a distrofina esteja ausente desde antes do nascimento, o início dos ciclos de degeneração e regeneração muscular no camundongo *mdx* ocorre somente na terceira semana de vida (Pastoret e Seville, 1995). Com sete dias, observa-se cerca de 0,62% das fibras regeneradas no músculo esternomastóideo. No décimo quarto e vigésimo primeiro dias, 2,2% e 5%, respectivamente (Minatel *et al*, 2003). O pico de degeneração muscular ocorre entre o vigésimo primeiro e trigésimo dia de vida. Com 30 dias são observadas até 60% das fibras regeneradas ou em processo de regeneração em alguns músculos (Marques *et al*, 2008). Após seis meses de idade, alguns músculos se apresentam quase completamente regenerados, com cerca de 80-90% de fibras com núcleo central (característica de fibras regeneradas), restando apenas poucas áreas em degeneração (Pastoret e Seville, 1995). Com nove meses observa-se completa regeneração muscular com o diâmetro heterogêneo das fibras e depósito de tecido fibroso no perímio (Briguet *et al*, 2004).

Acredita-se que o início dos ciclos de degeneração e regeneração muscular na terceira semana de vida esteja associado ao aumento expressivo de radicais livres e influxo de íons cálcio na fibra muscular pela atividade motora nesse período (Cullen e Jarros, 1988; Disatnik *et al*, 1998).

No camundongo *mdx*, ao contrário do que acontece nos humanos com DMD, os sucessivos ciclos de degeneração presentes ao longo da vida desses animais são compensados por regeneração muscular eficaz, com menor quantidade de tecido fibroso (Li *et al*, 2009).

#### 1.4 Necrose e regeneração no músculo distrófico

O mecanismo fisiopatológico que resulta na necrose e fibrose nos músculos distróficos não foi completamente esclarecido e permanece sob estudo (Guglieri e Bushby, 2010). Sabe-se que a ausência da distrofina é o principal evento para a desorganização das proteínas associadas ao CDG e para as microrupturas da membrana celular durante estresse mecânico proveniente dos ciclos de contração e relaxamento muscular (Grounds *et al*, 2005a). Secundariamente devido a falta da distrofina, a diminuição da expressão e do funcionamento das proteínas do CDG e de canais de cálcio, bem como o aumento de radicais livres e enzimas citotóxicas, como as fosfolipases da classe A2, parecem contribuir para o processo de necrose e inflamação nos músculos distróficos (Disatnick *et al*, 1998; Tidball e Wehling-Henricks, 2007; Allen e Whitehead, 2011).

Estudos realizados mostram que há notável diminuição na expressão da nNOS e do óxido nítrico (NO) nos músculos distróficos, provavelmente em razão da desorganização do CDG (Chang *et al*, 1996; Chaubourt *et al*, 2002). Em condições normais, o papel da nNOS e do NO parece ser crítico para a manutenção adequada do fluxo sanguíneo muscular em resposta ao controle do sistema nervoso autônomo sobre a vasoconstrição e vasodilatação durante a atividade contrátil. Como esse mecanismo parece estar alterado, ocorreriam variáveis níveis de isquemia muscular contribuindo para a necrose, mesmo na ausência de anormalidade vascular (Rando, 2001; Voisin *et al*, 2005).

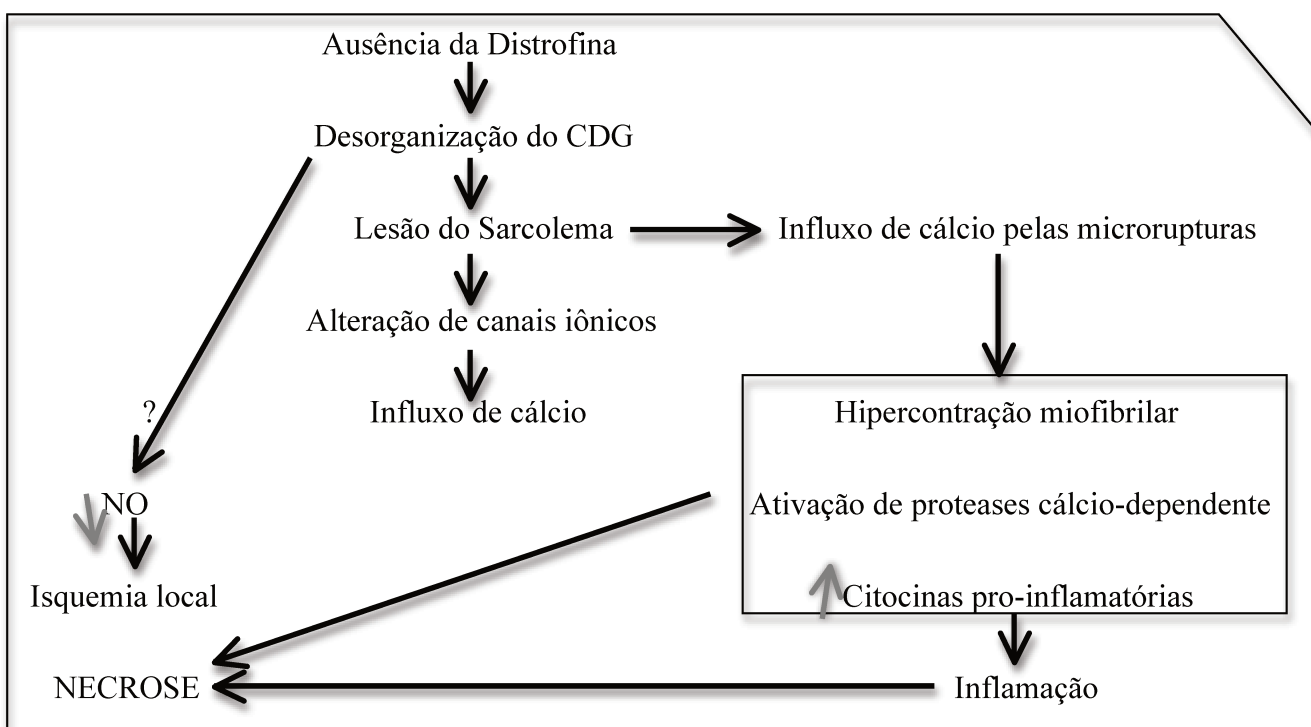
Além da redução do NO, o excesso de íons cálcio na fibra distrófica parece ser importante no processo de mionecrose na DMD (Vandebrouck *et al*, 2005). Sabe-se que canais iônicos possuem ligação estrutural e funcional com proteínas associadas à membrana celular e contribuem para o trânsito normal de cálcio em miócitos. O influxo de cálcio é mediado por canais voltagem-dependente ativados por despolarização da membrana e canais receptor-

dependentes (Franco-Obregon e Lansman, 1994). Assim, o influxo de grandes quantidades de íons cálcio do meio extracelular, devido ao funcionamento anormal dos canais de cálcio pela ausência da distrofina e pelas microrupturas da membrana celular, levaria a hipercontração das miofibrilas e ativação de proteases, tais como calpaínas, e fosfolipases endógenas dependentes do cálcio, resultando em necrose da célula (Watkins *et al*, 1988; Straub *et al*, 1997; Spencer e Mellgren, 2002). A ativação das calpaínas decorrente do excesso de cálcio promoveria proteólise dos constituintes celulares e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativação das fosfolipases A2, causaria peroxidação lipídica e alteração da permeabilidade da membrana celular (Allen e Whitehead, 2011). O excesso de cálcio intracelular influencia a via do fator nuclear kappa B (NF-kB) que regula a expressão de citocinas pro-inflamatórias, em particular o TNF-alfa (Acharyya *et al*, 2010; Piers *et al*, 2011).

A inflamação mediada por células do sistema imunológico, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, CD4 T e CD8 T, é um evento importante nos músculos distróficos, pois aumenta a necrose e intensifica os prejuízos funcionais em pessoas com DMD. Os neutrófilos são as células inflamatórias que migram rapidamente para o tecido após lesão, enquanto macrófagos representam os principais responsáveis pela fagocitose (Tidball, 2005). A liberação de citocinas e radicais livres derivados de macrófagos contribuem expressivamente para a degeneração muscular e fibrose na DMD e no camundongo *mdx* (Desguerre *et al*, 2009).

Estudos mostram que na fibra muscular distrófica ocorre a elevação expressiva do nível de TNF-alfa liberado por macrófagos, mastócitos e pelas próprias miofibrilas lesadas, promovendo resposta inflamatória e causando prejuízo adicional à fibra muscular distrófica (Radley and Grounds, 2006). O TNF-alfa é uma citocina pro-inflamatória de 17kDa que atua na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e na infecção. É produzida a partir da forma não-clivada do TNF-alfa de 26kDa associada a membrana pela *TNF-alpha-converting enzyme*

(TACE). A resposta biológica para o TNF-alfa é mediada por dois tipos de receptores transmembrana: TNFR1 (p60, p55 e CD120a) e TNFR2 (p80, p 75 e CD120b). Quando o TNF-alfa de 17 kDa se liga ao receptor TNFR1, pode levar à apoptose celular ou a ativação de NF-kB presente no citoplasma, que por sua vez se desloca para o núcleo da célula e ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios e de proteínas pró-apoptóticas (Palladino *et al*, 2009).



**Figura 1.** Esquema hipotético do mecanismo que resulta em necrose do músculo distrófico.

A regeneração muscular é um processo biológico complexo comparável à miogênese embrionária. Envolve a ativação de células satélites, liberação de fatores reguladores da miogênese (MyoD, Myf-5, miogenina e MRF4), fusão e diferenciação de mioblastos e maturação do miotubo ou fibra muscular imatura e multinucleada (sincício) em fibra muscular madura (Megene y e Rudnicki, 1995). No processo de regeneração, a MyoD é necessário para iniciar a diferenciação das células satélites em mioblastos. A expressão da miogenina marca o final da

proliferação dos mioblastos e promove a diferenciação do miotubo em fibra muscular madura (Jin *et al*, 2000; Chargé e Rudnick, 2004). Apesar das células-tronco hematopoiéticas migrarem para diferentes tecidos, existe evidência indicando que as células-tronco residentes são as responsáveis pela regeneração e reparo do tecido muscular (Anderson, 2006).

Histologicamente, a fibra muscular íntegra é caracterizada por formato poligonal, citoplasma eosinófilo e núcleo periférico. A fibra muscular em regeneração apresenta núcleo central com aspecto vesicular, citoplasma geralmente basófilo, refletindo alta síntese proteica e escassez de elementos contráteis, visível pelo número reduzido de estriações (Torres e Duchon, 1987). Já a fibra muscular completamente regenerada é caracterizada pela centro-nucleação, citoplasma eosinófilo e aumento da relação citoplasma/núcleo (Pastoret e Sebillé, 1995; Earnshaw *et al*, 2002).

### **1.5 Ácido Eicosapentaenóico**

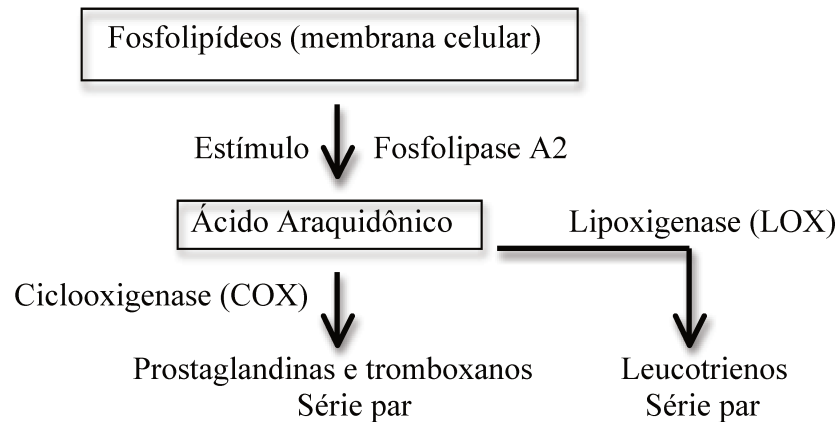
O tratamento farmacológico das distrofinopatias tem promovido mudanças na evolução natural da doença e a descoberta de terapias mais efetivas poderá contribuir para uma evolução clínica e funcional menos devastadora em pacientes com DMD (Carret-Pierrat *et al*, 2011).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's) são ácidos carboxílicos que apresentam duas ou mais ligações duplas entre átomos de carbono. Incluem duas classes principais: ômega-3 e ômega-6 que diferem entre si pela posição da primeira dupla ligação em relação ao radical metil do ácido graxo. Os ácidos ômega-3 mais comuns incluem o ácido alfa-linolênico, ácido docosahexanóico e o ácido eicosapentaenóico (EPA). O EPA (ácido *all-cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico) é um ácido graxo de cadeia longa encontrado em certa quantidade em lipídeos de peixes de água fria e na linhaça (Lopez-Ferrer *et al*, 2001; Harper *et al*, 2006). Entre as principais funções dos PUFA's estão a participação na composição das membranas celulares e

serem precursores de substâncias, tais como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que atuam como mediadores da inflamação (Lo *et al*, 1999). A ingestão de fontes ricas em ácidos graxos n-3 poliinsaturados resulta na diminuição de ácido araquidônico na membrana plasmática e, conseqüentemente, reduz a inflamação por diminuir a formação de prostagladina-E2 (Babcock *et al*, 2000; Novak *et al*, 2003).

Estudos realizados em humanos e modelos experimentais mostraram grande potencial terapêutico dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 nas doenças do sistema cardiovascular, como na arteriosclerose e na atrofia muscular (Babcock *et al*, 2000; Smith *et al*, 2004).

O mecanismo pelo qual o EPA atua nas células não está totalmente esclarecido, porém sugere-se que o EPA possa inibir a citocina pró-inflamatória TNF-alfa liberada pelas células do sistema imunológico (Babcock *et al*, 2000; Novak *et al*, 2003).



**Figura 2.** Participação do ácido araquidônico e as enzimas COX e LOX na síntese de prostaglandinas e leucotrienos da série par.

**2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi verificar se o ácido eicosapentaenóico protege o músculo estriado esquelético do esqueleto axial e apendicular de camundongos *mdx* da necrose e inflamação no estágio inicial da distrofinopatia.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *mdx* e C57BL/10, de ambos os sexos, obtidos de casais mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia. As matrizes são oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 25º dia de vida pós-natal, sendo separados em grupos de mesmo sexo. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas com ciclos de 12 horas claro/escuro, ração e água *ad libitum*.

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP - protocolo nº 2165-1) e está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 3.2 Grupos experimentais e tratamento com o ácido eicosapentaenóico

Foram estudados oito camundongos C57BL10 e 30 camundongos *mdx* divididos em dois grupos experimentais, um para o tratamento com o ácido eicosapentaenóico (EPA) e outro como grupo controle. O grupo tratado com o EPA (cis-5,8,11,14,17-ácido eicosapentaenóico, pureza  $\geq 98,5\%$ , Fluka/Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA; grupo *mdx*  $\omega$ -3, n=15) recebeu por gavagem intragástrica a dose de 300 mg/Kg/dia dissolvida em óleo mineral (Nujol, Mantecorp, SP, Brasil) do décimo quarto ao trigésimo dia de vida (Matsumoto *et al*, 2009). Os grupos *mdx* controle (grupo *mdx* CTRL; n=15) e C57BL10 (grupo C57BL10; n=8) receberam o mesmo volume de óleo mineral. Os animais tratados do grupo *mdx*  $\omega$ -3 foram pesados diariamente em balança semi-analítica (Marte, modelo AS2000C) para que a quantidade de EPA fosse ajustada ao peso do animal.

### 3.3 Procedimento cirúrgico para retirada dos músculos

Terminado o tratamento, os animais foram anestesiados com 0,1 ml/10g de peso da mistura 1:1 de cloridrato de cetamina (130mg/kg, Francotar, Virbac, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg, 2% m/v, Virbaxyl, Virbac, São Paulo, Brasil) para que os materiais biológicos fossem cirurgicamente retirados para análise.

Os músculos tibial anterior (TA), esternomastóideo (STN), diafragma (DIA) e bíceps braquial (BB) de oito animais de cada grupo (C57BL10, *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL) foram retirados, mantidos por 45 segundos em n-hexano (J.T. Baker) a -130°C, rapidamente transferidos para tubos criogênicos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o processamento para a quantificação do TNF-alfa pela técnica de western blotting. Os mesmos músculos citados acima de outros sete animais dos grupos *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL foram retirados e colocados em suporte de madeira usando “gum tragacanth” (Sigma-Aldrich). Em seguida, seguiu-se o mesmo procedimento para congelamento e armazenamento até o processamento para a análise.

Três lâminas de cada músculo com cortes transversais do terço médio com 7  $\mu$ m de espessura foram obtidas em criostato Micron-HS505E para as análises histopatológica em hematoxilina-eosina (HE), de mionecrose em azul de Evans e para imunomarcção de macrófagos.

### 3.4 Análise histopatológica

A utilização de parâmetros histopatológicos para o estudo das alterações musculares decorrentes da distrofia, tais como a relação do número de fibras musculares com núcleo periférico e central, e a área da secção transversal com infiltrado inflamatório, nos fornecem

dados que, em conjunto, permitem analisar o processo de degeneração e regeneração ocorrido ao longo do tempo nos músculos distróficos (Gaschen e Burgunder, 2001).

As lâminas com os cortes histológicos transversais foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos, em seguida lavadas em água corrente por dez minutos e novamente imersas em solução de eosina por 15 segundos. O excesso de eosina foi retirado em água corrente. Depois da coloração, os cortes foram desidratados em sequência de álcoois e xilóis e montadas em meio de montagem alkan (Alkimia).

Quatro cortes de cada lâmina foram escolhidos aleatoriamente e analisados com auxílio de uma objetiva de 20X e ocular de 10X contendo um retículo quadrilátero com 100 pontos, acoplada ao microscópio Nikon Eclipse E 400. Para a contagem das fibras musculares, utilizou-se um contador manual. As imagens foram adquiridas com uma vídeo câmera Nikon Express Series (Nikon Express Series; Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio óptico conectado a um microcomputador com o software Image Pro-Express (Media Cybernetic; Silver Spring, Maryland, USA).

A análise histopatológica foi realizada de forma qualitativa, pela descrição comparativa entre as imagens obtidas dos grupos *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL, e quantitativa, seguindo os critérios descritos a seguir. A fibra muscular íntegra é caracterizada pelo seu formato poligonal, citoplasma eosinófilo e núcleo periférico, enquanto que na fibra recém regenerada observa-se a centronucleação (Henricks-Wehling *et al*, 2004). Hipercontração das fibras está associada a alteração da membrana plasmática e influxo de cálcio (Barend e Engel, 1987). Quantificou-se o número total fibras musculares, o número de fibras com núcleo periférico e de fibras com núcleo central (fibras regeneradas). Outras características histológicas também permitiram avaliar o processo de degeneração e regeneração muscular. Considerou-se como processo de degeneração

as fibras com morfologia irregular, citoplasma pouco corado com ou sem a presença de células fagocitárias. Grupos de células com diâmetro menor, citoplasma escasso e fortemente basófilo em presença de infiltrado inflamatório abundante ao redor das células foram consideradas como indicativas do estágio inicial de regeneração (Grounds *et al*, 2005b; Briguet *et al*, 2004; Grounds e Torrisi, 2004).

A partir dos dados descritos, obteve-se o número total de fibras musculares, com exceção do músculo diafragma onde foi realizada a contagem de um hemidiafragma, a porcentagem de fibras com núcleo periférico (fibras íntegras - %np), a porcentagem de fibras com núcleo central (fibras regeneradas - %nc) e a porcentagem da área total do músculo com abundante infiltrado inflamatório e células em processo inicial de regeneração (%área infl/reg).

### **3.5 Análise da mionecrose pela técnica do azul de Evans**

O corante azul de Evans (AE; tetrasodium diazo salt Evans blue dye; Sigma) é amplamente usado como um marcador *in vivo* de lesões do sarcolema, pois evidencia fibras musculares degeneradas ou em degeneração (Matsuda *et al*, 1995). O acúmulo intracelular do AE na fibra muscular esquelética indica alteração na permeabilidade da membrana (Hamer *et al*, 2002). O AE possibilita detectar alterações precoces da fibra muscular, quando ainda não são detectadas com técnicas histológicas tradicionais como a hematoxilina-eosina (Straub *et al*, 1997).

No dia em que completaram 29 dias de idade, 15 dias após o início do tratamento, cinco dos animais de cada grupo *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL foram pesados e receberam 0,01 ml/g de AE a 1% m/v via intraperitonal. Após 16 horas da injeção, os animais foram anestesiados e seus músculos retirados para análise conforme o item 3.3. O sucesso da injeção do AE foi identificado pela coloração azul presente nas orelhas e patas dos animais.

As lâminas com os cortes histológicos congelados foram lavadas três vezes em acetona P.A e PBS (solução em PBS: 14g de fosfato de sódio monofásico, 4,3g de fosfato de potássio dibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em um litro de água destilada; pH 7,5), secas em temperatura ambiente e montadas em meio para fluorescência DABCO (Sigma). As imagens fluorescentes foram obtidas a partir de uma vídeo câmera (NiHamamatsu C2400) acoplada ao microscópio de fluorescência (Nikon EFD-3 - comprimento de onda de emissão de 590nm), conectada a um microcomputador com o software Image Pro-Express. O número de fibras positivas ao AE foi obtida com auxílio de um contador manual.

### **3.6 Imunohistoquímica para F4/80**

A imunomarcção de macrófagos nas secções transversais dos músculos TA, STN, DIA e BB de dois animais dos grupos *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL foi baseada no protocolo de Villalta *et al*, 2009. Os cortes congelados foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida fixados em acetona por 10 minutos a 4°C e bloqueados por uma hora com solução de soro de cavalo a 10% em 0,05% de Tween-20 diluído em 50mM de Tris-HCl (pH 7,6) contendo 150mM de cloreto de sódio (NaCl). Os cortes foram incubados com o anticorpo rat anti-mouse F4/80 (Serotec; 1:250; BSA 1% em 0,1M PBS) a 4 °C *overnight*, lavados com PBS e incubados por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo secundário CY-3 anti-rat IgG (CY-3; Jackson ImmunoResearch; 1:250 em 0,1M PBS e BSA 1%, pH 7,8) por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100F) e as imagens captadas com a vídeo câmera Nikon Express Series conectada a um microcomputador com o software Image Pro-Express.

### **3.7 Quantificação do fator de necrose tumoral-alfa pela técnica de Western blotting**

#### **3.7.1 Preparo do extrato total**

Os músculos dos animais dos grupos C57BL10, *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL, previamente coletados em tubos criogênicos conforme descrito no item 3.3, foram seccionados em pequenos fragmentos com auxílio de um almofariz e pistilo e homogeneizados por 30 segundos com 2 ml de solução tampão a 4°C (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM, pirofosfato de sódio 10mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio 0,25mM, PMSF 1mM e 0,1 mg/ml de aprotinina) em velocidade máxima no aparelho Polytron PTA 20S modelo PT 10/35 (Brinkmann Instruments, Westbury, NewYork, USA). Em seguida, os extratos obtidos foram centrifugados a 11000 rpm, a temperatura de 4°C por 30 minutos no aparelho Sigma 3-18k (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany), sendo o sobrenadante utilizado para a quantificação protéica do extrato total pelo método de Bradford (1976).

#### **3.7.2 Quantificação protéica**

As amostras de extrato protéico foram tratadas com 50  $\mu$ l tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,04 mg/ml, glicerol 20% e SDS 2%, Tris-HCl 0,12 M, pH 6,8, beta-mercaptoetanol 0,28 M), aquecidas em chapa aquecedora por 5 minutos e agitadas em aparelho vórtex por 1 minuto. Em seguida, cinco géis SDS-poliacrilamida 8%-15% receberam 30  $\mu$ g de proteína total dos músculos TA, STN, DIA e BB. A corrida eletroforética foi de 4 h, em cuba vertical de acrílico contendo tampão Tris Glicina 50 mM, pH 8,3, sob tensão de 120 V e a eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante), ambas no aparelho de eletroforese da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, USA). Em seguida, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente com

solução basal (Trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) com 5% de leite desnatado pelo tempo de duas horas. Na sequência, as membranas foram incubadas a 4 °C por 12 horas com 10 µL do anticorpo primário Rabbit anti-mouse tumor necrosis factor-alpha polyclonal antibody–TNF-alfa (Millipore) em 10 ml de solução basal com 3% de leite desnatado. As membranas foram lavadas com solução basal por 30 minutos e posteriormente incubadas por duas horas em temperatura ambiente com 10ml de solução basal contendo 1% de leite em pó desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário rabbit HRP (H+L) (KPL, Gaithersburg, Meryland, USA). Em seguida, as membranas foram imersas em solução de quimioluminescência SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 minutos e as bandas imunorreativas foram detectadas e quantificadas no aparelho G:Box iChemi (Syngene, Cambridge, UK) com o software Gene Tools Version 4.01 (Syngene, Cambridge, UK).

Após a quantificação do TNF-alfa, as membranas de nitrocelulose foram mantidas em solução *stripping* (β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% m/v, Tris 62,5 mM, pH 6,7) por 30 minutos em estufa a 60 °C, em seguida lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - rabbit policlonal antibody - Santa Cruz) por 12 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário rabbit HRP (H+L) (KPL, Gaithersburg, Meryland, USA) por duas horas, lavadas e imersas em solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce) por 5 minutos. A leitura das bandas imunorreativas foi realizada de acordo com o mesmo procedimento realizado para a leitura do TNF-alfa.

### 3.8 Determinação da creatinoquinase (CK) no plasma sanguíneo

A CK é uma enzima intracelular encontrada nos músculos esqueléticos, músculo cardíaco e sistema nervoso central. Tem importante função na transferência de energia para o metabolismo muscular, pois catalisa a conversão da fosfocreatina em creatina durante a transformação da adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP) para a contração muscular (Nelson e Cox, 2008). O aumento da CK no plasma sanguíneo de indivíduos com DMD, bem como nos camundongos *mdx*, indica perda da integridade da membrana celular muscular (Percy *et al*, 1979).

Uma amostra de sangue de oito animais de cada grupo (*mdx* ω-3 e *mdx* CTRL) foi obtida sob anestesia de acordo com o item 3.3. Após toracotomia e exposição do coração, uma seringa heparinizada foi introduzida no ventrículo esquerdo e 0,5 ml de sangue foram puncionados. Em seguida, o sangue foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml, centrifugado a 12000 rpm, na temperatura de 4°C por 15 minutos no aparelho Sigma 3-18k (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany), sendo o sobrenadante utilizado para análise. Para quantificação utilizou-se o kit bioquímico CK da Bioclin. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro U.V Thermo Electron Corporation Spectrophotometer Genesys 20 (Thermo Electron Scientific Instruments Corp., Madison, Wisconsin, USA) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

### 3.9 Medida da força

Para verificar a influência do tratamento com o EPA sobre a força dos animais, dez camundongos *mdx* de cada grupo tiveram a força dos membros anteriores medidas em aparelho de medição de força horizontal tipo *grip strength* (Newprimer, Brasil) no início e no término do tratamento. Os animais foram contidos pela cauda e estimulados a segurar, com os membros anteriores, uma barra conectada a um transdutor, que transmite a força de contração dos músculos para o aparelho. Foram realizadas quatro medidas individuais para compor a média de cada animal, sendo o resultado final expresso em Grama-Força/Grama de animal (Messina *et al*, 2009).

### 3.10 Análise estatística

O software Bioestat 3.0 foi utilizado para a análise dos dados. Os valores foram expressos em média  $\pm$  dp. O *teste-t Student*, com significância  $p \leq 0,05$ , foi aplicado para comparação individual entre grupos.

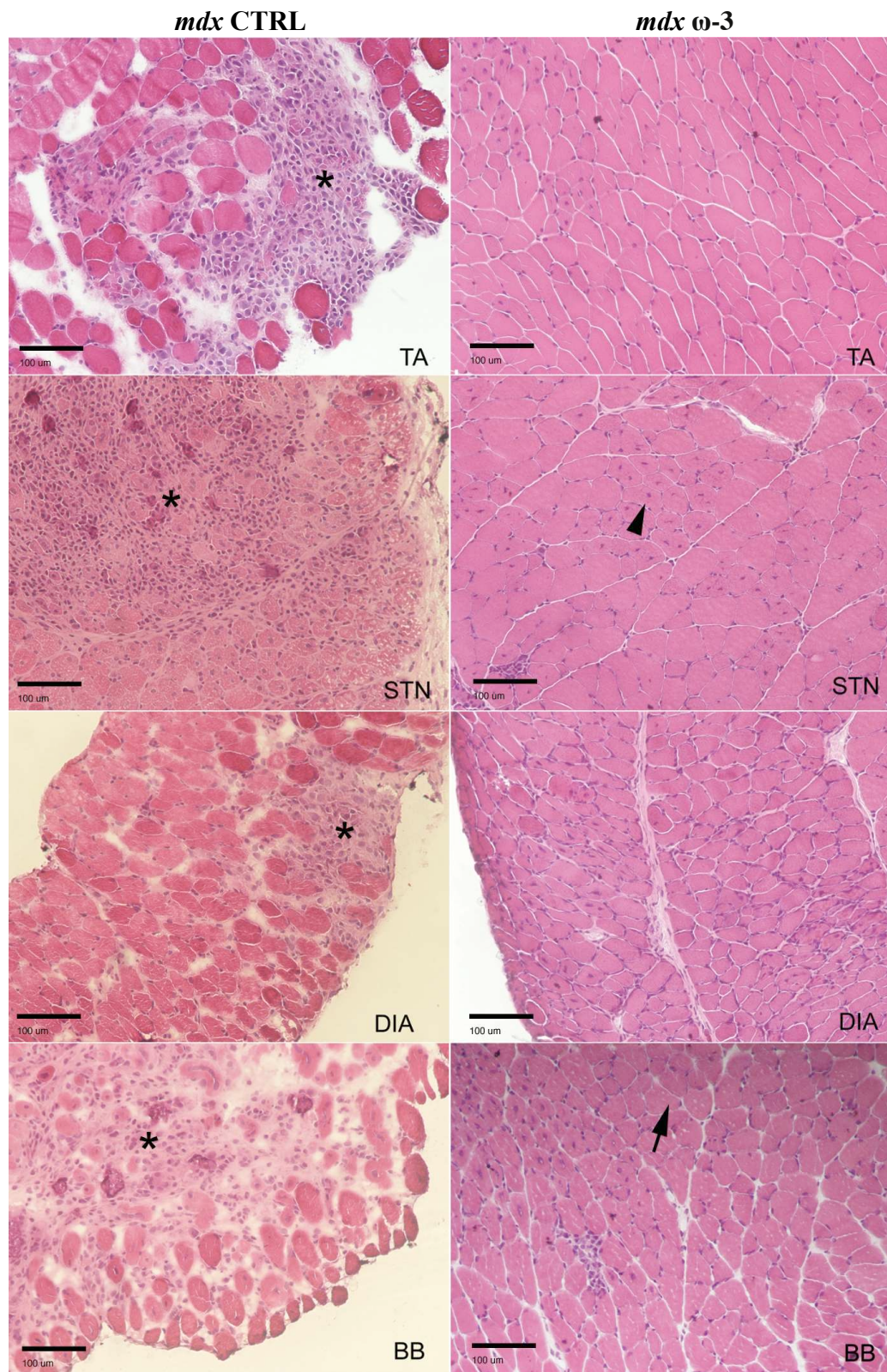
## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Análise da massa corporal dos animais

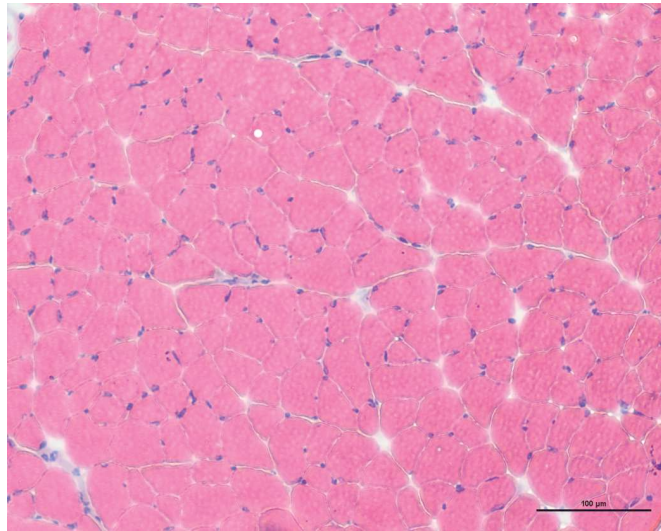
A massa corporal média dos grupos *mdx* CTRL (n=10) e *mdx*  $\omega$ -3 (n=10) com 14 dias de idade foi de 6,8 g  $\pm$  0,5 e 7,2 g  $\pm$  0,7, respectivamente, sem diferença significativa no início do tratamento (p=0,09, *test-t Student*). Com 30 dias, os animais foram novamente pesados e ambos os grupos tiveram aumento do peso corporal de cerca de 45-50%. Os valores obtidos foram 10,7 g  $\pm$  1,0 para o grupo *mdx* CTRL (p=0,004; *test-t Student*) e 11,4 g  $\pm$  2,0 para o grupo *mdx*  $\omega$ -3 (p=0,01; *test-t Student*). A comparação final entre grupos não apresentou diferença significativa (p=0,11; *test-t Student*), mostrando que o EPA não interferiu no crescimentos dos animais tratados.

#### 4.2 Análise histopatológica

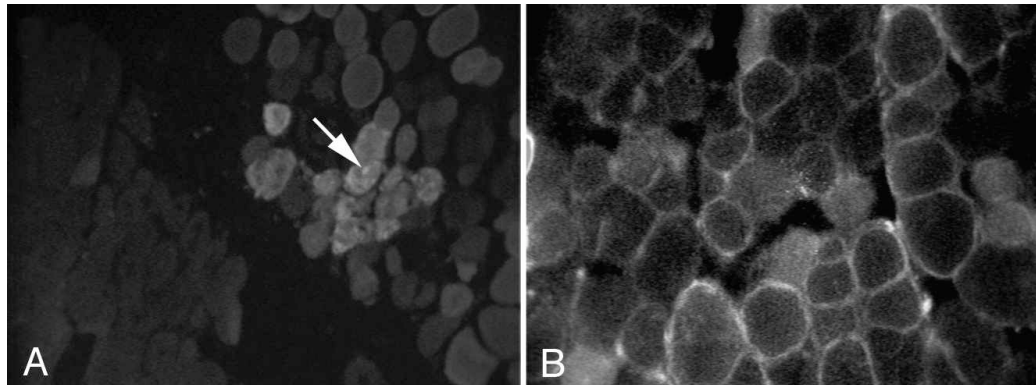
A secção transversal de um músculo estriado esquelético normal (Figura 4; grupo C57BL10; BB; coloração HE) mostra um padrão morfológico típico, com a presença de fibras musculares poligonais, de diâmetro pouco variável, com núcleo periférico e ausência de infiltrado inflamatório e processo de degeneração e regeneração muscular. Nos músculos TA, STN, DIA e BB dos grupos *mdx* CTRL e *mdx*  $\omega$ -3 (Figura 3) foram observadas fibras com núcleo periférico (*mdx*  $\omega$ -3; BB), fibras em degeneração na presença de infiltrado inflamatório (*mdx* CTRL; STN; BB), fibras no estágio inicial de regeneração (*mdx* CTRL; TA; DIA), fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras regeneradas (*mdx*  $\omega$ -3; STN). Nos cortes histológicos do grupo *mdx*  $\omega$ -3, notou-se a diminuição do espaço entre as fibras musculares em relação ao grupo *mdx* CTRL. Fibras AE-positivas (Figura 5) e imunomarcação para F4/80 (Figura 6), foram observadas em todos os músculos distróficos estudados de ambos os grupos.



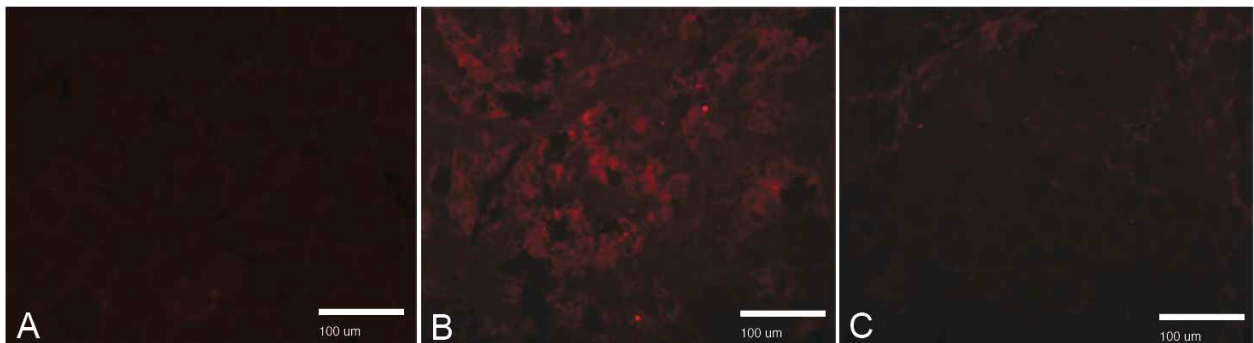
**Figura 3.** Secções transversais dos músculos tibial anterior (TA), esternomastóideo (STN), diafragma (DIA) e biceps braquial (BB) dos grupos *mdx CTRL* e *mdx ω-3*. Coloração HE.



**Figura 4.** Secção transversal do músculo bíceps braquial (BB) do grupo C57BL10. Coloração HE.



**Figura 5.** Secção transversal do músculo esternomastóide (STN) dos grupos *mdx* CTRL (A; 100X) e *mdx*  $\omega$ -3 (B; 200X) em microscopia de fluorescência mostrando grupo de fibras positivas ao AE (seta branca).



**Figura 6.** Secção transversal para imunomarcação de macrófagos no músculo bíceps braquial (BB) do grupo C57BL10 (A), *mdx* CTRL (B) e *mdx*  $\omega$ -3 (C).

### 4.3 Análise quantitativa

Os dados da Tabela 1 mostram que o grupo *mdx*  $\omega$ -3 preservou maior quantidade de fibras íntegras (%np) em todos os músculos estudados, chegando ao aumento significativo de 20% no STN. Ao mesmo tempo, diminuiu a mionecrose (%AE) em até quatro vezes nos músculos TA, STN e DIA. A inflamação (%área infl/reg) diminuiu em todos os músculos estudados. No músculo TA e BB esta diminuição foi cerca de sete vezes, enquanto que no STN e DIA três e quatro vezes do que no grupo *mdx* CTRL, respectivamente. Não houve diferença significativa entre o grupos *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL para o número total de fibras musculares.

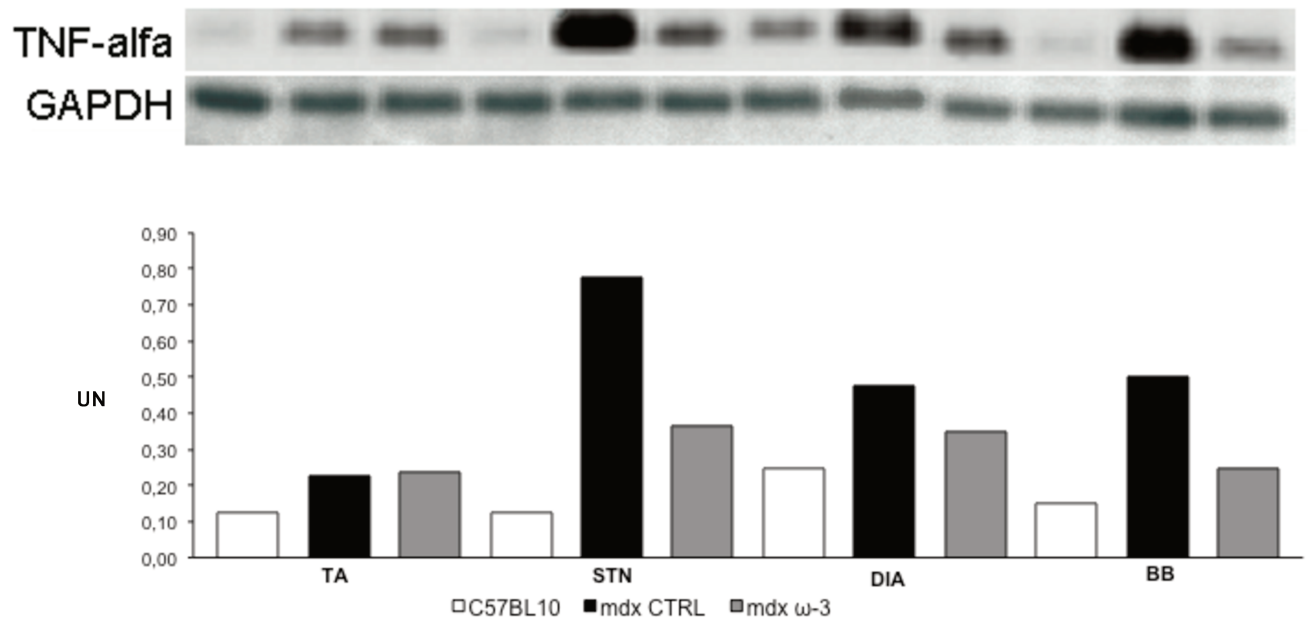
**Tabela 1. Dados quantitativos obtidos a partir da secção transversal dos músculos distróficos TA, STN, DIA e BB dos grupos *mdx* CTRL e *mdx*  $\omega$ -3.**

|            | <i>mdx</i>  | Número de fibras  | %np                          | %AE                         | % nc                        | %área infl/reg             |
|------------|-------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>TA</b>  | CTRL        | 1254 $\pm$ 83,59  | 66,71 $\pm$ 3,82             | 12,58 $\pm$ 2,58            | 20,72 $\pm$ 3,65            | 23,43 $\pm$ 20,45          |
|            | $\omega$ -3 | 1385 $\pm$ 174,89 | 81,13* $\pm$ 7,82<br>p<0,001 | 1,92* $\pm$ 1,57<br>p<0,001 | 16,94 $\pm$ 6,66            | 3,20* $\pm$ 2,00<br>p=0,04 |
| <b>STN</b> | CTRL        | 966 $\pm$ 52,27   | 50,04 $\pm$ 4,53             | 15,64 $\pm$ 2,67            | 34,32 $\pm$ 2,31            | 27,00 $\pm$ 20,12          |
|            | $\omega$ -3 | 882 $\pm$ 84,22   | 70,56* $\pm$ 5,52<br>p<0,001 | 4,25* $\pm$ 2,27<br>p<0,001 | 25,19* $\pm$ 5,36<br>p<,001 | 8,44* $\pm$ 2,09<br>p=0,04 |
| <b>DIA</b> | CTRL        | 1250 $\pm$ 90,51  | 73,38 $\pm$ 6,61             | 16,36 $\pm$ 7,10            | 10,26 $\pm$ 3,47            | 13,23 $\pm$ 7,85           |
|            | $\omega$ -3 | 1320 $\pm$ 94,20  | 86,71* $\pm$ 4,28<br>p<0,01  | 5,26* $\pm$ 2,70<br>p=0,004 | 8,03 $\pm$ 2,68             | 3,41* $\pm$ 3,18<br>p=0,03 |
| <b>BB</b>  | CTRL        | 961 $\pm$ 88,68   | 71,68 $\pm$ 8,27             | 9,27 $\pm$ 3,62             | 18,62 $\pm$ 7,28            | 21,86 $\pm$ 18,89          |
|            | $\omega$ -3 | 1183 $\pm$ 109,35 | 83,30* $\pm$ 3,02<br>p=0,03  | 4,17* $\pm$ 1,81<br>p=0,01  | 13,85 $\pm$ 2,92            | 3,22* $\pm$ 2,42<br>p=0,03 |

**TA**, músculo tibial anterior; **STN**, músculo esternomastóideo; **DIA**, músculo diafragma; **BB**, músculo bíceps braquial; **%np**, porcentagem de fibras com núcleo periférico; **%AE**, porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans; **%nc**, porcentagem de fibras regeneradas com núcleo central; **%Área infl/reg**, porcentagem da área de secção transversal que se encontra em processo inicial de regeneração em presença de abundante infiltrado inflamatório; \*Teste-t *Student*; Grupo *mdx* CTRL (n=5); Grupo *mdx*  $\omega$ -3 (n=5)

#### 4.4 Quantificação do fator de necrose tumoral-alfa

Os músculos do grupo *mdx* CTRL apresentaram níveis elevados de TNF-alfa quando comparado ao grupo C57BL10. O grupo *mdx*  $\omega$ -3 mostrou menor quantidade de TNF-alfa quando comparado com o grupo *mdx* CTRL, com exceção do músculo TA. Embora o EPA diminuísse os níveis de TNF-alfa nos animais tratados, ainda mostra-se elevado quando comparado com o grupo de animais C57BL10. A quantificação de TNF-alfa foi expressa em unidade arbitraria normalizada para os níveis de GAPDH usado como proteína controle (Figura 5).



**Figura 7.** Quantificação dos níveis de TNF-alfa (26kDa) pela técnica de Western blotting nos músculos tibial anterior (TA), esternomastoide (STN), diafragma (DIA) e bíceps braquial (BB) dos grupos C57BL/10 (barra branca; n=8), *mdx* CTRL (barra preta; n=8) e *mdx*  $\omega$ -3 (barra cinza; n=8). Diferença significativa entre C57BL10 x *mdx*  $\omega$ -3 (a), C57BL10 x *mdx* CTRL (b) e *mdx* CTRL X *mdx*  $\omega$ -3 (c).

#### 4.5 Níveis plasmáticos de creatinoquinase (CK)

Os valores médios de CK, expressos em U/L, dos grupos *mdx* CTRL e *mdx*  $\omega$ -3 foram  $1208 \pm 376$  e  $838 \pm 347$ , respectivamente ( $p=0,04$ ; teste t de *Student*;  $n=8$ ).

#### 4.6 Medida da força

Com 14 e 30 dias de vida foi realizada a medida da força horizontal de dez animais de cada grupo. A análise mostra que ambos os grupos, *mdx* CTRL e *mdx*  $\omega$ -3, tiveram ganho da força de cerca de 53% e 30%, respectivamente, quando comparado com o início do tratamento. Quando comparamos a medida da força inicial entre os grupos *mdx* CTRL e *mdx*  $\omega$ -3, a diferença não foi significativa ( $p=0,34$ ; teste t de *Student*). A comparação final da força entre grupos mostra diferença significativa ( $p=0,02$ ; teste t de *Student*), com o grupo *mdx*  $\omega$ -3 apresentando menor ganho de força quando comparado com o grupo *mdx* CTRL.

**Tabela 2. Massa (g), Força (gf) e Força/Massa (gf/g) de camundongos *mdx* no início e final do protocolo experimental.**

|                        | Massa (g)     |                | Força (grama-força - gf) |                | Força/Massa (gf/g) |                             |
|------------------------|---------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------|-----------------------------|
|                        | Início        | Final          | Início                   | Final          | Início             | Final                       |
| <i>mdx</i> CTRL        | $6,8 \pm 0,5$ | $10,7 \pm 1,0$ | $9,3 \pm 0,7$            | $22,9 \pm 3,8$ | $1,4 \pm 0,2$      | $2,1 \pm 0,2$               |
| <i>mdx</i> $\omega$ -3 | $7,2 \pm 0,7$ | $11,4 \pm 2,0$ | $9,7 \pm 2,1$            | $18,6 \pm 1,7$ | $1,3 \pm 0,2$      | $1,7^* \pm 0,2$<br>$p=0,02$ |

\* teste t de *Student*

## **5. DISCUSSÃO**

Na DMD e no camundongo *mdx* a proteína estrutural distrofina está ausente no sarcolema ou expressa de forma não funcional. Com isso, o complexo distrofina glicoproteínas se desorganiza, a fibra muscular se torna frágil durante os ciclos de contração e relaxamento, a concentração intracelular de íons cálcio e de radicais livres aumentam, resultando em necrose da célula (Watkins *et al*, 1988; Spencer e Mellgren, 2002; Grounds *et al*, 2005a, Gluglieri e Bushby, 2010). Nos músculos distróficos, a inflamação que ocorre após dano celular é um evento importante e está diretamente relacionada com a evolução da doença (Gorospe *et al*, 1994; Chen *et al*, 2000; Porter *et al*, 2002; Grounds *et al*, 2004). Os anti-inflamatórios corticosteróides prednisona e deflazacort são os únicos fármacos que mostraram comprovadamente retardar os prejuízos funcionais da DMD, porém o uso prolongado provoca efeitos colaterais prejudiciais ao organismo (Biggar *et al*, 2006; Bushby *et al*, 2010).

O EPA é um ácido graxo poli-insaturado ômega-3 com ação anti-inflamatória encontrado em peixes de água fria, óleo de peixe ou sintetizado no organismo a partir da ingestão de ácido alfa-linolênico (Arterburn *et al*, 2006). A ingestão de ômega-3 tem mostrado benefício na doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatóide, arteriosclerose, dentre outras enfermidades (Nestel, 2000; Ruggiero *et al*, 2009). Em pacientes com câncer pancreático avançado, o consumo de suplemento nutricional enriquecido com 1,09g de EPA, duas vezes ao dia, atenuou a progressão da caquexia (Barber *et al*, 1999). Os efeitos colaterais do EPA são considerados mínimos e estão relacionados principalmente ao desconforto gastrointestinal.

Estudos mostram que o EPA poderia modificar a composição de fosfolípidos de membrana celular, reduzindo o nível de ácido graxo poliinsaturado da série  $\omega$ -6 ( $\omega$ -6 PUFA) e aumentando os níveis de  $\omega$ -3 PUFA, promovendo um ambiente adequado para a organização de canais iônicos e fluxo de íons cálcio e sódio através da membrana celular (Nair *et al*, 1997). EPA também mostrou modular a atividade de canais de cálcio do tipo-L presentes no sarcolema de

cardiomiócitos, impedindo a elevação citoplasmática de íons cálcio a níveis tóxicos (Leaf e Weber, 1988). A dieta com óleo de peixe diminuiu a atividade de enzimas fosfolipases da classe A2, a degradação protéica e regulou os fatores miogênicos, sugerindo que o EPA poderia atenuar o processo de mionecrose. A ativação da fosfolipase A2 causa a elevação dos níveis intracelulares de cálcio e ácido araquidônico (AA), contribuindo para inflamação e necrose da célula (Castillero *et al*, 2009; Allen e Whitehead, 2011).

O AA, liberado a partir de fosfolipídios de membrana por ação das fosfolipases A2, pode ser convertido em eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos) através da ação das enzimas ciclooxigenase (COX-1-constitutiva e COX-2-indutiva) e 5-lipoxigenase. Sugere-se que o EPA iniba, competitivamente, a atividade da ciclooxigenase e lipoxigenase, diminuindo a produção de prostaglandina E2 e leucotrienos da série 4 e, conseqüentemente, a inflamação (Broughton e Wade, 2002). Embora os eicosanóides derivados da COX e da 5-lipoxigenase pareçam não contribuir para o aumento da necrose nos músculos distróficos (Pierno *et al*, 2007), a ação inibitória do EPA no metabolismo do ácido araquidônico poderia suprimir a produção destes mediadores inflamatórios e explicar, pelo menos em parte, a redução da inflamação na distrofinopatia (James *et al*, 2000; Calder, 2008).

A dose de EPA de 300mg/kg/dia administrada para os camundongos distróficos foi baseada no trabalho de Matsumoto *et al* (2009) e está além da recomendada para o consumo diário em humanos (1000 mg/dia). As diferenças entre metabolismo, progressão da doença e duração do tratamento foram consideradas na escolha da dose para os camundongos *mdx*. Porém, em humanos distróficos que necessitam de tratamento por tempo indeterminado, são necessários estudos clínicos detalhados para determinar a dose de EPA que atenda as necessidades terapêuticas desses pacientes.

A análise qualitativa dos cortes transversais corados com HE de ambos os grupos, *mdx*  $\omega$ -3 e *mdx* CTRL, confirma a presença de fibras musculares em degeneração, identificadas pela presença de áreas necróticas com infiltrado inflamatório, fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras regeneradas, caracterizada pela centro-nucleação. Nos cortes transversais do grupo *mdx*  $\omega$ -3 notou-se uma organização morfológica harmônica com menor variação aparente no diâmetro e espaço entre as fibras musculares e infiltrado inflamatório, observada pela menor marcação com o anticorpo F4/80.

Os dados quantitativos expressos na Tabela 1 corroboram a observação qualitativa e mostram que o EPA diminuiu a mionecrose que ocorre normalmente nos camundongos distróficos, pois foi encontrado menor número de fibras positivas ao AE e com núcleo central, menor área de inflamação/regeneração e preservação de maior quantidade de fibras com núcleo periférico. A diminuição da enzima CK no plasma sanguíneo indica a ação sistêmica do EPA sobre os músculos distróficos. Ao mesmo tempo, EPA não interferiu no crescimento e no ganho de força dos animais tratados. O grupo *mdx*  $\omega$ -3 apresentou menor ganho de força, quando comparado com o grupo *mdx* CTRL. Embora as razões para explicar este achado não sejam claras, uma hipótese seria a de que o EPA poderia ter interferido no comportamento dos animais distróficos. Sabe-se que os animais *mdx* apresentam alteração de comportamento, exibindo diminuição de atividade explorativa quando sob estresse (Yamamoto *et al*, 2008). Entretanto maiores estudos seriam necessários para se verificar possíveis ações do EPA nos sistemas motivacionais e comprovar esta hipótese.

Os resultados obtidos para o grupo *mdx* CTRL estão de acordo com os estudos prévios de Marques *et cols* (2008) e Leite *et cols* (2010), realizados nos músculos distróficos axiais e

apendiculares. Observa-se a presença de áreas mionecróticas com infiltrado inflamatório e o aumento dos níveis de TNF-alfa nos camundongos *mdx* durante o primeiro mês de vida.

Verificou-se que, com exceção do músculo TA, o tratamento com EPA diminuiu os níveis de TNF-alfa. Na análise qualitativa das secções transversais dos músculos estudados houve aparente diminuição da imunomarcção para F4/80, uma glicoproteína transmembrana de 125kDa expressa por macrófagos, indicando que o EPA poderia influenciar na produção ou liberação do TNF-alfa.

O TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória produzida por células do sistema imunológico e muscular durante o desenvolvimento, exercício extenuante, lesão e regeneração. O aumento da expressão de TNF-alfa foi observado em músculos de pacientes com DMD. Nos músculos distróficos, a elevação dos níveis de TNF-alfa acentua a degeneração e seu bloqueio farmacológico reduz consideravelmente a mionecrose, confirmando seu papel na progressão da distrofinopatia (Grounds and Torrissi, 2004; Radley e Grounds, 2006; Water *et al*, 2010). Babcock e cols (2002) demonstraram que a ação inibitória do EPA sobre a liberação de TNF-alfa por macrófagos poderia diminuir a inflamação.

A via de sinalização intracelular pelo qual o TNF-alfa estimula a produção de substâncias pró-inflamatórias se faz através do fator nuclear kappa B (NF-kB). O NF-kB é um fator de transcrição presente no citosol, estando inativado pelo inibidor de kappa B (IkB). O TNF-alfa se liga a receptores de membrana aumentando a atividade da espécies reativas de oxigênios dentro da fibra muscular e ativando os fatores NF-kB e p38 MAPK, que por sua vez migram até o núcleo da célula e induz a expressão de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória, apoptose e atrofia (Joussen *et al*, 2002; Singer *et al*, 2008). A ativação anormal de NF-kB leva a inflamação crônica ou excessiva em doenças como artrite reumatóide e asma (Lo *et al*, 1999;

Wang *et al*, 2011). O TNF-alfa atua via p38 MAPK nos músculos esqueléticos aumentando a expressão dos genes relacionados à via ubiquitina-proteassoma, dentre elas a atrogin1/MAFbx, resultando em atrofia muscular. p38 é uma proteína ativada por diversas formas de estresse celular, incluindo estresse oxidativo e TNF-alfa (Li *et al*, 2005).

No presente estudo, o mecanismo pelo qual o EPA diminuiu os níveis de TNF-alfa, que estão aumentados nos músculos distróficos, não foi esclarecido. Porém sugere-se que o tratamento com EPA poderia inibir a sinalização do TACE, para liberação do TNF-alfa solúvel (17kDa), ou do NF-kB, para genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim, para a diminuição da necrose e inflamação muscular nos animais jovens estudados. A partir dos resultados obtidos, seria de interesse estudar o efeito do EPA sobre os níveis de TNF-alfa circulantes, a expressão do NF-kB e da p38, uma vez que a elevação dos níveis dessa proteína poderia promover o catabolismo muscular pela ativação de atrogenes. Os resultados deste trabalho mostraram-se satisfatórios, pois o EPA amenizou a necrose e inflamação que normalmente ocorrem no camundongo *mdx*. Considerando que o EPA é utilizado como terapia coadjuvante para diversas doenças em humanos, seu uso poderia ser estendido para o tratamento das distrofinopatias.

## **6. CONCLUSÃO**

Verificamos que o EPA protege os músculos estriados esqueléticos do camundongo *mdx* da distrofinopatia, diminuindo a mionecrose e a inflamação nos estágios iniciais da doença. Os efeitos protetores do EPA foram evidentes no músculo diafragma, um dos músculos mais afetados na distrofia muscular. Sugere-se que o EPA, ao diminuir os níveis de TNF-alfa, amenize o processo inflamatório e, conseqüentemente, reduza a mionecrose. Visto o uso já estabelecido do EPA para o tratamento de outras patologias humanas, o presente trabalho sugere que o EPA possa ser potencialmente útil como terapia adicional para as distrofinopatias.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACHARYYA, S.; SHARMA, S.M.; CHENG, A.S.; LADNER, K.J.; HE, W.; KLINE, W.; WANG, H.; OSTROWSKI, M.C.; HUANG, T.H.; GUTTRIDGE, D.C. TNF inhibits noth-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in Duchenne muscular dystrophy. **Public Library of Science One**. v. 5, n. 8, p. e12479, 2010.

ALLAMAND, V.; CAMPBELL, K.P. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. **Human Molecular Genetics**. v. 9, n. 16, p. 2459-2467, 2000.

ALLEN, D.G.; WHITEHEAD, N.P. Duchenne muscular dystrophy – What causes the increase membrane permeability in skeletal muscle? **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. n. 43, p. 290-294, 2011.

ANDERSON, J.E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. **The Journal of Experimental Biology**. v. 209, p. 2276-2292, 2006.

ARTERBURN, L. M.; HALL, E. B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n<sub>3</sub> fatty acids in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.83, p.467S–1476S, 2006.

BABCOCK, T. A.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. 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.; ESPAT, N. J. Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF-alfa production. **Surgical Infections**. v.3, p.145-149, 2002.

BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; VOSS, A.C.; TISDALE, M.J.; FEARON, K.C.H. The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight loss in patients with pancreatic cancer. **Brazilian Journal of Cancer**. v. 81, p. 80-86, 1999.

BAREND, P.L.; ENGEL, A.G. Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane. **Neurology**. v. 37, p. 1466-1475, 1987.

BIGGAR, W.D.; HARRIS, V.A.; ELIASOPH, L.; ALMAN, B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. **Neuromuscular Disorders**. v. 16, p. 249-255, 2006.

BOBO, J.K.; KENNESON, A.; KOLOR, K.; BROWN, M.A. Adherence to American Academy of Pediatrics recommendation for cardiac care among female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Pediatrics**. v. 123, p. e471-e475, 2009.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal Molecular Medicine**, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. **Neuromuscular Disorders**. v. 14, p. 675-682, 2004.

BROUGHTON, K.S.; WADE, J.W. Total fat and (n-3):(n-6) Fat ratios influence eicosanoid production in mice. **Journal of Nutrition**. v. 32, p. 88-94, 2002.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 81, p. 1189-1192, 1984.

BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D.J.; CASE, L.; CLEMENS, P.R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. **The Lancet Neurology**. v. 9, p. 177-189, 2010;

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Molecular Nutrition Food Research**. v. 52, p. 885-897, 2008.

CARRET-PIERRAT, M.; LAFOUX, A.; TANNIOU, G.; CHAMBONNIER, L.; DIVET, A.; FOUGEROUSSE, F.; HUCHET-CADLOU, C.; SÉGALAT, L. Pre-clinical study of 21 approved drugs in the *mdx* mouse. **Neuromuscular Disorders**. v. 21, n. 5, p. 313-327, 2011.

CASTILLERO, E.; MARTÍN, A.L.; LÓPEZ-MENDUIÑA, M.; VILLANÚA, M.; LÓPEZ-CALDERÓN, A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogen-1 and on myogenic regulatory factors. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 297, p. R1322–R1331, 2009.

CHANG, W.J.; IANNACONE, S.T.; LAU, K.S.; MASTERS, B.S.; MCCABEM T.J.; MCMILAN, K.; PADRE, R.C.; SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G.; STULL, J.T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 17, p. 9142-9147, 1996.

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICK, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**. v. 84, p. 209-238, 2004.

CHAUBOURT, E.; VOISIN, V.; FOSSIER, P.; BAUX, G.; ISRAËL, M.; De La PORTE, S. Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 96, p. 43-52, 2002.

CHEN, Y. W.; ZHAO, P.; BORUP, R.; HOFFMAN, E. P. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. **Journal of Cell Biology**. v.151, p. 1321-1336, 2000.

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

DESGUERRE, I.; MAYER, M.; LETURCQ, F.; BARBET, J.P.; GHERARDI, R.K.; CHRISTOV, C. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. v. 68, n. 7, p.762-73, 2009.

DISATNICK, M.H.; DH AWAN, 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. **Journal of the Neurological Science**. v. 161, p. 77-84, 1998.

EARNSHAW, J.C.; KYPRIANOU, P.; KRISHEN, K.; DHOOT, K. Differentiation of original and regenerated skeletal muscle fibers in mdx dystrophic muscles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 118, p. 19-27, 2002.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. New York: McGraw-Hill, Inc., 1994. 1937p. p. 1133-1187.

FAIRCLOUGH, R.J.; BAREJA, A.; DAVIES, K.E. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy. **Experimental Physiology**. DOI: 10.1113/expphysiol.2010.053025, 2011.

FRANCO-OBREGON, J.R.A.; LANSMAN, J.B. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. **Journal of Physiology**. v. 481, p. 299-309, 1994.

GASCHEN, F.; BURGUNDER, J.M. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. **Acta Neuropathologica**, v. 101, p. 591-600, 2001.

GOROSPE, J.R.M.; THARP, M.; DEMITSU, T.; HOFFMAN, E.P. Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. **Neuromuscular Disorders**. v. 4, p. 325-333, 1994.

GOYENVALLE, A.; SETO, J.T.; DAVIES, K.E.; CHAMBERLAIN, J. Therapeutics approaches to muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**. v. 20, p. R69-R78, 2011.

GROUND, M.D.; TORRISI, J. Anti-TNF $\alpha$  (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **FASEB Journal**. v. 18, p. 676-682, 2004.

GROUND, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**. v. 15, p. 381-391, 2005a.

GROUND, M.D.; DAVIES, M.; TORRISI, J.; SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.; HODGETTS, S. Silencing TNF $\alpha$  activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. **Cell and Tissue Research**. v. 320, n.3, p. 509-515, 2005b.

GUGLIERI, M.; BUSHBY, K. Molecular treatments in Duchenne muscular dystrophy. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 10, p. 331-337, 2010.

HAMER, P.W.; McGEACHIE, J.M.; DAVIES, M.J.; GROUND, M.D. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **Journal of Anatomy**, v. 200, p. 69-79, 2002.

HARPER, C.R.; EDWARDS, M.J.; DEFILIPIS, A.P.; JACOBSON, T.A. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. **Journal of Nutrition**. v.136, p.83-87, 2006.

HENRICKS-WEHLING, M.; LEE, J.J.; TIDBALL, J.G.; Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 483-490, 2004.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.; KUNKEL, L.M. Dystrophin – the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**. v. 51, n. 6, p. 919-928, 1987.

JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.71, p.343S-348S, 2000.

JIN, Y.; MURAKAMI, N.; SAITO, Y.; GOTO, Y.; KOISHI, K.; NONAKA, I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 99, p. 619-627, 2000.

JOUSSEN, A.M.; POULAKI, V.; MITSIADES, N.; KIRCHHOF, B.; KOIZUMI, K.; DOHMEN, S.; ADAMIS, A.P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF $\alpha$  suppression. **FASEB Journal**. v.16, p.438-40, 2002.

KHURANA, T.S.; DAVIES, K.E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 2, p. 379-389, 2003.

LEAF, A.; WEBER, P. C. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. **New England Journal of Medicine**. v. 318, p. 549-557, 1988.

LEITE, P.E.; LAGROTA-CANDIDO, J.; MORAES, L.; D'ELIA, L.; PINHEIRO, D.F.; DA SILVA, R.F.; YAMASAKI, E.N.; QUIRICO-SANTOS, T. Nicotinic acetylcholine receptor activation reduces skeletal muscle inflammation of *mdx* mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 227, p. 44-51, 2010.

LI, Y-P.; CHEN, Y.; JOHN, J.; MOYLAN, J.; JIN, B.; MANN, D.L.; REID, M.B. TNF- $\alpha$  acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle **The FASEB Journal**. v. 19, p. 362-370, 2005.

LI, H.; MITTAL, A.; MAKONCHUK, D.Y.; BHATNAGAR, S.; KUMAR, A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 14, p. 2584–2598, 2009.

LO, C.J.; CHIU, K.C.; FU, M.; LO, R.; HELTON, S. Fish oil augments macrophage cyclooxygenase II (COX-2) gene expression induced by endotoxin. **Journal Surgical Research**. v. 86, p.103-107, 1999.

LOPEZ-FERRER, S.; BAUCCELLS, M.D.; BARROETA, A.C.; GALOBART, J.; GRASHORN, M.A. n-3 Enrichment of Chicken Meat. 2. Use of Precursors of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids: Linseed Oil. **Poultry Science**. v. 80, p. 753-762, 2001.

MANZUR, A.Y.; KINALI, M.; MUNTONI, F. Update of management of Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Disease Childhood**. v. 93, n. 11, p. 986-990, 2008.

MARQUES, M.J.; MACHADO, R.V.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. **Muscle & Nerve**. v. 37, n.1, p. 61-67, 2008.

MATSUDA, R.; NISHIKAWA, A.; TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **Journal of Biochemistry**. v. 118, n. 5, p. 959-964, 1995.

MATSUMOTO, T.; NAKAYAMA, N.; ISHIDA, K.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Eicosapentaenoic acid improves imbalance between vasodilator and vasoconstrictor actions of endothelium-derived factors in mesenteric arteries from rats at chronic stage of Type 2 diabetes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 329, p. 324-334, 2009.

MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemical and Cell Biology**. v.73, n. 9-10, p.723-732, 1995.

MESSINA, S.; BITTO, A.; AGUENNOUZ, M.; MAZZEO, A.; MIGLIORATO, A.; POLITO, F.; IRRERA, N.; ALTAVILLA, D.; VITA, G.L.; RUSSO, M.; NARO, A.; PASQUALE, M.G.; RIZZUTO, E.; MUSARÒ, A.; SQUADRITO, F.; VITA, G. Flavocoxid counteracts muscle necrosis and improves functional properties in mdx mice: A comparison study with methylprednisolone. **Experimental Neurology**. v. 220, p. 349–358, 2009.

MINATEL, E.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. **Muscle & Nerve**. v. 28, n. 5, p. 561-569, 2003.

MULLER, J.; VAYSSIERE, N.; ROYUELA, M.; LEGER, M.E.; MULLER, A.; BACOU, F.; PONS, F.; HUGON, G.; MORNET, D. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**. v. 22, p. 133-139, 2001.

NAIR, S.S.; LEITCH, J.W.; FALCONER, J.; GARG, M.L. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. **Journal of Nutrition**. v. 127, p. 383-393, 1997.

NAKAMURA, A.; TAKEDA, S. Mammalian models of Duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Article ID 184393, 8 pages doi:10.1155/2011/184393, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

NESTEL, P. J. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. **American Journal Clinical Nutrition**. v.71, p.228S–231S, 2000.

NOVAK, T.E.; BABCOCK, T.A.; JHO, D.H.; HELTON, W.S.; ESPAT, N.J. NF- $\kappa$ B inhibition by  $\omega$ -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- $\alpha$  transcription. **American Journal Physiological Lung Cell Molecular Physiology**. v. 284, p. L84–L89, 2003.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti-TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. **Nature Review Drug Discovery**. v. 2, p. 736-746, 2009.

PARREIRA, S.L.S.; RESENDE, M.B.D; PEDUTO, M.D.C; MARIE, S.K.N; CARVALHO, M.S.; REED, U.C. Quantification of muscle strength and motor ability in patients with Duchenne muscular dystrophy on steroid therapy. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 65, n. 2A, p. 245-250, 2007.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of Neurological Science**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PERCY, M.E.; CHANG, L.S.; MURPHY, E.G.; OSS, I.; VERELLEN-DUMOULIN, C.; THOMPSON, M.W. Serum creatine kinase and pyruvate kinase in Duchenne muscular dystrophy carrier detection. **Muscle & Nerve**. v. 2, n. 5, p. 329-339, 1979.

PIERNO, S.; NICO, B.; BURDI, R.; LIANTONIO, A.; DIDONNA, M. P.; CIPPONE, V.; FRAYSSE, B.; ROLLAND, J.F.; MANGIERI, D.; ANDREETTA, F.; FERRO, P.; CAMERINO, C.; ZALLONE, A.; CONFALONIERI, P.; DE LUCA, A. Role of tumor necrosis factor  $\alpha$ , but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v. 33, p. 344-359, 2007.

PIERS, A.T.; Lavin, T.; Radley-Crabb, H.G.; Bakker, A.J.; Grounds, M.D.; Pinniger, G.J. Blockade of TNF in vivo using cV1q antibody reduces contractile dysfunction of skeletal muscle in response to eccentric exercise in dystrophic mdx and normal mice. **Neuromuscular Disorders**. v. 21, p. 132-141, 2011.

PORTER, J.D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H.J.; RAO, J.S.; MERRIAN, A.P.; RICHMONDS, C.R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F.H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Human Molecular Genetics**. v. 11, p. 263-272, 2002.

RADLEY, H.G.; GROUND, M.D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiology Disease**. v. 23, p. 387-397, 2006.

RANDO, T.A. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. **Microscopy Research and Thechnique**, v. 55, p. 223-235, 2001.

RUGGLERO, C.; LATTANZIO, F.; LAURETANI, F.; GASPERINI, B.; ANDRES-LACUEVA, C.; CHERUBINI, A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and immune-mediated diseases: inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis. *Curr. Pharm. Des.* v. 15, p. 4135-4138, 2009.

SASAKA, T.; IMAMURA, M.; ARAISHI, K.; NOGUCHI, S.; MIZUNO, Y.; TAKAGOSHI, N.; HAMA, H.; WAKABAYASHI-TAKAI, E.; YOSHIMOTO-MATSUDA, Y.; NONAKA, I.; KANEKO, K.; YOSHIDA, M.; OZAWA, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in  $\gamma$ -sarcoglycan-deficient mice. **Neuromuscular Disorders**. v. 13, p. 193-206, 2003.

SINGER, P.; SHAPIRO, H.; THEILLA, M.; ANBAR, R.; SINGER, J.; COHEN, J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and integrative perspective. **Intensive Care Medical**. v. 34, p. 1580-1592, 2008.

SMITH, H.J.; GREENBERG, N.A.; TISDALE, M.J. Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice. **British Journal of Cancer**. v. 91, n. 2, p. 408-412, 2004.

SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. **Human Molecular Genetics**. v. 11, n. 21, p. 2645-2655, 2002.

STRAUB, V.; RAFAEL, J.A.; CHAMBERLAIN, J.S.; CAMPBELL, K.B.; Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. **Journam of Cell Biology**, v. 139, n. 2, p. 375-385, 1997.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 288, p. 345-353, 2005.

TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. **Journal of Applied Physiology**. v. 102, p. 1677-1686, 2007.

TORRES, L.F.; DUCHEN, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**. v. 110, p. 269-299, 1987.

VANDEBROUCK, A.; DUCRET, T.; BASSET, O.; SEBILLE, S.; RAYMOND, G.; RUEGG, U.; GAILLY, P.; COGNARD, C.; CONSTANTIN, B. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. **The FASEB Journal**, doi:10.1096/fj.04-3633fje, 2005.

VILLALTA, S.A.; NGUYEN, H.X.; DENG, B.; GOTOH, T.; TIDBALL, J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for the arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**. v. 18, p. 482-496, 2009.

VOISIN, V.; SÉBRIÉ, C.; MATECKI, S.; YU, H.; GILLET, B.; RAMONATXO, M.; ISRAËL, M.; DE LA PORTE, S. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, p. 123-130, 2005.

YAMAMOTO, K.; YAMADA, D.; KABUTA, T.; TAKAHASHI, A.; WADA, K.; SEKIGUCHI, M. Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. **Neuromuscular disorders**. v. 20, n. 8, p. 505-511, 2010.

WANG, W.-L.; LIU, W.; GONG, H.-Y.; HONG, J.-R.; LIN, C.-C.; WU, J.-L. Activation of cytokine expression occurs through the TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-mediated pathway in birnavirus-infected cells. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 31, p. 10-21, 2011.

WATERS, F.J.; SHAVLAKADZE, T.; MCILDOWIE, M.J.; PIGGOTT, M.J.; GROUNDS, M.D. Use of pifithrin to inhibit p53-mediated signaling of TNF in dystrophic muscles of *mdx* mice. **Molecular Cell Biochemistry**. v. 337, 119-131, 2010.

WATKINS, S.C.; HOFFMAN, E. P.; SLAYTER, H.S. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibers. **Nature**. v. 333, n. 6176, p. 863-866, 1988.

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.

## ANEXO - I



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2165-1, sobre "Terapia farmacológica das distrofias musculares: agentes anti-inflamatórios e o complexo distrofina glicoproteínas", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Julia Marques / Rafael Ventura Machado, 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 28 de junho de 2010.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2165-1, 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 June 28, 2010.

Campinas, 28 de junho de 2010

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
PresidenteFátima Alonso  
Secretária Executiva