

**SAMARA CAMAÇARI DE CARVALHO**

**“POPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS EM MÚSCULOS  
ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS *mdx* TRATADOS COM  
ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO”**

**CAMPINAS, 2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SAMARA CAMAÇARI DE CARVALHO

**“POPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS EM MÚSCULOS  
ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS *mdx* TRATADOS COM  
ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Samara Camaçari de Carvalho*  
  
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 .

Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Co-Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

CAMPINAS, 2012

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

C253p	<p>Carvalho, Samara Camaçari de, 1982- Populações de macrófagos em músculos esqueléticos de camundongos <i>mdx</i> tratados com ácido eicosapentaenóico / Samara Camaçari de Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Maria Julia Marques. Coorientador: Selma Maria Michelin Matheus. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p style="text-align: center;">1. Ácido eicosapentaenóico. 2. Camundongo <i>mdx</i>. 3. Distrofia muscular de Duchenne. 4. Inflamação. 5. Macrófagos. I. Marques, Maria Julia, 1961-. II. Matheus, Selma Maria Michelin. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Population of macrophages in skeletal muscles of *mdx* mice treated with eicosapentaenoic acid

**Palavras-chave em Inglês:**

Eicosapentaenoic acid

*Mdx* mice

Duchenne muscular dystrophy

Inflammation

Macrophages

**Área de concentração:** Anatomia

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

**Banca examinadora:**

Maria Julia Marques [Orientador]

Maeli Dal Pai

Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**Data da defesa:** 30-08-2012

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

Campinas, 30 de agosto de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

  
Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcondes Cavalcante Franca Junior

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Henrique Marques De Souza

\_\_\_\_\_  
Assinatura

***Dedico...***

Aos meus pais, Osmar (*in memoriam*) e Iraci, pela atenção e carinho com que me ensinaram a respeitar a mim e ao próximo e pelo exemplo diário e constante. Aos meus irmãos Túlio e Glauco pelo companheirismo e apoio! Ao meu sobrinho Luiz Henrique pela alegria da sua presença.

Amo-os incondicionalmente!!

*“Viver é sempre dizer aos outros que eles são importantes. Que nós os amamos, porque um dia eles se vão e ficaremos com a impressão de que não os amamos o suficiente.”*

*Chico Xavier*

### *Agradeço...*

Ao **meu pai**, Osmar (*in memoriam*), que mesmo em poucos anos de convívio nesta vida foi capaz de me ensinar valores que carrego comigo e coloco em prática todos os dias; agradeço pelo amor, carinho, dedicação e pela Luz que me guia.

À **minha mãe**, Iraci, por ser minha mãe, pelo amor, força, coragem e dedicação; pelos ensinamentos, conversas e apoio; por sempre ter permitido que a vida me ensine a ter “novos olhos” e por estar sempre ao meu lado.

Aos **meus irmãos**, Túlio e Glauco, que sempre estiveram presentes em minha vida, que me mostram com atitudes como ser digno de si.

Ao **meu sobrinho**, Luiz Henrique por me ensinar o valor que existe por trás das pequenas coisas da vida!

*“O que as grandes e puras afeições têm de bom é que depois da felicidade de tê-las sentido, resta ainda a felicidade de recordá-las.”*

*(Alexandre Dumas)*

*Agradecimento especial...*

À **Profa. Dra. Maria Julia Marques** por ter aberto as portas desta Universidade, por ter acreditado em meu trabalho, pelos ensinamentos e amadurecimento profissional, pelo enriquecimento de idéias, pela atenção e paciência, por ser exemplo de dedicação, por conduzir meus passos na pós-graduação e por tornar este trabalho possível.

*“Um nobre exemplo torna fáceis às ações difíceis.” (Johann Goethe)*

À **Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus** pela dedicação com que me conduzindo na vida acadêmica, por ter despertado minha paixão pela Anatomia, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, por zelar pela minha busca ao conhecimento, por sempre estar presente em minha vida e por tornar este trabalho possível.

*“Ficamos mais sábios por termos vivido momentos de aprendizado com os que caminham ao nosso lado”. (Paola Rhoden)*

*Agradeço...*

À **Profa. Dra. Maeli Dal Pai**, pela contribuição e apoio no decorrer da minha formação acadêmica e pelas sugestões a este trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli**, pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica e pelas considerações feitas a este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcondes Cavalcante Franca Junior**, pelas sugestões compartilhadas na pré-banca deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Henrique Marques de Souza**, por gentilmente aceitar nosso convite para compor a banca.

*“A ciência, como um todo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário”.*

*(Albert Einstein)*

### ***Agradeço...***

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

*“Conhecer não é demonstrar nem explicar, é aceder à visão.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

À **Profa. Dra. Valéria Cagnon Quitete** por gentilmente abrir as portas de seu laboratório para a realização de algumas análises deste trabalho e pela orientação no Programa de Estágio Docente (PED) que enriqueceu e ampliou minha formação acadêmica.

*"A experiência mantém uma preciosa escola." (Benjamin Franklin)*

À todos os **docentes do “Departamento de Anatomia” da UNICAMP** pela contribuição na minha formação através do conhecimento compartilhado nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*(Albert Einstein)*

Aos **docentes do Instituto de Ciências Biológicas da UNESP-Botucatu**, por transmitirem o conhecimento científico e pessoal, por fazerem da graduação momento de enriquecimento de vida, pelo carinho e atenção e por fazerem parte da minha vida até os dias de hoje!

*“Diga-me e eu esquecerei, ensina-me e eu poderei lembrar, envolva-me e eu aprenderei.”*

*(Benjamin Franklin)*

### **Agradeço...**

À **Dra. Ana Paula Tiemi Taniguti, Dra. Adriana Pertille, Dra. Cintia Yuri Matsumura, Dr. Rafael Machado, Dr. Renato Ferretti, Ms. Letícia Montagholi Apolinário**, pela ajuda diária, amizade constante, por enriquecerem o meu dia a dia tornando-o muito mais divertido e por toda a ajuda na realização desde trabalho.

*“A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja; ela exerce-se (é uma virtude).”*  
(Simone Weil)

Aos demais **amigos e colegas do laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular e do “departamento de Anatomia” (UNICAMP)**, pelo aprendizado da convivência em grupo, pela companhia diária e auxílio na realização deste trabalho.

*“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado.”* (Isaac Newton)

À **Elisa Mari Kawamoto, Mariana Almeida Barbosa, Tassiani Nunes Yamashita e Carlos Henrique Camargo** por terem feito e fazerem parte da minha vida, pelo apoio desde a graduação e amizade que supera qualquer distância!!

*“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os verdadeiros amigos sempre são amigos, mesmo que não tenham quase mais nada em comum, ouvem uns aos outros e acima de tudo compartilham as mesmas recordações! E assim são os amigos”.* (Vinícius de Moraes)

À **Maria Conceição Selke, Ingo Grinhard Selke, Elisabeth Gerda Selke e Marlene Castanharo** por estarem presentes em todos os momentos da minha vida e da minha família; e por todo o apoio e carinho que recebo desde o primeiro dia em que os conheci.

*“Um Amigo se faz rapidamente; já a amizade é um fruto que amadurece lentamente.”*  
(Aristóteles)

### *Agradeço...*

Aos **Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula** pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais realizados neste trabalho. À **Sra. Marlene Lima** pelo auxílio na manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho. Aos **Srs. Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos, Toni Donizeti dos Santos, Walter e Érika Campos** pela prestatividade durante o mestrado.

À **FAPESP (2010/13412-7)** pelo apoio financeiro que permitiu a execução deste trabalho.

À **CAPES, FUNCAMP, CNPq** pelo apoio financeiro ao nosso grupo de pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela excelência na formação profissional de seus alunos.

À **Sra. Lílian Alves Senne Panagio** pela atenção, dedicação e auxílio durante o mestrado.

*“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra.” (Aristóteles)*

*“A verdadeira viagem da descoberta não consiste em  
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”*

*Marcel Proust*

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BB** – Músculo bíceps braquial
- BSA** – Albumina de soro bovino
- CDG** - Complexo distrofina-glicoproteínas
- CK** – Creatina Quinase
- DABCO** - 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
- DIA** – Músculo diafragma
- DMD** – Distrofia Muscular de Duchenne
- EPA** – *Eicosapentaenoic acid*
- Grb2** - *growth factor receptor-bound 2*
- HE** – Hematoxilina-eosina
- IL** – Interleucina
- IFN- $\gamma$**  – Interferon gama
- iNOS** – Óxido nítrico sintase induzível
- i.p.** – injeção intraperitoneal
- mdx** – Murine dystrophin X-linked
- nNOS** – Óxido nítrico sintase neural
- Nc** – Núcleo central
- Np** – Núcleo periférico
- PBS** – Tampão fosfato salina
- PUFA** – Ácido graxo poli-insaturado
- QDR** – Músculo quadríceps femoral

## RESUMO

---

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia progressiva causada pela ausência da proteína distrofina e necrose muscular progressiva. No camundongo *mdx*, modelo da DMD, a resposta inflamatória é exacerbada e populações distintas de macrófagos, M1 e M2, influenciam a degeneração e regeneração muscular, respectivamente, regulando a progressão da doença. Anti-inflamatórios esteróides são utilizados para a terapia farmacológica da DMD. Contudo, os efeitos colaterais decorrentes do seu uso contínuo estimulam o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para esta doença. No presente trabalho, verificamos os efeitos do ácido eicosapentaenóico (EPA) sobre os macrófagos M1 e M2 nos músculos bíceps braquial (BB), diafragma (DIA) e quadríceps femoral (QDR) do camundongo *mdx*. Camundongos *mdx* (14 dias de vida pós-natal) receberam 300mg/Kg de EPA diluído em óleo mineral, via gavagem, diariamente, por 16 dias. Camundongos *mdx* não tratados e camundongos C57BL/10 não tratados receberam óleo mineral via gavagem, pelo mesmo período. Verificamos que o EPA diminuiu a mionecrose (redução da CK no plasma) e aumentou o número de fibras com núcleo periférico, principalmente no BB e DIA. Em todos os músculos estudados, o tratamento com EPA diminuiu significativamente a área total de inflamação. Nos músculos BB e DIA, o tratamento com EPA aumentou a área de macrófagos M2. No QDR, observou-se predominância de regeneração muscular após o EPA, evidenciada por extensas áreas contendo fibras com núcleo central, em diferentes estágios de regeneração. Estes resultados sugerem que o EPA altera o balanço entre os macrófagos M1 e M2, promovendo diminuição de macrófagos M1, citotóxicos, o que pode contribuir para a proteção contra a mionecrose dos músculos distróficos.

## ABSTRACT

---

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive myopathy characterized by the absence of dystrophin and progressive muscle necrosis. In the *mdx* mice model of DMD, the inflammatory response is exacerbated and distinct macrophage populations, M1 and M2, influence muscle degeneration and regeneration, respectively, regulating the progression of the disease. Antiinflammatory steroids are the choice pharmacological therapy for DMD. However, their side effects stimulate the development of new drug therapies for this disease. In the present study, we observed the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on M1 and M2 macrophages in the biceps brachii (BB), diaphragm (DIA) and quadriceps (QDR) muscles of the *mdx* mice. *Mdx* mice (14 days old) received 300mg/kg of EPA diluted in mineral oil by gavage, daily, for 16 days. Untreated *mdx* and C57BL/10 mice received mineral oil by gavage for the same period. We observed that EPA decreased myonecrosis (reduced plasma CK) and increased the number of fibers with peripheral nuclei, mainly in the BB and DIA. In all muscles, treatment with EPA significantly decreased the total area of inflammation. In DIA and BB muscles, treatment with EPA increased the area of M2 macrophage. In the QDR, there was a predominance of muscle regeneration after EPA, with extensive areas containing fibers with central nuclei at different stages of regeneration. These results suggest that EPA affects the balance of M1 and M2 macrophages in dystrophic muscles, with a trend towards a decrease in the cytotoxic M1 phenotype, which may contribute to the protection against myonecrosis in the dystrophic muscles.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. Introdução</b>	
1.1. Distrofia Muscular de Duchenne.....	<b>01</b>
1.2. Distrofina e o Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG).....	<b>03</b>
1.3. Camundongo <i>mdx</i> .....	<b>06</b>
1.4. Degeneração Muscular.....	<b>09</b>
1.5. Resposta Inflamatória.....	<b>10</b>
1.6. Regeneração Muscular.....	<b>12</b>
1.7. Ácido Eicosapentaenóico.....	<b>14</b>
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>17</b>
3.1. Animais.....	<b>17</b>
3.2. Grupos Experimentais e Tratamento.....	<b>17</b>
3.3. Procedimento Cirúrgico para Retirada dos Músculos.....	<b>19</b>
3.4. Análise Histológica.....	<b>20</b>
3.4.1. Imunomarcção dos Macrófagos.....	<b>20</b>
3.4.2. Hematoxilina e Eosina.....	<b>21</b>
3.5. Determinação da Creatina Quinase (CK).....	<b>24</b>
3.6. Análise Estatística.....	<b>24</b>

<b>4. Resultados.....</b>	<b>25</b>
4.1. Análise Histopatológica.....	25
4.1.1. Análise Qualitativa dos Macrófagos.....	25
4.1.2. Análise Quantitativa da Área Total dos Macrófagos (F4/80).....	27
4.1.3. Análise Quantitativa dos Macrófagos M1 (iNOS) e M2 (CD206).....	28
4.1.4. Análise Qualitativa das Fibras Musculares (HE).....	30
4.1.5. Análise Quantitativa das Fibras Musculares (HE).....	32
- Músculos Bíceps Braquial (BB) e Diafragma (DIA).....	32
- Músculo Quadríceps Femoral (QDR).....	34
4.2. Creatina Quinase (CK).....	35
4.3. Peso Corporal.....	36
<b>5. Discussão.....</b>	<b>37</b>
5.1. Área Total dos Macrófagos.....	37
5.2. Populações dos Macrófagos M1 e M2.....	38
5.3. Degeneração e Regeneração Muscular.....	40
5.3.1. Músculo Bíceps Braquial (BB) e Diafragma (DIA).....	40
5.3.2. Músculo Quadríceps Femoral (QDR).....	40
5.4. Creatina Quinase (CK).....	41
5.5. Peso Corporal.....	42
5.6. Uso do EPA na terapia das distrofinopatias.....	43
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>45</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>46</b>
<b>8. Anexo.....</b>	<b>55</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

As distrofias musculares são doenças genéticas de caráter degenerativo e progressivo sendo o termo “distrofinopatia” utilizado para designar este grupo de doenças. Na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), a mais grave e frequente dentre todas as distrofinopatias, ocorre ausência ou expressão da forma não funcional de distrofina (ENGEL *et al.*, 1994; FAIRCLOUGH *et al.*, 2011).

A DMD, descrita em 1861, é uma doença ligada ao cromossomo X que acomete 1 em cada 3.500 meninos nascidos vivos (SWASH & SCHWARTZ, 1998; BIGGAR, 2006). É herdada pelos indivíduos do sexo masculino, sendo que somente 30% dos casos originam-se de mutação não herdadas (TINSLEY *et al.*, 1994; BOBO *et al.*, 2009). A anormalidade genética da DMD está associada ao tamanho e complexidade do gene da distrofina, que proporciona uma elevação na frequência de mutações de ponto, deleções ou duplicações (TINSLEY *et al.*, 1994). Isso resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da distrofina, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (SEIXAS *et al.*, 1997). A não expressão da distrofina resulta na ausência desta proteína nos músculos esqueléticos, lisos, cardíaco (ENGEL *et al.*, 1994) e também em células da glia ocasionando disfunção cognitiva (HOFFMAN *et al.*, 1987).

A análise histológica dos músculos esqueléticos de portadores da DMD revela fibras em degeneração e presença de infiltrado inflamatório com macrófagos e linfócitos. Pequenas fibras imaturas de núcleo central também são observadas, refletindo a regeneração muscular pelas células satélites (McDOUALL *et al.*, 1990; SCHMALBRUCH, 2006). A regeneração muscular

na DMD produz fibras musculares sem distrofina, propensas a degeneração. Com a progressão da doença, a capacidade de regeneração pelas células satélites diminui e as fibras musculares são substituídas por tecido cicatricial fibroadiposo (ENGEL *et al.*, 1994; SEIXAS *et al.*, 1997; GROUNDS *et al.*, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005;), sem função contrátil, o que justifica a perda da função muscular observada nesses pacientes.

Os primeiros sinais clínicos da DMD são evidentes no início da infância, entre dois e cinco anos de idade, em que a fraqueza muscular promove quedas frequentes, dificuldades em correr, subir escadas e em levantar-se do chão da posição de decúbito para a bípede. No início da segunda década de vida, a fraqueza muscular nos pacientes com DMD ocasiona a incapacidade de deambular, tornando-os dependentes de cadeira de rodas (CHAKKALAKAL *et al.*, 2005).

A resposta inflamatória, que é exacerbada nos músculos distróficos, contribui substancialmente para a patologia da doença (WEHLING *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2003; HODGETTS *et al.*, 2006). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), pelas células do sistema imunológico e pelas próprias miofibrilas lesadas, contribui para intensificar a necrose nos músculos distróficos (CHEN *et al.*, 2000).

Embora recursos terapêuticos melhorem a qualidade de vida dos portadores da DMD, na maioria dos casos o óbito ocorre ao fim da segunda década de vida por falência cardiorespiratória (ENGEL *et al.*, 1994; BOGDANOVICH *et al.*, 2004). As terapias farmacológicas para a DMD têm como objetivo principal retardar a evolução da doença, diminuindo o acometimento muscular e minimizando os prejuízos funcionais decorrentes desta distrofinopatia (PORTER *et al.*, 2002).

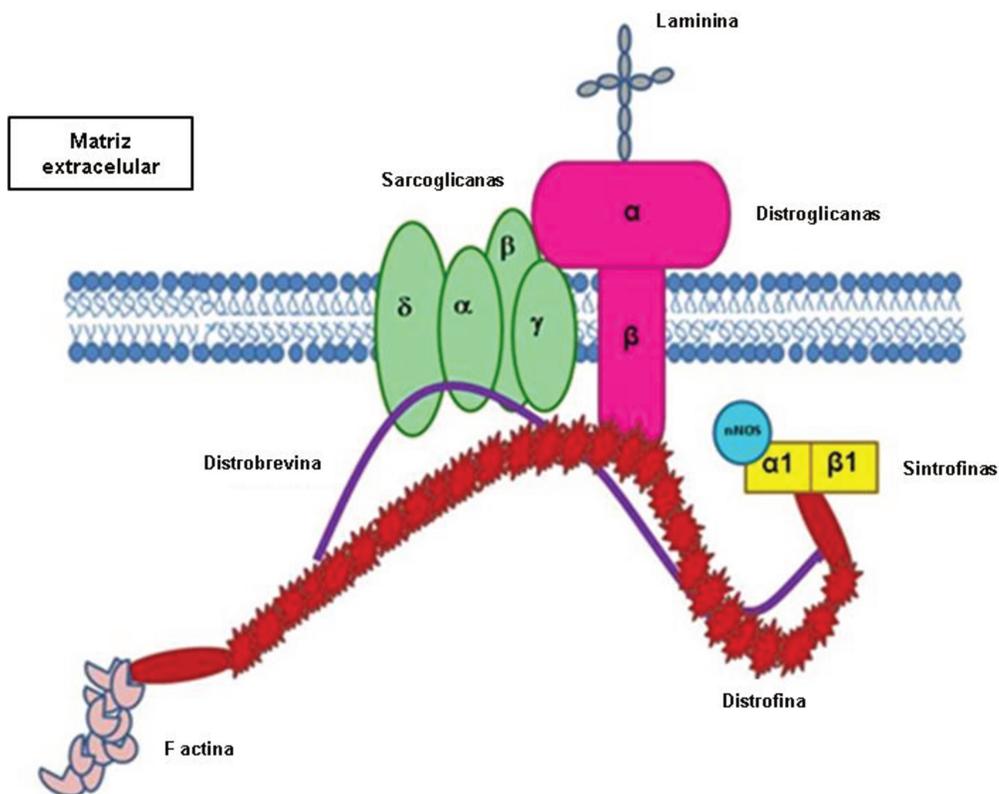
Corticosteroides, tais como a prednisona e o deflazacort, são amplamente utilizados na terapia da DMD. Embora promovam resultados positivos, o uso prolongado provoca efeitos

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). Assim, estudos com fármacos que não apresentem os efeitos colaterais indesejáveis dos corticosteroides, bem como o desenvolvimento de terapias gênicas e celulares, veem sendo amplamente realizados, porém os resultados ainda são insatisfatórios ou estão em fase pré-clínica (CARRET-PIERRAT *et al.*, 2011; GOYENVALLE *et al.*, 2011).

### **1.2 Distrofina e o Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG)**

A distrofina é um membro das proteínas spectrinas, com peso molecular de 427kDa (HOFFMAN *et al.*, 1987), que conecta a F-actina à laminina, componente da matriz extracelular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993). A distrofina não é expressa em indivíduos afetados pela DMD e em camundongos *mdx*, modelo experimental da DMD. Em músculos esqueléticos normais localiza-se na superfície citoplasmática do sarcolema e se associa com glicoproteínas formando o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) (HOFFMAN *et al.*, 1987).

Além da distrofina, fazem parte do CDG (*Figura 1*) as distroglicanas, as sintrofinas, as sarcoglicanas e as distrobevinas (RANDO, 2001; BIGGAR *et al.*, 2002; LAPIDOS *et al.*, 2007; MARQUES, 2004). Admite-se que o CDG atue como estabilizador mecânico do sarcolema durante a contração muscular (PETROF *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema, incluindo os componentes integrais do complexo (distrofina, complexo distroglicano, complexo sarcoglicano,  $\alpha$ -distrobrevina e sintrofinas), a ligação com a matriz extracelular (laminina), parte da ligação intracelular (F-actina) e molécula de sinalização ligada ao complexo (sintase de óxido nítrico neuronal – nNOS). Laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular, 2012.

As moléculas de sinalização associadas ao CDG incluem a calmodulina, o receptor-ligante 2 do fator de crescimento (*growth factor receptor-bound 2* – Grb2), que participa das vias de transdução de sinais e está conectado à  $\beta$ -distroglicana e a óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* - NOS). A NOS interage com vários componentes do complexo, principalmente com a sintrofina, leva à produção de óxido nítrico (NO), o qual modula vias de sinalização intracelular e provoca injúria muscular (RANDO, 2001; MARQUES, 2004).

A  $\alpha$ -distroglicana encontra-se no espaço extracelular, onde se liga à laminina-2 da lâmina basal e à  $\beta$ -distroglicana, que é uma proteína transmembrana. A  $\beta$ -distroglicana serve de ligação entre a  $\alpha$ -distroglicana e a distrofina (WATCHKO & HOFFMAN, 2002).

As sarcoglicanas do músculo esquelético se ligam à  $\alpha$ -distroglicana (OZAWA *et al.*, 2005) e são compostas por quatro subunidades de proteínas transmembrana:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -sarcoglicanas, que interagem e funcionam como uma proteína única.

As sintrofinas são proteínas intracelulares que, nas células musculares, existem sob a forma das subunidades  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ . Ambas se ligam a distrofina (STRAUB & CAMPBELL, 1997; JONES *et al.*, 2003). A  $\alpha 1$ -sintrofina liga-se também à enzima óxido nítrico sintase neuronal (*neuronal nitric oxide synthase* - nNOS).

A nNOS corresponde a isoforma da óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* - NOS) encontrada em maior quantidade no músculo esquelético, embora pequenas quantidades das isoformas endotelial (*endothelial nitric oxide synthase* - eNOS) e induzível (*inducible nitric oxide synthase* - iNOS) também sejam encontradas. Nas fibras musculares, a nNOS é encontrada próximo ao sarcolema, ligada à  $\alpha 1$ -sintrofina e livre no citosol (STRAUB & CAMPBELL, 1997; JONES *et al.*, 2003)..

A distrobrevina é uma proteína intracelular que se liga a distrofina. Esta proteína interage com a nNOS e com os canais de cálcio voltagem-dependentes (DURBEEJ & CAMPBELL, 2002).

A distrofina, que tem a forma de um dímero antiparalelo, liga-se à  $\alpha$ -actina e interage com a  $\alpha 2$ -laminina e  $\alpha$ -distroglicana via  $\beta$ -distroglicana (ENGEL *et al.*, 1994). Direta ou indiretamente, a distrofina liga-se também com glicoproteínas da membrana, como as sarcoglicanas (alfa, beta e gama-SG), distroglicana (beta-DG) e sintrofinas (SPENCER & MELLGREN, 2002; BOGDANOVICH *et al.*, 2004).

Na ausência da distrofina, o CDG é desorganizado tornando as fibras musculares sujeitas a lesões do sarcolema, principalmente durante os ciclos de contração e relaxamento, permitindo o influxo elevado de íons cálcio, resultando em mionecrose (GROUDS *et al.*, 2005). Outros mecanismos podem estar relacionados a mionecrose, tais como a sinalização celular alterada do óxido nítrico que é liberado em níveis citotóxicos ocasionando degeneração muscular (RANDO, 2001), aumento do estresse oxidativo e participação de fatores inflamatórios liberados por neutrófilos, macrófagos e citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ; para revisão ver Whitehead, 2006).

### 1.3 Camundongo *mdx*

O camundongo C57BL/10-Dmd<sup>mdx</sup> (murine dystrophin X-linked - *mdx*) foi descoberto ao acaso em 1984 (BULFIELD *et al.*, 1984), durante a realização de estudos sobre alterações nos glóbulos vermelhos em uma linhagem mutante de camundongos C57BL/10-ScSn. Estes animais apresentam elevado nível plasmático de creatina quinase (CK), sugerindo degeneração muscular (HOFFMAN *et al.*, 1987), bem como alteração genética na sequência de nucleotídeos da banda Hq Bpa do cromossomo X, correspondente ao *locus* p21.2 do cromossomo X humano, o que resulta em ausência da distrofina nos músculos esquelético, cardíaco e liso (BULFIELD *et al.*, 1984; KHURANA & DAVIES, 2003). Nestes camundongos, a análise histológica de músculos esqueléticos revelou a existência de degeneração e regeneração muscular semelhantes ao que ocorre em portadores da DMD (BULFIELD *et al.*, 1984), tornando-o um valioso modelo para estudos desta distrofinopatia.

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 & TAKEDA, 2011). Porém, o camundongo *mdx* é o modelo experimental mais utilizado devido à maior disponibilidade e ao baixo custo de produção e manutenção (TANABE et al., 1986; HAMER et al., 2002; SASAOKA et al., 2003).

Nos camundongos *mdx*, diferentemente dos pacientes com DMD, ambos os sexos são afetados e há ciclos sucessivos de degeneração ao longo da vida, que são compensados por regeneração muscular eficaz (LI et al., 2009). Embora esses animais apresentem intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, não desenvolvem fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos músculos esqueléticos, fatos observados na DMD (LI et al., 2009; PASTERNAK et al., 1995).

No *mdx*, a degeneração das fibras musculares se inicia por volta dos 20 dias de vida pós-natal, seguida por regeneração muscular. Por volta dos 30 dias, os músculos esqueléticos apresentam-se com até 60% das fibras com núcleo periférico (MARQUES et al., 2008). Entre 60 e 90 dias, mais de 50% das fibras musculares encontra-se em processo de regeneração, com núcleo central. Com 120 dias de idade, a incidência de fibras necróticas é reduzida (TANABE et al., 1986), estando praticamente todas as fibras musculares com núcleo central, indicativo de regeneração (TANABE et al., 1986; PASTORET & SEBILLE, 1995; BRIGUET et al., 2004). Aos 6 meses de idade, alguns músculos esqueléticos estão quase completamente regenerados, com cerca de 80-90% de fibras com núcleo central, restando poucas áreas em degeneração (PASTORET & SEBILLE, 1995). Com 9 meses observa-se completa regeneração muscular, com fibras de diâmetro heterogêneo e depósito de tecido fibroso no perímio (BRIGUET et al., 2004). Com 20 meses de vida, a capacidade de regeneração muscular decresce devido a

diminuição gradual da quantidade e da capacidade de proliferação das células satélites (LUZ *et al.*, 2002). Os animais começam a apresentar características patológicas semelhantes às observadas em humanos, com fraqueza motora progressiva e perda de fibras musculares, que são substituídas por tecido conjuntivo (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995).

Dependendo do músculo estudado, observam-se diferenças na evolução e na intensidade das lesões musculares (PASTORET & SEBILLE, 1995; RADLEY & GROUNDS, 2006; MARQUES *et al.*, 2008). O diafragma sofre intensa degeneração e apresenta histopatologia semelhante a dos pacientes distróficos (STEDMAN *et al.*, 1991). Por outro lado, os músculos intrínsecos da laringe não apresentam mionecrose, sendo protegidos da falta da distrofina (MARQUES *et al.*, 2007a), tal como os músculos extraoculares (BAKER *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2007b). O músculo cardíaco do *mdx* é afetado ao redor dos 7 meses de idade (QUINLAN *et al.*, 2004). Já o músculo sóleo, quando comparado ao diafragma e gastrocnêmio, apresenta reduzida área de inflamação (PORTER *et al.*, 2004; BANI *et al.*, 2008). No músculo quadríceps observa-se pico inflamatório ao redor de 1 mês de idade, demonstrado pela presença de macrófagos (VILLALTA *et al.*, 2009). Desta forma, observa-se que os músculos esqueléticos respondem diferentemente a ausência da distrofina, o que pode ter correlação com o tipo de fibra, com a idade do animal (BANI *et al.*, 2008), com a variação no metabolismo de colágeno, ao apresentarem diferenças na expressão de TGF- $\beta$  (GOSSELIN *et al.*, 2007) e/ou com a intensidade da resposta inflamatória (WEHLING *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2002; HODGETTS *et al.*, 2006).

#### 1.4 Degeneração Muscular

Vários fatores contribuem para a degeneração do músculo distrófico, dentre eles a instabilidade mecânica do sarcolema (CHAKKALAKAL *et al.*, 2005; ERVASTI, 2007) e a alteração no funcionamento dos canais de cálcio da membrana (WHITEHEAD *et al.*, 2006). A ausência da distrofina favorece a instabilidade do sarcolema, com aumento das micro-rupturas que ocorrem pela força contrátil do sarcômero durante os ciclos de contração e relaxamento (GROUNDS *et al.*, 2005). As rupturas na membrana plasmática podem ser observadas pela perda de conteúdo intracelular da fibra muscular para o meio extracelular, como por exemplo, da proteína creatina quinase (CK); (STRAUB *et al.*, 1997; AMTHOR *et al.*, 2004). Na ausência da distrofina, o funcionamento dos canais de cálcio é alterado permitindo o influxo de íons cálcio descontroladamente e provocando sobrecarga das mitocôndrias, com consequente redução da síntese de ATP, ativação de proteases endógenas cálcio-dependentes e ativação de fosfolipases A<sub>2</sub>, enzimas que digerem os fosfolipídeos da membrana. Isto levaria a um aumento das áreas de descontinuidade do sarcolema, permitindo a entrada de íons cálcio para o meio intracelular (WHITEHEAD *et al.*, 2006) e consequente mionecrose.

Um fator que contribui de forma significativa para a progressão da doença é a resposta inflamatória, que é exacerbada nos músculos distróficos (WEHLING *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2002; HODGETTS *et al.*, 2006).

## 1.5. Resposta Inflamatória

A resposta inflamatória ocorre com a invasão das células imunes, macrófagos, linfócitos-T citotóxicos, células-T helper e neutrófilos no tecido muscular lesado, logo após a morte das fibras musculares, com a finalidade de reparação (PRISK & HUARD, 2003). A proporção destes diferentes tipos celulares parece influenciar significativamente na gravidade da doença (SPENCER *et al.*, 1997; SPENCER *et al.*, 2001; WEHLING *et al.*, 2001; TIDBALL, 2005; HODGETTS *et al.*, 2006. VILLALTA *et al.*, 2009).

Fibras musculares em degeneração liberam várias substâncias, dentre as quais se destacam as citocinas pró-inflamatórias, proteases, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento (BONDESEN *et al.*, 2007). As citocinas pró-inflamatórias e os fatores quimiotáticos estimulam a migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para o local da lesão (TIDBALL, 2005). Os neutrófilos e macrófagos liberam proteases que degradam os fragmentos celulares e os fagocitam. As proteases liberadas por estas células podem provocar danos ao tecido muscular íntegro que circunda a lesão e assim aumentar a área lesada, gerando aumento da resposta inflamatória local (TIDBALL, 2005).

Recentemente, foi relatada a presença de populações distintas de macrófagos, M1 e M2, os quais influenciam respectivamente a degeneração e a regeneração da fibra muscular distrófica (VILLALTA *et al.*, 2009), ver *Figura 2*. Macrófagos M1 são citotóxicos, pró-inflamatórios e participam da resposta imune Th1; macrófagos M2 promovem regeneração muscular, participando da resposta imune Th2 (VILLALTA *et al.*, 2009).

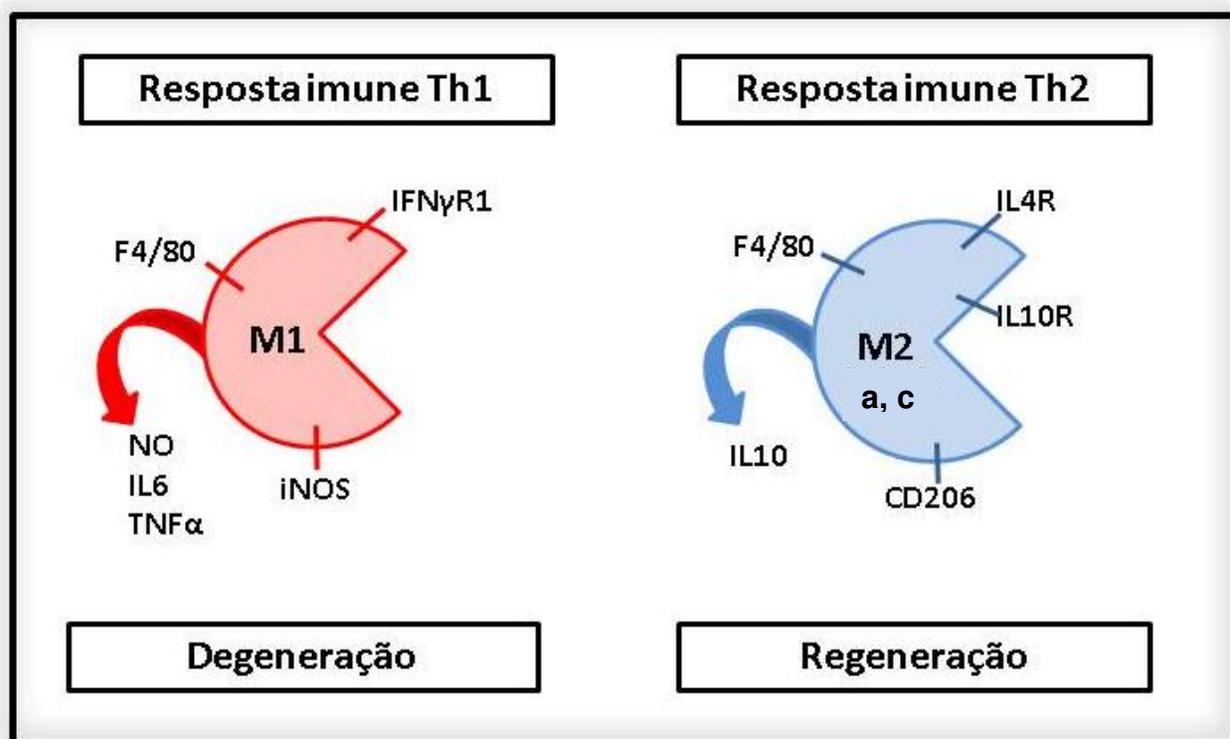
Os macrófagos M1 (*Figura 2*) são ativados pela via do Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (LAGROTA-CANDIDO *et al.*, 2002) e provocam injúria muscular *in vivo* e *in vitro* pela produção de oxido

nítrico (NO) em níveis citotóxicos através da indução da síntese de NO (VILLALTA *et al.*, 2009). O NO pode aumentar o dano ao tecido (SHI *et al.*, 2002).

Depois que os macrófagos M1 atingem seu pico de concentração, provocando dano e degeneração muscular, eles passam a expressar outras proteínas que os caracterizam como macrófagos tipo 2 (M2), que atenuam a resposta inflamatória e promovem o reparo do tecido (WEHLING-HENRICKS *et al.*, 2010).

Os macrófagos M2 são fenotipicamente divididos em três subcategorias, M2a, M2b e M2c, que refletem especializações funcionais e moleculares. Os macrófagos M2a são ativados por IL-4 e IL-13 e promovem o restabelecimento e reparação do tecido; os M2b são ativados por complexos imunes ou pelo receptor Toll-like e os macrófagos M2c são ativados por IL-10. Os macrófagos M2a e M2c (*Figura 2*) estão presentes na regeneração muscular e expressam a proteína CD206 (M2a e M2c) e a proteína CD163 (M2c); (VILLALTA *et al.*, 2009).

As populações de macrófagos M1 e M2, por serem responsáveis, respectivamente, pela injúria e reparo dos músculos esqueléticos, recebem atenção nas pesquisas atuais, uma vez que a proporção destas células pode regular a progressão da DMD (VILLALTA *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Esquema das populações de macrófagos M1 (citotóxico) e M2 (reparador). Os macrófagos M1 participam da resposta imune Th1 e promovem a degeneração nos músculos distróficos, enquanto que os macrófagos M2 participam da resposta imune Th2 responsável pela regeneração. IFN $\gamma$ R1: receptor de Interferon gama; NO: óxido nítrico; IL6: interleucina 6; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL4R: receptor de interleucina 4; IL10: interleucina 10; IL10R: receptor de interleucina 10.

### 1.6.Regeneração Muscular

O processo de regeneração envolve a formação de novas fibras musculares, a miogênese. O início da miogênese depende da ativação das células satélites, precursoras das células musculares, indiferenciadas e mononucleadas localizadas entre o sarcolema e a membrana basal das fibras musculares (BONDESEN et al., 2004; FOSCHINI et al., 2004; SCHMALBRUCH, 2006). Na ativação das células satélites atuam, por exemplo, os macrófagos, que além de serem importantes para a resposta inflamatória, liberam fatores de crescimento e citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação destas células (SHEN et al., 2008). Na miogênese, além da ativação

das células satélites, há a liberação de fatores reguladores (MyoD, Myf-5, miogenina e MRF4), fatores de fusão, diferenciação de mioblastos e de maturação do miotubo (MEGENEY & RUDNICKI, 1995).

Após a proliferação das células satélites, estas se diferenciam em células precursoras miogênicas chamadas mioblastos. A maioria dos mioblastos apresenta diminuição da expressão gênica do Pax7 e aumento da expressão da miogenina, originando os miotubos (SEALE et al., 2004). Os miotubos, devido ao aumento da expressão e da ação da miogenina, se fundem e se diferenciam, originando as miofibras multinucleadas (DAWHAN & RANDO, 2005; LE GRAND & RUDNICKI, 2007). No processo de regeneração, a MyoD é necessária 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 (LE GRAND & RUDNICKI, 2007). Apesar das células-tronco hematopoiéticas migrarem para diferentes tecidos, existem evidências de que as células-tronco residentes são responsáveis pela regeneração e reparo do tecido muscular (ANDERSON, 2006).

Nos camundongos *mdx*, os ciclos de degeneração/regeneração ocorrem durante grande parte da vida do animal. Apenas os animais idosos demonstram perda funcional, que ocorre devido à exaustão das células satélites e conseqüentemente diminuição da capacidade regenerativa do tecido muscular (PASTORET & SEBILLE, 1995; DECONINK & DAN, 2007). Já nos portadores da DMD, os ciclos de degeneração/regeneração ocorrem durante os primeiros anos de vida até que, ainda no início da infância, ocorre diminuição da capacidade de regeneração através das células satélites, tornando-as incapazes de compensar a degeneração. Nesta idade aparecem os primeiros sinais de fraqueza muscular. Com o passar dos anos, os repetidos ciclos de degeneração/regeneração aos quais os músculos são submetidos provocam exaustão das células

satélites e os músculos apresentam acúmulo progressivo de tecido conjuntivo fibroadiposo (ENGEL *et al.*, 1994).

### **1.7. Ácido Eicosapentaenóico**

Os ácidos pesados poliinsaturados (PUFAs) apresentam duas famílias principais: o ômega-6 e o ômega-3 (CALDER, 2008). O ômega-6, mais especificamente os ácidos linoléico e linolênico, são ácidos pesados essenciais para a produção do ácido araquidônico, o qual é metabolizado e origina os eicosanóides (prostaglandinas e prostaciclina) que são mediadores e reguladores da inflamação. Os ácidos ômega-3 mais comuns incluem o ácido alfa-linolênico, ácido docosahexanóico e o ácido eicosapentaenóico (ácido all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico). O ácido eicosapentaenóico (EPA) é um ácido graxo de cadeia longa encontrado em lipídeos de peixes de água fria e na linhaça (LOPEZ-FERRER *et al.*, 2001; HARPER *et al.*, 2006).

O consumo de ômega-3 melhora o prognóstico de várias doenças inflamatórias como a arteriosclerose, lúpus sistêmico eritematoso, psoríase e artrite reumatóide (STAMOPOULOS, 2002). A ingestão de fontes ricas em ácidos graxos n-3 poliinsaturados resulta na diminuição de ácido araquidônico na membrana plasmática. O EPA, ao competir com o ácido araquidônico, inibe a produção dos eicosanóides e, conseqüentemente, o processo inflamatório e promove redução ou inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias, atuando, portanto, nas vias das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (BABCOCK *et al.*, 2000; BABCOCK *et al.*, 2002). Adicionalmente, o EPA parece inibir a translocação do fator pró-inflamatório NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo e, desta forma, reduzir a síntese de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa); (BABCOCK *et al.*, 2000).

O TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  de 26kDa associada a membrana pela *TNF-alpha-converting enzyme* (TACE). A resposta biológica para o TNF- $\alpha$  é mediada por dois tipos de receptores transmembrana: TNFR1 (p60, p55 e CD120a) e TNFR2 (p80, p 75 e CD120b). Quando o TNF- $\alpha$  de 17 kDa se liga ao receptor TNFR1, pode levar à apoptose celular ou a ativação de NFkB 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).

Considerando que a resposta inflamatória pode agravar o quadro da DMD; que o EPA reduz ou inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias; e a necessidade do estabelecimento de terapias farmacológicas alternativas para a DMD, devido aos efeitos colaterais significativos dos anti-inflamatórios esteroides: neste estudo investigamos o potencial terapêutico do EPA sobre a proporção dos macrófagos M1 e M2, que influenciam a degeneração e regeneração, nos músculos esqueléticos de camundongos *mdx*, modelo experimental mais utilizado para estudos da DMD.

## 2. OBJETIVO

---

Verificar se o tratamento com o ácido eicosapentaenóico (EPA), no estágio inicial da distrofinopatia, altera a proporção dos macrófagos M1 e M2, em diferentes músculos esqueléticos distróficos (diafragma, bíceps braquial e quadríceps femoral), do camundongo *mdx*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

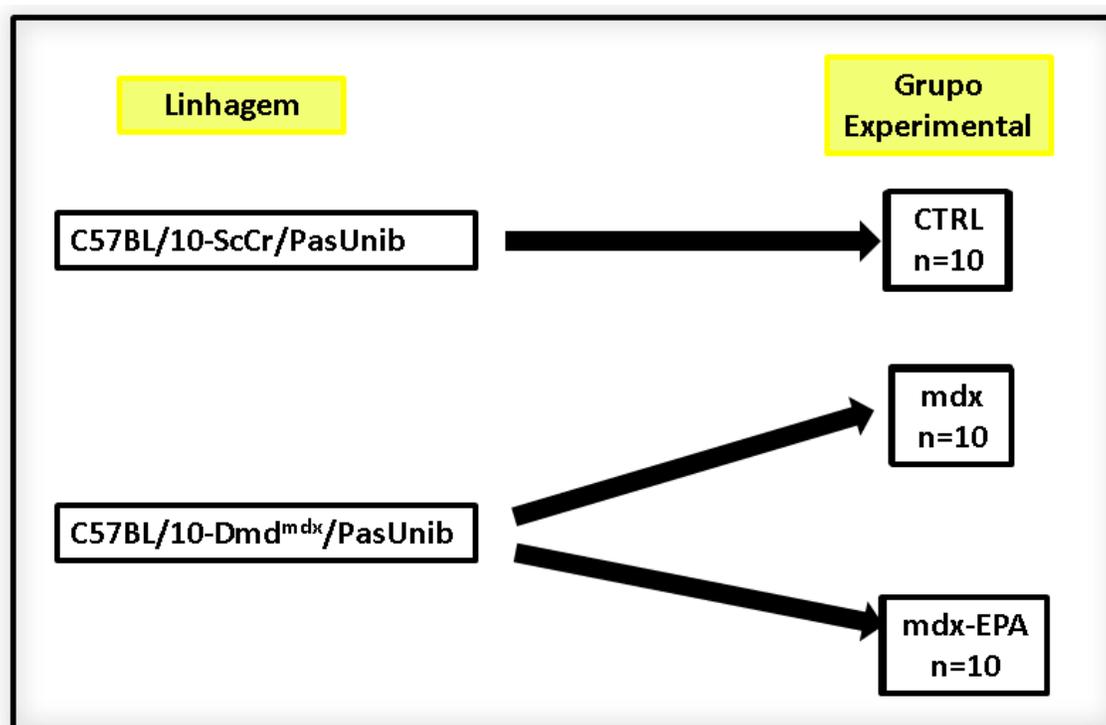
---

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos das linhagens C57BL/10-ScCr/PasUnib e C57BL/10-Dmd<sup>mdx</sup>/PasUnib, obtidos a partir do acasalamento de animais mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, UNICAMP. As matrizes são 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*. Após o nascimento, os filhotes permaneceram nas mesmas condições citadas acima e em companhia da fêmea até o 30º dia de vida. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o processo 2232-1 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IB-UNICAMP) e está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### 3.2 Grupos Experimentais e Tratamento

Foram utilizados 10 camundongos C57BL/10-ScCr/PasUnib (grupo CTRL) e 20 camundongos *mdx* (C57BL/10-Dmd<sup>mdx</sup>/PasUnib) divididos em dois grupos experimentais, um para o tratamento com ácido eicosapentaenoico (*mdx*-EPA) e o outro como grupo controle (*mdx*), ver *Figura 3*.



**Figura 3.** Esquema da divisão dos grupos experimentais. **CTRL:** grupo de animais controle tratados com Nujol; **mdx:** grupo dos animais *mdx* tratados com Nujol; **mdx-EPA:** grupo dos animais *mdx* tratados com EPA.

Os camundongos do grupo mdx-EPA receberam 300 mg/Kg/dia de EPA (ácido *all-cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico, 98.5% de EPA na composição; densidade do óleo 0.943g/ml, Fluka/Sigma-Aldrich®), diluído em óleo mineral (Nujol, petrolato líquido para uso via oral em humanos, Mantecorp, SP, Brazil), via gavagem, por 16 dias, do 14° ao 30° dia de vida (MATSUMOTO *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2011). Os grupos mdx controle (mdx, n=10) e C57BL/10-ScCr/PasUnib (CTRL, n=10) receberam o mesmo volume de óleo mineral (Nujol), pela mesma via e período. Os animais foram pesados diariamente em balança semi-analítica (Marte® AS2000C) para que a dose da droga fosse ajustada ao peso do animal.

### 3.3. Procedimento Cirúrgico para Retirada dos Músculos

Ao 31º dia de idade, os animais foram anestesiados (injeção intraperitoneal) com cloridrato de cetamina (130mg/kg, Francotar®; Virbac, São Paulo, Brasil) 10% m/v e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg, Virbaxyl®; Virbac, São Paulo, Brasil) 2% m/v (1:1, 0,1 ml/10g de camundongo) para que os músculos diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e quadríceps femoral (QDR) fossem retirados.

A escolha dos músculos estudados levou em consideração diferenças quanto a evolução da doença e quanto a intensidade das lesões musculares entre os músculos da pata e o diafragma, sendo que este último apresenta patologia severa e semelhante a observada em pacientes da DMD (PASTORET & SEBILLE, 1995; GROUNDS *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2008; MATSUMURA *et al.*, 2009). O BB é moderadamente afetado quando comparado com o DIA (GROUNDS *et al.*, 2008); o QDR apresenta pico inflamatório ao redor de 1 mês de idade (VILLALTA *et al.*, 2009) e, apesar de ser utilizado para coleta de biopsias em pacientes com DMD, é pouco estudado no mdx.

Os músculos DIA, BB e QDR de dez animais de cada grupo (CTRL, mdx e mdx-EPA) foram dissecados e fixados em suportes de madeira com tragacanth gum. Em seguida, foram imersos em n-hexano (J.T. Baker) por 60 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C. Posteriormente, os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos à -80°C no Biofreezer.

Os músculos (BB, DIA e QDR) de cada animal foram cortados transversalmente em criostato (Microm-HS505E) à -25°C com 7µm de espessura, para a análise histopatológica em hematoxilina-eosina (HE) e para a imunomarcção dos macrófagos.

### **3.4. Análise Histopatológica**

#### **3.4.1. Imunomarcção dos Macrófagos**

A marcação dos macrófagos M1 e M2 foi baseada no protocolo de Villalta et al (2009). Os músculos coletados e armazenados no biofreezer a -80°C foram seccionados transversalmente (7 µm de espessura) no criostato (Microm – HS505E), fixados em acetona e bloqueados com BSA 3% diluído em TBS-T (50mM de Tris-HCl e 150mM de NaCl. pH 7,4).

A população de macrófagos (M1 e M2) foi marcada pela incubação overnight a 4°C com anticorpo F4/80 (Serotec, 1:200). Os macrófagos M1 foram identificados pela incubação overnight a 4°C com anticorpo mouse anti-iNOS (Sigma, 1:200) e os macrófagos M2 foram identificados através do anticorpo mouse anti-CD206 (Serotec, 1:200). Os cortes foram lavados com TBS-T e incubados com anticorpo secundário (1:200), respectivamente anti-rat conjugado com rodamina (Vector Laboratories, 1:200) e anti-mouse conjugado a FITC por 1 hora, em temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos primários e respectivos secundários, os cortes foram lavados em TBS-T (VILLALTA et al., 2009). As lâminas foram montadas em DABCO, fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100/TS100F) e em microscópio Confocal (Zeiss, LSM 510, FCM-Unicamp).

#### **- Quantificação dos macrófagos:**

As imagens foram capturadas por uma vídeo câmera (Nikon® Express Series) acoplada a um microscópio de fluorescência (Nikon® Eclipse), conectado a um microcomputador com o software Image Pro-Express®. A quantificação foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foi

obtida a área total de inflamação (marcação com F4/80). Posteriormente, foram obtidas as áreas correspondentes a cada população de macrófagos: M1 (marcação com iNOS) e M2 (marcação com CD206).

### **3.4.2. Hematoxilina e Eosina**

Para a coloração com hematoxilina-eosina (HE), os músculos coletados e armazenados no Biofreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram seccionados transversalmente a  $7\ \mu\text{m}$  de espessura no criostato (Microm – HS505E). Os cortes congelados foram inicialmente lavados com etanol 70%. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, lavados novamente em água corrente por 10 minutos e corados com eosina. Em seguida, os cortes foram desidratados em séries de etanol e diafanizados em xilol e as lâminas montadas em Entellan (Sigma).

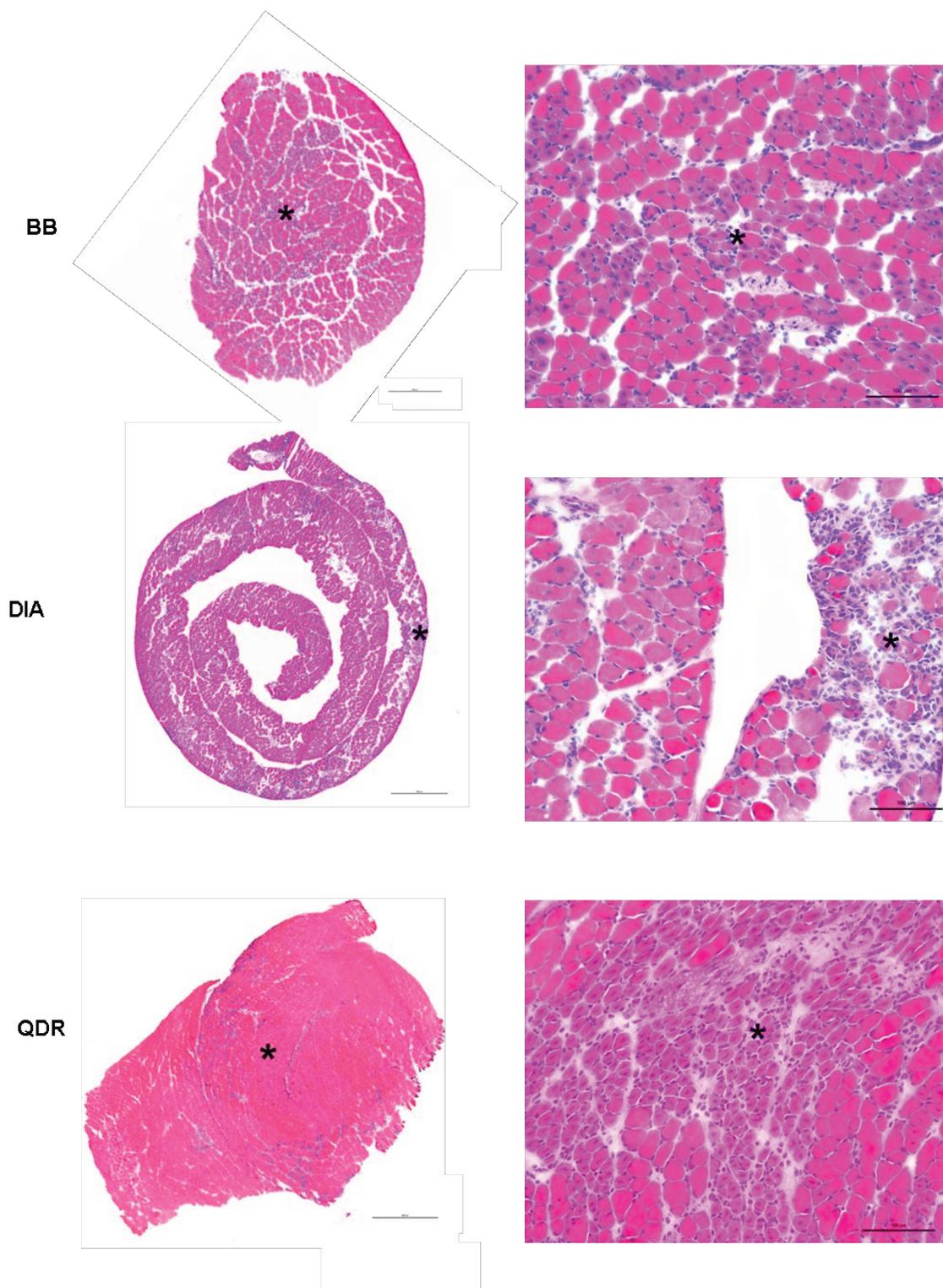
#### **- Quantificação das fibras com núcleos periféricos e centrais:**

As lâminas foram observadas em microscópio de luz binocular (Carl Zeiss), acoplado a uma objetiva com retículo quadrilátero com 100 pontos e 2 cortes por músculo (BB, DIA e QDR) foram analisados. A contagem dos núcleos centrais (regeneração) e periféricos (não sofreram degeneração) foi realizada com um contador manual.

Para o músculo bíceps braquial, a quantificação foi expressa em porcentagem em relação ao número total de fibras. Para o músculo diafragma, a quantificação foi realizada em cinco campos aleatórios, devido ao grande número de fibras deste músculo.

O quadríceps, que tem cerca de 7000 fibras musculares, apresentou várias áreas com fibras em regeneração, de maneira diferente da observada nos outros músculos (*Figura 4*). Assim, a

quantificação foi feita na forma de áreas com fibras de núcleo central, áreas com fibras de núcleo periférico e áreas em regeneração, expressas em porcentagem em relação à área total do corte. As imagens foram capturadas por vídeo câmera (Nikon® Express Series) acoplada a um microscópio de luz (Nikon® Eclipse), conectado a um microcomputador com o software Image Pro-Express®.



**Figura 4.** Secções transversais dos músculos bíceps braquial (**BB**), diafragma (**DIA**) e quadríceps femoral (**QDR**) do grupo mdx-EPA corados com Hematoxilina & Eosina (HE). À esquerda montagem total dos músculos (barra: 500μm), à direita detalhe da área em regeneração (asterisco); (barra: 100μm).

### **3.5. Determinação de Creatina Quinase (CK)**

Para observar a ação do ácido eicosapentaenoico sobre a degeneração muscular, realizamos a quantificação de creatina quinase (CK) nos grupos CTRL (n=18), mdx (n=18) e mdx-EPA (n=18). O sangue foi coletado por punção cardíaca sob anestesia com cloridrato de cetamina (130mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8mg/Kg). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 936 RCF (Força centrífuga relativa a aceleração da gravidade) e 4°C por 10 minutos. Utilizamos o kit para quantificação de CK – Bioclin. As absorbâncias 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.

Para verificar se possíveis alterações nos valores de CK nos animais tratados estariam diretamente relacionadas com a diminuição da mionecrose, realizamos análise de CK em camundongos do grupo CTRL (C57BL/10ScCr).

### **3.6. Análise Estatística**

A análise de variância, *ANOVA*, foi utilizada para a comparação entre os grupos experimentais, os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e a significância foi de  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

---

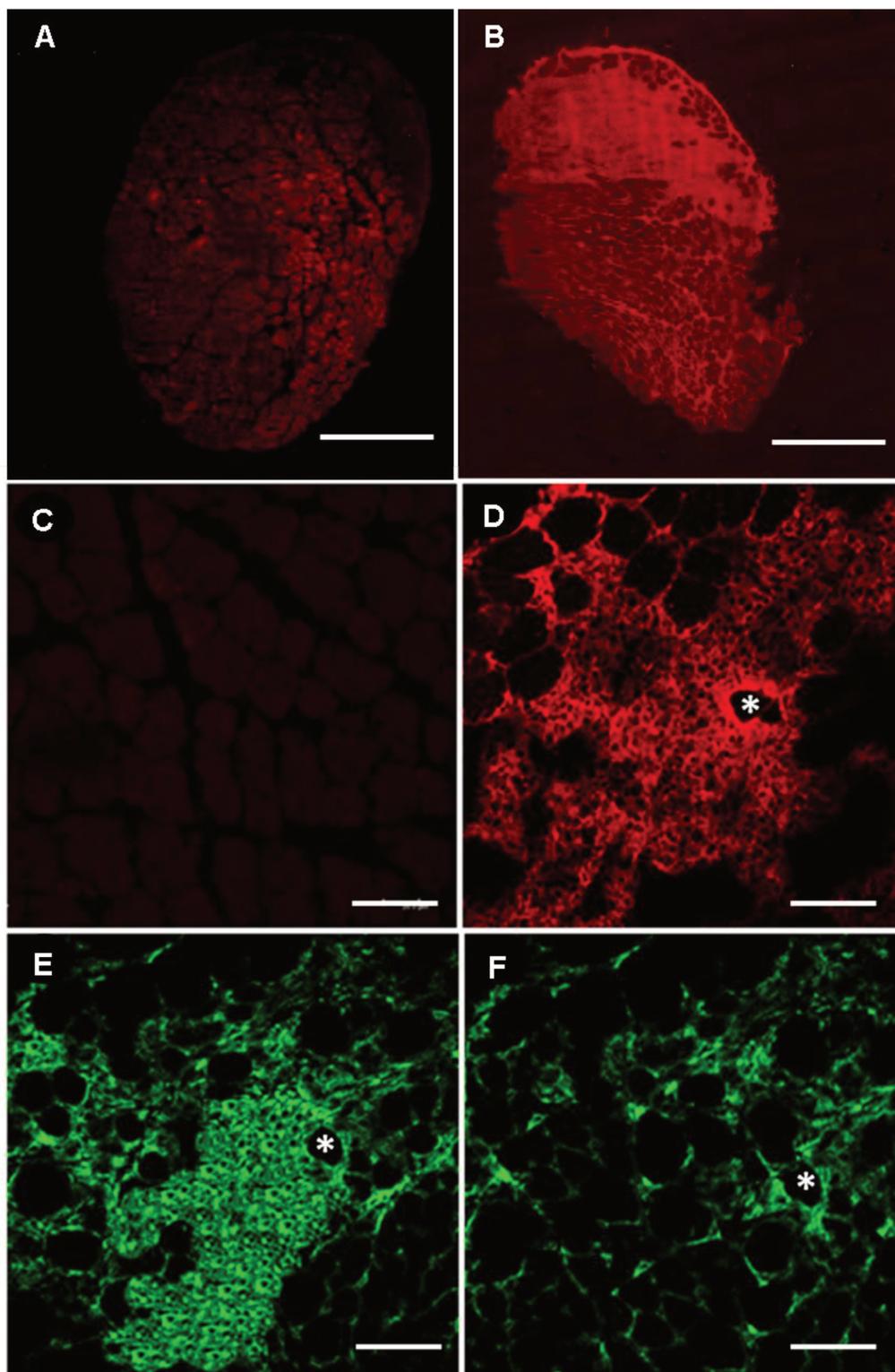
### 4.1. Análise Histológica

#### 4.1.1. Análise Qualitativa dos Macrófagos

A imunomarcção dos macrófagos nos músculos esqueléticos distróficos (grupos: mdx e mdx-EPA), apresentou características semelhantes (*Figura 5*). Os macrófagos (M1 e M2) foram identificados pela imunomarcção com F4/80. O F4/80 marca a superfície dos macrófagos em vermelho e os núcleos não são corados (*Figura 5*). Áreas positivas ao F4/80 foram quantificadas e expressas como área total de inflamação.

Nos músculos bíceps braquial (BB) e quadríceps femoral (QDR) os macrófagos das áreas de inflamação apresentaram-se com formato esférico, em grandes e pequenos grupos no interstício muscular (*Figura 5B*), estando raramente isolados. Os macrófagos M1 e M2, identificados com iNOS e CD206, respectivamente, foram identificados pela marcação em verde do superfície dos macrófagos e núcleo não corado. Os M1 (iNOS) e M2 (CD206) apresentaram mesmo padrão de marcação com o F4/80 e colocalizados com a marcação pelo F4/80.

No músculo diafragma, os macrófagos (F4/80) identificados da mesma forma que para os músculos BB e QDR apresentaram forma esférica, porém sempre em pequenos grupos ou isoladamente. As imunomarcções para as subpopulações dos macrófagos, M1 (iNOS) e M2 (CD206) mantiveram a forma esférica e a disposição observada com o F4/80. No grupo CTRL não foi identificada nenhuma marcação.

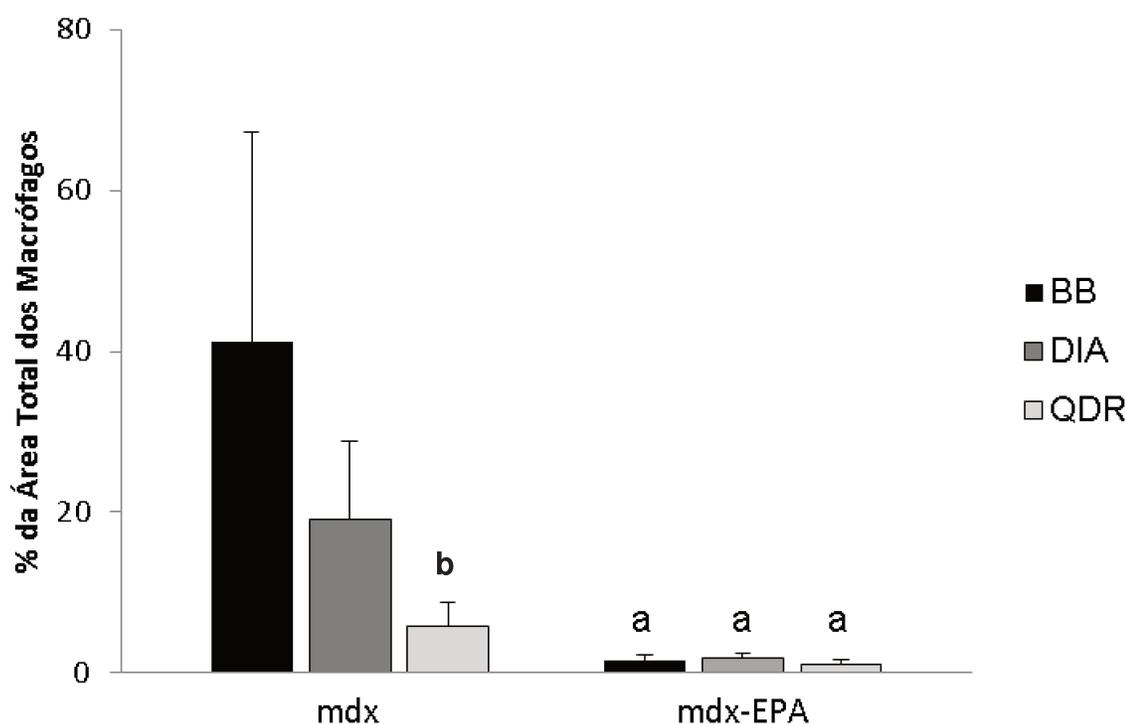


**Figura 5.** Imunomarcção dos macrófagos no músculo bíceps braquial. **A,C:** animais controle; **B, D, E e F:** animais *mdx* não tratados com EPA. **A-D:** marcação com F4/80 (M1 e M2); **E:** marcação com iNOS (M1); **F:** marcação com CD206 (M2); **A-B:** barra 500 $\mu$ m; **C-F:** barra 100 $\mu$ m; fibra muscular (asterisco).

#### 4.1.2. Análise Quantitativa da Área Total dos Macrófagos (F4/80)

Na quantificação da área total dos macrófagos, observou-se que o tratamento com EPA reduziu a inflamação cerca de 96% no BB ( $p < 0,01$ ), 90% no DIA ( $p = 0,01$ ) e 81% no QDR ( $p = 0,02$ ) quando comparado com os animais não tratados (*Figura 7*).

A comparação entre os músculos indica que no grupo mdx-EPA não houve diferença na área de inflamação; no grupo mdx, a área de inflamação do BB foi 53% maior que a do DIA ( $p = 0,46$ ) e 86% maior que a do QDR ( $p = 0,08$ ); já o DIA teve sua área 69% maior que a do QDR ( $p = 0,33$ ), ver *Figura 7*.



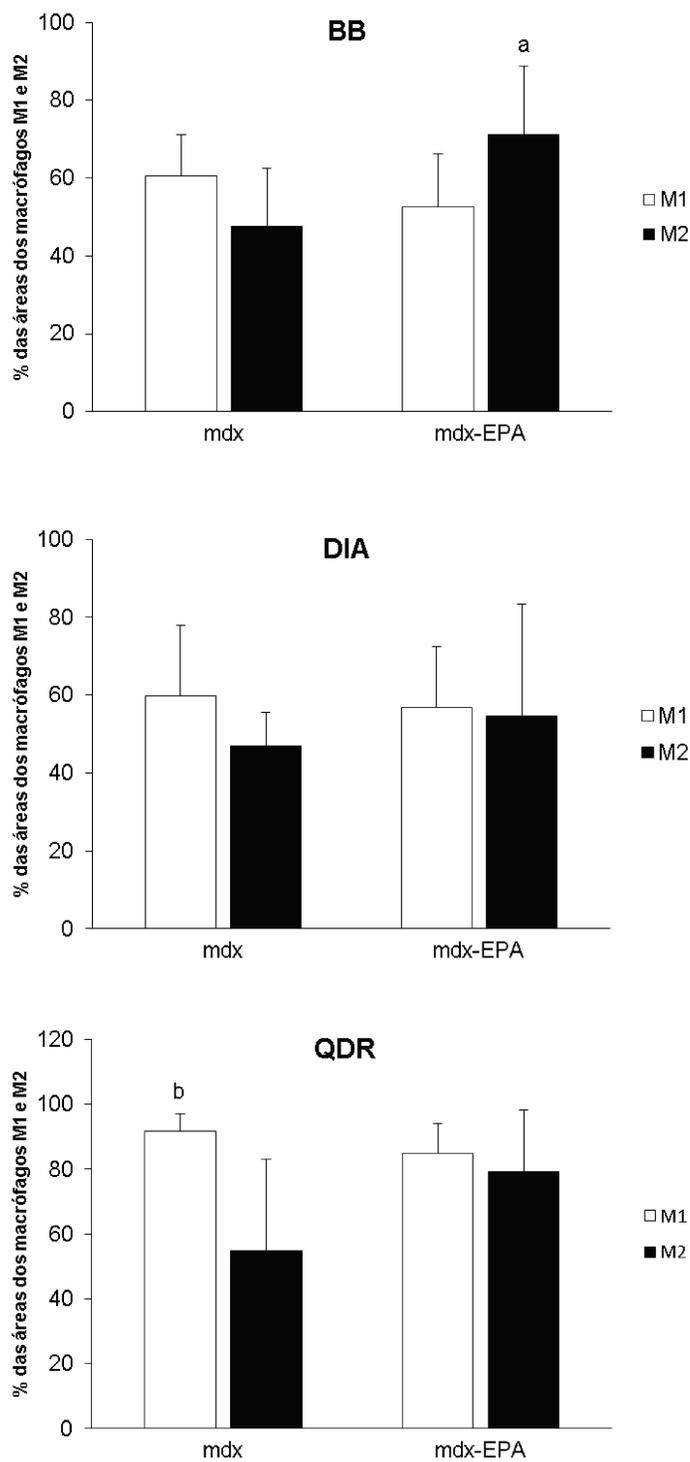
**Figura 7.** Porcentagem da área total de inflamação (F4/80: macrófagos M1 e M2). **BB:** músculo bíceps braquial; **DIA:** músculo diafragma; **QDR:** músculo quadríceps femoral; **mdx:** grupo dos animais *mdx* não tratados; **mdx-EPA:** grupo dos animais *mdx* tratados com EPA. **a**, diferença significativa entre os grupos mdx e mdx-EPA; **b**, diferença significativa entre os músculos BB e QDR do grupo mdx. Médias  $\pm$  desvios padrões das porcentagens das áreas totais de inflamação ( $p \leq 0,05$ , ANOVA: Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls).

#### 4.1.3. Análise Quantitativa dos Macrófagos M1 (iNOS) e M2 (CD206)

O tratamento com EPA aumentou a porcentagem da área dos macrófagos M2, associados com a regeneração muscular, em 33% ( $p=0,05$ ) no BB, 14% no DIA ( $p=0,90$ ) e 31% no QDR ( $p=0,46$ ); *Figura 8*.

No grupo *mdx*, observa-se predomínio de 21% do fenótipo M1 em relação ao M2, tanto no BB ( $p=0,17$ ) quanto no DIA ( $p=0,22$ ) e no QDR esse predomínio foi de 40% ( $p=0,02$ ). No grupo *mdx-EPA* os macrófagos M2 predominaram sobre os M1 nos músculos BB (26%;  $p=0,36$ ) e DIA (4%;  $p=0,92$ ). Já para o músculo QDR dos animais tratados não se observa essa inversão nas populações dos macrófagos. Os macrófagos M1 do QDR do grupo *mdx-EPA* predominaram sobre os M2 (7%;  $p=0,6$ ), ver *Figura 8*.

A comparação entre músculos indica que no QDR do grupo *mdx* os macrófagos M1 tem área 34% maior que a do BB ( $p=0,06$ ) e 35% maior que a do DIA ( $p=0,03$ ).

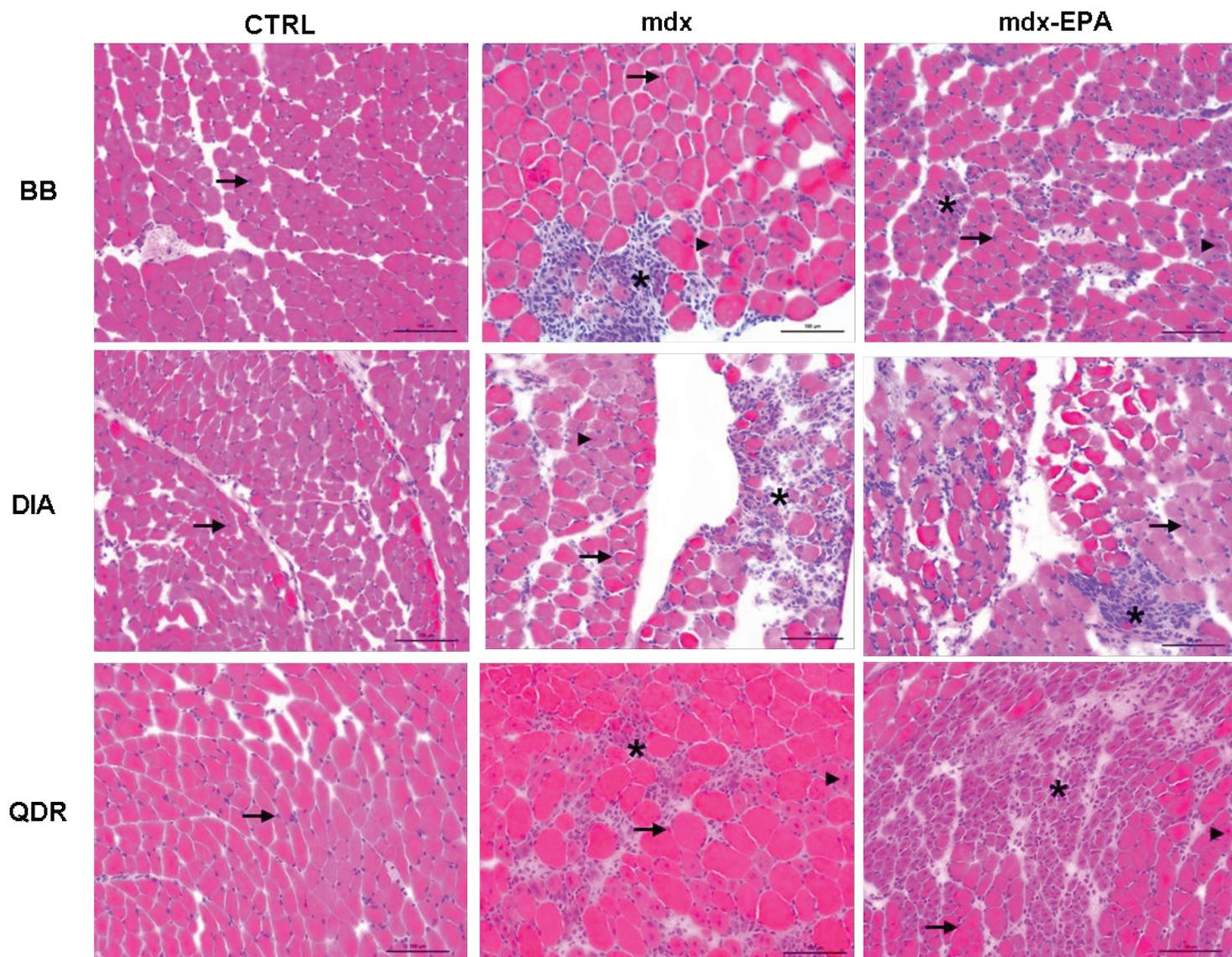


**Figura 8.** Porcentagem das áreas dos macrófagos **M1** (iNOS) e **M2** (CD206) no grupo **mdx** (animais *mdx* não tratados com EPA) e grupo **mdx-EPA** (animais *mdx* tratados com EPA). **BB** (músculo bíceps Braquial), **DIA** (músculo diafragma) e **QDR** (músculo quadríceps femoral); **a**, diferença entre a % da área dos M2 no BB; **b**, diferença entre a % da área dos M1 e M2 no grupo mdx. Médias  $\pm$  desvios padrões das porcentagens das áreas dos macrófagos ( $p \leq 0,05$ , ANOVA: Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls).

#### 4.1.4. Análise Qualitativa das Fibras Musculares (HE)

Os músculos esqueléticos dos grupos estudados (CTRL, mdx e mdx-EPA) apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. No trigésimo primeiro dia de vida foram observadas fibras com núcleo periférico, fibras em regeneração e fibras completamente regeneradas. Áreas de inflamação também foram observadas em todos os músculos do grupo mdx (*Figura 9*).

As fibras musculares em regeneração foram caracterizadas por pequenos miócitos com núcleo central entremeados por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade (Área em regeneração, *Figura 9*; asterisco). Fibras regeneradas (*Figura 9*; cabeça de seta) foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, condensado, citoplasma eosinófilo e diâmetro da fibra muscular próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico. As fibras com núcleo periférico, indicativo de fibras que não sofreram processo de degeneração-regeneração, apresentam formato poligonal em justaposição com outras fibras de mesma característica (Fibra com núcleo periférico, *Figura 9*; seta).



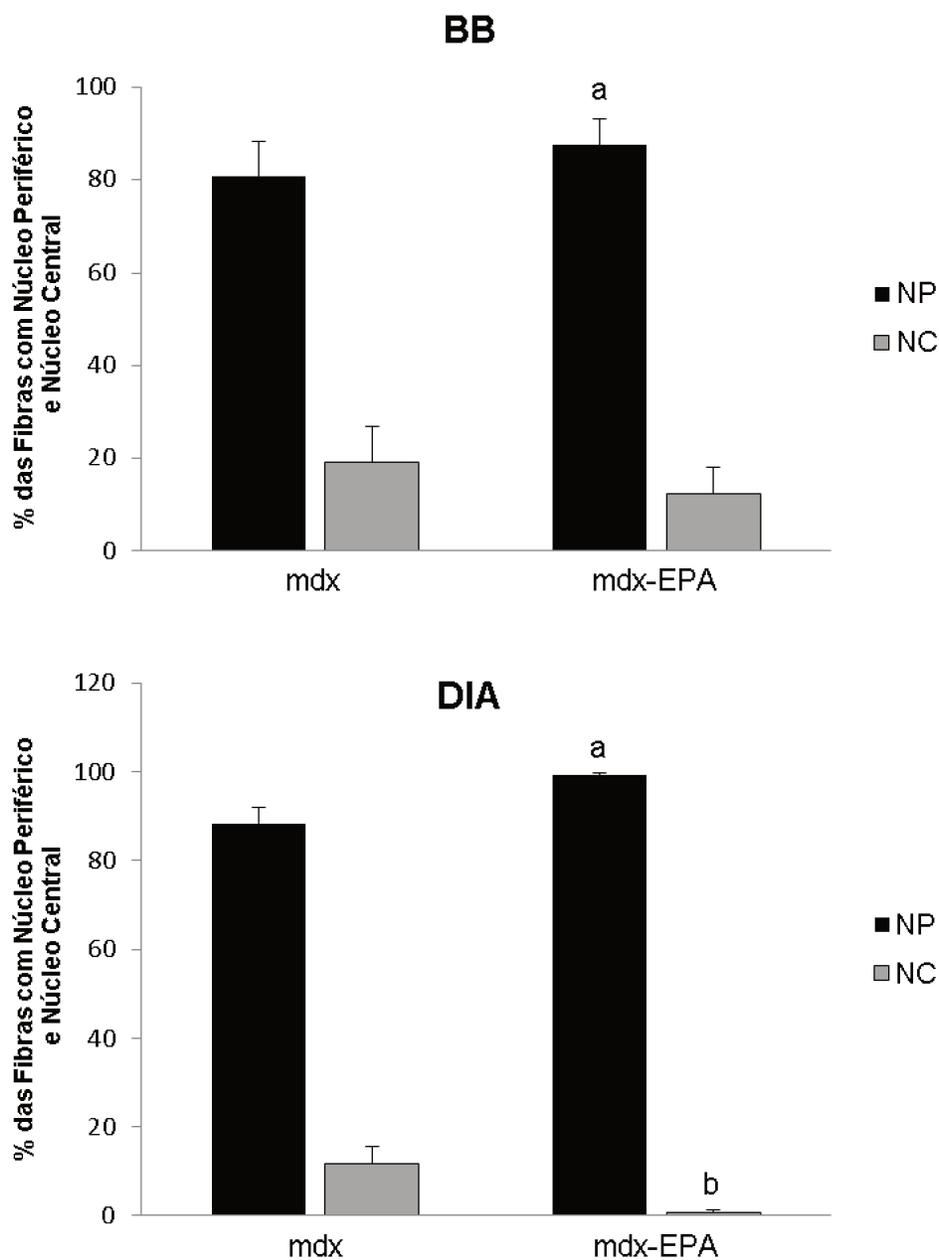
**Figura 9.** Secções transversais dos músculos bíceps braquial (**BB**), diafragma (**DIA**) e quadríceps femoral (**QDR**) corados com Hematoxilina & Eosina (HE). **CTRL**: grupo dos animais controle; **mdx**: grupo dos animais *mdx* não tratados; **mdx-EPA**: grupo dos animais *mdx* tratados com EPA. Núcleo periférico (seta); núcleo central (cabeça de seta); área em regeneração (asterisco); barra: 100 $\mu$ m.

#### **4.1.5. Análise Quantitativa das Fibras Musculares (HE)**

##### **- Músculo Bíceps Braquial (BB) e Diafragma (DIA)**

Nos músculos BB e DIA dos animais tratados com EPA houve uma tendência de aumento da porcentagem de fibras com NP, em comparação com os animais *mdx* não tratados (*Figura 10*). Com o tratamento a porcentagem de fibras com NC diminuiu no DIA ( $p < 0,01$ ).

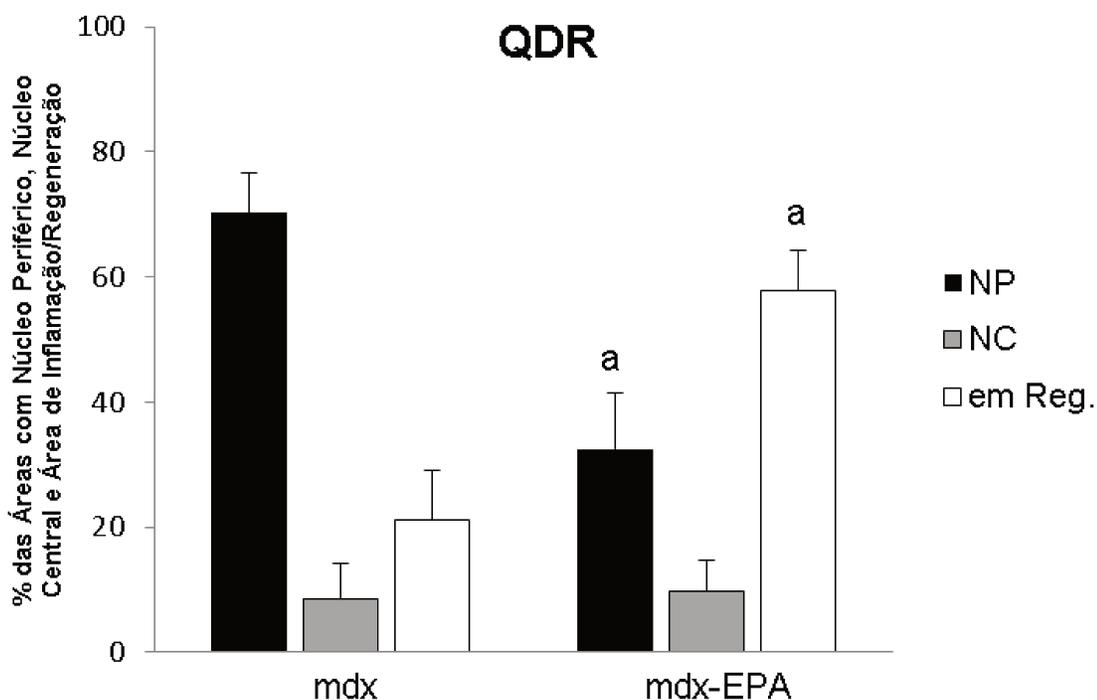
As fibras musculares dos músculos BB e DIA do grupo CTRL apresentam 99,5% (BB) e 100% (DIA) de fibras com núcleos periféricos (*Figura 10*).



**Figura 10.** Porcentagem das fibras com Núcleo Periférico (NP) e Núcleo Central (NC) nos músculos bíceps braquial (**BB**) e diafragma (**DIA**). **mdx**: grupo dos animais *mdx* não tratados; **mdx-EPA**: grupo dos animais *mdx* tratados com EPA; **a**, diferença entre a %NP e %NC no grupo mdx-EPA; **b**, diferença entre a % NC do grupo mdx e mdx-EPA. Médias  $\pm$  desvios padrões das porcentagens de fibras com NP e NC ( $p \leq 0,05$ , ANOVA: Kruskal-Wallis; student-Newman-Keuls);.

### - Músculo Quadríceps Femoral (QDR)

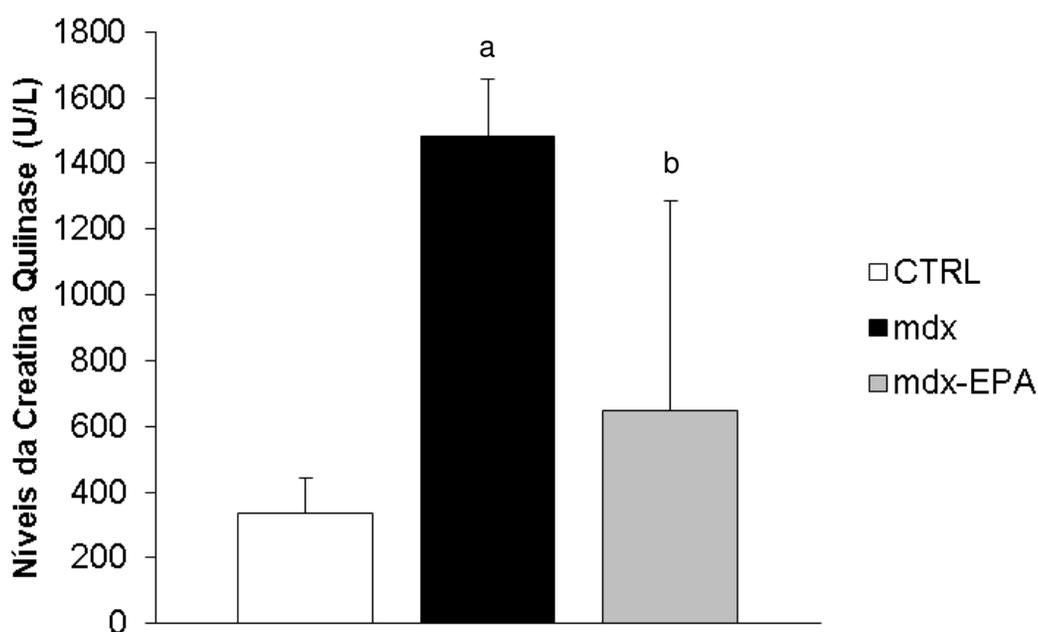
No grupo mdx-EPA, comparado com o grupo mdx, houve diminuição da área das fibras com núcleo periférico ( $p < 0,01$ ) e aumento da área de fibras com núcleo central ( $p = 0,7$ ); *Figura 11*. Nos animais tratados a área em regeneração foi 63% ( $p < 0,01$ ) maior que nos *mdx* não tratados (*Figura 11*). O músculo QDR dos animais controle apresentou 100% de fibras com núcleo periférico.



**Figura 11.** Porcentagem das áreas com NP (núcleo periférico), NC (núcleo central) e área em regeneração. **mdx**: grupo dos animais *mdx* não tratados; **mdx-EPA**: grupo dos animais *mdx* tratados com EPA; **a**, diferença significativa entre os grupos *mdx* e *mdx-EPA*. Médias  $\pm$  desvios padrões das porcentagens das áreas de NP, NC e em regeneração. ( $p \leq 0,05$ , ANOVA: Kruskal-Wallis; student-Newman-Keuls);

## 4.2. Creatina Quinase (CK)

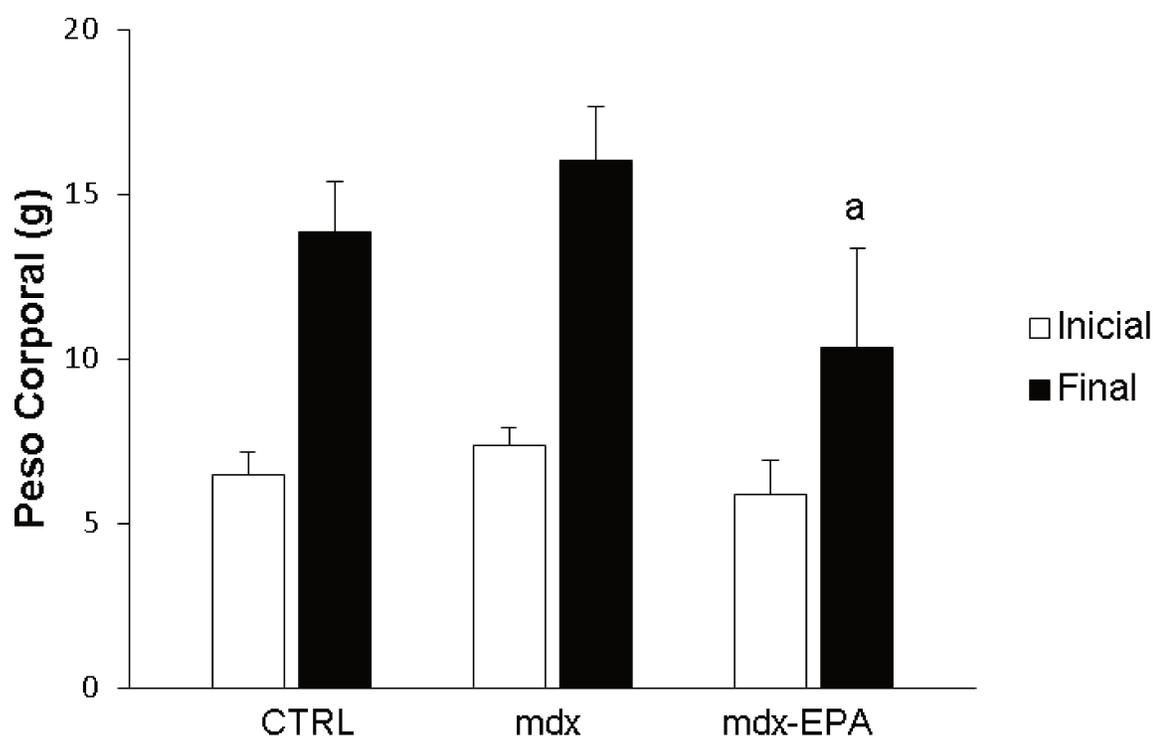
A CK do grupo mdx foi cerca de 4 vezes maior que a do grupo CTRL. Com o tratamento houve redução em cerca de 56% nos níveis da CK em relação ao grupo mdx ( $p < 0,01$ ; *Figura 12*). Não houve diferença significativa entre o grupo CTRL e o mdx-EPA ( $p = 0,32$ ).



**Figura 12.** Níveis da Creatina Quinase (CK), expressos em U/L. **CTRL:** grupo dos animais controle; **mdx:** grupo dos animais *mdx* não tratados com EPA; **mdx-EPA:** grupo dos animais *mdx* tratados com EPA. **a,** diferença significativa entre os grupos CTRL e mdx; **b,** diferença significativa entre os grupos mdx e mdx-EPA. Médias  $\pm$  desvios padrões dos níveis de CK ( $p \leq 0,05$ , Teste ANOVA: Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls).

### 4.3. Peso Corporal

No início do tratamento, ao 14° dia de idade, não houve diferença significativa no peso corporal entre os animais dos grupos CTRL e mdx ( $p=0,2$ ), CTRL e mdx-EPA ( $p=0,6$ ) e entre os grupos mdx e mdx-EPA ( $p=0,08$ ). Ao término do tratamento, ao 31° dia de idade, não houve diferença no ganho de peso entre os grupos CTRL e mdx ( $p=0,3$ ) e CTRL e mdx-EPA ( $p=0,07$ ). Já entre os grupos mdx e mdx-EPA o ganho de peso ao término do experimento foi significativamente menor nos animais tratados com EPA ( $p\leq 0,01$ ); (*Figura 13*).



**Figura 13.** Peso corporal (g) no início e término do tratamento. **CTRL:** grupo dos animais controle; **mdx:** grupo dos animais mdx não tratados com EPA; **mdx-EPA:** grupo dos animais mdx tratados com EPA; **a,** diferença significativa no peso ao final do tratamento comparando o grupo mdx com mdx-EPA Médias  $\pm$  desvios padrões do peso corporal no início e término do experimento ( $p\leq 0,05$ , Teste ANOVA: Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls).

## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1. Área Total de Macrófagos

Os macrófagos do grupo mdx-EPA mantiveram o aspecto esférico e padrão de distribuição inalterado, ou seja, o padrão de agrupamento dos macrófagos observado nos músculos bíceps braquial (BB) e quadríceps femoral (QDR) foi o mesmo ao observado no grupo dos animais não tratados. Com relação ao músculo diafragma (DIA), a distribuição em grupos também se manteve. Foi possível observar qualitativamente redução da área de inflamação nos animais tratados com EPA. Essa redução foi confirmada com a morfometria da área marcada por F4/80. Com o tratamento ocorreu redução significativa da área total dos macrófagos, em todos os músculos estudados. Provavelmente, a diminuição da área marcada por F4/80 foi devida às propriedades do EPA em reduzir os níveis do TNF- $\alpha$  (MACHADO *et al.*, 2011) ou em inibir sua liberação (BABCOCK & COLS, 2002). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por células do sistema imunológico e muscular durante o desenvolvimento, exercício extenuante, lesão e degeneração. Nos músculos de pacientes distróficos o bloqueio do TNF- $\alpha$  diminui consideravelmente a mionecrose (GROUNDS & TORRISI, 2004; RADLEY & GROUNDS, 2006) melhorando o quadro desta distrofinopatia. Um dos mecanismos pelo qual o EPA pode inibir a produção do TNF- $\alpha$  seria através da interleucina 10 (IL-10). O tratamento com EPA pode aumentar a expressão da IL-10 o que inibe a expressão do TNF- $\alpha$  (FIORENTINO *et al.*, 1989; ARNOLD *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2010), reduzindo assim a inflamação muscular.

## 5.2. Populações de Macrófagos M1 e M2

Nos músculos BB, DIA e QDR dos animais *mdx* não tratados com EPA observamos predomínio do fenótipo M1 (iNOS -degeneração muscular) sobre o M2 (CD206 – regeneração muscular), o que é coerente com os altos níveis da expressão de iNOS observados em camundongos *mdx* no estágio inicial da doença (VILLALTA *et al.*, 2009). Especificamente no QDR, a expressão do IFN- $\gamma$ , que é um ativador do fenótipo M1, está elevada nos estágios iniciais da doença, enquanto que o ativador do fenótipo M2, a IL4, somente aumenta entre 4 e 12 semanas de idade (VILLALTA *et al.*, 2009). Provavelmente, a expressão elevada do IFN- $\gamma$  e expressão tardia da IL-4 fez com que este músculo apresente porcentagem mais elevada do fenótipo M1 quando comparado aos outros músculos estudados.

O EPA reduziu a área correspondente aos macrófagos M1 tanto no BB quanto no DIA e QDR e aumentou significativamente a área dos M2 no BB, enquanto que no DIA e QDR esse aumento não foi significativo. O tratamento com EPA apesar de não ter ocasionado predomínio dos macrófagos M2 sobre os M1, no músculo QDR foi capaz de reduzi-lo a 7% e elevar os M2 em 31%. Nossos resultados, embora não significativos demonstraram que o EPA altera o balanço das populações de macrófagos, reduzindo os M1 e aumentando a área dos M2. Provavelmente a alteração nas populações de macrófagos ocorra por uma redução na expressão do IFN- $\gamma$  e ativação da IL-4 (VILLALTA *et al.*, 2009). No DIA, houve redução da área dos M1 em 5% e aumento dos M2 em 13%. Entretanto, os mecanismos que envolvem as citocinas inflamatórias, bem como as populações de macrófagos no músculo DIA ainda não foram elucidados.

Sugerimos que a ação do EPA sobre a proporção das populações dos macrófagos além do provável efeito sobre o IFN- $\gamma$ , IL-4, ocorra também pelo efeito deste fármaco sobre a IL-10. Estudos com células de Kupffer isoladas e tratadas com EPA demonstraram aumento

significativo da expressão de IL-10 (HAO *et al.*, 2010). A IL-10 estimula a indução de fagocitose pelos macrófagos M1, o que induz a mudança do fenótipo M1 para o M2 e inibe a expressão do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$ , reduzindo a atividade citotóxica do M1 (FIORENTINO *et al.*, 1989; ARNOLD *et al.*, 2007). Além disso, o aumento da expressão da IL-10 em macrófagos isolados do camundongo *mdx* reduziu significativamente a expressão de iNOS, desativando o fenótipo M1 e aumentou a expressão de CD206 (M2) e CD163 (M2c), (VILLALTA *et al.*, 2010), tal como observamos nos músculos dos animais tratados (aumento de M2 e diminuição de M1).

### **5.3 Degeneração e Regeneração**

#### **5.3.1 Músculos Bíceps Braquial (BB) e Diafragma (DIA)**

Nos animais *mdx* tratados, a redução da atividade citotóxica dos macrófagos M1, sugerida pelo aumento de fibras com núcleo periférico (fibras que não sofreram degeneração) e redução de fibras com núcleo central (regeneradas), nos músculos BB e DIA, talvez possa ser devida à inibição da expressão do IFN- $\gamma$  (FIORENTINO *et al.*, 1989; ARNOLD *et al.*, 2007), reafirmando o efeito protetor do EPA para esta distrofinopatia.

#### **5.3.2. Músculo Quadríceps Femoral (QDR)**

No QDR dos animais tratados observamos aumento de 62% na área de fibras regeneradas. O EPA aumenta a expressão da IL-10 nos macrófagos isolados do endotélio hepático (HAO *et al.*, 2010). Por sua vez, esta citocina eleva os níveis da miogenina, o que estimula a proliferação de mioblastos, contribuindo assim para a regeneração (VILLALTA *et al.*, 2010). Portanto, uma possibilidade para explicar os efeitos do EPA na regeneração do QDR seria a de sua ação na IL-10, favorecendo a regeneração. A IL-10 é ativadora do fenótipo M2 e atua também como inibidora da expressão do fenótipo M1 (VILLALTA *et al.*, 2011). Os macrófagos M2 são responsáveis pela remodelação e reparo tecidual e estão presentes no processo de regeneração muscular (VILLALTA *et al.*, 2009). Assim, o aumento da expressão da IL-10 levaria ao aumento da expressão do fenótipo M2 o que promoveria a regeneração muscular, fato observado neste músculo.

#### 5.4. Creatina Quinase (CK)

A quantificação dos níveis plasmáticos da creatina quinase (CK) fornece dados quantitativos diretamente relacionados com a degeneração muscular, sendo um parâmetro bastante utilizado para o diagnóstico de miopatias (KATIRIJI & AL-JABERI, 2001). Os níveis da creatina quinase refletem a quantidade de CK liberada por todos os músculos estriados esqueléticos inclusive da musculatura estriada cardíaca. Portanto, o resultado da análise histológica isolada de cada músculo pode não coincidir com os valores da creatina quinase (CK), pois os ciclos de degeneração/regeneração podem variar de um músculo para outro (PASTORET & SEBILLE, 1995; RADLEY & GROUNDS, 2006).

Na DMD, os níveis de CK estão cerca de 50 a 100 vezes acima dos limites superiores dos valores de referência (ENGEL *et al.*, 1994). Em camundongos *mdx*, os níveis de CK também se mostram elevados durante toda a vida do animal (BULFIELD *et al.*, 1984; YOSHIDA *et al.*, 2006). Neste trabalho, os grupos de camundongos *mdx* (*mdx* e *mdx*-EPA) apresentaram níveis séricos da CK significativamente maiores em relação ao grupo de camundongos C57BL/10. Tal resultado se justifica pelos constantes ciclos de degeneração/regeneração muscular que ocorrem nos *mdx* (PASTORET & SEBILLE, 1995; RADLEY & GROUNDS, 2006).

O tratamento com EPA purificado por 16 dias (14<sup>o</sup>-30<sup>o</sup> dia de vida), resultou na diminuição em cerca de 56% dos níveis de CK comparado com os *mdx* não tratado, demonstrando que o tratamento com EPA reduz a degeneração muscular melhorando o quadro desta distrofinopatia. Estes dados são coerentes com o trabalho do Machado *et al.* (2011), que estudou outros músculos distróficos de animais tratados com EPA e obteve resultados da CK inferiores àqueles encontrados nos *mdx* não tratados.

Nosso trabalho demonstrou que o EPA altera a proporção dos macrófagos M1 e M2 em músculos distróficos. Adicionalmente, o EPA promove regeneração muscular, bem como reduz a degeneração muscular (CK). Este fármaco vem sendo empregado em outras patologias humanas, com efeitos colaterais mínimos (JINNO *et al.*, 2011; CASTILLERO *et al.*, 2009; RIEDGER *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2004; BABCOCK *et al.*, 2000; TISDALE & DHESI, 1990), o que o torna uma droga potencialmente útil para terapia adicional da DMD. Porém, estudos que esclareçam as consequências do uso prolongado deste anti-inflamatório são necessários, uma vez que os tratamentos relacionados à DMD são de longo prazo.

### **5.5. Peso Corporal**

Ao término do experimento (31° dia de vida) o ganho de peso entre os grupos estudados, revelou que o grupo mdx-EPA teve menor ganho de peso (43%) em comparação com os grupos CTRL (53%) e mdx (54%). Sugerimos que a diferença no peso final dos animais tratados com EPA se deva ao tamanho da ninhada e não ao tratamento. Ninhadas com número superior a 8 filhotes podem favorecer a perda de peso entre os filhotes (BRAGGIO *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a ninhada do grupo mdx-EPA teve em média 11 filhotes e as ninhadas dos grupos CTRL e mdx tiveram em média 8-9 filhotes. Assim, acreditamos que o menor ganho de peso observado nos animais tratados com EPA seja decorrente do tamanho da ninhada e não devido a algum efeito direto da droga. Adicionalmente, em estudos prévios em nosso laboratório não foi observada perda de peso dos mdx tratados com EPA, na mesma dose (300mg/Kg/dia) e na mesma idade aqui utilizados, quando comparados aos grupos controle e mdx não tratados (MACHADO *et al.*, 2011).

## 5.6. Uso do EPA na terapia das distrofinopatias

Os anti-inflamatórios corticosteróides, prednisona e deflazacorte, são fármacos que retardam a evolução da DMD. Contudo, o uso prolongado destas drogas provoca efeitos colaterais prejudiciais ao organismo (BIGGAR *et al.*, 2006; BUSHBY *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram que o ácido eicosapentaenóico (EPA) possui propriedades anti-inflamatórias, reduz os riscos de doenças cardiovasculares, como a arteriosclerose, atua na redução da atrofia muscular (BABCOCK *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2004. RIEDGER *et al.*, 2009) e diminui a imobilidade causada pela artrite reumática (CASTILLERO *et al.*, 2009).

O EPA purificado é atualmente utilizado para o tratamento de hiperglicemia reduzindo os níveis plasmáticos de triglicerídeos (JINNO *et al.*, 2011). Este anti-inflamatório modifica as propriedades das lipoproteínas de baixa densidade (*very low density lipoprotein*; VLDL) e diminui a atividade das citocinas pró-inflamatória, inibindo os níveis da *lipoprotein lipase* (LPL) nos macrófagos (JINNO *et al.*, 2011). A VLDL é conhecida por induzir o acúmulo de triglicerídeos e, em seguida, induzir a expressão da IL-1 e TNF- $\alpha$  através da ativação da *activator protein 1* (AP-1) e pelo *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK) nos macrófagos (STOLLENWERK *et al.*, 2005), aumentando a inflamação nos músculos esqueléticos.

Se considerarmos que a dose de EPA recomendada para os humanos é 1000mg/dia, humanos adultos com 70kg iriam ingerir 14,29mg/kg/dia de EPA. Em pacientes com câncer pancreático avançado, o consumo de suplemento nutricional enriquecido com 1,09g de EPA, duas vezes ao dia (31,14mg/kg/dia), diminuiu a progressão da caquexia (BARBER *et al.*, 1999). No presente estudo, a dose utilizada para os camundongos *mdx* foi de 300mg/kg/dia (MATSUMOTO *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2011). Esta dose é cerca de 21 vezes maior que a recomendada para os humanos. Em ratos modelos de caquexia, a toxicidade do EPA, avaliada

quanto a presença de diarreia e apatia, foi observada em doses de 5g/kg (TISDALE & DHESI, 1990). A dose empregada neste trabalho (300mg/Kg), embora seja maior que a recomendada para os humanos (14,29mg/kg), não atinge o nível de toxicidade observado nos animais modelos da caquexia (5g/kg). Contudo, estudos clínicos são necessários para se verificar o uso potencial do EPA, e seus efeitos colaterais, para o tratamento das distrofinopatias.

## 6. CONCLUSÃO

---

- O tratamento de camundongos *mdx* com ácido eicosapentaenóico (EPA) purificado altera o balanço das populações dos macrófagos M1 e M2 em músculos esqueléticos, reduzindo a expressão dos M1 (citotóxicos) e aumentando a dos M2 (regenerativos).
- O EPA atua de forma diferenciada nos músculos estudados, diminuindo a inflamação nos músculos com maior área inflamatória (BB e DIA) e promovendo a regeneração do músculo com menor inflamação (QDR).

O presente trabalho sugere que o EPA possa ser potencialmente útil como terapia adicional para as distrofinopatias. Entretanto, estudos clínicos com EPA são necessários para determinar possíveis efeitos colaterais decorrentes do uso contínuo desta droga em pacientes portadores da DMD.

## 7. REFERÊNCIAS

---

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.

ARNOLD, L., HENRY, A., PORON, F., BABA-AMER, Y., van ROOIJEN, N., PLONQUET, A., GHERARDI, R.K., CHAZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med.**; 204(5):1057-69, 2007.

BABCOCK, T. A.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory  $\omega$ -3 fat with potential clinical applications. **Nutrition.**; 16:1116-1118, 2000.

BABCOCK, T.A.; HELTON, W. S.; HONG, D.; ESPAT, N. J. Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF- $\alpha$  production. **Surgical Infections.**; 3:145-149, 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.**; 81:80-86, 1999.

BAKER, P. E.; KEARNEY, I. A.; GONG, B.; MERRIAM, A. P.; KUHN, D. E.; PORTER, J. D.; RAFAEL-FORTNEY, J. A. Analysis of gene expression differences between utrophin/dystrophin-deficient vs *mdx* skeletal muscles reveals a specific upregulation of slow muscles genes in limb muscles. **Neurogenetics**; 7:81-91, 2006.

BANI, C., LAGROTA-CANDIDO, J.; PINHEIRO, D.F.; LEITE, P.E. C.; SALIMENA, M. C.; HENRIQUES-PONS, A.; QUIRICO-SANTOS, T. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscle of *mdx* mice. **Muscle & Nerve**, 37:583-592, 2008.

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

BIGGAR, W.D., KLAMUT, H.J., DEMACIO, P.C., STEVENS, D.J., RAY, P.N. Duchenne Muscular Dystrophy: current knowledge, treatment and future prospects. **Clin Orthop Relat Res.**; 401:88-106, 2002.

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.**; 123: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**; 82(2):102-115, 2004.

BONDESEN, B. et al. Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *FASEB J.*; 21:3338-3345, 2007.

BONDESEN, B. et al. The cox-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*; 287:475- 483, 2004.

BRAGGIO, M.M., MARTINS, A.R.S., VALEROS, V.B. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus Musculus*). *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.70, n.2, p.149-153, 2003.

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. *Neuromuscul Disord.*; 14: 675-682, 2004.

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.*; 81: 1189-1192, 1984.

BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D.J.; CASE, L.; CLEMENS, P.R.; CRIFE, 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.*; 9: 177-189, 2010.

CALDER P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition and Food research*, 52: 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. *Neuromuscul. Disord.*; 21(5): 313-327, 2011.

CASTILLERO, E., MARTÍN, A.I., LÓPEZ-MENDUINA, M., VILLANÚA, M.A., LÓPEZ-CALDERÓN, A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogen-1 and on myogenic regulatory factors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 297(5):R1322-31, 2009.

CHAKKALAKAL, J. et al. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J.*; 19: 880-891, 2005.

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

DECONINK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr. Neurol.*; 36 (1): 1-7, 2007.

- DHAWAN, J.; RANDO, T.A. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. **TRENDS Cell. Biol.**; 15(12): 666-673, 2005.
- DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. Muscular dystrophies involving the dystrophin- glycoprotein complex: an overview of current mouse models. **Curr. Opin. Gen. Dev.**; 12: 349-361, 2002.
- ENGEL, A.; Yamamoto, M.; FISCKHBECK, H. Dystrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, Inc., p. 1937 , 1994.
- ERVASTI, J. M. Dystrophin, its interaction with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochim. Biophys. Acta**, n. 1772:108-117, 2007.
- ERVASTI, J.M.; CAMPBELL, K.P Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.**; 3: 139-166, 1993.
- FAIRCLOUGH, R.J.; BAREJA, A.; DAVIES, K.E. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy. **Experimental Physiology**. DOI: 10.1113/expphysiol.2010.053025, 2011.
- FIORENTINO, D.F., BOND M.W., MOSMANN T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**. 1;170(6):2081-95, 1989.
- FOSCHINI, R.M.S.A.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. **Arq. Bras. Oftamol.**; 67: 681-687, 2004.
- GOSSELIN, L. E.; WILLIAMS, J. E.; PERSONIUS, K.; FARKAS, G. A. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (mdx) mice: impact of pirfenidone. **Muscle & Nerve**; 35:208 –216, 2007.
- GOYENVALLE, A.; SETO, J.T.; DAVIES, K.E.; CHAMBERLAIN, J. Therapeutics approaches to muscular dystrophy. **Human Molec. Genet.**; 20: R69-R78, 2011.
- GROUNDS, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports.**; 15: 381-391, 2005.
- GROUNDS, M.D.; TORRISI, J. Anti-TNF $\alpha$  (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **FASEB Journal.**; 18: 676-682, 2004.
- HAMER, P. et al. Evans blue die as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **J. Anat.**; 200: 69-79, 2002.

HAO, W., WONG, O.Y., LIU, X., LEE, P., CHEN, Y., WONG, K.K.  $\omega$ -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. **J Pediatr. Surg.**; 45(12):2412-8, 2010.

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. **J. of Nutrit.**; 136: 83-87, 2006.

HODGETTS, S.; RADLERY, H.; DAVIERS, M. and GROUNDS, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking of TNF $\alpha$  function with Etanercept in mdx mice. **Neuromuscul. Disord.**; 16: 591-602, 2006.

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

HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Semin. Cell Dev. Biol.**; 16: 575-584, 2005.

JINNO, Y., NAKAKURI, M., KAWANO, H., NOTSU, T., MIZUGUCHI, K., IMADA, K. Eicosapentaenoic acid administration attenuates the pro-inflammatory properties of VLDL by decreasing its susceptibility to lipoprotein lipase in macrophages. **Atherosclerosis.**; 219(2):566-72. 2011.

JONES, K. J. et al. Deficiency of the syntrophins and  $\alpha$ -dystrobrevin in patients with inherited myopathy. **Neuromuscul. Disord.**; 13: 456-467, 2003.

KATIRJI, B; AL-JABERI, M.M. Creatine Kinase Revisited. **J. Clin. Neuromuscul. Dis.**; 2: 158-163, 2001.

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

LAGROTA-CANDIDO, J.; VASCONCELLOS, R.; CAVALCANTI, M.; BOZZA, M.; SAVINO, W. and QUIRICO-SANTOS, T. Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. **Int. J. Exp. Pathol.**; 83: 121-132, 2002.

LAPIDOS, K., KAKKAR, R., MCNALLY, E. The dystrophin-glycoprotein complex signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circ Res.**; 94: 1023-1031, 2004.

LE GRAND, F.; RUDNICKI, M.A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. **Curr. Opin. Cell Biol.**; 19: 628-633, 2007.

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

- 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 Molec. Genet.**; 18(14): 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. **J. Surg. Research.**; 86:103-107, 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 Sc.**; 80: 753-762, 2001.
- 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.**, 35(6): 691-695, 2002.
- MACHADO, R. V., MAURICIO, A. F., TANIGUTI, A.P. T., FERRETTI, R., SANTO NETO, H., MARQUES, M. J. Eicosapentaenoic acid decreases TNF- $\alpha$  and protects dystrophic muscles of mdx mice from degeneration. **Journal of Neuroimm.**; 232: 145–150, 2011.
- MANZUR, A.Y.; KINALI, M.; MUNTONI, F. Update of management of Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Disease Childhood.**; 93(11): 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.**; 37(1): 61-67, 2008.
- MARQUES, M. J., FERRETTI, R., VOMERO, V. U., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**; 35: 349-353, 2007a.
- MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Braz J Morphol Sci.**; 21(3): 145-152, 2004.
- MARQUES, M. J. et al. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. **Anat. Rec.**; 290(7): 846-854, 2007b.
- 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. **J. of Pharm. and Exper. Therap.**; 329: 324-334, 2009.

McDOUALL, R.M., DUNN, M.J., DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. **Jornal of Neurol. Sc.**, 99: 199-217, 1990.

MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemical and Cell Biology.**; 73(9-10): 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.

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.**; 22: 133-139, 2001.

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.

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.**; 284: L84–L89, 2003.

OZAWA, E. et al. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. **Muscle & Nerve**; 2(5): 563-576, 2005.

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

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

PASTORET, C.; SEBILLE, A. *Mdx* mice show weakness and muscle deterioration with age. **J. Neur. Sci.**; 129: 97-105, 1995.

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

PORTER, J.D.; MERRIAM, A. P.; LEAHY, P.; GONG, B.; FEUERMAN, J.; CHENG, G.; et al. Temporal gene expression profiling of dystrophindeficient (mdx) mouse diaphragm identifies conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. **Human Molec. Genet.**;13:257–269, 2004.

PORTER, J. D.; GUO, W.; MERRIAM, A. P.; KHANNA, S.; CHENG, G.; ZHOU, X.; et al. Persistent over-expression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in mdx skeletal muscle. **Neuromuscul. Disord.** 13:223–35, 2003.

PORTER, J.D. et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Human Molec. Genet.**; 11(3): 263-272, 2002.

PRISK, V; HUARD, J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation. **Histol. Histopathol.**; 18: 1243-1256, 2003.

QUINLAN, J. G.; HAHN, H. S.; WONG, B. L.; LORENZ, J. N.; WENISCH, A. S.; and LEVIN, L. S. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. **Neuromuscul. Disord.**, 14: 491–496, 2004.

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

RANDO, T. A. Role of nitric oxide role in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. **Microsc. Res. Tech.**; 55: 223-235, 2001.

RIEDIGER, N. D.; OTHMAN M, R. A.; SHUH, M.H, MOGHADASIAN.A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease, **J. Am. Diet. Assoc.** 109: 668–679, 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. **Neuromuscul. Disord.**; 13: 193-206, 2003.

SCHMALBRUCH, H. The satellite cell of skeletal muscle fibres. **Bras. J. Morphol Sci.**; 23(2): 159-172, 2006.

SEALE, P. et al. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+:Sca1+ stem cells from injured muscle. **PLoS Biology.**; 2(5), 2004.

SEIXAS, S. et al. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arq. Neuropsiquiatr.**; 55(3-B): 610-617, 1997.

SHEN, W. et al. Interaction Between macrophages, TGF- $\beta$ 1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. **J. Cell. Physiol.**; 214(2): 405-412, 2008.

SHI, H.P.; FISHEL, R.S.; EFRON, D.T.; WILLIAMS, J.Z.; FISHEL, M.H and BARBUAL, A. Effect of supplemental ornithine on wound healing. **J. Surg. Res.**, 106: 299-302, 2002.

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.**; 91(2): 408-412, 2004.

SPENCER, M. J.; RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. and TIDBALL, JG. Helper (CD4+) and cytotoxic (CD8+) Tcells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. **Clin. Immunol.**, 98: 235-243, 2001.

SPENCER, M. J.; WALSH, C. M.; DORSHKIND, K. A.; RODRIGUEZ, E. M. and TIDBALL, J. G. apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. **J. Clin. Invest.**, 99: 2745-2751, 1997.

SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. **Human Molec. Genet.**; 11(21): 2645-2655, 2002.

STAMOPOULOS, A.P.: Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J AmColl Nutr** 21:495-505, 2002.

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.**; 352: 536-539, 1991.

STOLLENWERK, M.,M., SCHIOPU, A., FREDRIKSON, G.,N., DICHTL, W., NILSSON, J., ARES, M.P. Very low density lipoprotein potentiates tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in macrophages. **Atherosclerosis**;179:247-54, 2005.

STRAUB, V.; CAMPBELL, K. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. **Curr. Opin. Neurol.**; 10(6): 168-175, 1997.

SWASH, M.; SCHWARTZ, M. S. Muscular diseases. A practical approach to diagnosis and management. **Springer-verlag 2. ed. USA.**; 1998.

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

TINSLEY, J.M., BLAKE, D.J., RICHARD, A.Z., DAVIS, K.E. Increase complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.91, p.8307-8313, 1994.

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

TISDALE, M.; DHESI, J.K. Inhibition of weight loss by Omega-3 fatty acids in an experimental cachexia model. **Cancer Res.**; 50, 5022-5026, 1990.

VILLALTA, S. A., NGUYEN, H.X., DENG, B., GOTOH, T., TIDBALL, J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Human Molec. Genet.**, 18: 482-96, 2009.

VILLALTA, S. A., RINALDI, C., Bo DENG, LUI, G., FEDOR, B., TIDBALL, J. G. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivation M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Human. Molec. Genet.**, 20: 709-805, 2011.

WATCHKO, J. F.; O'DAY, T. L.; HOFFMAN, E. P. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. **J. Appl. Physiol.**; 93: 407-417, 2002.

WEHLING-HENRICKS, M.; JORDAN, M.C.; GOTOH, T.; GODOY, W. W.; ROOS, K. P.; TIDBALL, J. G. Arginine Metabolism by Macrophages Promotes Cardiac and Muscle Fibrosis in mdx Muscular Dystrophy. **PLoS ONE**; 5(5): e10763, 2010.

WEHLING, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **J. Cell Biol.**; 155(1): 123-131, 2001.

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.**; 33: 657-662, 2006.

YOSHIDA, M. et. al. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*; 290(2): 449-455, 2006.



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

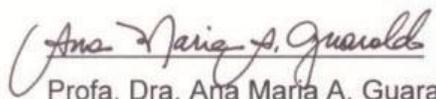
**CERTIFICADO**

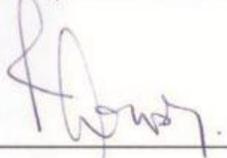
Certificamos que o Protocolo nº 2232-1, sobre "População de Macrófagos em Músculos Esqueléticos de Camundongos *mdx* tratados com Ácido Eicosapentanóico", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Júlia Marques / Samara Camaçari de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 13 de setembro de 2010.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 2232-1, 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 13, 2010.

Campinas, 13 de setembro de 2010.

  
 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
 Presidente

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva