

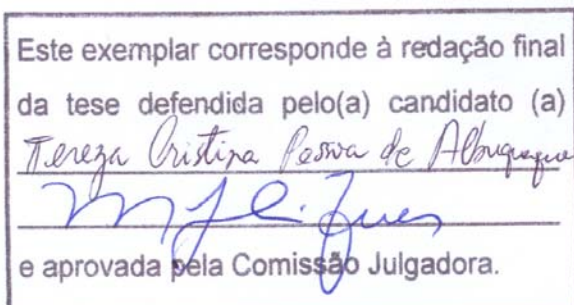
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Tereza Cristina Pessoa de Albuquerque

**“Ação de antiinflamatórios não-esteróides na
degeneração/regeneração de fibras musculares distróficas de
camundongos *mdx*”**



Tese 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

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

AL15a

Albuquerque, Tereza Cristina Pessoa de
Ação de antiinflamatórios não-esteróides na
degeneração/regeneração de fibras musculares distróficas
de camundongos *mdx* / Tereza Cristina Pessoa de
Albuquerque. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Maria Júlia Marques.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Camundongo *mdx*. 2. Músculos - Regeneração. 3.
Músculos - Degeneração. 4. Nimesulida. 5. Naproxeno.
I. Marques, Maria Júlia. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Nonsteroidal antiinflammatory influence in the degeneration/regeneration cycles of mdx mice dystrophic muscle fibers.

Palavras-chave em inglês: *Mdx* mice; Muscle regeneration; Muscle degeneration; Nimesulide; Naproxen.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Júlia Marques, Rosana Macher Teodori, Selma Maria Michelin Matheus.

Data da defesa: 11/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 11 de junho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

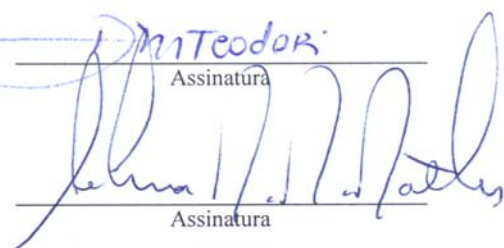
Profª. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Rosana Macher Teodori


Assinatura

Profª. Dra. Selma Maria Michelin Matheus


Assinatura

Profª. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

Assinatura

Profª. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

Agradeço...

A Deus pela presença em minha vida, dando-me força e consolo, guiando os meus passos nas incertezas e mostrando que sempre há um caminho a ser percorrido.

A minha mãe, Renata, o amor, incentivo e apoio em todos os momentos e que foram indispensáveis para realização de mais este importante passo em minha vida.

A minha Tia Célia pelo amor, carinho e apoio que foram indispensáveis para a minha formação.

Ao Rodrigo pelo amor, companheirismo, compreensão, estímulo e paciência em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Beta e Breninho, e ao Augusto por todo carinho, apoio e compreensão necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus sobrinhos Raoni e Isa pela alegria que me proporcionam a cada dia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela contribuição ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Profa. Maria Júlia Marques pela sua dedicação e paciência durante o período de orientação e pela confiança e incentivo ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Anatomia pela contribuição dada para a minha formação e pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

Aos Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula pela colaboração nos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

A Sra. Marlene Lima pela manutenção e cuidados dispensados aos animais utilizados neste trabalho.

Aos Srs. Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos e Toni Donizeti dos Santos, funcionários do departamento de Anatomia, pelo auxílio e prestatividade durante o mestrado.

Aos amigos Cíntia Matsumura, Ana Paula Taniguti, Renato Ferretti, Adriana Pertille, Rafael Machado pela importante contribuição para a realização deste trabalho e pela amizade e convívio nestes dois anos.

Aos amigos do Laboratórios de Eletromiografia, Biologia da Reprodução e de Regeneração Nervosa pela amizade e bons momentos compartilhados durante o mestrado.

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

Ao CNPq, CAPES e FAPESP o apoio financeiro.

"O único homem que está isento de erros é aquele que não arrisca acertar."

Albert Einstein

Sumário

Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução.....	1
1.1 A Distrofia Muscular de Duchenne.....	4
1.2 O camundongo <i>mdx</i> como modelo da distrofia muscular de Duchenne.....	6
1.3 Distrofina e complexo distrofina-glicoproteínas.....	8
1.4 Degeneração muscular.....	10
1.5 Resposta inflamatória.....	12
1.6 Regeneração muscular.....	13
1.7 Prostaglandinas e regeneração muscular.....	16
1.8 Aintinflamatórios não-esteróides e regeneração muscular.....	19
2. Objetivo.....	22
3. Materiais e métodos.....	24
3.1 Animais.....	25
3.2 Grupos experimentais e tratamento.....	25
3.3 Sacrifício e coleta do material.....	26
3.4 Análise da integridade do sarcolema.....	26
3.5 Preparo dos músculos para a análise histopatológica.....	27
3.6 Quantificação da creatinoquinase.....	28
3.7 Análise histológica.....	30
3.8 Análise estatística.....	31
4. Resultados.....	32
4.1 Análise histopatológica.....	33
4.1.1 Análise qualitativa.....	33
4.1.2 Análise quantitativa.....	35
4.1.3 Análise comparativa entre os músculos TA e STN.....	36
4.2 Quantificação da creatinoquinase.....	39
5. Discussão.....	40
5.1 Degeneração muscular.....	41
5.2 Regeneração muscular.....	41
5.3 Análise da creatinoquinase.....	44
6. Conclusões.....	47
7. Referências bibliográficas.....	49
8. Declaração do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	61

Lista de abreviaturas

AE – azul de Evans

AINE – antiinflamatório não-esteróide

ATP – adenosina tri-fosfato

CDG – complexo distrofina-glicoproteínas

CK – enzima creatinoquinase

DMSO – dimetilsulfóxido

COX-1 – ciclooxigenase 1

COX-2 – ciclooxigenase 2

CRO – camundongo *mdx* tratado com o cromoglicato de sódio

CTRL – camundongo *mdx* controle

DABCO – 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano

DMD – distrofia muscular de Duchenne

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

HE – hematoxilina-eosina

HGF – hepatocyte growth factor

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

mdx – X chromosome-linked muscular dystrophy

NAP – naproxeno

NIM – nimesulida

NO – radical livre óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

Pax-7 – paired-box transcription factor 7

PG – prostaglandina

PGD₂ – prostaglandina D₂

PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α}

PGG₂ – prostaglandina G₂

PGH₂ – prostaglandina H₂

PGI₂ – prostaglandina I₂

STN – músculo esternomastóide

TA – músculo tibial anterior

Resumo

Em fibras musculares distróficas de camundongos *mdx* e na distrofia muscular de Duchenne (DMD), a deficiência da distrofina provoca lesão do sarcolema e degeneração muscular. Esta deficiência está associada a alterações na estabilidade do sarcolema e aumento dos níveis intracelulares de cálcio, que podem provocar mionecrose. O mecanismo exato que provoca a lesão da membrana e a mionecrose são desconhecidos. Uma das hipóteses é que a resposta inflamatória endógena pode aumentar a lesão do sarcolema devido à ausência da distrofina. O processo inflamatório está associado com a regeneração muscular e com o reparo tecidual. Antiinflamatórios não-esteróides (AINE) podem reduzir a inflamação que ocorre como consequência de lesão muscular através da inibição das ciclo-oxigenases, provocando redução da síntese de prostaglandinas. Estudos anteriores mostraram que houve atraso da regeneração muscular após a utilização de AINE. Neste estudo, foi verificado se os AINE naproxeno e nimesulida reduzem a mionecrose no camundongo *mdx*, um dos modelos experimentais da DMD. Camundongos *mdx* (n= 48) com 21 dias de idade receberam injeções intraperitoneais de naproxeno (10 mg/kg de peso corporal) ou de nimesulida (25 mg/kg de peso corporal) durante 15 ou 30 dias consecutivos. Camundongos *mdx* não tratados receberam injeção intraperitoneal de solução salina. Para a observação e contagem de fibras em degeneração, três animais de cada grupo receberam injeção intraperitoneal de azul de Evans (AE), marcador que indica alterações de permeabilidade do sarcolema. Secções transversais dos músculos esternomastóide (STN) e tibial anterior (TA) foram coradas com hematoxilina-eosina. A secção total transversa foi dividida em área de infiltrado inflamatório, com fibras em estágios iniciais de regeneração (áreas INFL/REG), e áreas com fibras em estágio avançado de regeneração (áreas REG). Estas áreas foram expressas como porcentagens da área seccional transversa total. O número de fibras regeneradas (fibras com núcleo central), fibras com núcleo periférico e fibras em degeneração (positivas ao corante AE) foram quantificadas. O naproxeno mostrou-se mais efetivo que a nimesulida na diminuição da mionecrose, influenciando de maneira diferenciada os ciclos de degeneração/regeneração de músculos distróficos, principalmente quando utilizado nos estágios iniciais destes ciclos. Concluímos que a utilização de inibidores da produção de prostaglandinas não prejudica a regeneração muscular de camundongos *mdx*, podendo ser uma alternativa para o tratamento de miopatias, especialmente se associada a outros fármacos de ação mais direta na proteção à mionecrose.

Palavras-chave: camundongo *mdx*, regeneração muscular, mionecrose, nimesulida, naproxeno.

Abstract

In dystrophin-deficient fibers of *mdx* mice and in Duchenne muscular dystrophy (DMD), the lack of dystrophin leads to sarcolemma breakdown and muscle degeneration. The lack of dystrophin is associated with changes in membrane stability and increased levels of calcium in the muscle fiber, which leads to myonecrosis. The exact mechanism determining the sarcolemmal lesion and myonecrosis is unknown. One hypothesis is that the endogenous inflammatory response exacerbates the muscle fiber membrane damage due to the lack of dystrophin. Inflammation has also been associated to muscle regeneration and repair. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) can reduce inflammation following injury by inhibiting cyclooxygenase and leading to a reduction in prostaglandin synthesis. Previous experimental studies have indicated delayed muscle regeneration after NSAID. In this work, we verified the effects of the cyclooxygenase inhibitors, naproxen and nimesulide, on the extent of myofiber necrosis in the *mdx* mice model of DMD. *Mdx* mice (n=48) at 21 days after birth received daily intraperitoneal injections of naproxen (10 mg/kg body weight) or nimesulide (25 mg/kg body weight) for 15 or 30 days. Untreated *mdx* mice were injected with saline. To measure muscle fiber damage, some mice were injected with Evans blue dye (EBD; n=3), a marker of sarcolemmal lesion. Cryostat cross-sections of the sternomastoid (STN) and tibialis anterior (TA) muscles were stained with hematoxylin and eosin. The whole cross-sectional area of the muscles was divided into areas of inflammatory infiltrate with early regenerating fibers (INFL/REG areas) and areas with late regenerated fibers (REG areas). These areas were expressed as a percentage of the total cross-section area. The number of regenerated fibers (central nucleated fibers), fibers with peripheral cell nuclei and degenerated fibers (positive to EBD) was counted. Naproxen was more effective than nimesulide in decreasing myonecrosis. We concluded that the use of prostaglandin inhibitors does not impair muscle regeneration in the *mdx* mice. They could be useful therapeutic alternatives in the treatment of DMD, but should be accompanied by other strategies directed against muscle degeneration.

Keywords: *mdx* mice, muscle regeneration, muscle degeneration, nimesulida, naproxen.

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne é uma doença autossômica recessiva ligada ao cromossomo X que acomete um em cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (SWASH; SCHWARTZ, 1998; BIGGAR, 2006). É transmitida somente pelos indivíduos do sexo feminino e afeta apenas os indivíduos do sexo masculino (SWASH; SCHWARTZ, 1998). Esta distrofia afeta primariamente a musculatura estriada esquelética e cardíaca. Os primeiros sinais do acometimento se tornam evidentes no início da infância e a evolução da doença progride com perda progressiva da musculatura, substituição das fibras musculares por tecido fibroadiposo e aumento do tecido conjuntivo intersticial (SEIXAS et al., 1997). No início da segunda década de vida a maioria dos indivíduos perde a capacidade de deambular e fica dependente de cadeira de rodas (CHAKKALAKAL et al., 2005). Embora a utilização de recursos terapêuticos seja capaz de melhorar qualidade de vida dos portadores da DMD, na maioria dos casos o óbito ocorre ao fim da segunda década de vida por falência cárdio-respiratória (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994; BOGDANOVICH et al., 2004).

A alteração genética ocorrida na DMD causa modificação do gene responsável pela codificação da proteína distrofina, proteína que integra um complexo protéico denominado complexo distrofina-glicoproteínas (CDG). Este complexo é responsável pela conexão entre o citoesqueleto da fibra muscular e a matriz extracelular, sendo importante para a manutenção da estabilidade mecânica das fibras musculares (PETROF, 2002).

Em ausência de distrofina a estabilidade deste complexo é prejudicada e as fibras ficam sujeitas à ocorrência de lesões em seu sarcolema, principalmente durante os ciclos de contração e relaxamento aos quais os músculos são submetidos durante sua atividade. As lesões do sarcolema permitem o influxo exacerbado de íons cálcio, ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, inibição da atividade mitocondrial e hipercontração da fibra muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005).

Os músculos distróficos, além de serem susceptíveis à lesão do sarcolema, não apresentam capacidade regenerativa suficiente para compensar a degeneração muscular. Nestes músculos, as fibras degeneradas são substituídas por tecido fibroadiposo e, gradualmente, ocorre perda funcional (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994).

O camundongo da linhagem *mdx* (*X-chromosome linked muscular dystrophy*) é o animal mais utilizado como modelo da DMD devido à fácil disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986; HAMER et al., 2002; SASAOKA et al., 2003). Estes animais apresentam deficiência do gene responsável pela expressão da distrofina, assim como na DMD (SICINSKI et al., 1989). No entanto, eles apresentam ciclos de regeneração muscular que parecem compensar adequadamente a degeneração muscular e, simultaneamente, ocorre menor acúmulo de tecido conjuntivo e menor perda funcional quando comparados ao quadro da distrofinopatia humana (YABLONKA-REUVENI; ANDERSON, 2006).

No tratamento da DMD as estratégias farmacológicas têm como objetivo principal a diminuição do acometimento muscular, minimizando os prejuízos funcionais decorrentes da doença (PORTER et al., 2002). Os antiinflamatórios corticosteróides são fármacos muito utilizados na tentativa de minimizar a evolução da doença. Porém seus efeitos colaterais são severos (MUNTONI et al., 2002; KHURANA; DAVIES, 2003; PARREIRA et al., 2007; RADLEY et al., 2007; MANZUR et al., 2008). A utilização de estratégias farmacológicas alternativas, como o uso de antiinflamatórios não-esteróides (AINE) torna-se uma opção, visto que estes fármacos provocam efeitos colaterais de menor gravidade (ALMEKINDERS; GILBERT, 1986; SHEN et al., 2006).

Os efeitos dos AINE na biologia dos músculos esqueléticos são tradicionalmente estudados após indução da lesão muscular em músculos normais (MISHRA et al., 1995;

THORSSON et al., 1998, MACKEY et al., 2007), sendo controversos os resultados obtidos. Alguns estudos relatam que a regeneração muscular não sofre atraso em decorrência do uso dos AINE (JARVINEN et al., 1992; THORSSON et al., 1998). Outros mostram que a utilização de AINE pode comprometer a regeneração muscular que se segue à lesão (MISHRA et al., 1995; para revisão ver PRISK; HUARD, 2003; MACKEY et al., 2007). Alguns estudos demonstraram ainda não haver prejuízo da força muscular após a utilização destes fármacos, mesmo com o possível atraso da regeneração muscular (ALMEKINDERS; GILBERT, 1986; OBREMSKY et al., 1994).

1.1 A Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é o tipo mais comum de distrofia e ocorre em 1 a cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (PETROF, 1998). É uma doença autossômica recessiva ligada ao cromossomo X e, devido a esta característica, é transmitida somente pelos indivíduos do sexo feminino e afeta apenas os indivíduos do sexo masculino (SWASH; SCHWARTZ, 1998).

A alteração primária ocorrida na DMD é a mutação no gene responsável pela codificação da proteína distrofina, resultando em deficiência na expressão desta proteína ou na expressão de formas mutantes da mesma (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987). A distrofina é codificada por um gene que possui 2,4 megabases de DNA localizado na banda Xp21 do braço curto do cromossomo X e que ocupa cerca de 1% de todo este cromossomo (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994). Devido ao seu tamanho e complexidade, a frequência com que ocorrem mutações, deleções ou duplicações neste gene é alta (SEIXAS et al., 1997).

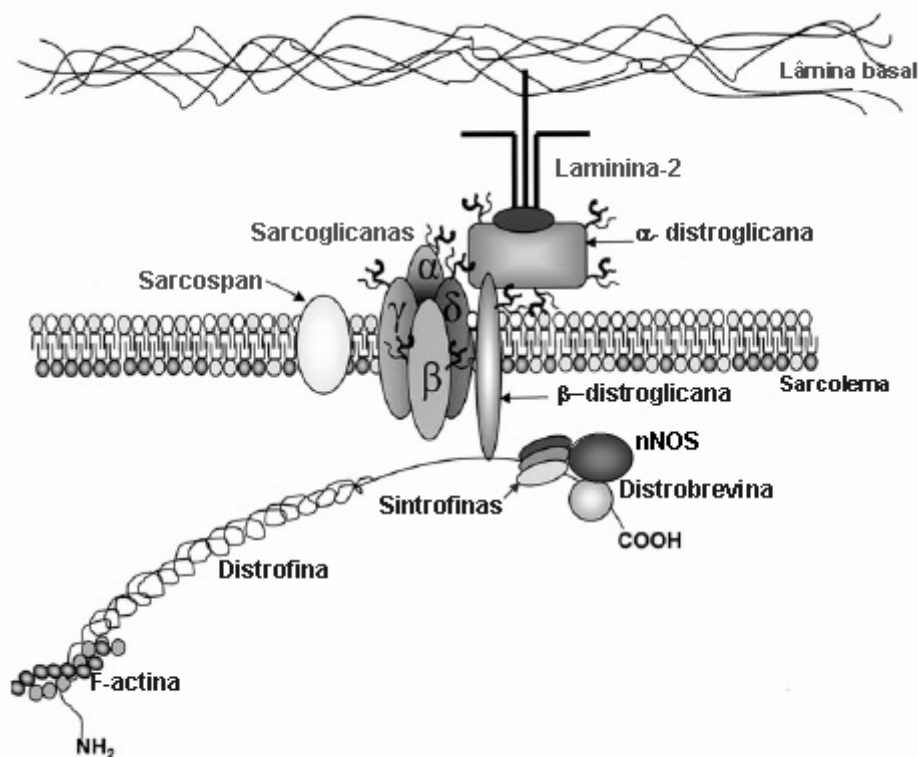


Figura 1: Representação esquemática do complexo distrofina-glicoproteínas. Adaptado de Watchko, O'Day e Hoffman, 2002.

A distrofina faz parte de um complexo denominado complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), representado na Figura 1. Este complexo atravessa o sarcolema e estabelece uma ligação mecânica entre o citoesqueleto da fibra muscular e a matriz extracelular, sendo responsável pela estabilidade mecânica das fibras musculares (PETROF, 2002). Na ausência da distrofina, a estabilidade deste complexo é prejudicada e as fibras ficam sujeitas à ocorrência de lesões no sarcolema, principalmente durante os ciclos de contração e relaxamento. Os músculos distróficos não apresentam capacidade regenerativa suficiente para compensar a degeneração muscular e as fibras degeneradas são substituídas por tecido fibroadiposo e, gradualmente, os

músculos afetados apresentam perda funcional (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994).

Os indivíduos afetados pela DMD apresentam-se clinicamente normais ao nascimento e por volta de 2 a 5 anos de idade apresentam os primeiros sinais clínicos. Estes sinais incluem atraso no desenvolvimento motor, dificuldade para correr, andar e subir escadas, quedas frequentes, hipertrofia dos músculos da panturrilha e fraqueza muscular progressiva. Geralmente, por volta dos 20 anos de idade esta patologia leva a óbito por falência respiratória ou cardíaca (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994).

1.2 O camundongo *mdx* como modelo da distrofia muscular de Duchenne

O camundongo *mdx* foi o primeiro modelo experimental da DMD e é o mais utilizado nos estudos relacionados a esta patologia (TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986; HAMER et al., 2002; SASAOKA et al., 2003). Esta linhagem, denominada C57BL/10 *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) surgiu espontaneamente da linhagem C57BL/10 e foi descoberta ao acaso durante a realização de estudos sobre alterações nos glóbulos vermelhos (BULFIELD et al., 1984). Nestes animais, o nível plasmático da creatinoquinase (CK) mostrou-se elevado, sugerindo degeneração muscular (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987). Posteriormente, foi confirmada a deficiência do gene responsável pela expressão da distrofina em virtude de alteração genética semelhante à ocorrida na DMD (SICINSKI et al., 1989). Nestes camundongos, a análise histológica de músculos estriados esqueléticos revelou a existência de degeneração e regeneração muscular, semelhante ao que ocorre em portadores da DMD (BULFIELD et al., 1984). No entanto, nos camundongos *mdx* os ciclos de regeneração muscular parecem compensar adequadamente a degeneração muscular. Estes animais apresentam menor

acúmulo de tecido conjuntivo e menor perda funcional quando comparados à distrofinopatia desenvolvida em humanos (YABLONKA-REUVENI; ANDERSON, 2006).

A degeneração das fibras musculares nestes animais se inicia por volta dos 20 dias de vida pós-natal e é seguida por uma rápida resposta de regeneração muscular. Por volta dos 30 dias, as fibras musculares mostram alterações histológicas e, entre 60 e 90 dias, mais de 50% das fibras musculares encontram-se em processo de regeneração, mostrando núcleo central e diâmetro variável. Em torno de 120 dias, praticamente todas as fibras musculares apresentam núcleo central indicando que elas encontram-se regeneradas (TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986; PASTORET; SEBILLE, 1995). Com o passar do tempo, a capacidade de regeneração muscular diminui, provavelmente devido à exaustão das células satélites (LUZ; MARQUES; NETO, 2002), que são as células precursoras das células musculares e responsáveis pela regeneração muscular (para revisão ver DAWHAN; RANDO, 2005). Por volta dos 20 meses de idade estes animais apresentam substituição das fibras musculares degeneradas por tecido conjuntivo fibroso, as características histológicas de seus músculos tornam-se semelhantes às observadas em humanos e eles apresentam fraqueza muscular progressiva (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995).

Apesar das semelhanças existentes, há diferenças entre o desenvolvimento da distrofia nos camundongos *mdx* e nos humanos portadores da DMD. Nos camundongos *mdx*, os dois sexos são afetados e as fibras têm capacidade de se regenerar sucessivamente após a degeneração durante grande parte da vida do animal (revisão ver CULLEN; JAROS, 1988). Apenas os camundongos *mdx* idosos apresentam perda funcional da musculatura (PASTORET; SEBILLE, 1995; para revisão ver DECONINK; DAN, 2007). Nos humanos, apenas o sexo masculino é afetado pela DMD e a perda funcional ocorre ainda no início da infância (para revisão ver ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994). Esta diferença pode ser

justificada pela existência de mecanismos compensatórios nos camundongos *mdx*, tais como maior capacidade de regeneração das fibras musculares ou substituição da distrofina pela utrofina. A utrofina é uma proteína de estrutura homóloga à distrofina localizada na face citoplasmática do sarcolema durante o desenvolvimento fetal e, após o nascimento, localizada apenas na face citoplasmática das junções neuromusculares e miotendinosas (DECONINK et al., 1997; BONUCCELLI, 2003). Nos camundongos *mdx* a utrofina é expressa em maiores quantidades (para revisão ver DECONINK et al., 1997) e localiza-se na face citoplasmática do sarcolema, substituindo a distrofina. A utrofina desempenha função semelhante à que seria desempenhada pela distrofina (para revisão ver BLAKE et al., 2002). Possivelmente, esta substituição faz com que os *mdx* apresentem um quadro de distrofia menos severo que o observado em humanos (ERVASTI, 2007).

1.3 Distrofina e complexo distrofina-glicoproteínas

A distrofina é uma proteína com massa molecular relativa de 427kDa localizada na face citoplasmática do sarcolema. Esta proteína liga os filamentos de F-actina a um complexo de glicoproteínas do sarcolema (SUNADA; CAMPBELL, 1995). Este complexo de proteínas, junto com a distrofina, forma o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG); (Figura 1).

Estruturalmente, a distrofina possui quatro domínios distintos: o primeiro corresponde a uma das extremidades da proteína e possui um radical NH_2 , sendo chamado de amino-terminal; o segundo e maior domínio corresponde a um segmento em forma de bastão; o terceiro é um domínio rico em cisteína; e o quarto domínio corresponde à outra extremidade da distrofina e possui um radical $-\text{COOH}$, sendo denominado carboxi-terminal (para revisão ver ERVASTI, 2007).

Além da distrofina, as outras proteínas que fazem parte deste complexo são as distroglicanas (α e β), sarcoglicanas (α , β , γ e δ), sarcospan, distrobrevina (α) e sintrofinas ($\alpha 1$ e $\beta 1$) (DURBEEJ; CAMPBELL, 2002).

A α -distroglicana encontra-se no espaço extracelular, onde se liga à laminina-2 da lâmina basal e à β -distroglicana, que é uma proteína transmembrana. A β -distroglicana serve de ligação entre a α -distroglicana e a distrofina (WATCHKO; O'DAY; HOFFMAN, 2002).

O grupo das sarcoglicanas é composto por quatro subunidades de proteínas transmembrana: α , β , γ e δ -sarcoglicanas, que se ligam entre si e funcionam como uma proteína única. As sarcoglicanas se ligam à α -distroglicana (OZAWA et al., 2005).

As sintrofinas são proteínas intracelulares que, nas células musculares, existem sob a forma das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$. Ambas se ligam diretamente ao terminal C da 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 também livre no citosol. Em ausência da distrofina, esta enzima encontra-se somente no citosol e sua quantidade total é reduzida, assim como sua atividade e a produção de óxido nítrico (NO) (para revisão ver RANDO, 2001). No tecido muscular esquelético, o NO está envolvido com a manutenção do fluxo sanguíneo adequado para o tecido muscular durante a contração, com a liberação do íon Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático, com o metabolismo da glicose (para revisão ver KAMINSKI; ANDRADE, 2001 e RANDO, 2001) e também com a ativação das células satélites (para revisão ver HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005). Para a

manutenção do fluxo sanguíneo adequado durante a contração, o NO atua na vasoconstrição simpática no músculo durante o período de contração muscular, diminuindo-a a fim de adequar o fluxo sanguíneo à necessidade fisiológica do tecido. Nos músculos distróficos, esta ação protetora do NO é deficiente e os músculos ficam sujeitos à ocorrência de isquemia durante o desempenho de suas atividades. Uma das hipóteses sugeridas para a mionecrose ocorrida na DMD é que esta isquemia pode desencadear eventos que culminam com a morte de fibras musculares (para revisão ver KAMINSKI; ANDRADE, 2001; SANDER et al., 2000).

A distrobrevina é uma proteína intracelular que se liga ao terminal C da distrofina. Esta proteína interage com a nNOS e com os canais de cálcio voltagem-depedentes (DURBEEJ; CAMPBELL, 2002).

As interações das proteínas do CDG permitem ligação do citoesqueleto à laminina-2 da lâmina basal da matriz extracelular. Este arranjo sugere a importância da distrofina e das demais proteínas na manutenção da estabilidade mecânica do sarcolema, sendo ela uma proteína fundamental para a integridade física da fibra muscular (ERVASTI; CAMPBELL, 1993; PETROF, 1998; LAPIDOS; KAKKAR; MCNALLY, 2005; ALLIKIAN; MCNALLY, 2007).

1.4 Degeneração muscular

Várias hipóteses procuram explicar os mecanismos que levam à degeneração muscular nos músculos distróficos (para revisão ver DECONINCK; DAN, 2007). A hipótese mecânica sugere que a inexistência da ligação entre os meios intra e extracelular, decorrente da ausência da distrofina e das demais proteínas do CDG, torna o sarcolema mecanicamente instável (COHN; CAMPBELL, 2000; BATCHELOR; WINDER, 2006; DECONINCK; DAN, 2007; ERVASTI, 2007). A instabilidade mecânica faz com que os músculos se tornem susceptíveis à

lesão durante os ciclos de contração e relaxamento (CHAKKALAKAL et al., 2005). Em virtude desta fragilidade, ocorrem áreas de descontinuidade do sarcolema permitindo a passagem de substâncias do meio extracelular para o meio intracelular, como o íon cálcio, e de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, como a enzima creatinoquinase (CK); (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994). Na DMD, o aumento do nível plasmático da CK é característico da fase inicial da doença. Durante os três primeiros anos de vida, os níveis de CK aumentam até atingirem um pico que coincide com o início do aparecimento dos primeiros sinais clínicos da patologia (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKBECK, 1994). Nos camundongos *mdx*, os níveis de CK são elevados durante grande parte da vida do animal (BULFIELD et al., 1984; ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994; YOSHIDA et al., 2006).

A hipótese do cálcio sugere o envolvimento do CDG no funcionamento de canais iônicos da membrana e sua alteração provoca alteração no funcionamento destes canais. A passagem excessiva deste íon para o interior da fibra muscular provoca sobrecarga das mitocôndrias com conseqüente redução da síntese de ATP, ativação de proteases cálcio-dependentes e ativação de fosfolipases A₂, enzimas que digerem os fosfolipídeos da membrana, levando a um aumento das áreas de descontinuidade desta e permitindo a entrada de mais íons cálcio para o meio intracelular (para revisão ver GISSEL, 2005; WHITEHEAD; YEUNG; ALLEN, 2006). Devido a esta série de eventos, as fibras musculares distróficas sofrem degeneração e necrose (PETROF, 1998; ALDERTON; STEINHARDT, 2000; BATCHELOR; WINDER, 2006). Esta hipótese se confunde com a hipótese mecânica devido à interação existente entre os dois mecanismos.

A hipótese inflamatória sugere que músculos distróficos apresentam resposta inflamatória excessiva em conseqüência à lesão das fibras musculares, independente do mecanismo que provoca a lesão. A resposta inflamatória exacerbada é um mecanismo

secundário que aumenta a mionecrose e contribui para a progressão da doença (WEHLING; SPENCER; TIDBALL, 2001; PORTER et al., 2002; HODGETS et al., 2006).

1.5 Resposta inflamatória

A resposta inflamatória do tecido muscular se inicia logo após a morte das fibras musculares. Ela compreende uma série de eventos que envolvem a integração do sistema imunológico com o tecido lesado e sua finalidade é o reparo tecidual, para que a regeneração possa acontecer (PRISK; HUARD, 2003).

As fibras musculares em degeneração liberam várias substâncias, dentre as quais se destacam as citocinas pró-inflamatórias, proteases, prostaglandinas, collagenases, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento (BONDESEN et al., 2007). As citocinas pró-inflamatórias e os fatores quimiotáticos estimulam o deslocamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para local da lesão (ROBERTSON et al., 1993; PRISK; HUARD, 2003; TIDBALL, 2005; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007). As prostaglandinas também atuam na quimiotaxia de células inflamatórias e são importantes na ativação, proliferação e diferenciação das células satélites durante a regeneração muscular (para revisão ver FUNK, 2001; PRISK; HUARD, 2003).

Os neutrófilos e macrófagos liberam proteases que degradam os fragmentos celulares e fagocitam estes fragmentos, auxiliando na remoção dos mesmos do local da lesão. As proteases liberadas por estas células podem provocar danos ao tecido muscular íntegro que circunda a lesão e assim aumentar a área da lesão, gerando aumento da resposta inflamatória local (CHEUNG; TIDBALL, 2003; para revisão ver TIDBALL, 2005).

Em condições patológicas tais como nas miopatias e nas distrofias, além da lesão provocada pelo excesso do íon cálcio no interior das fibras musculares, a resposta inflamatória excessiva também pode promover mionecrose (para revisão ver HODGETS et al., 2006 e RADLEY; GROUNDS, 2006). A inibição das células inflamatórias pode diminuir a degeneração e a necrose do tecido muscular. Estudos utilizando antiinflamatórios mostram redução significativa da mionecrose em músculos esqueléticos de camundongos *mdx* (HODGETS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007; MARQUES et al., 2008).

1.6 Regeneração muscular

O processo de regeneração envolve a formação de novas fibras musculares através da miogênese. O início da miogênese depende da ativação das células satélites, que são as células precursoras das células musculares e apresentam-se como células indiferenciadas e mononucleadas localizadas entre o sarcolema e a membrana basal das fibras musculares (BONDESEN et al., 2004; FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004; para revisão ver SCHMALBRUCH, 2006).

No tecido muscular adulto, em situações fisiológicas, as células satélites encontram-se quiescentes, apresentando expressão gênica e síntese protéica limitadas. Em resposta a estímulos tais como lesão, remodelação ou crescimento, estas células são ativadas e entram em ciclo de divisão celular (para revisão ver HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005). Não se sabe exatamente como é controlada a passagem destas células do estado quiescente para o estado ativado. Uma hipótese para esta ativação sugere que o estresse mecânico ao qual as fibras são submetidas durante a atividade muscular pode provocar lesão e desencadear reações específicas no interior

das fibras musculares, resultando na liberação de substâncias, como o fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor, HGF*), prostaglandinas e óxido nítrico, dentre outras, que possuem a capacidade de ativar as células satélites (WOZNIAK; ANDERSON, 2007). Os macrófagos, além de serem importantes para a resposta inflamatória, também atuam na ativação das células satélites através da liberação de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação destas células (para revisão ver SHEN et al., 2008).

Outra hipótese sugere que esfingolipídios localizados na face citoplasmática do sarcolema e liberados em decorrência de sua lesão, são capazes de ativar as células satélites, fazendo com que elas entrem em ciclo de divisão celular (NAGATA et al., 2006). Nas células satélites, o óxido nítrico induz a expressão da folistatina, molécula que ativa a miogênese. A folistatina, por sua vez, inibe a ação da miostatina, um potente regulador negativo da miogênese (BOGDANIVICH et al., 2004) expresso pelas células satélites quiescentes, possibilitando o início da miogênese (para revisão ver LE GRAND; RUDNICKI, 2007).

Após serem ativadas, as células satélites iniciam ciclos de divisão celular e aumentam a expressão de genes responsáveis pela transcrição de fatores reguladores da miogênese, como Pax7 (*paired-box transcription factor 7*), MyoD e miogenina. O Pax-7 é um fator que estimula a diferenciação das células satélites em células miogênicas (SEALE et al., 2000), assim como a MyoD, que também atua como fator de ativação da miogenina, a responsável pela diferenciação e desenvolvimento de miotubos e miofibras (MEGENEY et al., 1996; JIN et al., 2000; TAMAKI et al., 2002; para revisão ver SCHMALBRUCH, 2006).

A proliferação e a diferenciação das células satélites originam células precursoras miogênicas chamadas mioblastos. Após a diferenciação, a maioria dos mioblastos originados a partir das células satélites 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 (para revisão ver DAWHAN; RANDO, 2005; para revisão ver LE GRAND; RUDNICKI, 2007).

Alguns mioblastos não se diferenciam em miotubos, pois continuam expressando em maiores quantidades o gene responsável pela transcrição do Pax7 e diminuem a expressão dos demais fatores miogênicos. Estes mioblastos interrompem o ciclo de divisão celular e voltam a ser células satélites quiescentes, podendo ser ativadas posteriormente de acordo com a necessidade do tecido muscular. O processo de auto-renovação das células satélites é importante para a manutenção da população de células satélites disponíveis para que o tecido muscular continue sendo capaz de regenerar-se (para revisão ver CHARGE; RUDNICKI, 2004).

No tecido muscular adulto não-distrófico, a população de células satélites quiescentes é mantida mesmo após vários ciclos de degeneração e regeneração muscular, sugerindo a existência do mecanismo de auto-renovação e manutenção da população de células satélites quiescentes (para revisão ver ZAMMIT et al., 2006). Foi verificada a existência de duas linhagens distintas de células satélites musculares, uma destinada à regeneração muscular e outra destinada à reposição das células satélites musculares quiescentes. Ambas linhagens são importantes para o processo de regeneração, pois, sem a reposição das células quiescentes, o tecido muscular apresentaria capacidade regenerativa limitada (para revisão ver LE GRAND; RUDNICKI, 2007).

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 progressivo acúmulo de tecido conjuntivo fibroadiposo (ENGEL; YAMAMOTO; FISHKBECK, 1994).

Nos camundongos *mdx* os ciclos 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 diminuição da capacidade regenerativa do tecido muscular (PASTORET; SEBILLE, 1995; para revisão ver DECONINK; DAN, 2007).

1.7. Prostaglandinas e regeneração muscular

As prostaglandinas (PG) são derivadas dos fosfolípidos que compõem a membrana plasmática e desempenham várias funções fisiológicas (GILMAN et al., 1996). Elas são largamente produzidas durante a inflamação que ocorre após a lesão muscular, sendo importantes para a quimiotaxia de células inflamatórias e para a ativação de células satélites (PRISK; RUARD, 2003).

A síntese das PG se inicia com a ação de fosfolipases que liberam o ácido araquidônico, ácido graxo que faz parte da constituição do sarcolema (Figura 2). Depois de liberado, o ácido araquidônico sofre ação das ciclooxigenases (COX) sendo convertido em prostaglandina G_2 (PGG_2). Em seguida, esta é transformada em prostaglandina H_2 (PGH_2), um produto intermediário instável do metabolismo do ácido araquidônico (FUNK, 2001). Depois de sintetizada, a PGH_2 é rapidamente metabolizada, originando as prostaglandinas ativas PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 e PGD_2 (DUBOIS et al., 1998; BONDESEN et al., 2004; MOLLACE et al., 2005; GILMAN et al., 1996). Somente depois de ativadas, as prostaglandinas são secretadas pelas células (DUBOIS et al., 1998). As principais PG envolvidas com a resposta inflamatória e miogênese são as PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$. A PGE_2 atua em várias etapas da resposta inflamatória do

tecido muscular, incluindo a indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias, ativação da enzima óxido nítrico sintase, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia de células inflamatórias (para revisão ver PRISK; HUARD, 2003). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ está envolvida no processo de fusão de miotubos com miofibras e de miotubos entre si (para revisão ver HORSLEY; PAVLATH, 2004; para revisão ver SHEN et al., 2006).

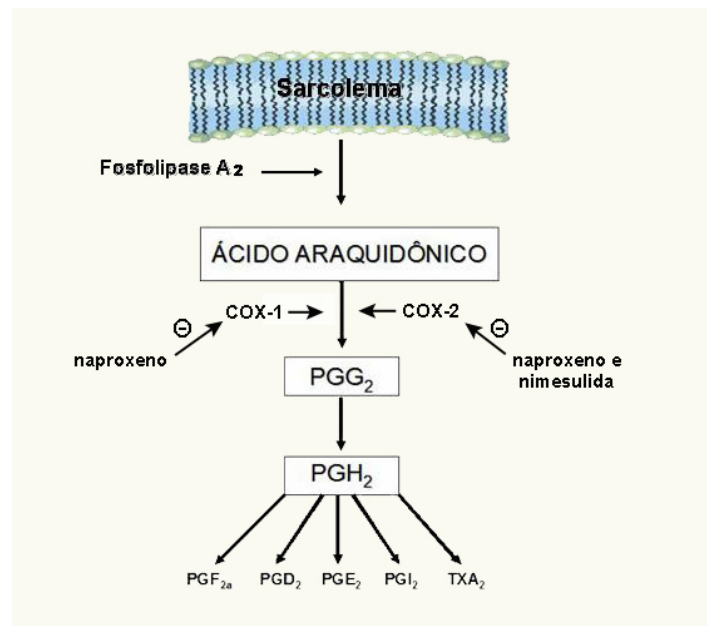


Figura 2: Síntese das prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Adaptado de DUBOIS et al., 1998.

As PG são essenciais em várias etapas da miogênese, sendo sintetizadas em grandes quantidades pelas fibras musculares em regeneração (para revisão ver BONDESEN et al., 2007). Estudos realizados em cultura de células satélites mostram que as PG estão envolvidas diretamente na proliferação e diferenciação das células satélites, na fusão de miotubos e provavelmente no crescimento das miofibras durante seu desenvolvimento (para revisão ver PIERNO et al., 2007). Adicionalmente, as PG regulam a síntese e degradação protéica (BONDESEN et al., 2004; BONDESEN et al., 2007) e modulam a resposta inflamatória (RAINSFORD et al., 2006).

Dentre as várias isoformas de COX, as COX-1 e 2 são relevantes no processo de regeneração muscular (MENDIAS;TATSUMI; ALLEN, 2004). A COX-1 é expressa normalmente em quase todos os tecidos, onde desempenha suas funções sob condições fisiológicas e parece estar envolvida com a resposta inflamatória aguda. A COX-2 tem sua expressão baixa ou ausente na maioria dos tecidos (O'NEIL; FORD-HUTCHINSON,1993). Nas células inflamatórias sua expressão é induzida em resposta à presença de mitógenos, citocinas, fatores de crescimento e à lesão das fibras musculares (SHEN et al., 2006; BONDESEN et al. 2005). O aumento da expressão da COX-2 leva à síntese de grande quantidade de prostaglandinas, provocando a ativação de outros mediadores inflamatórios e contribuindo para a progressão do reparo tecidual (TEGEDER; PFEILSCHIFTE; GEISSLINGER, 2001) e, devido sua ação ser de grande importância para o desencadeamento da resposta inflamatória, ela é considerada como uma enzima pró-inflamatória (GILROY et al., 1999).

Enquanto que a COX-1 é importante para a diferenciação e fusão das células satélites, a COX-2 tem atuação significativa na sua proliferação, diferenciação e fusão (MENDIAS; TATSUMI; ALLEN, 2004). Estas enzimas são fundamentais para a síntese das PG responsáveis pela resposta inflamatória e a regeneração muscular pode ser comprometida com sua inibição (MOLLACE et al., 2005).

1.8 Antiinflamatórios não-esteróides e regeneração muscular

Os AINE são fármacos que inibem a ação das COX, diminuindo a produção de PG no local da lesão (DUBOIS et al., 1998). Estes fármacos são prescritos com frequência para o tratamento de lesões musculares com a finalidade de diminuir a dor e a resposta inflamatória, sem considerar suas influências na regeneração muscular.

Em alguns estudos a regeneração muscular mostrou-se prejudicada pela utilização de AINE (MISHRA et al., 1995; para revisão ver PRISK; HUARD, 2003; BONDESEN et al., 2004; MENDIAS;TATSUMI; ALLEN, 2004; SHEN et al, 2005; MACKEY et al., 2007), enquanto que em outros a regeneração muscular ocorreu normalmente (JARVINEN et al., 1992; para revisão ver THORSSON et al., 1998).

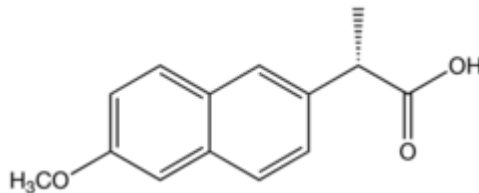


Figura 3. Estrutura molecular do naproxeno (GILMAN et al., 1996).

O naproxeno é um AINE cujo nome químico é ácido 6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético e sua estrutura molecular está representada na Figura 3 (GILMAN et al., 1996). Ele é um antiinflamatório amplamente utilizado no tratamento de lesões musculares devido às suas propriedades antiinflamatória, analgésica e antipirética (THORSSON et al., 1998; MENDIAS; TATSUMI; ALLEN, 2004). Seu mecanismo de ação é a inibição simultânea das COX-1 e COX-2. Como a maioria dos AINE, ele pode provocar vários efeitos colaterais, principalmente no trato gastrointestinal. No estômago, as prostaglandinas induzem a produção de muco que

protege a mucosa gástrica dos efeitos corrosivos do suco gástrico. Com a inibição da produção das prostaglandinas, a mucosa gástrica fica desprotegida e sujeita à lesões (para revisão ver DUBOIS et al., 1998; GUDIS & SAKAMOTO, 2005; GILMAN et al., 2006).

A nimesulida é um AINE que pertencente à classe das sulfonamidas e que tem efeitos antiinflamatório, antipirético e analgésico. Seu nome químico é 4-nitro-2-fenoxi-trifluorometano-sulfonamida e sua estrutura molecular está representada na Figura 4 (RAINSFORD, 2006).

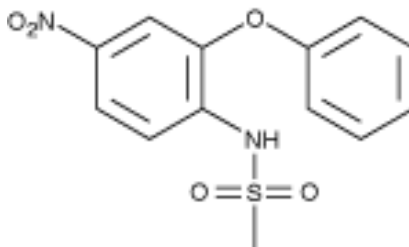


Figura 4. Estrutura molecular da nimesulida (RAINSFORD, 2006).

A nimesulida é um inibidor específico da COX-2 (MITCHEL; WARNER, 1999; RAINSFORD, 1999) e também inibe outras ações importantes para a resposta inflamatória, tais como a liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos e a ação das metaloproteinases, que provocam a degradação dos proteoglicanos, colágeno e de outros componentes da matriz do tecido conjuntivo (para revisão ver RAINSFORD, 2006). A principal vantagem da utilização de inibidores específicos da COX-2 em humanos é a baixa ocorrência de efeitos colaterais, especificamente no trato gastrointestinal, em comparação com os efeitos provocados pela utilização de outros AINE (RAINSFORD, 1999).

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de verificar se a inibição das COX altera a regeneração muscular. A maioria destes estudos foi realizada em fibras musculares

sadias submetidas à lesão muscular por baixas temperaturas (BONDESEN; MILLS; PAVLATH, 2006), à atrofia por desuso (BONDESEN et al., 2004) ou em cultura de células precursoras miogênicas (MENDIAS; TATSUMI; ALLEN, 2004, SHEN et al., 2005). Foi sugerido que a atuação simultânea das COX-1 e 2 é importante para a ativação das células satélites, enquanto que a COX-2 isolada atua principalmente na proliferação das células satélites (BONDESEN et al., 2004). A utilização de inibidores específicos da COX-2 mostrou que PG pró-inflamatórias derivadas desta enzima são importantes nos estágios iniciais da regeneração muscular (BONDESEN; MILLS; PAVLATH, 2006).

2.OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos antiinflamatórios não-esteróides naproxeno e nimesulida no processo de degeneração/regeneração muscular de fibras musculares distróficas de camundongos *mdx*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 54 camundongos adultos jovens de ambos os sexos, sendo 48 da linhagem C57Bl/10-*mdx* e 6 da linhagem C57BL/10ScCr/Uni. Os animais utilizados foram obtidos através do acasalamento de camundongos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 21º dia de vida pós-natal, sendo então separados. Durante a realização de todo o experimento os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp em caixas plásticas padrão sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) e com ração e água *ad libitum*. O trabalho foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP e aprovado (Protocolo nº 1222-1).

3.2 Grupos experimentais e tratamento

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo *mdx* não-tratado (*mdx* salina) (n=12): animais que receberam injeção intraperitoneal de solução salina.

- Grupo *mdx* tratado com naproxeno (*mdx* NAP) (n=12): animais tratados com naproxeno através de injeção intraperitoneal.

- Grupo *mdx* tratado com nimesulida (*mdx* NIM) (n=12): animais tratados com nimesulida através de injeção intraperitoneal. Como esta droga não é hidrossolúvel, foi necessária sua diluição em dimetilsulfóxido (DMSO); (BRAYTON, 1986; ALVES, 1998). Para verificar possíveis efeitos do DMSO, um grupo de camundongos *mdx* (n=12) foi tratado apenas com o DMSO (grupo *mdx* DMSO).

A partir do 21º dia de vida pós-natal, os camundongos foram pesados semanalmente e receberam injeção intraperitoneal diária de naproxeno (Sigma; 10 mg/kg de peso corporal) segundo THORSSON et al. (1998), nimesulida (Cayman Chemical; 25 mg/kg de peso corporal) segundo SÜLEYMAN et al. (2004) ou de 0,02ml de DMSO. O grupo *mdx* salina recebeu injeções intraperitoneais de solução salina sem adição de fármacos. Em cada grupo, seis animais receberam tratamento durante 15 dias consecutivos, sendo sacrificados no 36º dia de vida e outros seis animais receberam tratamento durante 30 dias consecutivos, sendo sacrificados no 51º dia de vida.

3.3 Sacrifício e coleta do material

Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de 0.1ml/30g de peso corporal de uma mistura de cloridrato de cetamina (130 mg/kg); (Francotar; Virbac) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg); (Virbaxyl; Virbac). Após a anestesia, os animais foram então sacrificados para a retirada dos músculos tibial anterior (TA) e esternomastóide (STN).

Para o congelamento, os músculos STN e TA foram 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. Os músculos foram então retirados do nitrogênio e mantidos à -70°C no biofreezer.

3.4 Análise da integridade do sarcolema

Três animais de cada grupo receberam injeção intraperitoneal do corante Azul de Evans (tetrasodium diazo salt Evans blue dye; Sigma) 12 horas antes do sacrifício. Este corante é

composto por moléculas que não atravessam a membrana plasmática de fibras musculares esqueléticas íntegras (HAMER et al., 2002). As moléculas deste corante ligam-se a albumina sérica e penetram na fibra muscular em degeneração devido à lesão do sarcolema. Assim, a marcação com este corante evidencia somente fibras degeneradas ou em degeneração, fornecendo informações sobre algumas características dinâmicas e estruturais de músculos esqueléticos normais e portadores de patologias (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; MARQUES; MATSUMURA; SANTO NETO, 2007). Foi utilizada solução 1% de corante Azul de Evans (Sigma), em PBS (PBS: 14g de fosfato de sódio monofásico, 4,3 de fosfato de potássio bibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em 1L de água destilada, pH 7.5), injetada intraperitonealmente na concentração de 0,1ml de solução por 10g de peso do animal (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; HAMER et al., 2002; MARQUES; MATSUMURA; SANTO NETO, 2007). Doze horas após a injeção do corante azul de Evans, os animais foram sacrificados e os músculos STN e TA retirados e congelados.

3.5 Preparo dos músculos para a análise histopatológica

Para obtenção dos cortes histológicos, os músculos foram mantidos no micrótomo criostato por aproximadamente 30 minutos para atingirem a temperatura de -23°C. Posteriormente, estes músculos foram seccionados transversalmente na espessura de 7µm utilizando micrótomo criostato (Microm-HS505E). Os cortes seriados obtidos dos músculos de animais que receberam injeção do azul de Evans foram coletados em duas lâminas: uma delas para coloração em hematoxilina-eosina (HE) e a outra para análise deste corante em microscópio de fluorescência. As lâminas utilizadas para análise da integridade do sarcolema

foram incubadas por 15 minutos com acetona à -20°C, e montadas em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma).

Para a coloração em HE, os cortes congelados foram inicialmente fixados com solução de Bouin por três horas e, em seguida, lavados por 12 horas com etanol 70%. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por dez minutos e, posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, lavados novamente em água corrente por 10 minutos e, em seguida, corados com eosina. Em seguida, os cortes foram desidratados em séries de etanol e diafanizados em xilol e as lâminas montadas com Entellan (Sigma) para posterior observação em microscopia de luz.

3.6 Quantificação da creatinoquinase

A creatinoquinase (CK) é uma enzima relacionada com a formação de ATP encontrada principalmente no músculo esquelético, no músculo cardíaco e no cérebro. Ela catalisa a fosforilação reversível da creatina em fosfocreatina com liberação de um fosfato de alta energia da adenosina trifosfato (ATP). No tecido muscular a fosfocreatina atua como uma molécula de armazenamento de energia e, nos casos de necessidade energética, sua clivagem é realizada para fornecimento de ATP para a atividade muscular (KATIRJI; AL-JABERI, 2001).

Na DMD e nos camundongos *mdx*, devido às lesões existentes no sarcolema, ocorre passagem de CK para o meio extracelular e deste para a corrente sanguínea (para revisão ver OZAWA; HAGIWARA; YOSHIDA, 1999). Assim, a quantificação dos níveis circulantes desta enzima fornece dados quantitativos diretamente relacionados à degeneração muscular (KATIRJI; AL-JABERI, 2001).

A quantificação dos níveis séricos desta enzima é um parâmetro utilizado para a complementação do diagnóstico de miopatias. Embora sejam amplamente utilizados, os valores obtidos podem apresentar considerável variação individual. Ainda não há consenso em relação à variação dos níveis plasmáticos desta enzima, mas sabe-se que vários fatores podem influenciá-los (WARREN et al., 2006). As causas de elevação transitória dos valores da CK na ausência de doença neuromuscular incluem lesão muscular devido a injeções intramusculares, realização de eletromiografia de agulha, realização de procedimentos cirúrgicos e realização de exercício físico prolongado e extenuante. O aumento é extremamente variável entre os indivíduos e depende do sexo, da raça e do condicionamento físico de cada um. Em geral, as quantidades circulantes de CK são maiores em homens e negros do que em mulheres e brancos. (KATIRJI; AL-JABERI, 2001).

Para a quantificação do nível plasmático da CK, foram coletadas amostras sangüíneas de 3 animais de cada grupo, totalizando 24 camundongos *mdx*. Além dos camundongos *mdx*, foram utilizados seis camundongos C57BL/10ScCr/Uni como grupo controle para a comparação dos níveis plasmáticos da CK. Os animais foram anestesiados e submetidos à punção cardíaca com seringa heparinizada. Através deste procedimento, coletou-se uma amostra de aproximadamente 1 ml de sangue que, posteriormente, foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf. As amostras de cada animal permaneceram individualizadas e, após 3h em temperatura ambiente, o sangue foi centrifugado a 936g, em temperatura de 4°C, por 10 minutos (Centrifuga Refrigerada Sigma 3-18k). Foi utilizado o kit CK-NAC Cinético (Bioclin) para quantificação da CK. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro U.V. (Thermo Electron Corporation Spectrophotometer Genesys 20) com comprimento de onda de 340 nm e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

3.7 Análise histopatológica

Para cada músculo, dois cortes aleatórios foram analisados qualitativa e quantitativamente, sem que o pesquisador soubesse a qual grupo pertencia o músculo em análise.

As lâminas coradas com HE foram analisadas com objetivas de 20X e oculares de 10X contendo retículo quadrilátero de 100 pontos, acopladas ao microscópio de luz binocular (Carl Zeiss®). As imagens foram captadas através de uma vídeo-câmera (Nikon Express Series) acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E400) e conectada a um computador. As imagens obtidas foram analisadas e quantificadas em μm^2 através do software Image Pro-Express.

As fibras positivas ao azul de Evans (AE) foram analisadas sob o comprimento de onda de 590nm, em microscópio de fluorescência (Nikon Express Series) acoplado a uma vídeo-câmera (Hamamatsu C2400) para a captação das imagens que, posteriormente, foram digitalizadas através da placa de digitalização de imagens Imagraph e salvas com extensão .psd no software Adobe Photoshop. A contagem das fibras positivas ao azul de Evans em cada corte analisado foi realizada com ajuda de um contador manual.

Nas lâminas coradas com HE, foram quantificados o número total de fibras musculares, o número de fibras com núcleo central (NC), o número de fibras com núcleo periférico (NP), a área seccional transversa do músculo, as áreas de infiltrado inflamatório com fibras em diferentes estágios de regeneração e áreas de regeneração em estágio mais avançado. Para a quantificação das fibras com núcleo periférico, foi utilizada a fórmula $\text{NP} = (\text{n}^\circ. \text{total de fibras}) - (\text{NC} + \text{AE})$ (MARQUES et al., 2008). Os resultados relativos à quantificação destas fibras

musculares foram expressos como porcentagens em relação ao número total de fibras musculares das secções transversas analisadas.

Cada músculo analisado apresentou áreas com características histológicas distintas que foram classificadas de acordo com parâmetros adotados em trabalhos anteriores (GROUNDS; TORRISI, 2004; GROUNDS et al., 2005; MARQUES et al., 2008). Os resultados obtidos através da quantificação destas áreas foram expressos como porcentagens em relação à área seccional transversa total dos músculos analisados.

As áreas que apresentaram predomínio de infiltrado inflamatório e presença de fibras em estágio inicial de regeneração, com citoplasma fortemente basófilo, núcleo central e pequena proporção citoplasma/núcleo foram classificadas como áreas de inflamação e regeneração (INFL+REG). As que apresentaram pouco infiltrado inflamatório, fibras em estágio avançado de regeneração com o citoplasma mais basófilo em relação ao das fibras totalmente regeneradas ou em relação ao citoplasma das fibras íntegras e núcleo periférico, foram classificadas como áreas de regeneração (REG). As fibras musculares com citoplasma levemente basófilo, núcleo central, aumento da proporção citoplasma/núcleo, diâmetro aparentemente menor que o diâmetro das fibras com núcleo periférico e menor quantidade de infiltrado inflamatório circundante foram designadas como sendo fibras em regeneração.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da aplicação do test *t* de *Student* com significância $p \leq 0,05$ entre os grupos experimentais avaliados.

4. RESULTADOS

4.1 Análise histopatológica

4.1.1 Análise qualitativa

Os músculos analisados apresentaram fibras com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras com núcleo periférico, fibras em degeneração, fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras completamente regeneradas com núcleo central (Figura 3).

As fibras com núcleo periférico apresentavam formato poligonal e estavam justapostas em relação a outras fibras de mesma característica (Figura 3A). Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado e condensado, citoplasma eosinófilo e diâmetro da fibra muscular semelhante ao diâmetro de fibras musculares com núcleo periférico (Figura 3B). As fibras em degeneração apresentavam-se com contornos irregulares, fracamente coradas pelo HE e aparentemente fragmentadas (Figura 3C). As fibras em degeneração positivas ao Azul de Evans, quando observadas em microscópio de fluorescência, estavam evidenciadas pela presença deste corante em seu interior (Figura 3D).

As áreas contendo fibras musculares em regeneração foram classificadas em dois estágios de acordo com suas características morfológicas e a celularidade local. Áreas de inflamação e regeneração (INFL+REG) apresentavam grande celularidade e pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeados por infiltrado inflamatório exuberante (Figura 3E). Áreas de regeneração (REG) apresentaram menor celularidade, fibras com citoplasma levemente basófilo e núcleo central, maior proporção de citoplasma em relação ao volume nuclear e diminuição aparente do infiltrado inflamatório circundante (Figura 3F).

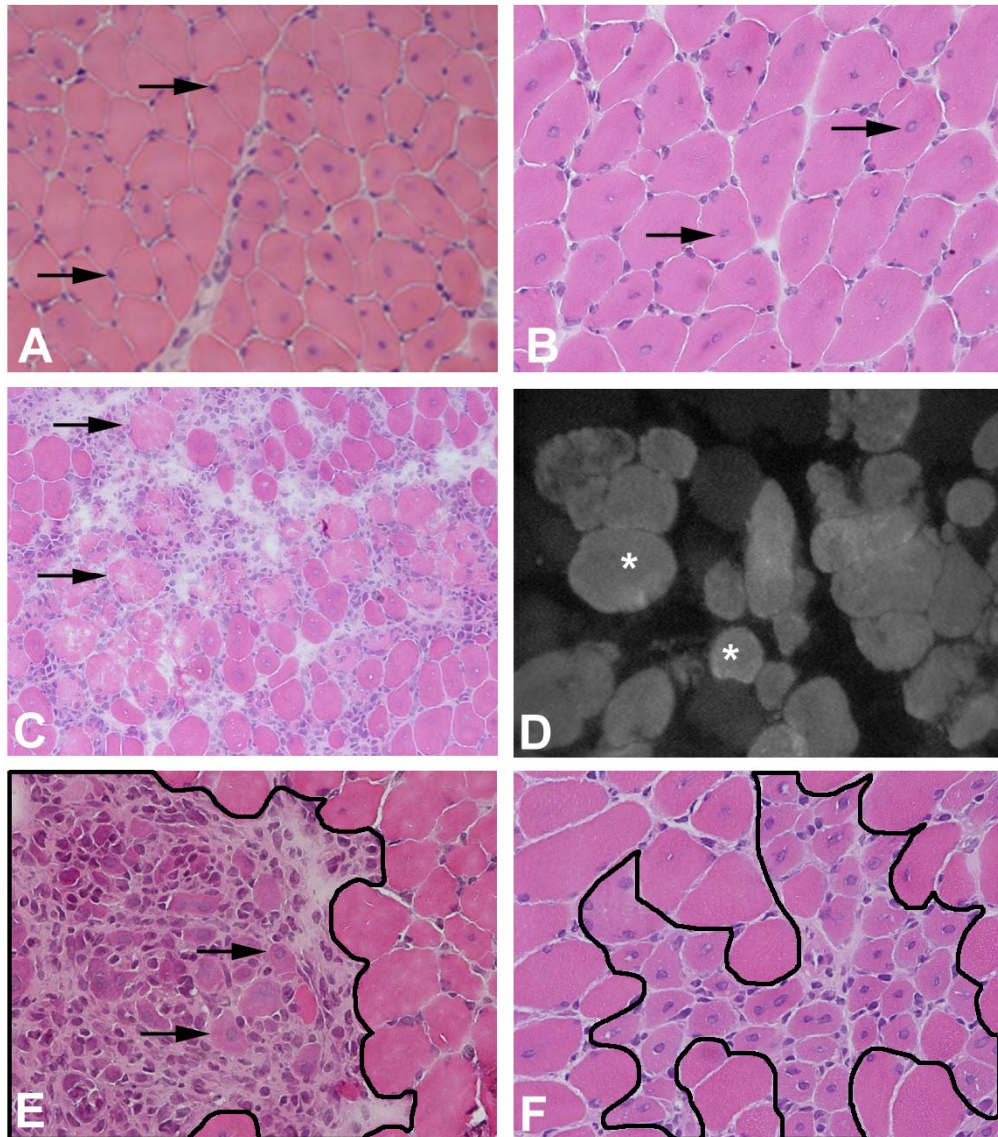


Figura 3. Secções transversais de músculos STN (A, C e D) e TA (B, E e F) de camundongos *mdx* tratados com naproxeno (A, B e E), nimesulida (D) e solução salina (C e F). Em A, fibras musculares com núcleo periférico (setas). Em B, fibras musculares regeneradas com contorno arredondado e núcleo centralizado (setas). Em C, área de intenso infiltrado inflamatório com fibras musculares em degeneração (setas). Em D, fibras em degeneração positivas ao AE (asterisco) observadas em microscópio de fluorescência. Em E, destaque para área de inflamação e regeneração (INFL+REG), com exuberante infiltrado inflamatório e fibras musculares em estágio inicial de regeneração (setas). Em F, destaque para área de regeneração (REG) com fibras em estágio mais avançado de regeneração. Em A,B,C, E e F, microscopia de luz e coloração HE. Em D, microscopia de fluorescência, corante azul de Evans. Aumento de 200X em A e C e de 400X em B,D,E e F.

4.1.2 Análise quantitativa

Os resultados da análise quantitativa são observados nas Tabelas 1 e 2.

A análise histológica do músculo TA mostrou que nenhum dos tratamentos realizados provocou alterações significativas nas áreas INFL+REG e REG (Tabela 1). No grupo que recebeu tratamento com naproxeno durante 15 dias ocorreu aumento da porcentagem de NC (58,4%) e diminuição da porcentagem de NP (41,4%) em relação ao grupo controle (45% e 53,5%, respectivamente) e não houve alteração da quantidade de fibras positivas ao azul de Evans. Nos grupos submetidos ao tratamento com antiinflamatórios por 30 dias não houve alteração da porcentagem de NC, NP e AE (Tabela 2).

A análise histológica do músculo STN revelou que as áreas INFL+REG e REG não sofreram alterações significativas após os tratamentos realizados durante 15 dias consecutivos. O tratamento com naproxeno durante 15 dias promoveu redução significativa da porcentagem de NC (44,2%) e aumento significativo da porcentagem de NP (55,1%) em relação aos valores encontrados para o grupo controle (51,7% e 47,1%, respectivamente). No grupo tratado com nimesulida durante 30 dias houve diminuição significativa da porcentagem de fibras positivas ao Azul de Evans (0,70%) em relação ao grupo controle (2,5%).

O tratamento com DMSO alterou a área INFL+REG do STN de animais que receberam esta droga durante 30 dias, aumentando-a em relação à área INFL+REG do STN do grupo *mdx* salina. Os demais parâmetros analisados não sofreram alteração após o tratamento com DMSO.

4.1.3 Análise comparativa entre os músculos TA e STN

Analisando os músculos TA e STN dos grupos *mdx* salina observamos que, aos 36 dias de idade, o TA apresenta predomínio de fibras com núcleo central em relação à porcentagem de

fibras com núcleo periférico (45,0% e 53,5%, respectivamente) e o STN não apresenta diferença significativa entre as porcentagens de fibras com núcleo central e núcleo periférico (51,7% e 47,1%, respectivamente). Ainda nesta idade, a proporção de fibras positivas ao azul de Evans nos dois músculos não se mostrou significativamente diferente (1,9% no TA e 1,7% no STN). Aos 51 dias, ambos os músculos apresentaram predomínio de fibras com núcleo central e a proporção de fibras positivas ao azul de Evans no STN era significativamente maior que no TA (2,5% e 0,3%, respectivamente).

Comparando os músculos TA e STN de camundongos dos grupos *mdx* salina observamos que, na idade de 36 dias, o STN tinha sido mais afetado pela distrofia do que o TA, pois apresentava maior porcentagem de fibras com núcleo central. As proporções de fibras positivas ao azul de Evans destes músculos não se apresentaram significativamente diferentes quando comparadas entre si. Aos 51 dias os dois músculos apresentavam comprometimento semelhante quando comparamos as porcentagens de NC e NP, mas a comparação da porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans indicava que nesta idade o STN tinha maior proporção de fibras em degeneração que o TA.

Após o tratamento com naproxeno, os músculos TA e STN apresentaram comportamentos diferentes quando comparados com os grupos *mdx* salina. Nos grupos que receberam tratamento até o 36º dia de vida, a análise do músculo TA mostra que houve aumento de NC, diminuição de NP e o AE não foi alterado significativamente. No STN ocorreu diminuição de NC, aumento de NP e o AE também não foi alterado significativamente. Aos 51 dias de idade, o tratamento com naproxeno não provocou alteração nos músculos TA e STN, que continuaram apresentando predomínio de fibras com núcleo central. Ainda nesta idade, após o tratamento com naproxeno o músculo STN continuou apresentando maior porcentagem de fibras em degeneração que o TA (2,9% e 0,02%, respectivamente).

A nimesulida não alterou significativas nas proporções de NC e NP dos músculos TA e STN em nenhum dos períodos de tratamento aplicados em relação ao grupo *mdx* salina. A proporção de fibras positivas ao AE foi menor no STN de animais do grupo *mdx* NIM com 51 dias de idade, porém, quando comparada à proporção encontrada no músculo TA deste mesmo grupo, estas não são significativamente diferentes (1,8% no TA e 0,7% no STN), indicando que os músculos estavam igualmente afetados.

Nas áreas de INFL+REG e REG não houve alteração após o tratamento com naproxeno ou com nimesulida. No músculo STN do grupo *mdx* DMSO com 51 dias de idade houve aumento da área INFL+REG em relação ao grupo *mdx* salina, mas quando comparada com a área INFL+REG do grupo *mdx* DMSO de mesma idade, esta área não se mostra significativamente diferente (2,9% no TA e 2,6% no STN).

		% INFL/REG		%REG	
		36d	51d	36d	51d
TA	<i>mdx</i> salina	3,1±3,0	8,4±12,6	0,5±0,6	1,4±2,3
	<i>mdx</i> NAP	2,0±1,4	2,1±2,1	0,02±0,04	0,08±0,07
	<i>mdx</i> NIM	2,5±3,7	8,7±15,1	0,5±0,5	0,2±0,2
	<i>mdx</i> DMSO	5,3±9,5	2,9±1,3	0,01±0,03	0,9±1,2
STN	<i>mdx</i> salina	1,3±1,1	10,4±7,3	1,1±1,5	0,1±0,3
	<i>mdx</i> NAP	6,4±5,0	5,5±4,0	0,6±1,0	0,7±1,0
	<i>mdx</i> NIM	4,6±3,6	3,6±2,3	0,6±1,1	0,4±0,6
	<i>mdx</i> DMSO	6,3±7,2	2,6±1,9	1,0±1,3	0,9±1,8

Tabela 1. Efeitos do naproxeno (NAP) e nimesulida (NIM) sobre as áreas de inflamação/regeneração(INFL/REG) e regeneração (REG). Os resultados foram expressos como proporção em relação à área seccional transversa total dos músculos analisados.

		%NC		%NP		%AE	
		36d	51d	36d	51d	36d	51d
TA	<i>mdx</i> salina	45,0 ± 3,1	57,5 ± 4,1	53,5 ± 2,5	41,9 ± 4,1	1,9 ± 1,5	0,3 ± 0,3
	<i>mdx</i> NAP	58,0 ± 6,5¹	58,0 ± 5,9	41,9 ± 6,3¹	42,0 ± 5,9	0,2 ± 0,4	0,02 ± 0,03
	<i>mdx</i> NIM	51,3 ± 8,6	54,8 ± 4,2	48,6 ± 8,6	44,5 ± 3,6	0,05 ± 0,08	1,8 ± 1,2
	<i>mdx</i> DMSO	48,5 ± 6,2	52,0 ± 1,6	51,4 ± 6,4	48,0 ± 1,6	0,3 ± 0,5	7,2 ± 8,2
STN	<i>mdx</i> salina	51,1 ± 1,2	59,8 ± 9,2	47,1 ± 2,7	38,7 ± 8,5	1,7 ± 2,1	2,4 ± 0,3
	<i>mdx</i> NAP	44,2 ± 5,8¹	65,1 ± 6,0	55,1 ± 35,5¹	32,8 ± 4,7	1,0 ± 2,9	2,9 ± 2,4
	<i>mdx</i> NIM	49,8 ± 5,2	67,3 ± 3,4	47,2 ± 7,9	32,5 ± 3,0	4,0 ± 5,1	0,7 ± 1,2¹
	<i>mdx</i> DMSO	50,4 ± 8,3	66,3 ± 5,1	49,4 ± 8,4	33,0 ± 5,1	0,3 ± 0,3	2,4 ± 1,9

Tabela 2. Efeitos do naproxeno (NAP) e nimesulida (NIM) na porcentagem de fibras com núcleo periférico (NP), núcleo central (NC) e fibras positivas ao azul de Evans (AE). ¹diferença significativa em relação ao grupo controle de mesma idade; $p \leq 0,05$ Teste *t* de Student.

4.2. Quantificação da creatinoquinase

Na análise dos níveis plasmáticos da creatinoquinase (CK), os valores obtidos em camundongos que receberam solução salina ou AINE foram comparados com os valores obtidos em camundongos C57BL/10. A Tabela 3 mostra os valores da CK nos diferentes grupos experimentais. Todos os grupos de camundongos *mdx* apresentaram níveis plasmáticos da CK elevados em relação ao grupo de camundongos C57BL/10.

	C57BL/10	<i>mdx</i> salina	<i>mdx</i> NAP	<i>mdx</i> NIM	<i>mdx</i> DMSO
36d	38,7±10,2	659,3±303,9 ¹	1075,9±495,7 ^{1,2}	1803±424,8 ^{1,2,3}	1421,1±501,8 ¹
51d	60,3±11,2	3497,9±1815,9 ¹	1752,1±178,8 ¹	4195,0±927,9 ^{1,3}	1632,5±331,9 ¹

Tabela 3. Média em unidades por litro (U/L) e desvio padrão para os valores da atividade enzimática da CK no plasma de camundongos C57BL/10 e *mdx*. ¹ comparação com o grupo C57BL/10; ² comparação com o grupo *mdx* salina; ³ comparação com o grupo *mdx* NAP ; p≤0,05, teste *t* de Student.

Os grupos *mdx* NAP e *mdx* NIM tratados durante 15 dias apresentaram níveis plasmáticos da CK mais elevados que grupo *mdx* salina (1075,9 ± 495,7 U/L, 1803 ± 424,8 U/L e 659,3 ± 303,9 U/L, respectivamente). A comparação entre os grupos *mdx* NAP e *mdx* NIM tratados durante 15 dias mostrou que o grupo *mdx* NIM apresentou valor da CK mais elevado.

Entre os grupos submetidos ao tratamento com 30 dias de duração, sendo sacrificados aos 51 dias de idade, nenhum dos grupos estudados apresentou valores médios das dosagens da atividade da CK significativamente diferentes em relação aos valores médios obtidos do grupo *mdx* salina. O grupo que recebeu injeções intraperitoneais de nimesulida apresentou níveis plasmáticos da CK mais elevados que o grupo tratado com naproxeno (4195,0 ± 927,9 U/L e 1752,1 ± 178,8 U/L, respectivamente) e a comparação entre os grupos *mdx* NIM e *mdx* NAP mostrou que o grupo *mdx* NIM apresentou valor da CK mais elevado.

5. DISCUSSÃO

5.1 Degeneração muscular

No presente trabalho, a análise da quantidade de fibras positivas ao azul de Evans mostra que a proporção de fibras em degeneração e mionecrose (fibras positivas ao azul de Evans) manteve-se inalterada nos músculos TA dos grupos estudados quando comparados ao grupo *mdx* salina. Na análise dos músculos STN, apenas o grupo que recebeu tratamento com nimesulida até o 51º dia de vida mostrou diminuição significativa da proporção de fibras positivas ao azul de Evans.

Comparando o índice de fibras em degeneração dos músculos TA e STN observamos que aos 36 dias estes músculos apresentavam-se igualmente afetados. Aos 51 dias o STN mostrava-se mais afetado que o TA e, após o tratamento com nimesulida, a proporção de fibras positivas ao azul de Evans diminuiu apenas no STN. Este resultado sugere o envolvimento dos produtos da COX-2 na degeneração muscular.

Possivelmente, as diferenças observadas na degeneração e mionecrose nos músculos estudados são conseqüências dos diferentes tempos em que cada músculo apresenta os ciclos de degeneração/regeneração (PASTORET; SEBILLE, 1995; MARQUES et al., 2008) e das diferentes respostas dos músculos aos fármacos utilizados, assim como relatado em estudos anteriores (RADLEY; GROUND, 2006; MARQUES et al., 2008).

5.2 Regeneração muscular

Os AINE podem afetar a regeneração muscular devido à inibição da produção de prostaglandinas, principalmente das PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$. Estas prostaglandinas são importantes para a ativação e proliferação de células satélites, diferenciação e fusão de mioblastos e para a formação de miofibras a partir da fusão de miotubos (SHEN et al., 2006). A análise das áreas de

INFL+REG e REG dos grupos estudados mostrou que após o tratamento com naproxeno ou com nimesulida não houve alteração significativa destas áreas.

Para analisar se os AINE naproxeno e nimesulida reduziram as áreas de regeneração e de resposta inflamatória nos músculos estudados, seria interessante a imunomarcagem das células satélites e das células inflamatórias para diferenciá-las. Esta diferenciação possibilitaria a quantificação das áreas de inflamação e de regeneração separadamente e se estas foram alteradas pela ação dos AINE.

Outro parâmetro utilizado para a observação da regeneração muscular foi a contagem de fibras com núcleo central, que revela indícios de que estas fibras passaram pelo processo de regeneração. No músculo TA do grupo *mdx* NAP tratado durante 15 dias consecutivos houve aumento da porcentagem de fibras com núcleo central e concomitante diminuição de fibras com núcleo periférico. Apesar da área de regeneração ter apresentado tendência à diminuição, esta não foi significativa, sugerindo que o tratamento com naproxeno não prejudicou o processo de regeneração muscular, assim como observado em trabalhos anteriores (THORSSON et al., 1998). Em ausência das PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, cujas produções são inibidas pelos AINE, os miotubos diferenciam-se rapidamente em fibras musculares adultas sem que ocorra a fusão entre eles (para revisão ver PRISK; HUARD, 2003). Tal fato pode justificar o aumento do número de fibras com núcleo central no músculo TA do grupo *mdx* NAP tratado durante 15 dias, pois, a ação do fármaco pode ter provocado a diferenciação precoce dos miotubos para estágios mais avançados da regeneração sem que houvesse fusão entre eles.

No músculo STN a análise das proporções de fibras com núcleo central e núcleo periférico mostrou que apenas no grupo *mdx* NAP tratado durante 15 dias consecutivos ocorreu diminuição da porcentagem de fibras com núcleo central e concomitante aumento da proporção de fibras com núcleo periférico. Neste músculo a inibição das ações das COX-1 e 2 pelo

naproxeno pode ter protegido as fibras musculares da ação das células inflamatórias e, assim, menos fibras foram prejudicadas pela ação de substâncias citotóxicas liberadas por estas células. Os macrófagos estão envolvidos no processo de regeneração devido à liberação de fatores que ativam as células satélites (ROBERTSON et al., 1993; ARNOLD et al., 2007; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007, SHEN et al, 2008) e a inibição de sua ação pelos AINE pode explicar o fato de não haver aumento do número de fibras com núcleo central no STN.

Embora cada músculo tenha apresentado uma resposta diferente, o efeito observado após a inibição simultânea das COX-1 e 2, pelo naproxeno, sugere que este fármaco pode ter efeito benéfico nos músculos distróficos de camundongos *mdx*. No músculo TA os resultados obtidos reforçam a hipótese de que a ausência das prostaglandinas pode provocar diferenciação precoce dos miotubos sem que ocorra fusão entre eles (para revisão ver PRISK; HUARD, 2003).

No STN, a inibição simultânea das COX-1 e 2 possivelmente diminuiu a ação de fatores citotóxicos que poderiam provocar lesão de fibras musculares saudáveis localizadas nos arredores do local da lesão, reforçando uma das hipóteses sugeridas anteriormente (CHEUNG; TIDBALL, 2003; para revisão ver TIDBALL, 2005). No músculo STN do grupo *mdx* NIM com 51 dias de idade, a redução da proporção de fibras positivas ao azul de Evans sugere que a inibição da COX-2 diminuiu a liberação de substâncias citotóxicas.

Uma observação interessante do presente trabalho diz respeito à diferença das respostas dos músculos estudados. Existem relatos na literatura que mostram diferenças na evolução e intensidade das lesões musculares de acordo com a função desempenhada pelo músculo tais como locomoção, manutenção postural e respiração (PASTORET; SEBILLE, 1995) e que alguns grupos musculares não sofrem degeneração, tais como os músculos extra-oculares (PERTILLE et al., 2007, MARQUES et al., 2007a) e os músculos intrínsecos da laringe (MARQUES et al., 2007b). Existe ainda a hipótese de que as diferenças entre as proporções dos

tipos de fibras musculares existentes em cada músculo podem ser responsáveis pelas características biomecânicas que proporcionam diferentes resistências às lesões decorrentes da distrofinopatia (HASLETT et al., 2005; BANI et al., 2008). Estes dados, associados aos dados obtidos no presente trabalho, sugerem que o envolvimento das células inflamatórias pode ser diferenciado em cada músculo, assim como a produção de fatores que promovam a mionecrose ou regeneração muscular.

5.3 Análise da creatinoquinase

A quantificação dos níveis plasmáticos da CK nos fornece dados quantitativos diretamente relacionados com a degeneração muscular e é um parâmetro bastante utilizado para o diagnóstico de miopatias (KATIRIJI; AL-JABERI, 2001). Na avaliação dos valores encontrados deve-se levar em conta que os níveis séricos desta enzima dependem da velocidade de seu *clearance*, que sofre variações individuais (WARREN et al., 2006). Assim, o diagnóstico e a evolução das doenças neuromusculares não devem ser baseados unicamente nos valores da CK. Estes resultados devem servir como dados complementares no diagnóstico da doença. Em portadores da DMD, estes valores podem encontrar-se 50 a 100 vezes maiores que o valor de referência máximo (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHKHBECK, 1994). Nos camundongos *mdx*, os níveis séricos desta enzima encontram-se elevados durante toda a vida do animal, devido aos sucessivos ciclos de degeneração e regeneração muscular (YOSHIDA et al., 2006).

Todos os grupos de camundongos *mdx* 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 camundongos *mdx*.

Os níveis plasmáticos da CK refletem a quantidade de CK liberada por todos os músculos estriados esqueléticos e pela musculatura estriada cardíaca. O resultado da análise histológica isolada de cada músculo pode não coincidir com os valores da CK, pois, como dito anteriormente, o ciclos de degeneração/regeneração podem variar de um músculo para outro (PASTORET; SEBILLE, 1995; RADLEY; GROUNDS, 2007).

Durante a realização da dosagem da CK, foi verificado que o plasma dos camundongos *mdx* submetidos ao tratamento com nimesulida apresentava coloração amarelada em relação ao plasma obtido dos outros grupos. O mesmo foi observado em amostras obtidas de camundongos C57BL/10 que receberam nimesulida durante 15 dias. A alteração da coloração das amostras pode ser observada na Figura 4. Estudos anteriores confirmam a presença da nimesulida e/ou de seus derivados no plasma sanguíneo (PTACEK; MACEK; KLIMA, 2001; ROLIM; PORTA; STORPIRTIS, 2007; SORA et al., 2007). Provavelmente, a presença deste fármaco e/ou de seus derivados no plasma provoca alteração na coloração do mesmo e, como a medida da atividade enzimática da CK é realizada através de um método colorimétrico, os resultados obtidos através desta técnica podem não representar as quantidades reais desta enzima no plasma dos animais tratados com nimesulida devido à alteração da coloração das amostras utilizadas. Especificamente nos grupos *mdx* NIM, os resultados obtidos para a CK podem não refletir o real efeito da nimesulida na degeneração muscular devido às alterações observadas na coloração do plasma obtido de animais submetidos ao tratamento com este fármaco..

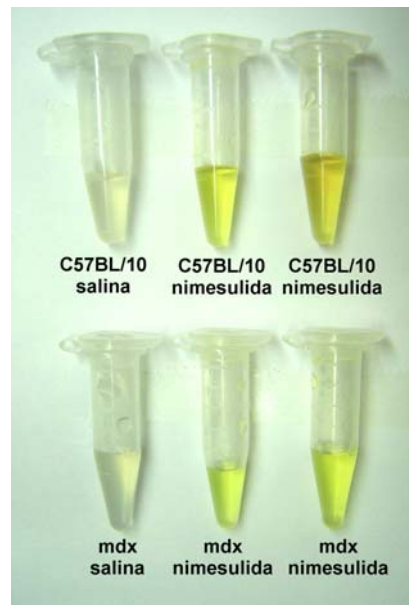


Figura 4. Tubos eppendorf contendo plasma sangüíneo de animais C57BL/10 e *mdx*. As amostras de animais tratados com nimesulida apresentam coloração amarelada em relação às amostras obtidas de animais que receberam solução salina.

6. CONCLUSÕES

Dentre as drogas utilizadas, o naproxeno mostrou-se ser mais efetivo, influenciando de forma diferenciada os músculos distróficos, principalmente quando utilizado nos estágios iniciais dos ciclos de degeneração/regeneração. Possivelmente, a inibição simultânea das COX-1 e 2 beneficiou a recuperação do tecido muscular mais do que a inibição específica da COX-2.

Apesar da importância das prostaglandinas para a resposta inflamatória e para a regeneração muscular, a utilização de fármacos inibidores da produção destas substâncias não impediu a regeneração de músculos distróficos de camundongos *mdx*. Sugere-se que o uso de AINE pode ser uma alternativa potencialmente útil para o tratamento das distrofinopatias, mas este deve ser acompanhado de outros fármacos de ação mais direta na proteção à degeneração.

7. REFERÊNCIAS

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

ALDERTON, J.M., STEINHARDT, R.A. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 275, p. 9452-9460, 2000.

ALLIKIAN, M, J.; MCNALLY, E. M. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*, v. 8, p. 177-183, 2007.

ALMEKINDERS, L.C.; GILBERT, J.A. Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *Am J Sports Med.*,v.14,,p. 303-308, 1986.

ALVES, G.E.S. Dimetilsulfóxido (DMSO). *Saúde Equina*, n.6, p.6-10, 1998.

ARNOLD, L. et al. Inflammatori monocytes recruited aftes skeletal muscle injuty switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. *JEM*, v. 204, n. 5, p. 1057-1069, 2007.

BANI, C. et al. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of *mdx* mice. *Muscle & Nerve*, v. 37, n. 5, p. 583-592, 2008.

BATCHELOR, C. L.; WINDER, S. J. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *TRENDS in Cell Biology*, v. 16, n. 4, p.198-205, 2006.

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

BLAKE, D. J. et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.*, v.82, p. 291–329, 2002.

BOGDANOVICH, S. et al. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *J Mol Med.*, v. 82, n.2, p. 102-115, 2004.

BOGDANOVICH, S. et al. Funtctional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, v. 420, p. 418-421, 2002.

BONDESEN, B. et al. Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *FASEB Journal*, v.21, p.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.*, v. 287, p. 475- 483, 2004.

BONDESEN, B.; MILLS, S.; PAVLATH, G. The cox-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2006.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.*, v.76, p.61-90, 1986.

BULFIELD, G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad.*, v. 81, p. 1189-1192, 1984.

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

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.*, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.

CHEUNG, E. V.; TIDBALL, J. G. Administration of the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen increases macrophage concentrations but reduces necrosis during modified muscle use. *Inflammation Research*, v. 52, n. 4, p. 170-176, 2003.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* v. 23, n. 10, p. 1456-1471, 2000.

CULLEN, J.; JAROS, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the x chromosome-linked dystrophic (*mdx*) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.*, v. 77, n. 1, p. 69-81, 1988.

DECONINK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatric Neurology*, v.36, n. 1, p.1-7, 2007.

DHAWAN, J.; RANDO, T.A. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *TRENDS in Cell Biology*, v.15, n. 12, p.666-673, 2005.

DUBOIS, R. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.*, v. 12, p. 1063-1073, 1998.

DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. Muscular dystrophies involving the dystrophin- glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Gen. Develop.*, v. 12, p. 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., 1994. 1937 p.

ERVASTI, J. M. Dystrophin, its interaction with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1772, p. 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.*, v.3, p. 139-166, 1993.

FOSCHINI, R.M.S.A.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. *Arq. Bras. Oftamol.*, v. 67, p.681-687, 2004.

FUNK, C. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Sci.*, v. 294, p. 1871-1875, 2001.

GILROY, D. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.*, v. 5, n. 6, p. 687-691, 1999.

GISSEL, H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1066, p.166-180, 2005.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN; J. G.; LIMBIRD, L. E. The pharmacological basis of therapeutics. 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996. 1905 p.

GROUND, M. D. et al. Silencing TNF α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an *in vivo* bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell and Tissue Research*. v. 320, n.3, p. 509-515, 2005.

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

GUDIS, K.; SAKAMOTO, C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Digestive Diseases and Sciences*, v, 50, suppl. 1, p. S16-S23, 2005.

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.*, v. 200, p. 69-79, 2002.

HASLETT, J. N. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. *Mammalian Genome*, v. 16, n. 10, p. 739-748, 2005.

HODGETTS, S. et al. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF- α function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord.*, v. 16, p. 591-602, 2006.

HOFFMAN, E.; BROWN, J. R.; KUNKEL, L. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, v. 51, p. 919-985, 1987.

HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 16, p. 575-584, 2005.

HORSLEY, V.; PAVLATH, G.K. Prostaglandin F $_{2\alpha}$ stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *Journal of Cell Biology*, v. 161, n. 1, p. 111-118, 2003.

JARVINEN, M. et al. : Effects of some antiinflammatoryagents of the healing of ruptured muscle. An experimental study in rats. *J Sports Traumatol.* v. 14, p. 19-28, 1992.

JIN, Y. et al. Expression of myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. *Acta Neuropathol.*, v. 99, p. 619-627, 2000.

JONES, K. J. et al. Deficiency of the syntrophins and α -dystrobrevin in patients with inherited myopathy. *Neuromuscular Disorders*, v. 13, p. 456-467, 2003.

KAMINSKI, H. J.; ANDRADE, F. H. Nitric oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscular Disorders*, v. 11, p. 517-524, 2001.

KATIRJI, B; AL-JABERI, M.M. Creatine Kinase Revisited. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*, v. 2, p.158-163, 2001.

KHURANA, T. S.; DAVIES, K. E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 5, p. 379-390, 2003.

LAPIDOS, K.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. The dystrophin-glycoprotein complex. signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ. Res.*, v. 94, p. 1023-1031, 2005.

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

LE GRAND, F.; RUDNICKI, M.A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* , v. 19, p. 628-633, 2007.

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

MACKEY, A. L. et al., The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *J. Appl. Physiol.*, v. 103, p. 425-431, 2007.

MANZUR, A. Y. et al. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 1, 2008, Art. No.: CD003725. DOI: 10.1002/14651858.CD003725.pub3

MARQUES, M. J et al. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. *Muscle Nerve*, v. 37, p. 61-67, 2008.

MARQUES, M. J. et al. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *Anatomical Record*, v. 290, n. 7, p. 846-854, 2007a.

MARQUES, M.J. et al. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Muscle Nerve*, v.35, n. 3, p. 349-353, 2007b.

MARQUES, M. J.; MATSUMURA, C. Y.; SANTO NETO, H. Alterations in the permeability of dystrophic fibers during neuromuscular junction development. *Acta Biol Hung.* v. 58, n. 1, p. 1-9, 2007.

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

MENDIAS, C.; TATSUMI, R.; ALLEN, R. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in satellite cell proliferation, differentiation, and fusion. *Muscle Nerve*, v. 30, p. 497-500, 2004.

MEGENEY, L.A. et al. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & Development*, v.10, n.10, p.1173-1183, 1996.

MISHRA, D. K. et al. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.79, n.8, p. 1270-1271, 1995.

MITCHEL, J.A.; WARNER, T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.*, v. 128, p. 1121-1132, 1999.

MOLLACE, V. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharm. Rev.*, v. 57, n. 2, p. 217-252, 2005.

MUNTONI, F. et al. Steroids in Duchenne muscular dystrophy: From clinical trials to genomic research. *Neuromuscular Disorders*, v. 12, supplement, p. S162-S165, 2002.

NAGATA, Y. et al. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J. Cell. Biol.*, v.174, n.2, p. 245-253, 2006.

OBREMSKY, W.T.; SEABER, A.V.; RIBBECK, B.M., et al. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *Am. J. Sports Med.*, v.22, n.4, p.558-561, 1994.

- O'NEIL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A.W. Expression of mRNA for cyclo-oxygenase1 and cyclo-oxygenase-2 in human tissues. *FEBS Letters*. V.330, n.2, p.156-160, 1993
- OZAWA, E. et al. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle and Nerve*, v. 2, n. 5, p. 563-576, 2005.
- OZAWA, E.; HAGIWARA, Y.; YOSHIDA, M. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 190, n. 1-2, p. 143-151, 1999.
- PARREIRA, S. L. S. et al. Quantification of muscle strength and motor ability in patients with Duchenne muscular dystrophy on steroid therapy. *Arq Neuropsiquiatr.*, n. 65, v. 2A, p. 245-250, 2007.
- PASTORET, C.; SEBILLE, A. *Mdx* mice show weakness and muscle deterioration with age. *J. Neur. Sci.*, v. 129, p. 97-105, 1995.
- PERTILLE, A. et al. Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient mdx mice: potential role in muscle sparing. 2008(*Artigo em preparação*).
- PETROF, B. J. The molecular basis of activity-induced injury in Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 111, p. 111-123, 1998.
- PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *American Journal Physical Medicine and Rehabilitation*. v.81 (Suppl), p.S162-S174, 2002.
- PIERNO, S. et al. Role of tumor necrosis factor α , but not of cyclo-oxygenase-2 derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in *mdx* mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 33, p. 344-359, 2007.
- PORTER, J.D. et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Molecular Genetics*, v.11, n. 3, p. 263-272, 2002.
- PRISK, V; HUARD, J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation. *Histol. Histopathol.*, v.18, p. 1243-1256, 2003.

PTACEK, P; MACEK, J.; KLIMA, J. Rapid and simple high performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma, *J. Chromatogr. B*, v. 758, p. 183, 2001.

RADLEY, H. G. et al. Duchenne muscular dystrophy: Focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 39, n. 3, p. 469-477, 2007.

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

RAINSFORD, K. D. Relationship of nimesulide safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. *Rheumatology*, v.38, n. 1, p 4-10, 1999.

RAINSFORD, K. D. Nimesulide - a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. *Current Medical Research Opinion*, v. 22, n. 6, p 1161-1170, 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. *Microscopy Research and Technique*, v. 55, p. 223-235, 2001.

ROBERTSON, T. A. et al. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Experimental Cell Research*, v. 207, p. 321-331, 1993.

ROLIM, C. M. B.; PORTA, V.; STORPIRTIS, S.. Quantitation of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection and its application to a bioequivalence study. *Arzneimittel-Forschung*, v. 57, p. 537-541, 2007.

SANDER, M. et al. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13818-13823, 2000.

SASAKA, T. et al. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscular Disorders*, v. 13, p. 193-206, 2003.

SCHMALBRUCH, H. The satellite cell of skeletal muscle fibres. *Bras. J. Morphol Sci.*, v.23, n. 2, p.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*, v. 2, n. 5, 2004.

SEALE, P. et al. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell*, v.102, n. 6, p. 777-786, 2000.

SEIXAS, S. et al. Importância do camundongo *mdx* na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 55, n. 3-B, p. 610-617, 1997.

SHEN, W. et al. Inhibited skeletal muscle healing in Cyclooxygenase-2 deficient mice: a role of PGE₂ and PGF_{2α}. *J. Appl.Physiol.*, v. 101, p 1215-1221, 2006.

SHEN, W. et al. NS-398, a Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitor, Delays Skeletal Muscle Healing by Decreasing Regeneration and Promoting Fibrosis. *American Journal of Pathology*, v.167, n.4, p. 1105-1117, 2005.

SHEN, W. et al. Interaction Between macrophages, TGF-β1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J. Cell. Physiol.*, v.214, n.2, p.405-412, 2008.

SICINSKI, P. et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse. A point mutation. *Sci.*, v. 244, p. 1578-1580, 1989.

SORA, I. et al. Determination of nimesulide and its active metabolite in plasma samples based on solvent deproteinization and HPLC-DAD analysis. *Revue Roumaine de Chimie*, in press, 2007.

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

SÜLEYMAN, H. et al. Anti-inflammatory effects of selective cox-2 inhibitors. *Pol. J. Pharmacol.*, v. 56, p. 775-780, 2004.

SUNADA, Y.; CAMPBELL, K. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr. Opin. Neurol.*, v. 8, p. 379-385, 1995.

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

TAMAKI, T et al. New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal growth. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 50 n.8, p.1097-1111, 2002.

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

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.*, v. 15, p. 2057-2072, 2001.

THORSSON, O.; RANTANEN, J.; KALIMO, H. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am. J. Sports Med.*, v. 26, n. 2, p. 172-176, 1998.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, n. 2, p. R345-R353, 2005.

TIDBALL J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J. Physiol.*, v.578, n.1, p.327-336, 2007.

WARREN, G. L. et al. CK-MM autoantibodies: Prevalence, immune complexes, and effect on CK clearance. *Muscle and Nerve*, v. 34, n. 3, p. 335-346, 2006.

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

WEHLING, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mice. *Journal of Cell Biology*, v. 155, n. 1, p. 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. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. v.33, p.657-662, 2006.

WOZNIAK, A.C.; ANDERSON, J.E. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Dev. Dyn.*, vol. 236, p.240-250, 2007.

YABLONKA-REUVENI, Z.; ANDERSON, J.E. Satellite cells from dystrophic (*mdx*) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Developmental Dynamics*. v. 235, n. 1, p. 203-212, 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*, v. 290, n. 2, p. 449-455, 2006.

ZAMMIT, P. S. et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 9, p. 1824-1832, 2006.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada “**Ação de antiinflamatórios não-esteróides na degeneração/regeneração de fibras musculares distróficas de camundongos *mdx***”

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1222-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).

Tereza Cristina P. de Albuquerque
Tereza Cristina Pessoa de Albuquerque
aluna

Maria Júlia Marques
Maria Júlia Marques
orientadora

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Apauada Guaraldo
Nome:
Função: Profª. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAI/IB - UNICAMP