AMANDA DE ABREU MARTINS

**Efeitos do ácido ursólico *in vitro* em células satélites musculares
de cães afetados e portadoras de GRMD**

São Paulo
2014

AMANDA DE ABREU MARTINS

Efeitos do ácido ursólico *in vitro* em células satélites musculares de cães afetados e portadoras de GRMD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Dr^a.Lilian de Jesus Oliveira

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3073
FMVZ

Martins, Amanda de Abreu
Efeitos do ácido ursólico *in vitro* em células satélites musculares de cães afetados e portadoras de
GRMD / Amanda de Abreu Martins. -- 2014.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Lilian de Jesus Oliveira.

1. Células muscular. 2. Distrofia. 3. Proteínas. 4. Viabilidade celular. 5. Metilação.
I. Título.

São Paulo, 15 de outubro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do ácido ursólico in vitro em células satélites musculares de cães afetados e portadoras de GRMD", protocolado sob o CEUA nº 8673220814, utilizando 10 Cães (10 machos), sob a responsabilidade de Lilian De Jesus Oliveira, foi aprovado na reunião de 15/10/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Effects of Ursolic Acid in Vitro on Canine Satellite Muscle Cells Isolated from Affected and Carrier of GRMD ", protocol number CEUA 8673220814, utilizing 10 Dogs (10 males), under the responsibility Lilian De Jesus Oliveira, was approved in the meeting of day 10/15/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Martins, Amanda Abreu de

Título: Efeitos do ácido ursólico *in vitro* em células satélites musculares de cães afetados e portadoras de GRMD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha família, por todo o amor, dedicação, paciência e amizade:

Aos meus pais, Armando Carlos Martins e Claudina Maria de Abreu Martins.

A minha tia Maria José de Abreu

E principalmente a minha amada avó Olivia Porto Silveira de Abreu

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, pela fidelidade, benção e por nunca ter me abandonado em todos os momentos de fraqueza.

Á Prof^a. Maria Angélica Miglino obrigada por toda ajuda, carinho, amizade e por ter me concedido a oportunidade de realizar o mestrado, no departamento de cirurgia, no setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Á Dra Lilian de Jesus de Oliveira, por toda confiança, amizade, carinho, exemplo de humildade e sabedoria. Sem você e sua confiança não conseguiria desenvolver todo esse trabalho.... Obrigada por tudo !!!!!

Ao Rodrigo Barreto pelo seu companheirismo, amizade, confiança, e a pessoa especial que se tornou em minha vida. Amo você maninho !!!

Ao Dr Phelipe Favaron, agradeço por sempre ter me acolhido e pela a amizade construída ao longo desses anos.

A todas as minhas queridas amigas do LMMD-FZEA, em especial a, Nairinha, Aline Fernanda, Alessandra Pinheiro, Mari Trés, Mari Martucci, Gabi Mammede, obrigada por todo companheirismo e momentos de amizade em todo tempo de mestrado que com certeza estarão guardados comigo para sempre!! Adoro vocês e sentirei muitas saudades!!

Ao meu trio favorito Rodrigo Barreto, Rafael Vilar Sampaio e Juliano Sangali Rodrigues nem sei dizer o que seria de mim de vocês nesse trabalho, meus amigos-irmãos, sempre me ajudando me fazendo rir quando eu mais precisava AMO VOCÊS .

As minhas amigas queridas, Catherine Berchielli dos Santos, Grazielle Bijotti, Carolina Carosini, Ana Carolina Luccas, Flávia Paiva, Ana Cláudia Farinazzo, Ana Carolina Souza pelo grande apoio nos momentos difíceis.

Ao pessoal do canil GRMD, Barbara Schafer (saudades das pizzas nos plantões), Marina Brolio (que medo eu tinha de você amiga) rsrs , Dani, Paula, Renatinha, Dilayla, Thaís.

Aos amados cães GRMD em especial, Ana Maria, Mouse, Rapadura, Vanderléia, Cocada, Carol e Jujuba, pode passar o tempo que for, vocês serão para sempre os meus filhotes.

Aos meus pais e avós por me transformarem no que hoje eu sou, pelos constantes ensinamentos, pelo suporte nas minhas mais loucas escolhas e pelos inúmeros esforços.

.

RESUMO

MARTINS, A. A. **Efeitos do ácido ursólico *in vitro* em células satélites musculares de cães afetados e portadoras de GRMD.** [Effects of ursolic acid in vitro on canine satellite muscle cells isolated from affected and carrier of GRMD]. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária ligada ao cromossomo 'X' que tem como principais características a atrofia e fraqueza muscular progressiva, chegando até mesmo ao comprometimento da musculatura cardíaca e respiratória. A ausência e/ou disfunção da proteína distrofina na DMD faz com que qualquer esforço muscular contribua para deterioração do tecido muscular. Portanto, presente estudo avaliou pela primeira vez os níveis de metilação e hidroximetilação global no músculo esquelético de animais portadores e afetados pela DMD e analisou os efeitos do ácido ursólico sobre a viabilidade e produção de proteínas de linhagens celulares musculares isoladas de animais portadores e afetados pela GRMD. As análises dos níveis de metilação e hidroximetilação sugerem que as células musculares de cães portadores apresentam maiores níveis de hidroximetilação, em geral, o que pode estar associado com a estabilidade e capacidade de reparo celular; o tratamento com ácido ursólico *in vitro*, aumentou a concentração de proteínas sobre as células cultivadas; no entanto apresentou-se tóxico às células cultivadas *in vitro* quando em baixas concentrações, para animais portadores e afetados com 6 meses de idade. Ainda que ensaio de viabilidade celular demonstrou que o ácido ursólico pode ser tóxico em determinada concentração, quando comparado com o controle, entretanto, a utilização deste componente parece ser favorável às células.

Palavras-chaves: Células muscular. Distrofia. Proteínas. Viabilidade celular. Metilação.

ABSTRACT

MARTINS, A. A. **Effects of ursolic acid in vitro on canine satellite muscle cells isolated from affected and carrier of GRMD.** [Efeitos do ácido ursólico *in vitro* em células satélites musculares de cães afetados e portadoras de GRMD]. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a hereditary 'X'-linked wasting muscle disease which is characterized by atrophy and progressive muscle weakness that in later stages affects cardiac and respiratory muscles leading to death. The lack and/or dysfunction of dystrophin in DMD induces muscle injury after each muscles contraction leading severe wasting of the muscle tissue. Therefore, for the first time this study assessed the global levels of methylation levels and hydroxymethylation in skeletal muscle of carrier and affected dogs by DMD. Also, we assessed the effects of ursolic acid on the cell viability and protein production of muscle cells lineages isolated from carrier and affected dogs by DMD. The analysis of global levels of methylation and hydroxymethylation showed that muscle cells from carrier dogs had higher levels of global hydroxymethylation when compared to heir affected counterparts, which may be associated with the cellular stability and repair capacity. Taken together, our results showed that there is a difference on global methylation of DNA the skeletal muscle between carrier and affected dogs by DMD, which can be a new prognostic tool for disease progression. Also, the treatment with ursolic acid in vitro increased protein concentration in cultured cells, however ursolic acid showed to be toxic to muscle cells lineages isolated from carrier and affected dogs by DMD at low concentrations. Although cell viability assay showed that ursolic acid may be toxic in certain concentrations, when compared with the control, however, the use of this component appears to be favorable to the cells.

Keywords: Muscular cell. Distrophy. Protein. Viability. Methilation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral da formação do complexo glicoproteínas-ditrofina (CGD)	25
Figura 2 - O Ácido ursólico ativa a cascata de IGF-1 por aumento da Akt - 1 fosforilação in vivo e, conseqüentemente, diminui a apoptose das células tratadas. Diretamente assim inibindo a PTPB1 que desfosforila o IGF-I e os receptores de insulina	31
Figura 3 - Modelo Esquemático de citosina na qual um grupo metilo é ligado ao carbono 5-Metilcitosina, alterando a metilação do DNA.....	32
Figura 4 - Modelo esquemático da conversão da 5-mC à 5-hmc e conseqüentemente a C	33
Figura 5 - Representação esquemática do delineamento experimental utilizados	37
Figura 6 - A-B, Fotomicrografias de músculo esquelético (quadríceps femoral) de cão distrófico	48
Figura 7 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo-esquelético de cão portador submetido a imunohistoquímica para 5-mC	50
Figura 8 - Fotomicrografia de corte transversal de músculo-esquelético de cão distrófico, demonstrando resultados da Imunohistoquímica para 5-mc.....	52
Figura 9 - Fotomicrografia de corte transversal de músculo-esquelético de cão distrófico (A) e portador (B), demonstrando resultados da imunohistoquímica para 5-hmC	53
Figura 10 - A- culturas confluentes altas B e C - Células multinucleadas e diferenciadas D - células confluentes altas mostrando organização "net-like" em duas direções diferentes.....	61
Figura 11 - Em A, B e C: presença de células multinucleadas diferenciadas (setas brancas) e D: células confluentes altas mostrando organização "net-like" em duas direções diferentes.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células fibroblásticas no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica	55
Gráfico 2 -	Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células intersticiais no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica.....	56
Gráfico 3 -	Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células musculares no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica	58
Gráfico 4 -	Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células totais no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica.	59
Gráfico 5 -	Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células fibroblástica, intersticiais, musculares e totais do quadriceps femoral de animais portadores (barras pretas) ou afetados (barras cinzas) pela distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica	60
Gráfico 6 -	Ensaio de toxicidade do ácido ursólico animais portadores (barras pretas) ou afetados (barras cinzas) pela distrofia muscular de Duchenne, avaliados pelo ensaio colorimétrico de metabolização de MTT	63
Gráfico 7 -	Ensaio de viabilidade da células tratadas com ácido ursólico de animais portadores (barras pretas) ou afetados (barras cinzas) pela distrofia muscular de Duchenne, avaliados pelo ensaio colorimétrico de metabolização de MTT.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animal, Idade e Grupo dos animais utilizados em cada etapa do experimento	38
Tabela 2 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células fibroblásticas positivas para 5-mC em animais portadores e afetados pela GRMD	55
Tabela 3 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células fibroblásticas positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD	55
Tabela 4 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células intersticiais positivas para 5-mC em animais portadores e afetados pela GRMD	57
Tabela 5 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células intersticiais positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD	57
Tabela 6 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células musculares positivas para 5-mC em animais portadores e afetados pela GRMD	58
Tabela 7 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células musculares positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD	59
Tabela 8 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células totais positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVOS GERAIS	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	23
3.2	DISTROFINA	24
3.3	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA DMD	26
3.4	CÉLULAS SATÉLITE	27
3.5	ÁCIDO URSÓLICO	29
3.6	EPIGENÉTICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAIS	36
4.2	ANIMAIS	36
4.3	BIÓPSIA MUSCULAR	38
4.4	PROCESSAMENTO DOS TECIDOS PARA HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	39
4.5	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	40
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA: EOSINA	40
4.6.1	Imunohistoquímica de 5-mC e 5h-mC	40
4.6.2	Isolamento e Cultivo Primário de Células Musculares	41
4.6.3	Ensaio de toxicidade do ácido ursólico sobre a célula muscular in vitro	42
4.6.4	Ensaio de proliferação e viabilidade celular por MTT	43

4.6.5	Efeitos ácido ursólico na proliferação e produção de proteínas das células musculares	43
4.6.6	Quantificação das proteínas totais	44
4.6.7	Quantificação de proteínas totais por Bradford Reagent®	45
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS	45
5	RESULTADOS	47
5.1	IMUNOHISTOQUÍMICA DE 5-mC E 5-hmC	48
5.2	ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DOS NÍVEIS GLOBAIS DE METILAÇÃO E HIDROXIMETILAÇÃO DO DNA DO QUADRICEPS FEMORAL DE ANIMAIS AFETADOS E PORTADORES AOS 6 MESES DE IDADE	54
5.3	FIBROBLASTOS	54
5.4	INTERSTÍCIO	56
5.5	CÉLULA MUSCULAR	57
5.6	CÉLULAS TOTAIS	59
5.6.1	5-mC e 5-hmC Global	60
5.7	ISOLAMENTO E CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS MUSCULARES	61
5.8	ENSAIO DE TOXICIDADE DO ÁCIDO URSÓLICO SOBRE LINHAS DE CÉLULAS MUSCULARES IN VITRO	62
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	76

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária, caracterizada por uma degeneração muscular progressiva, causando fraqueza (EMERY, 1993). Por ser uma condição recessiva ligada ao cromossomo “X”, a DMD afeta predominantemente meninos, e estudos recentes reportam que sua incidência geral corresponde a 1:4087 (MENDELL et al., 2012).

Esta distrofia é caracterizada pela ausência ou expressão deficiente de distrofina em diversos tecidos (HOFFMAN et al., 1987). A distrofina é a proteína estrutural mais abundante do tecido muscular e corresponde a cerca de 0.002% da massa proteica da célula muscular estriada (WORTON, 1992). Com o desenvolvimento da DMD, a ausência e/ou disfunção desta proteína resulta ciclos recorrentes de necrose seguida de regeneração muscular, o que diminui a capacidade regenerativa muscular por causar depleção das células satélites, gerando, por fim, a produção de gordura e fibrose (CHARGÉ; RUDNICK 2004; MENDELL et al., 2012).

Mutações espontâneas do gene da distrofina têm sido observadas em animais, tornando-os modelos experimentais para DMD. Camundongos são frequentemente utilizados como modelo para a doença, incluindo animais com mutação espontânea, como os animais *mdx* que apresentam uma mutação pontual no exon 23 do gene da distrofina, ou modelos knockout, ainda que ambos apresentem um fenótipo menos severo do que o humano (SICINSKI et al., 1989; ITAGAKI et al., 1995; GRADY et al., 1997; BERG et al., 2011).

Estudos relataram distrofinopatias provenientes de mutações espontâneas em cães e gatos, ressaltando a similaridade genética da doença, principalmente entre cães e humanos, uma vez que o gene da distrofina é conservado em relação ao seu tamanho e função em mamíferos (KOENIG et al., 1987; KORNEGAY et al., 1988). A Distrofia muscular de Duchenne foi observada com maior incidência em cães da raça Golden Retriever, os quais possuem Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD, *do inglês: Golden Retriever Muscular Dystrophy*) (BERGMAN et al., 2002). Nestes cães, assim como em humanos, pode existir ausência da

distrofina, causando morte das células musculares à medida que são submetidas à contrações (JORDE, 2004).

O músculo esquelético, tecido afetado pela DMD, possui uma grande capacidade de regeneração que pode estar associada à presença de células satélites (HAWKE; GARRY, 2001). As células satélites musculares têm sido amplamente estudadas com o objetivo de compreender os mecanismos regulatórios da regeneração muscular e contribuir para os avanços terapêuticos na DMD (MOTOHASHI; ASAKURA, 2014).

Estas células tem uma característica essencial, a qual consiste na participação em regenerações musculares repetidas de forma que, com a injúria muscular, as células satélites são ativadas e começam a proliferar (HANGING, 2013). Após proliferação estas células se diferenciam em miócitos que se fundem às fibras musculares existentes e reparação do tecido injuriado (CHARGE; RUDNICKI, 2004). Além disso, uma pequena parte destas células geram novas células satélites ou se renovam para manter-se em estado quiescente (COLLINS et al., 2005).

Desta forma, fatores que possam acelerar o processo de regeneração muscular vêm sendo estudados para o desenvolvimento de novas terapias. Estudos recentes mostraram que a inibição de histonas acetilases II em células satélites promove hipertrofia muscular e maior taxa de fusão celular *in vitro*, provavelmente em consequência da diminuição de produção de óxido nítrico neural em camundongos mdx (COLUSSI et al., 2009).

Rentemente, uma análise global dos níveis de metilação pré e pós diferenciação de mioblastos em miotubos *in vitro*. Durante a miogênese, os mioblastos apresentam níveis semelhantes de desmetilação e metilação de novo; já após a diferenciação em miotubos há uma predominância de processos de desmetilação (KOJI et al., 2014). Esses achados sugerem que há uma regulação epigenética importante que modula a expressão de genes necessários (ativam ou reprimindo) envolvidos em processos metabólicos e estruturais para essa remodelação do tecido muscular tanto durante o crescimento quanto durante a reparação tecidual, como ocorre na distrofia muscular de Duchenne. Neste contexto, estudos sobre o papel do ácido ursólico (AU) tem demonstrado seu potencial no tratamento de perda de massa muscular aguda e crônica (KUNKEL et al., 2011). O possível efeito anabólico do AU pode estar relacionado a um aumento

na produção proteínas totais, após o tratamento de uma linhagem celular muscular humana imortalizada (FIGUEIREDO; NADER., 2012).

Existem evidências de que o AU aumenta os níveis de fosforilação da proteína quinase serina/treonina (*AKT1*) na via de sinalização insulina/Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) (KUNKEL et al., 2011). Ademais, o AU está associado com o aumento de massa muscular consequente à proliferação de células satélites, sendo capaz de inibir a atrofia muscular e apresentar efeito na prevenção da formação de fibrose (SIEGEL et al., 2008; KUNKEL et al., 2011).

Portanto, presente estudo avaliou os níveis de metilação e hidroximetilação global no músculo esquelético de animais portadores e afetados pela GRMD. A hipótese é de que os animais afetados pela GRMD possuem um menor nível de metilação e hidroximetilação global em relação aos animais portadores, em consequência ao constante processo de destruição e reparação tecidual. Ainda, a análise dos efeitos do ácido ursólico sobre a viabilidade e produção proteína de linhagens células musculares isoladas de animais portadores e afetados pela GRMD, para testar se as células de animais afetados pela GRMD recuperam a produção proteica após ao tratamento com ácido ursólico.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais desse trabalho foram:

- identificar padrão global de metilação e hidroximetilação no músculo esquelético;
- avaliar efeitos do tratamento do ácido ursólico in vitro sobre linhas celulares de animais portadores afetados pela GRMD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho estão descritos abaixo:

- Isolar e expandir mioblastos a partir de biópsias do músculo quadriceps femoral de animais afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne e animais portadores.
- Imunolocalização de 5-mC e 5h-mC, para determinar o padrão de metilação e hidroximetilação global no músculo de animais portadores e afetados pela GRMD aos 6 meses de idade.
- Determinar os efeitos do ácido ursólico nas concentrações de 5, 10 e 20 μM sobre a viabilidade celular de linhagem de células musculares de animais portadores e afetados pela GRMD.

- Determinar os efeitos do ácido ursólico os efeitos do ácido ursólico nas concentrações de 5 e 10 μM sobre a produção total de proteínas de linhagem de células musculares de animais portadores e afetados pela GRMD.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A Distrofia muscular de Duchenne é a doença muscular genética mais frequente em crianças (CHO,1993). A diversidade estrutural e funcional da distrofina (MUNTONI, 1993). Caracteriza-se por ser progressiva e hereditária que afeta quase exclusivamente meninos (ANNEXSTAD et al., 2014). Ao ser comparada com demais distrofias, a DMD apresenta como peculiaridade o fato de que qualquer esforço muscular que cause fadiga contribui para deterioração do tecido muscular (EMERY, 1993).

Estudos epidemiológicos recentes confirmam que a incidência da DMD corresponde a 1:4087 nascidos (MENDELL et al., 2012), sendo que 90% da meninas portadoras são aparentemente assintomáticas, enquanto que 10% delas podem desenvolver um quadro de cardiomiopatia isolada, sendo esta cardiomiopatia dilatada ou hipertrófica (BUSHBY et al., 2003).

No início da década de 1990, pacientes afetados pela DMD apresentavam uma expectativa de vida média de 20 anos, enquanto nas últimas duas décadas o desenvolvimento de terapias adequadas tem permitido a estas pessoas uma boa qualidade de vida com aumento da longevidade para 30 a 40 anos (EAGLE et al., 2002; RAHBEK et al., 2005; BUSHBY et al., 2010).

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença genética ligada ao cromossomo-X que é caracterizada por mutações, i.e. pontuais, duplicação e/ou deleção de éxons, do cromossomo X (KOENIG et al., 1987). Na DMD, a “fase de leitura aberta” (*do ingles* “open reading frame”) do gene da distrofina localizado no locus Xp21 do cromossomo X, é interrompido em consequência de deleções (~ 65%), duplicações (~ 10%), mutações pontuais (~ 10%), e outras alterações (15%) (BUSHBY, 2010). Essas alterações resultam em uma redução e/ou incorreto enovelamento, ou ausência da distrofina (AARTSMA-RUS et al., 2006).

Considerando o comprometimento na produção de distrofina funcional, a DMD apresenta vários níveis de gravidade dos sintomas da doença. No entanto, os dois mais comuns são a distrofia muscular de Duchenne (DMD) e a distrofia muscular de Becker, sendo a DMD a forma mais grave na apresentação da distrofia (AARTSMA-RUS et al., 2006). Até o momento, foram descritas mais de 4.700 mutações neste gene e, em cerca de um terço dos pacientes afetados a mutação não foi encontrada nas respectivas mães (AARTSMA-RUS et al., 2006).

A distrofina é uma das principais proteínas estruturais da fibra muscular, cujo papel principal consiste na contração miofibrilar e na manutenção da estabilidade da membrana da fibra muscular (DDECONINCK; DAN, 2007). Além disso, a anormalidade ou ausência da distrofina resulta na instabilidade e fragilidade da membrana muscular, desregulação dos níveis de cálcio, comprometimento da contração miofibrilar e não raro consequente apoptose da fibra muscular (JORGENSEN et al., 2009).

A DMD, de acordo com o comprometimento da produção de distrofina funcional, apresenta vários níveis de severidade dos sintomas da doença. No entanto os dois mais comuns são a distrofia muscular de Duchenne (DMD) e a distrofia muscular de Becker, sendo a DMD muito mais severa (RICARDO et al., 2009).

3.2 DISTROFINA

A distrofina é uma proteína de 427 KDa (Dp427) cuja expressão é controlada por oito genes promotores, os quais produzem várias isoformas, inclusive em células contráteis e não musculares. Esta proteína tem expressão ubíqua e é abundante no músculo esquelético e cardíaco (LEWIS et al., 2009). Além disso, corresponde a cerca de 0.002% da massa proteica da célula muscular estriada (WORTON, 1992).

Ainda, a distrofina tem papel pivotal no ancoramento de proteínas estruturais e de sinalização, uma vez que está associada a várias glicoproteínas integrais da

membrana, resultando na formação de um complexo glicoproteína-distrofina, como pode ser observado na figura 1 (WORTON, 1992),

A distrofina possui papel central na ancoragem do citoesqueleto, de forma que a estrutura quaternária do complexo formado por glicoproteína-distrofina estabiliza a periferia do músculo formando um andaime molecular para diferentes estruturas, como receptores, canais iônicos e moléculas de sinalização (ERVASTI; SONNEMANN, 2008).

Figura 1 - Estrutura geral da formação do complexo glicoproteínas-distrofina (CGD)

(Fonte): (LEWIS et al., 2009)

Notas: No esquema, a distrofina está representada pela estrutura Dp427, que está associada a actina de membrana do citoesqueleto (MAC) e as glicoproteínas (GP). Este complexo faz a ligação do sarcolema à MAC o que permite a conexão com citosol com a matriz extracelular (ME). A deficiência da Dp427 causa uma grave redução na formação do CGD, o que diminui a ligação entre ME e MAC, gerando anormalidades que irão causar degeneração muscular grave (adaptado de Lewis et al., 2009).

A deficiência em Dp427 no complexo glicoproteína-distrofina causa perda de estabilidade do complexo, de forma que em pacientes afetados pela DMD, os níveis de glicoproteínas que participam do complexo, como distroglicanas, sarcoglicanos e sintrofina, estão reduzidos uma vez que sem o suporte estrutural da distrofina estas glicoproteínas são rapidamente dispersas (OHLENDIECK et al., 1993).

Como resultado, ocorrem alterações crônicas relacionadas a atividade proteolítica, a qual pode ter efeito sobre a integridade da distrofina, além de afetar o

metabolismo energético das células, mecanismos que podem causar um desgaste grave do tecido muscular e diminuição da sua força, levando a uma falência na contração muscular (LEWIS et al., 2009).

Portanto, no desenvolvimento da DMD, a ausência e/ou disfunção da distrofina leva a necrose e uma diminuída capacidade de regeneração da fibra muscular. Esse quadro se perpetua ao longo do curso da doença (CHARGÉ; RUDNICK, 2004).

3.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA DMD

Diversos modelos animais são considerados para o estudo da DMD, o que tem contribuído para o conhecimento dos mecanismos moleculares desta distrofia, além de contribuir para o desenvolvimento de opções de tratamentos para indivíduos afetados pela doença (CONOLLY et al., 2001).

O camundongo mdx foi o primeiro a ser reconhecido como modelo animal, por sua mutação glicolítica ligada ao X no qual ocorre necrose das miofibras. Outras características que definiram este animal como modelo para DMD foram a ausência de distrofina e a diminuição de seus níveis de RNAm (CHAMBERLAIN et al., 1987).

Entretanto, a capacidade de regeneração das fibras musculares, relacionada à presença de utrofina, uma proteína homóloga à distrofina que pode ser encontrada na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular em animais saudáveis (GRADY et al., 2000.), gerou questionamentos a respeito da similaridade genética desses animais com humanos. Após alguns estudos de mapeamento do DNAm, confirmou-se que a mutação estaria de fato localizada no gene da distrofina desses animais, o qual é homólogo ao gene *DMD* em humanos (SICINSKI et al., 1989).

Outro modelo animal refere-se ao camundongo deficiente em distrofina e utrofina (mdx:utrn2/2) (STRAU et al., 1997.). Este modelo mimetiza o fenótipo da DMD em humanos. Porém, os animais apresentam escoliose, contraturas e morte prematura, além de serem animais menores e mais fracos o que dificulta analisar a eficácia das estratégias de tratamento. Entretanto, este tipo de animal é necessário para o estudo de severidade de doença (DECONICK et al., 2001).

Além dos camundongos, outros animais apresentam uma progressão de distrofia que se assemelha ao que é observado em humanos (KORNEGAY et al., 1988). Como o gene da distrofina é conservado em relação ao tamanho e função entre mamíferos, as distrofinopatias originárias de mutações espontâneas durante a gametogênese em animais como cães e gatos têm sido descritas (KOENIG et al., 1987).

Particularmente, cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD do ingles “*Golden Retriever Muscular Distrophy*”) e o mais adequado modelo animal para o estudo da fisiopatologia e terapia em DMD, devido às bases genéticas e características fenotípicas da doença entre o cão e o humano são muito similares e tem sido amplamente estudada em ensaios pré-clínicos, considerando principalmente as terapias celular e gênica (KORNEGAY et al., 1988; BERG et al., 2011).

Assim como em humanos, os cães afetados pela GRMD apresentam ausência de distrofina, e conseqüentemente as células musculares morrem à medida que são submetidas a contrações musculares (JORDE, 2004).

Os sinais clínicos da distrofia muscular nos cães são observados logo após o nascimento pela presença de maior frequência disfagia, enrijecimento dos membros pélvicos com atrofia e hipertrofia muscular seletiva, desvio de eixo dos membros, hipertrofia da língua, fraqueza muscular e contraturas musculares (BERGMAN et al., 2002).

Assim, a utilização de um modelo animal não só torna-se importante no estudo da DMD, como apresenta-se como uma abordagem essencial para o estudo da fisiopatologia da doença e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que possam contribuir para a melhora da qualidade e expectativa de vida dos pacientes afetados pela distrofia.

3.4 CÉLULAS SATÉLITE

O reparo ou reposição de músculo esquelético após injúria ou durante um processo patológico de degeneração e regeneração muscular é mediado por células

satélites, presente em nichos de células-tronco do tecido muscular. Fisiologicamente, estas células ficam quiescentes no tecido, e são ativadas e” em resposta a danos associados a diversos fatores, como fatores de crescimento e óxido nítrico (BERG et al., 2010).

Para recrutamento destas células, as mesmas apresentam dois mecanismos diferentes de divisão, o que também está relacionado com a capacidade das células-satélites de auto renovação. Um dos mecanismos consiste na divisão assimétrica, na qual células-filhas são geradas, por grande parte das células-satélites, para que haja diferenciação miogênica. Enquanto isso, uma pequena parte das células irá gerar células filhas responsáveis pela auto-renovação. O outro mecanismo corresponde à divisão simétrica, que consiste na geração de duas populações de células-filhas idênticas. Tais mecanismos sofrem influência da expressão de genes envolvidos, bem como da localização nos tecidos e do ambiente (MOTOHASHI; ASAKURA, 2014).

Apesar de todo o potencial de renovação das células satélites, a capacidade destas células em diferenciar-se está esgotada em pacientes DMD. Estudos recentes sugerem a existência de população de células-tronco adicionais podem ser recrutadas ou podem participar na regeneração muscular para formação de miotubos funcionais na DMD (COSSU; BIRESSI, 2005).

Funcionalmente, estas células irão reiniciar o ciclo celular, expressando fatores de transcrição específicos para o músculo e conseqüentemente irão se diferenciar e se fundir umas com as outras ou com miofibras pré-existentes para reparar e repor o tecido muscular lesionado (HAWKE; GARRY, 2001; SHI; GARRY, 2006).

As células satélites possuem alto grau de plasticidade e potencial de diferenciação em células de linhagem miogênica, de forma que irão fundir-se entre elas mesmas e com miofibrilas já existentes, para que haja regeneração de músculo esquelético (BERG et al., 2010). Além disso, já foi descrito que as células apresentam potencial para diferenciação em linhagens celulares não musculares (HAWKE; GARRY 2001) em resposta a dependem de sinais específicos (JACKSON et al., 1999; MOTOHASHI; ASAKURA, 2014).

Essa plasticidade celular é uma propriedade característica à este tipo celular, uma vez que estudos recentes demonstraram que as células satélites de músculo esquelético adulto são também capazes de gerar componentes derivados do

mesoderma, como de tecido hematopoiético (JACKSON et al., 2003). Ainda, potencial de diferenciação destas células em linhagens celulares de outras camadas germinativas, como células neuronais já foi descrito (TAMAKI et al., 2005).

Ao mesmo tempo, tem aumentado o interesse na capacidade de transdiferenciação entre células progenitoras musculares e células da linhagem adipogênica, o que consiste na diferenciação de células originamente comprometidas para linhagem musculares, e que não são mais células pluripotentes, em células adipogênicas (HU et al., 1980). Para isso, alguns estudos têm investigado como ambas as vias de diferenciação podem acontecer, sugerindo que componentes reguladores de diferenciação, como receptor da ativação da proliferação do peroxissomo (PPAR) nas células satélites resulta na transdiferenciação de miofibras em células de linhagem adipogênica (ROSS et al., 2000; VERTINO et al., 2005).

Apesar de todo o potencial que estas células apresentam, estudos futuros são necessários para decifrar a capacidade dos progenitores miogênicos na geração de diferentes tipos celulares *in vivo*, com o objetivo de aprimorar o conhecimento do processo de regeneração para desenvolver terapias não somente para DMD, mas como para diversas doenças musculares (BERG et al., 2010).

3.5 ÁCIDO URSÓLICO

Os isoprenóides, comumente chamados de terpenóides, compreendem uma classe de moléculas consideradas como metabólitos de plantas, e são componentes essenciais na dieta (ISABELLA et al., 2012).

Além das inúmeras funções desempenhadas nas plantas, os terpenóides apresentam importantes papéis farmacológicos, como na quimioterapia em casos de câncer ovariano e carcinoma mamário (SLEE et al., 1998). Apesar dos avanços na extração desses compostos das plantas, pouco se sabe a respeito das vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos mesmos (IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008).

O Ácido Ursólico (AU) ou ácido 3 β -hidróxi-12-urs-12-en-28-óico é um ácido carboxílico triterpenóide pentacíclico, foi já considerado como biologicamente inativo

(LIU, 1995). Entretanto, nos últimos anos foram descobertos efeitos farmacológicos associados à baixa toxicidade deste composto (NOVOTNY et al., 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o AU apresenta funções biológicas importantes, como antitumoral na leucemia, no câncer de pele e até mesmo como anti-alérgico (NAJID et al., 1992; HUANG et al., 1994; RYU et al., 2000).

Recentemente, o ácido ursólico (AU) foi identificado como uma molécula capaz reduzir a atrofia do músculo esquelético em pacientes com lesão medular. O tratamento prolongado com AU levou o aumento da fosforilação da proteína quinase Akt (*do ingles*: “serine/threonine-protein kinases”) e da via IGF1/AKT. Além disso, acredita-se que o AU pode, não só prevenir a atrofia muscular, como também aumentar a massa e força dos músculos, o que o torna um candidato para o tratamento do desgaste muscular em uma grande variedade de condições humanas (KUNKEL et al., 2011).

Além disso, um estudo *in vivo* recente mostrou tratamento agudo com AU somente induz a fosforilação da AKT na Thr308 (OGHASAWARA et al., 2013). Uma vez que a Thr308 é necessária para ativação da AKT juntamente com a fosforilação da Ser473 (SARBASSOV et al., 2005) são necessários para a ativação mTORC1 (ORGASAWARA et al., 2013).

mTOR (*do ingles*: “mammalian target of rapamycin”) um complexo serina/treonina quinase regula as vias metabólicas celulares em resposta a estímulos ambientais, entre elas a produção de proteínas. mTOR é parte de dois complexos multiproteicos, mTORC1 e mTORC2 que possuem funções distintas (WULLSCHLEGER et al., 2006; GUERTIN; SABATINI, 2007). O complexo mTORC1 desempenha um papel regulador importante durante o processo de hipertrofia de células de músculo esquelético (BODINE et al., 2001).

Além do mais, exercícios de alta intensidade levam a fosforilação de fatores de sinalização “downstream” ao mTORC1 tais como p70S6K e rpS6 (SARBASSOV et al., 2005), a associação do tratamento com AU após o exercício manteve os níveis de fosforilação destas moléculas por pelo menos 6 h (OGASAWARA et al., 2013).

Em contraste, um recente estudo, *in vitro*, demonstrou que o tratamento de miotubos (linha ATCC# C2C12) com 50 μ M de AU levou a inibição de mTORC1 (OU et al., 2014).

Figura 2 - O Ácido ursólico ativa a cascata de IGF-1 por aumento da Akt -1 fosforilação *in vivo* e, consequentemente, diminui a apoptose das células tratadas. Diretamente assim inibindo a PTPB1 que desfosforila o IGF-I e os receptores de insulina

Fonte: (OU et al., 2004)

Além disso, um estudo sobre os efeitos do AU sobre miotubos totalmente diferenciados *in vitro*, revelou que houve um acúmulo de proteínas mas não altera taxa de proliferação destas células. Ainda, AU mostrou-se ser tóxico para os miotubos *in vitro* em altas concentrações (FIGUEIREDO; NADER, 2012). No entanto, não se sabe o efeito do AU sobre as células não diferenciadas, e também em linhagens primárias de células satélites.

Esses dados sugerem uma função mais pleiotrópica do AU sobre as células musculares. Uma vez que baixas doses podem potencializar e em doses mais altas levar ao bloqueio das vias anabólicas *in vitro*. Mais estudos focando o efeito dose/resposta do AU são necessários para identificar quais e como as vias anabólicas são moduladas pelo tratamento de células musculares com AU.

3.6 EPIGENÉTICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Todas as células do organismo possui uma copia completa de seu material genético, o que regula a diferenciação celular desde as primeiras do desenvolvimento embrionário são os mecanismos de regulação epigenética. O termo epigenética vem do grego onde “epi” = sobre, acima, portanto epigenética é o estudo dos mecanismos de expressão gênica sem alteração da sequência do DNA.

Os mecanismos epigenéticos compreendem em um conjunto de características herdáveis na cromatina que regulam a diferenciação celular de forma extrínseca ao DNA. Esses mecanismos epigenéticos podem regular desde da iniciação da transcrição de um determinado gene, durante a edição do RNA mensageiro até no processo final de enovelamento das proteínas (WATSON, 2006). Dentre os mecanismos de regulação epigenética podemos citar a metilação e hidroximetilação das ilhas CpG do DNA, as modificações pós-traducionais das caudas das histonas, expressão de RNAs não codificantes e a metilação, oxidação e edição do RNA mensageiro. A metilação do DNA corresponde à adição enzimática de um grupo metil à uma citosina, mecanismo essencial para o desenvolvimento e diferenciação celular em processos como impressão gênica, inativação do cromossomo X e silenciamento de elementos transponíveis (FEIL; FRAGA, 2012; JONES, 2012). Tanto em animais como em plantas, a metilação do DNA na região promotora está altamente relacionada com um silenciamento transcricional (JONES, 2012).

Figura 3 - Modelo Esquemático de citosina na qual um grupo metilo é ligado ao carbono 5-Metilcitosina, alterando a metilação do DNA

Fonte: (JONES, 2012)

A hidroximetilação tem sido identificada como um novo marcador epigenético que e esta relacionada com o processo de demetilação ativa (MENSAERT et al., 2014). Até o momento, uma importante função descrita para a hidroximetilação demonstrou que este mecanismo é crítico para o desenvolvimento do cérebro, onde genes responsáveis por diferenciação neuronal são encontrados (PFEIFER et al., 2013).

Figura 4 - Modelo esquemático da conversão da 5-mC à 5-hmc e consequentemente a C

Fonte: (PFEIFER et al., 2014)

Esses mecanismos epigenéticos estão também envolvidos nos processos de diferenciação, formação, crescimento e reparação muscular. Recentemente, estudos de mapeamento global das marcações epigenéticas demonstraram a localização e os genes afetados por estas marcações durante a miogenese (TSUMAGARI et al., 2013; TERRAGNI et al., 2014) .

Tsumagari et al. (2013) mapearam as alterações na metilação do DNA ligadas a miogenese utilizando o modelo de diferenciação do mioblasto mononuclear em miotubos multinucleados em 16 linhas celulares humanas, demonstrou que há hipermetilação associada a genes que codificam sequência-específica fatores de

transcrição durante a miogenese e grande parte desta hipermetilação é perdida após a diferenciação em músculo esquelético.

O músculo esquelético possui o DNA hipometilado que está fortemente associado com a expressão de genes que codificam as proteínas do músculo-específica. Essa hipometilação do DNA no músculo esquelético pode ser consequência da alta expressão de TET2 e TET1 em relação aos outros tecidos, uma vez que 5h-mC é duas vezes maior no musculo esquelético em comparação aos seus progenitores (TSUMAGARI et al., 2013).

A via de ativação NOTCH é uma via intercelular, essencial para o comprometimento da célula para uma linhagem durante a diferenciação, especialmente em células progenitoras e células tronco. Está também envolvida no controle da proliferação, sobrevivência, e homeostase em muitos tipos de células. Dados recentes mostraram que a regia intergênica de genes NOCTH e seus receptores é hipometilada e possui um alto nível de hidroximetilação (~38%) que pode ser responsável para a regulação dos elementos da via de ativação NOTCH no músculo esquelético (TERRAGNI et al., 2014).

No caso das distrofias musculares, a decisão de regenerar ou não as fibras lesionadas é regido por mecanismos epigenéticos. Por exemplo, as células satélites muitas vezes são direcionadas a transdiferenciação em fibro-adipócitos ao invés de promover a regeneração do músculo distrófico (UEZUMI et al., 2011).

O uso de agentes modificadores de cromatina, tais como inibidores da histona-desacetilase (HDACi) apresentam um grande potencial para o tratamento da DMD (CONSALVI et al., 2011; BRINKMEYER-LAGNFORD; KORNEGAY, 2013). No modelo mdx murino, HDACi aumentou o diâmetro da fibra muscular, diminuiu o infiltrado inflamatório e a formação de tecido fibroso de cicatrização (MINETTI et al., 2006; CONSALVI et al., 2011). No entanto, o uso das HDACi não foi relatado no modelo GRMD tratamento em cães GRMD.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O anticorpo anti-5 methylcytidine (5-mC, clone 33D3, 0.1 mg/mL, Cat# sc-56615) foi obtido pela Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA, EUA. O anticorpo anti-5 hydroxymethylcytosine (5-hmC, polyclonal, 0.25 mg/mL, Cat# AP9160a) pela Abgent - San Diego, CA, USA. O controle de isótipo anti-IgG de camundongo (clone MOPC-21, Cat# M5284) e o ácido ursólico foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Company - Saint Luis, MO, EUA. O controle de isótipo anti-IgG de coelho (polyclonal, Cat# ab27478) pela Abcam - Cambridge, MA, EUA. O “kit” de revelação da reação de imunohistoquímica utilizado foi Dako Advancetm HRP (Cat# #K4069) DAKO - Carpinteria, CA, EUA. O reagente Triton x-100 (Cat# 0694-1L) foi obtido pela Sigma-Aldrich Chemical Company - Saint Luis, MO, EUA.

Todos os reagentes utilizados para cultivo celular foram adquiridos da Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), e os kits utilizados para a análise de expressão de proteínas totais foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Chemical Company - Saint Luis, MO, EUA.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados animais provenientes do canil GRMD Brasil, no Departamento de Anatomia, Setor de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo com o protocolo de número: 8673220814, com data de aprovação pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) no dia (15 /10 /2014).

Os animais foram identificados como portador/afetado por análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de DNA (RFLP, do Inglês: *Restriction fragment length polymorphism*). O DNA genômico foi extraído utilizando kit GFX (GE Healthcare, Cat# 28-9034-66, Pittsburgh, PA, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, foi feito PCR utilizando dois primers, localizados no exon 6 (GR1) e intron 7 (GR2), produzindo um produto de 310 pares de bases (GR1 CTTAAGGAATGATGGGCATGGG exon 6) (GR2 ATGCTAGTTTCTCTCTATCTGC intron 7), Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel Agar-TBS 1% para separação e visualização da presença dos fragmentos de interesse.

Foram utilizados 11 cães da raça Golden Retriever provenientes de 03 ninhadas filhos de mães portadoras e pais hígidos (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do delineamento experimental utilizados

Fonte: (MARTINS, A. A., 2014)

Os animais foram distribuídos em grupos de acordo com a condição genética (portador versus afetado) e idade (jovens versus adultos): Grupo I: três cães jovens afetados pela GRMD (duas fêmeas e um macho – 6 meses de idade); Grupo II: três

cães jovens portadores pela GRMD (três fêmeas – 6 meses de idade); Grupo III: três cães adultos afetados pela GRMD (duas fêmeas e um macho – idade média 4,3 anos $\pm$ 2,5 de idade [de 2 a 7 anos]); Grupo IV: três cães adultos portadores pela GRMD (três fêmeas – idade média 4,3 anos $\pm$ 2,5 de idade [de 2 a 7 anos]) (Tabela 1).

Tabela 1 - Animal, Idade e Grupo dos animais utilizados em cada etapa do experimento

Animal	Grupo	Idade	Análises realizadas			
			HE	Imunohistoquímica	AU-MTT	AU-MTT + proteínas totais
1	Afetada	6 meses	x	X	X	X
2	Afetada	6 meses	x	X	X	X
3	Afetada	6 meses	x	X	X	X
4	Afetada	6 meses	x	X	X	X
5	Afetada	2 anos	-	-	X	X
6	Afetada	4 anos	-	-	X	X
7	Afetada	7 anos	-	-	X	-
8	Portadora	6 meses	x	X	X	X
9	Portadora	6 meses	x	X	X	X
10	Portadora	2 anos	-	-	X	-
11	Portadora	4 anos	-	-	X	X
12	Portadora	7 anos	-	-	X	X

4.3 BIÓPSIA MUSCULAR

A coleta de fragmentos musculares foi obtida do músculo vasto lateral, que compõe conjunto muscular quadríceps femoral de cada um dos cães incluídos no experimento. Foi retirado um fragmento 1 cm³, por incisão direta por com o auxílio

de um bisturi. A fluidoterapia de manutenção foi estabelecida pelo acesso venoso da veia cefálica em seguida submetidos o seguinte protocolo anestésico: associação de maleato de acepromazina [0.05 mg/kg (Acepran®, Univet, São Paulo, Brasil)] e cloridrato de tramadol [2mg/kg, (Tramal®, Pfizer, São Paulo, Brasil)] via intramuscular. O bloqueio local foi realizado por anestesia infiltrativa de cloridrato de lidocaína 2 % sem vasoconstritor [(7 mg/kg, Lidol 2 %, Hipolabor Farm, São Paulo, Brasil)] para o acesso na pele, subcutâneo e fascia muscular. No momento da coleta do fragmento muscular foi administrado Propofol [2.5 mg/kg, (Propofol - genérico, Eurofarma, São Paulo, Brasil)] por via intravenosa. O tratamento pós-operatório imediato consistiu na administração de dipirona [25 mg/kg, (D-500®, Fort Dodge Saúde Animal)] via intravenosa para analgesia durante três dias e antibioticoterapia à base de cefalexina [30 mg/kg, (Cefalexina - genérico, Eurofarma São Paulo, Brasil)] BID, por 7 dias.

Após a coleta, os fragmentos de biopsia foram divididos em duas partes: uma parte foi fixada em paraformaldeído 4 % para análises histológicas e outra foi utilizada para o isolamento e cultivo primário de células musculares.

4.4 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS PARA HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Após 24 de fixação, as amostras foram processadas por um gradiente crescente de alcoóis e xilóis, em intervalos de 40 minutos cada iniciando com álcool 70%, álcool 95%, álcool 100%, álcool 100 II, álcool-xilol (50%-50% v/v), xilol I, xilol II, parafina I e parafina II `a 56-58 °C. Após essa desidratação os fragmentos emblocados utilizando-se formas montadas com barras de ferro em formato de “L” preenchidas de parafina até a borda.

4.5 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas lavadas com solução sulfocrômica (100 mL de água destilada, 100 g de bicromato de potássio, 1 L de ácido sulfúrico e enxaguadas com abundância em água corrente e secadas em estufa a 67 °C e desengorduradas com solução de 50% de álcool e 50% de éter. Após secagem as lâminas foram silanizadas (solução de silano: 200 ml de acetona e 8ml de silano), passaram por três banhos, o primeiro contendo silano a 4% em acetona por um minuto; o segundo contendo acetona por um minuto e em seguida em água destilada fazendo rapidamente quatro mergulhos e deixando secar a temperatura de 37 °C

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA: EOSINA

Após o protocolo de desparafinização, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina, (TOLOSSA et al., 2003) para identificação das alterações histopatológicas no músculo de cães distróficos e de portadoras da Distrofia Muscular de Duchenne. Depois de coradas, as lâminas foram fotomicrografadas em Zeiss com a câmera Leica.

4.6.1 Imunohistoquímica de 5-mC e 5h-mC

Os protocolos foram estabelecidos por Grazul-Bilska et al. (2011) e Haffner et al. (2011). Os músculos foram seccionados com espessura de 4 µm e montados em lâminas silanizadas e desparafinados em concentrações decrescentes de xilol e reidratados em séries crescentes de álcool. Os cortes foram impermeabilizados em solução de tampão (PBS 1x) e, em seguida, foram imersos a solução de HCl a 3,5N

por 20 min na estufa a 37 °C para desnaturação do DNA. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3 % peróxido de hidrogênio em água destilada por 20 min sobre proteção de luz. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com 2 % de soro de cavalo em solução de fosfato tamponado (PBS: do inglês *phosphate buffered solution*) por 30 min. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos para anti-5-mC (1:50) e para anti-5-hmC (1:100) por aproximadamente 16 horas (*overnight*) em câmara úmida a 4 °C. A reação foi revelada utilizando o kit Dako Advance HRP, tanto para a 5-mC como para 5-hmC. As reações foram visualizadas pela precipitação da diaminobenzidina (DAB) e contra-coradas com hematoxilina. Para cada reação foi realizado um controle negativo com o controle de isotipo anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho. Entre cada passo, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 min cada. Após a incubação com o anticorpo primário, foi adicionado 0,2% de soro de cavalo no PBS de lavagem, por 3 vezes durante 5 minutos.

Para análise semi-quantitativa dos níveis de 5-mC e 5-hmC, 10 campos randômicos de cada amostra foram foto documentados com aumento de 400x (ocular=10x e objetiva=40x), usando o microscópio Zeiss Axioplan e a câmera Leica DM1000 (São Paulo, São Paulo). Usando o programa Image J software (v. 1.44p), as células foram quantificadas e classificadas pela presença/ausência da reação positiva nos três tipos células (células fibroblásticas, intersticiais e musculares). Os valores obtidos foram multiplicados por 15, uma vez que o campo possui uma área de 0,067 para converter o número final para células por mm² de acordo com Loughlin et al. (2007).

4.6.2 Isolamento e Cultivo Primário de Células Musculares

Os fragmentos obtidos a partir da biópsia dos cães foram dissociados mecanicamente e digeridos com 0,1% de collagenase tipo IV por 3 h à 38,5 °C para dissociação celular. Com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, os fragmentos foram finamente cortados, e transferidos para um tubo falcon estéril de 15 mL com 3 mL da solução de collagenase para digestão enzimática por 3 horas na estufa à 38,5 °C. Após 3 horas de digestão, o sobrenadante foi coletado e centrifugado para

obtenção do sedimento de células dissociadas. O sedimento celular foi ressuspenso em 3 ml de meio de cultivo DMEM, suplementado com soro fetal bovino 10%, antibiótico 1%, piruvato Na 0,1%, aminoácido não essencial 1% na placa de cultivo e as células foram semeadas em placas de cultivo estéreis e incubadas a $38,5^{\circ}\text{C}$ e atmosfera 5% CO_2 . As células foram repicadas quando atingiram 70 a 80% de confluência. Após o crescimento celular as células foram submetidas duas passagens de cultivo para expansão da linha celular.

Após a expansão, as células foram criopreservadas em solução de congelamento composta por DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (Cat#:11965-092), Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino e armazenadas em nitrogênio líquido.

Para a realização dos experimentos as células foram rapidamente descongeladas transferidas para um tubo falcon contendo 5 mL do meio de cultura DMEN| F-12 (Cat#: 12400-016), Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), 10% soro fetal bovino, 1% antibiótico, 0,1% piruvato Na, 1% amino-ácidos não essenciais. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento celular resuspenso em meio de cultivo DMEN F-12. A concentração celular foi estimada com auxílio hematocitometro e foi ajustada a 5×10^4 células/mL para realização dos experimentos descritos abaixo.

4.6.3 Ensaio de toxicidade do ácido ursólico sobre a célula muscular in vitro

Mioblastos na terceira passagem foram plaqueados em duplicata (5×10^4 cels/poços) em placa de 96 poços. As células foram cultivadas em meio de crescimento (DMEN| F-12 (Cat#: 12400-016), GIBCO, Nova York, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 ml de penicilina, 0,1ml de estreptomicina e 1 ml de L- glutamina) por 2 dias ou até atingir 50% confluência. As células foram então tratadas com ácido ursólico nas concentrações 0 μM ; 5 μM ; 10

μM , 20 μM em DMSO por 48 h. Após o tratamento, a viabilidade e proliferação celular foram estimados pelo ensaio colorimétrico de MTT.

4.6.4 Ensaio de proliferação e viabilidade celular por MTT

Para estimar a proliferação e a viabilidade celular foi utilizado o ensaio colorimétrico de metabolização do sal MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio brometo]. Resumidamente, após o tratamento das células com ácido ursólico ou DMSO por 48 h, foi adicionado 10 μL do sal MTT obtido da Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) por 2-4 horas conforme especificações do fabricante. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes tratadas com MTT foram incubadas em 100 μL de solução de HCl (0,04 M) diluída em isopropanol por 5 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ao comprimento de onda 550 nm.

4.6.5 Efeitos ácido ursólico na proliferação e produção de proteínas das células musculares

Mioblastos na terceira passagem foram plaqueados em duplicata (5x10³ cels/poços) em placa de 96 poços. As células foram cultivadas em meio de crescimento (DMEM| F-12 (Cat#: 12400-016), GIBCO, Nova York, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 ml de penicilina, 0,1ml de estreptomicina e 1 ml de L- glutamina) por 2 dias ou até atingir 50% confluência.

As células foram então tratadas com ácido ursólico nas concentrações 0 μM ; 5 μM e 10 μM em DMSO por 48 h. Neste experimento, um controle de células sem veículo ou tratamento com ácido ursólico foi adicionado para avaliar a concentração proteica inicial das células musculares sem a intervenção de fatores externos. Após

o tratamento, a viabilidade e proliferação celular foram estimados pelo ensaio colorimétrico de MTT e a concentração das proteínas totais foi estimado pelo método colorimétrico de Brad Ford.

4.6.6 Quantificação das proteínas totais

Extração de proteínas pelo método de Trizol®

Após tratamento com ácido ursólico, 100 µL do reagente Trizol® foi adicionado à placa de 96 poços, e cada amostra foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL para o protocolo de extração de proteína. À cada amostra foi adicionado 40 µL clorofórmio, e estas foram então incubadas por 5 minutos e centrifugadas por 1.2000 g por 15 minutos a 4°C. A fração transparente de RNA foi descartada e imediatamente adicionou-se 150 µL de álcool 100% etílico absoluto. Os tubos foram homogenizados por suaves inversões, incubados por 3 minutos e centrifugados a 6000 g por 5 minutos a 4 °C, removendo o sobrenadante e colocando em outro tubo. Foi adicionado ao pellet 300 µL de álcool isopropílico, incubado por 10 minutos e centrifugado 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi realizada uma lavagem, com a solução de 200 µL de solução alcoólica de hipocloreto de guanidina 0,3 M seguido por repouso por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugado 8000g por 5 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL de álcool etílico, incubado por 20 minutos e centrifugado 8000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o pellet precipitado seco foi ressuscitado em 50 µL de uréia, o qual foi estocado a - 80°C.

4.6.7 Quantificação de proteínas totais por Bradford Reagent®

A quantificação de proteínas totais foi realizada em duplicata utilizando o Kit Bradford Reagent® (Cat#: 0694-1L) Sigma-Aldrich Chemical Company - Saint Luis, MO, EUA), conforme especificações do fabricante. Para a construção da curva-padrão realizou-se uma diluição seriada a partir de uma solução padrão, composta por BSA 2mg/mL. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 2mg/mL, 1,5mg/mL, 1mg/mL, 750mg/mL, 500mg/mL, 250mg/mL. O procedimento seguinte constituiu em pipetar em cada poço as soluções em duplicata: 125 µL de Bradford Reagent®, 5 µL de amostra e novamente 125 µL de Bradford Reagent®. A placa foi homogenizada por 15 minutos e a leitura realizada no espectofotometro Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) em comprimento de onda de 596 nm.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS

Os dados de proliferação celular (MTT); quantificação das proteínas totais e quantificação dos níveis de 5mC e 5hmC foram analisados pela análise de variância dos mínimos quadrados (ANOVA) usando o procedimento GLM do programa Statistical Analysis System (SAS para Windows, Versão 9.4, Cary, NC, EUA). O modelo matemático inclui os efeitos principais animal, grupo, idade e tratamento e suas interações. Animal foi considerado efeito randômico enquanto os outros efeitos principais foram considerados fixos.

Resultados

5 RESULTADOS

Foram realizadas biópsias do quadríceps femoral de cães afetados e portadores pela distrofia muscular de Duchenne aos 6 meses de idade (Figura 6). A Figura 6A-B representam cortes histológicos transversais. Nos animais afetados é evidente heterogenidade com relação ao tamanho e organização das fibras musculares (Figura 6A-B), as quais são menores do que as fibras musculares de cães portadores (Figura 6C-D).

Os animais afetados pela doença apresentam fibras em processo de degeneração com intensa desorganização das miofibrilas por edema e aparência flocular (Figura 6A-B). Nos animais portadores, a grande maioria das fibras musculares são bem homogêneas, com maior organização das miofibrilas (Figura 6C-D). No entanto, há a presença de algumas fibras em estágio de degeneração com edema entre as miofibrilas. Isso ocorre porque no durante o crescimento o animal portador passa por uma fase de destruição das fibras musculares que expressão a distrofina alterada até a re-população do músculo afetado por fibras com expressão normal de distrofina.

Na figura 6B, há a presença de intenso infiltrado inflamatório composto por células de núcleos pequenos e de cromatina densa característico de linfócitos e algumas células alongadas com características de histiócitos. Esse intenso processo inflamatório ocorre, em resposta a lesão muscular, para eliminação de debris celulares das fibras destruídas.

Figura 6 - A-B, Fotomicrografias de músculo esquelético (quadríceps femoral) de cão distrófico

Fonte: (MARTINS, 2014).

Legenda: A-B. Corte transversal. Em A, a presença de fibras musculares (Fm) com núcleos periférico (setas contínuas). Notar o desarranjo e as diferenças no diâmetro das fibras musculares (Fm), estas, externamente são circundadas pelo perímio (Pm) e internamente pelo endomísio (En), ambos constituídos por tecido conjuntivo. Em B, na região destacada (círculo) há um intenso infiltrado inflamatório (círculo) em torno dos capilares sanguíneos (C) característicos em animais distróficos ou em músculos em estágios de reparação tecidual. Em C e D: o corte transversal das fibras musculares dos cães portadores. Observar a organização e homogeneidade das fibras musculares (Fm), as quais apresentam núcleos periféricos com a cromatina mais densa na região de endomísio (En) em relação aos animais afetados. Uma fina camada de perímio vascularizado (V) reveste as fibras musculares. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento: 40x. Setas tracejadas indicam os fibroblastos

5.1 IMUNOHISTOQUÍMICA DE 5-MC E 5-HMC

A hipótese inicial era de que animais afetados pela distrofia muscular apresentam menores níveis de metilação e hidroximetilação global em consequência

ao intenso processo de destruição/reparação tecidual. Foram avaliados por meio da análise de imunohistoquímica os níveis globais de 5-mC e 5-hmC no tecido muscular em animais afetados e portadores pela distrofia muscular de Duchenne aos seis meses de idade.

5-mC – cães portadores

Os cães portadores apresentam em geral forte intensidade de marcação tanto para 5-mC dos núcleos das células musculares e fibroblásticas (Figura 7 A-B), com a presença de nicho de células na região do endomísio também fortemente marcados (Figura 7-B) indicando um alto nível de metilação global do DNA nestas células. No entanto, em algumas regiões as células musculares e fibroblásticas apresentaram um grande número de células negativas e/ou levemente marcadas para 5-mC, que sugere que a ocorrência de processos de remodelação/regeneração tecidual mesmo em animais afetados (Figura 7 C-D).

Figura 7 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo-esquelético de cão portador submetido a imunohistoquímica para 5-mC

(Fonte: MARTINS, 2014)

Legenda: Em **A**: intensa marcação de núcleo de células musculares (seta preta) e de fibroblasto intensamente marcado (seta tracejada); em **B**: presença de nicho de células intersticiais no tecido conjuntivo intensamente metiladas (círculo) próximo a outro nicho de células intersticiais com diferentes níveis de metilação (círculo tracejado) e **C** - diferentes níveis de marcação para 5-mC das células musculares. Observar as células musculares com diferentes níveis de metilação global (círculo). **D**- intensa marcação de núcleo de células musculares (seta preta), núcleo de fibroblasto levemente metilado (seta tracejada), nicho de núcleo de célula do tecido conjuntivo em diferentes níveis de metilação global (círculo tracejado) e núcleo de células musculares em diferentes níveis de metilação global (círculo). **E**- controle de isótipo. IgG camundongo 1: 100. Contra-coloração: Hematoxilina. Aumento-40x

5-mC – cães distróficos

Os cães distróficos apresentaram uma marcação mais heterogênea dos núcleos das células musculares, que variam desde células negativas a células fortemente marcadas para 5-mC (Figura 8 A-B). Em geral, os núcleos menores, achatados e com cromatina mais densa semelhante com os encontrados nos animais portadores, apresentam uma marcação mais intensa para 5-mC (Figura 8A). Já, os núcleos maiores, mais ovalados com a cromatina mais froxa e nucléolo proeminente, apresentam uma marcação mais tenue para 5-mC, o que indica que esses núcleos possuem uma maior atividade de transcrição/tradução celular (Figura 8 C-E). Na figura 8 D-E foi observado a presença de cordões de mioblastos com diferentes níveis de marcação para 5-mC. Esses cordões de mioblastos foram raras ou não encontradas nas amostras analisadas provenientes de animais portadores. Da mesma forma, o endomísio apresenta núcleos de células musculares e fibroblastos intensamente corados e metilados (Figura 8). Além disso, a figura 8-C apresenta nichos de núcleos de células satélites, no interstício, com diferentes níveis de metilação. Na região do tecido de conexão, como esperado, os núcleos do infiltrado inflamatório apresentam forte marcação para 5-mC (Figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografia de corte transversal de músculo-esquelético de cão distrófico, demonstrando resultados da Imunohistoquímica para 5-mc

Fonte: (MARTINS, 2014)

Legenda: **A-** No tecido conjuntivo (Tc), intensa marcação e maior localização de células musculares (seta preta), núcleo de fibroblasto levemente metilado(*). No endomísio, presença de fortes núcleos corados em células musculares (seta) e núcleos de fibroblastos intensamente metilados na região do endomísio (seta tracejada). **B-** No interstício há intensa marcação e núcleo de fibroblastos intensamente metilados (seta preta), e presença de cordão de núcleos de mioblastos intensamente metilados (círculo). O Tc apresenta núcleos de células com diferentes níveis de metilação global em diferentes estágios (círculo tracejado). No endomísio observam-se núcleos de células musculares (seta tracejada). **C-** Abundante Tc concentrado de núcleo células musculares intensamente metiladas (seta), núcleo de fibroblasto intensamente metilado (seta tracejada). No interstício há nicho de núcleo de células satélites com diferentes níveis de metilação no (círculo) e núcleos de células intensamente metiladas(*). Na região do endomísio observa-se célula muscular levemente metilada (seta branca). **D-** No interstício, núcleo de fibroblasto levemente metilado (seta preta), nicho de núcleo de células musculares com níveis de metilação global em diferentes estágios, núcleo de célula metilada (seta tracejada) e núcleo de célula muscular (seta branca). Na região do endomísio pode-se observar cordão de mioblastos em diferentes estágios de metilação global (círculo tracejado). **E-** Observa-se a presença de núcleo de fibroblasto levemente metilado (seta preta) e núcleo de célula muscular levemente metilada na região do endomísio (seta tracejada). O interstício apresenta núcleo de célula muscular intensamente metilada (seta branca). **F-** IgG Mouse 1: 100 Controle Isótipo Negativo. Coloração hematoxilina. Aumento- 40x

5-hmC – cães portadores e distróficos

As amostras de músculo esquelético apresentaram um tenue marcação geral para 5-hmC em todos os tipos celulares tanto nos animais afetados como nos

animais portadores (Figura 9). Uma marcante diferença entre os grupos representada na figura 9A, foi que os animais afetados apresentaram maior frequência de células musculares com núcleos aumentados com mais intensa marcação para 5-hmC (seta tracejada). Já os animais portadores, todos os núcleos apresentaram semelhante níveis de 5-hmC (marcação positiva tenue) (Figura 9B).

Figura 9 - Fotomicrografia de corte transversal de músculo-esquelético de cão distrófico (A) e portador (B), demonstrando resultados da imunohistoquímica para 5-hmC

Fonte: (Martins, 2014)

Legenda: **A-** Animal distrófico apresenta no endomísio estão presentes núcleos de células musculares positivas para 5-hmC (seta preta) e núcleos de fibroblastos levemente metilados (seta tracejada). O interstício apresenta núcleos de células do tecido conjuntivo levemente hidroximetilados (seta branca). **B-** Animal portador, observar leve marcação positiva para 5-hmC dos núcleos das células musculares na região do interstício (círculo) e na região do endomísio (seta tracejada). **C-** Controle de isótipo IgG Coelho 1: 250. Contra-coloração Hematoxilina. Aumento- 40x

5.2 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DOS NÍVEIS GLOBAIS DE METILAÇÃO E HIDROXIMETILAÇÃO DO DNA DO QUADRICEPS FEMORAL DE ANIMAIS AFETADOS E PORTADORES AOS 6 MESES DE IDADE

Utilizando técnica de imunohistoquímica, foram estimados os níveis globais de metilacação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) metilação e hidroximetilação em amostras dos animais afetados e portadores. Como anteriormente mencionado, a quantificação foi realizada pela quantificação das células positivas e negativas nos seguintes compartimentos celulares: célula muscular; fibroblasto e interstício de 10 campos randomicamente fotografados. Foram analisados quanto ao número total de células metiladas e quanto à porcentagem de células metiladas em cada grupo.

5.3 FIBROBLASTOS

As células fibroblásticas do quadriceps femoral não apresentaram diferenças em número ou porcentagem de células metiladas, isto é marcadas positivamente para 5-mC entre os animais afetados e portadores (Figura 10 e Tabela 10). Quando os níveis de hidroximetilação, os animais afetados apresentaram quase duas vezes mais células fibroblásticas hidroximetiladas, marcadas positivamente para 5h-mC, em relação aos portadores (Tabela 2), porém essa diferença não atingiu a significância estatística. Relativamente, as células trofoblástica não apresentaram diferenças na porcentagem de células positivas em relação as células totais. Mesmo apresentando um número maior de células positivas para 5-hmC, os animais afetados apresentaram um menor nível de hidroximetilação global em relação ao portadores (Figura 1).

Gráfico 1 - Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células fibroblásticas no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica

Legenda: O eixo Y, no gráfico da esquerda representa o número absoluto de células positivas contadas por campo, enquanto no gráfico da direita a porcentagem de células positivas com relação ao número de células contadas. Em **P**: animais portadores. **A**: animais afetados. **5-mC**: 5-metil-citosina. **5-hmC**: 5- hidroximetil-citosina

Tabela 2 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células fibroblásticas positivas para 5-mC em animais portadores e afetados pela GRMD

	Portador					Afetado			
	N	Média	Std	Min	Max	Média	Std	Min	Max
n. células	3	226.50	148.28	97.50	388.50	239.50	24.93	213.00	262.50
% 5-mC	3	78.95	25.84	49.23	96.14	74.59	5.74	70.42	81.14

Tabela 3 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células fibroblásticas positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD

	Portador					Afetado			
	N	Média	Std	Min	Max	Média	Std	Min	Max
n. células	3	132.02	37.51	94.51	169.52	286.01	95.93	204.01	391.51
% 5-hmC	3	93.47	4.43	88.88	97.72	65.24	12.46	50.86	72.80

5.4 INTERSTÍCIO

As células intersticiais do quadriceps femoral dos animais portadores apresentaram um maior número de células positivas para 5-mC ($P < 0,002$) (Figura 1, Tabela 3). Da mesma forma, os animais portadores apresentaram maior número de células hidroximetiladas, positivas para 5h-mC quando comparadas aos afetados ($P < 0,05$) (Gráfico 1 e Tabela 3). Em relação à porcentagem de células metiladas e hidroximetiladas, no interstício, não houve diferença entre os grupos (Gráfico 2 e Tabelas 3 e 4).

Gráfico 2 - Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células intersticiais no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica

Legenda: O eixo Y, no gráfico da esquerda representa o número absoluto de células positivas contadas por campo, enquanto no gráfico da direita a porcentagem de células positivas com relação ao número de células contadas. Em **P**: animais portadores. **A**: animais afetados. **5-mC**: 5-metil-citosina. **5-hmC**: 5-hidroxi-metil-citosina

Tabela 4 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células intersticiais positivas para 5-mC em animais portadores e afetados pela GRMD

	Portador					Afetado			
	N	Média	Std	Min	Max	Média	Std	Min	Max
n. células	3	207.00	46.16	153.90	237.60	878.40	445.67	440.10	1331.10
% 5-mC	3	68.33	24.96	48.86	96.47	80.11	7.39	75.63	88.64

Tabela 5 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células intersticiais positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD

	Portador					Afetado			
	N	Média	Std	Min	Max	Média	Std	Min	Max
n. células	3	220.00	135.22	118.50	373.50	95.00	6.06	88.50	100.50
% 5-hmC	3	84.20	13.86	74.11	100.00	86.41	11.89	77.97	100.00

5.5 CÉLULA MUSCULAR

As células musculares do quadriceps femoral dos animais portadores apresentaram um maior número de células positivas para 5-mC ($P < 0,001$) (Gráfico 3 e Tabelas 6 e 7). Da mesma forma, os animais portadores apresentaram maior número de células hidroximetiladas, positivas para 5h-mC quando comparadas aos afetados ($P < 0,05$) (Gráfico 3 e Tabela 5). Em relação à porcentagem de células metiladas e hidroximetiladas, no interstício, não houve diferença entre os grupos (Figura 3 e Tabelas 3 e 4).

Gráfico 3 - Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células musculares no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica

Legenda: O eixo Y, no gráfico da esquerda representa o número absoluto de células positivas contadas por campo, enquanto no gráfico da direita a porcentagem de células positivas com relação ao número de células contadas. Em **P**: animais portadores. **A**: animais afetados. **5-mC**: 5-metil-citosina. **5-hmC**: 5-hidroximetil-citosina

Tabela 6 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células musculares positivas para 5-mC em animais portadores e afetados pela GRMD

	Portador					Afetado			
	N	Média	Std	Min	Max	Média	Std	Min	Max
n. células	3	449.10	74.16	402.30	534.60	1196.10	265.38	990.90	1495.80
% 5-mC	3	87.24	10.31	75.66	95.45	82.11	9.79	73.29	92.65

Tabela 7 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células musculares positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD

	N	Portador				Afetado			
		Média	Std	Min	Max	Média	Std	Min	Max
n. células	3	236.00	71.79	184.50	318.00	407.00	138.64	256.50	529.50
% 5-hmC	3	94.26	5.51	88.32	99.19	93.84	7.01	86.21	100.00

5.6 CÉLULAS TOTAIS

Da mesma forma, as células totais apresentaram um maior número de células totais metiladas ($p < 0,0001$) e de células hidroximetiladas ($P < 0,05$) nos animais portadores em relação aos afetados. No entanto, não houve diferenças na porcentagem de células totais metiladas e hidroximetiladas entre os grupos (Gráfico 4 e Tabela 7).

Gráfico 4 - Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células totais no quadriceps femoral de animais afetados ou portadores da distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica.

Legenda: O eixo Y, no gráfico da esquerda representa o número absoluto de células positivas contadas por campo, enquanto no gráfico da direita a porcentagem de células positivas com relação ao número de células contadas. Em **P**: animais portadores. **A**: animais afetados. **5-mC**: 5-metil-citosina. **5-hmC**: 5-hidroxi-metil-citosina

Tabela 8 - Estimativas de médias, números de observações, desvios-padrão, mínimo e máximo para os valores de número absoluto e porcentagem relativa de células totais positivas para 5-hmC em animais portadores e afetados pela GRMD

	Portador					Afetado			
	N	Média	Std	Min	Max	Média	std	Min	Max
n. células	3	588.02	216.54	397.51	823.52	788.01	212.03	607.51	1021.51
% 5-hmC	3	91.33	6.13	85.63	97.81	81.59	8.00	73.58	89.57

5.6.1 5-mC e 5-hmC Global

Finalmente, a análise de metilação e hidroximetilação global demonstraram que não houve diferença entre os grupos estudados em relação à porcentagem de células metiladas (Gráfico 5). Em contrapartida, os resultados demonstraram que a hidroximetilação global dos fibroblastos no grupo de animais afetados mostrou-se menor quando comparada com animais portadores ($P < 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global das células fibroblástica, intersticiais, musculares e totais do quadriceps femoral de animais portadores (barras pretas) ou afetados (barras cinzas) pela distrofia muscular de Duchenne, avaliados por imunohistoquímica

Legenda: O eixo Y, no gráfico da esquerda representa o porcentagem de células positivas para 5-mC, enquanto no gráfico da direita representa o porcentagem de células positivas para 5h-mC. Em P: animais portadores. A: animais afetados.

5.7 ISOLAMENTO E CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS MUSCULARES

Para obtenção das células musculares, os fragmentos obtidos a partir da biópsia dos cães foram dissociados mecanicamente e digeridos com 0,1% de colagenase tipo IV por 3 h à 38,5 °C para dissociação celular. A cultura de mioblasto foi iniciada com concentração ideal de aproximadamente 5×10^4 células mL.

Figura 10 - A- culturas confluentes altas B e C - Células multinucleadas e diferenciadas D - células confluentes altas mostrando organização "net-like" em duas direções diferentes

Fonte: (MARTINS, 2004)

Figura 11 - Em A, B e C: presença de células multinucleadas diferenciadas (setas brancas) e D: células confluentes altas mostrando organização "net-like" em duas direções diferentes

Fonte: (MARTINS, 2014).

5.8 ENSAIO DE TOXICIDADE DO ÁCIDO URSÓLICO SOBRE LINHAS DE CÉLULAS MUSCULARES IN VITRO

Os animais foram distribuídos em grupos de acordo com a condição genética (portador versus afetado) e idade (jovens versus adultos): Grupo I: três cães jovens afetados pela GRMD (duas fêmeas e um macho – 6 meses de idade); Grupo II: três cães jovens portadores pela GRMD (três fêmeas – 6 meses de idade); Grupo III: três cães adultos afetados pela GRMD (duas fêmeas e um macho – idade média 4,3 anos $\pm$ 2,5 de idade [de 2 a 7 anos]); Grupo IV: três cães adultos portadores pela GRMD (três fêmeas – idade média 4,3 anos $\pm$ 2,5 de idade [de 2 a 7 anos]). Para avaliação dos efeitos do ácido ursólico foram utilizadas as linhas de células musculares derivadas do Grupo I: cães jovens afetados pela GRMD; Grupo II: cães jovens portadores da GRMD; Grupo III: cães adultos afetados pela GRMD; Grupo IV:

ções adultos portadores da GRMD. As células foram tratadas com 3 concentrações crescentes de ácido ursólico (5, 10 e 20 μM) por 48 horas e a proliferação e viabilidade celular foi avaliada pelo método de precipitação de MTT. Tanto nos animais jovens quanto nos adultos, o tratamento com ácido ursólico aumentou o número de células viáveis de linhas provenientes do Grupos I e II (5, 10 e 20 μM); III e IV (5 e 10 μM) ($P < 0,05$), com relação aos seus respectivos controles (somente veículo DMSO) (dados não mostrados). As linhas isoladas de animais do grupo II demonstraram sensíveis as concentrações mais altas (20 μM) de ácido ursólico ($P < 0,05$). Ainda o tratamento com 5 μM de ácido ursólico por 48 aumentou significativamente a viabilidade celular tanto grupo II quanto no grupo IV em relação aos seus controles (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Ensaio de toxicidade do ácido ursólico animais portadores (barras pretas) ou afetados (barras cinzas) pela distrofia muscular de Duchenne, avaliados pelo ensaio colorimétrico de metabolização de MTT

Legenda: Em A: grupos I e II e em B: grupos II e IV. O eixo Y, representa a densidade óptica (valores arbitrários). Em P: animais portadores. A: animais afetados

- **Efeitos do ácido ursólico na viabilidade e produção de proteínas das células musculares**

Para avaliar o efeito do ácido ursólico sobre a produção de proteínas totais pelas células musculares tanto de animais portadores e animais afetados pela GRMD. As linhas celulares foram tratadas com ácido ursólico (0, 5 e 10 μM em DMSO) por 48 horas e o ensaio de viabilidade celular foi novamente realizado.

Ainda, amostras das células tratadas foram colhidas para a avaliação da concentração de proteínas totais por ensaio Brad Ford como anteriormente explicado.

O tratamento com 5 μ M diminuiu a viabilidade celular do grupo II em relação aos grupos I e IV (Figura 7-A). Quanto a concentração proteica não foi encontrada diferenças entre os grupos, no entanto há uma diferença evidente numérica da concentração de proteína do grupo II em relação ao grupo I (Figura 7 B). Talvez, o nível de significância não foi atingido em consequência a grande variabilidade inter and entre grupos. Ainda, o tratamento com 10 μ M, um aumento da viabilidade celular do grupo I em relação aos grupos II e III e do grupo II em relação ao IV (Figura 7-C). No entanto, somente o grupo II apresentou um aumento na concentração de proteínas totais em relação aos demais grupos (Figura 7-D). Já não houve nenhuma alteração na viabilidade e na concentração entre os grupos tratados somente com veículo (DMSO) ou não submetidos a nenhum tratamento (Figura 7 E-F).

Gráfico 7 - Ensaio de viabilidade da células tratadas com ácido ursólico de animais portadores (barras pretas) ou afetados (barras cinzas) pela distrofia muscular de Duchenne, avaliados pelo ensaio colorimétrico de metabolização de MTT

Legenda: Em **A**, **C**, **E** e **F**: viabilidade celular por ensaio de MTT nos grupos I, II, III, IV. O eixo Y, representa o densidade óptica (valores arbitrários)

Discussão

6 DISCUSSÃO

A DMD caracteriza-se pela perda funcional e ausência da proteína distrofina, o que leva a uma fraqueza muscular progressiva além de insuficiência respiratória e cardiomiopatias (HOFFMAN et al., 1987). Nesta doença, há uma falha na regeneração muscular, o que torna o tecido incapaz de compensar a perda muscular (EMERY, 2002).

A manutenção, reparação e regeneração do músculo esquelético é feita por células tronco residentes, as quais são denominadas células-satélites e estão localizadas sobre a lâmina basal da miofibra (MAURO, 1961; RELAIX; ZAMMIT, 2012). As células satélites encontram-se normalmente quiescentes embora possam ser ativadas para produzir precursores de mioblasto que se diferenciam para o reparo da lesão muscular. Em músculos saudáveis, o reparo é normalmente um processo eficiente. No entanto, no músculo distrofico é provável que a função das células satélites estejam comprometidas por causa da expressão da distrofia muscular mutada (MORGAN; ZAMMIT, 2010).

Um estudo realizado por Boldrin e colaboradores em 2014 mostrou que as células-satélites de camundongos *mdx* (modelos para DMD) mantêm sua capacidade de contribuir para a regeneração muscular em músculos de camundongos hospedeiros pré-irradiados. Essa descoberta pode ser uma evidência de que as células-satélites mantêm suas propriedades de células-tronco musculares e contribuem para a regeneração muscular, mesmo quando removidas do doador afetado e colocadas em um ambiente favorável. Com isso, deve-se considerar que músculos poderiam ser tratados de forma endógena bem como através de uma terapia envolvendo células-tronco (BOLDRIN et al., 2014).

O melhor modelo canino análogo à DMD em humanos é a Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD) (KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1988). Cães com GRMD sofrem de uma doença progressiva e fatal envolvendo os músculos esquelético e cardíaco com comprometimento muscular seletivo (KORNEGAY et al., 2003). Em nosso estudo também foram utilizados cães da raça Golden Retriever como modelo para DMD, e a análise histológica de biópsias musculares destes animais demonstrou que cães afetados aos 6 meses de idade

pela GRMD apresentam fibras musculares de diâmetro menor quando comparadas às fibras musculares de animais portadores. Além disso, as fibras dos animais afetados apresentam desarranjo das miofibrilas com a presença de edema e um intenso infiltrado inflamatório, o que ocorre com menor frequência no músculo de animais portadores, sugerindo gravidade da doença nestes animais.

A densidade mineral óssea é diretamente correlacionada com estresse da contração muscular sobre o osso, desta forma a mineralização é mantida. Giglio et al. (2009) demonstrou que animais portadores durante o crescimento passam por um período no qual há uma diminuição mineral óssea semelhante a encontrada nos animais afetados por GRMD, o que posteriormente volta a níveis normais, provavelmente após a repopulação das fibras musculares que expressam a distrofina mutante por fibras musculares com expressão normal de distrofina (GIGLIO et al., 2009). Em nossas análises, os animais portadores algumas regiões do tecido analisado apresentaram fibras musculares em processo de degeneração e presença de edema entre as miofibrilas.

A perda muscular em decorrência do envelhecimento, desuso em casos de paralisia, e em doenças que afetam diretamente o tecido muscular como as distrofias tem levado a comunidade científica a buscar um maior entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de miogênese e reparação muscular. Recentemente, alguns estudos focaram os aspectos da regulação epigenética envolvidos na miogênese e reparação muscular (TERRAGNI et al., 2014; TSUMAGARI et al., 2013).

Uma vez que a epigenética refere-se à coleção de características herdáveis que modulam a interação entre o genoma e o ambiente. Além disso, a epigenética permite às células adquirirem um padrão diversificado de expressão gênica durante sua diferenciação, o que pode favorecer uma adaptação celular ao meio ambiente, a qual pode perpetuar-se (MENSAERT et al., 2014).

Dentre algumas marcações epigenéticas estudadas estão a metilação e a hidroximetilação do DNA. A metilação do DNA é um processo essencial para o desenvolvimento e diferenciação (FEIL; FRAGA, 2012; JONES, 2012), enquanto a hidroximetilação, esta tem sido identificada como um novo marcador epigenético e esta envolvida nos processos de demetilação ativa. Por exemplo, estudos

descreveram o papel da hidroximetilação do DNA durante o desenvolvimento cerebral sobre a diferenciação neuronal (PFEIFER et al., 2013).

Em um estudo que avaliou níveis de globais metilação do DNA de mioblastos e miotubos por RRBS (*do inglês*: reduced representation bisulfite sequencing) concluiu que há uma hipermetilação miogênica, isto é nas fases iniciais da diferenciação de mioblastos e miotubos *in vitro*, associada a expressão de fatores de transcrição de genes homeobox e T-box. Enquanto que no músculo esquelético há hipometilação associada a genes da fibra contrátil. Ademais, os autores relataram que aproximadamente 30% de hipometilação do músculo esquelético e 3% de hipermetilação das células progenitoras miogênicas. Pela análise de 5-hmC, este mesmo estudo encontrou um aumento global de duas vezes de 5-hmC entre essas dois tipos celulares. Com isso, o estudo sugere que ocorre um processo de metilação *de novo*, previamente à formação de mioblastos, e que a expressão contínua de TET1 e TET2 no músculo esquelético resulta na estabilização dos níveis de hidroximetilação neste tecido (TSUMAGARI et al., 2013).

No presente estudo foram avaliados pela primeira vez, os níveis de globais metilação e hidroximetilação das células presentes nos tecidos de biópsias musculares dos animais portadores e afetados para GRMD por imunohistoquímica. Uma vez que todos os estudos focados nos níveis de metilação do DNA são geralmente direcionados a sequência de um gene ou de uma ontologia, e não de forma global *in situ*.

Nossos resultados, em geral, mostraram que há marcação mais intensa para 5-mC indicando um maior nível de metilação global nos animais portadores em relação aos afetados pela GRMD. Mais especificamente, os animais portadores apresentaram maiores níveis de metilação no interstício, células musculares levando a um maior nível de metilação global (células totais), ainda apresentaram também maiores níveis de hidroximetilação para fibroblastos, no interstício e das células musculares. Em contrapartida, os animais afetados apresentaram maiores níveis de hidroximetilação de células totais e global em fibroblastos. Estes achados corroboram com a nossa hipótese de que o tecido muscular de animais portadores não sofre lesão na mesma intensidade que o tecido de animais afetados e que as células-satélites não são recrutadas da mesma forma e/ou nem com mesma frequência que nos animais afetados. Além disso, nos animais afetados ocorre uma destruição de tecido muscular a cada contração, o que promove um recrutamento

frequente de células-satélites o que pode estar associado ao menor nível de metilação global.

A formação de cordões de mioblastos foi frequentemente observada em animais afetados, e estes apresentaram células justapostas com diferentes níveis de metilação. Além disso, o músculo distrófico, em nosso estudo, apresentou uma marcação mais tenue para metilação em relação aos animais portadores. O alto nível de metilação global nos animais portadores sugere uma menor taxa de remodelação tecidual bem como menor recrutamento das células-satélites.

No estudo de Terragni et al. (2014) foi avaliada a relação entre a expressão de genes NOTCH e o nível de metilação nas células musculares. O resultado revelou que há uma hipometilação em mioblastos, miotubos e no músculo esquelético, e um aumento de 5-hmC, o que pode estar relacionado com a expressão de genes NOTCH, podendo assim ser responsáveis pela renovação celular e homeostase para reparação do dano tecidual (TERRAGNI et al., 2014). Embora nosso estudo não tenha avaliado a expressão de genes específicos que na regulação da miogenese e reparação muscular, nossos resultados também indicam um maior nível de hidroximetilação em animais portadores, provavelmente em consequência ao menor das células-satélites não são frequentemente recrutadas nesses animais e que a hidroximetilação acentuada nos animais deste grupo pode estar relacionada com um reparo tecidual estável, diferentemente ao que ocorre nos animais afetados.

Em resumo, nossos resultados mostram diferenças nos níveis de metilação e hidroximetilação global entre animais portadores e afetados pela GRMD. Níveis maiores de metilação e hidroximetilação em animais portadores sugerem uma estabilidade da homeostase tecidual sem a necessidade de um recrutamento constante de células satélites. Em contrapartida, nos animais afetados níveis menores metilação e hidroximetilação indicam uma constante remodelação tecidual devido a instabilidade dos musculo distrófico. Este estudo se limitou a animais com 6 meses de vida, portanto o valor prognostico destes marcadores epigeneticos não pode ser avaliado.

Atualmente, ainda foi descoberta a cura para a DMD, e as terapias existentes para a melhorar os sintomas e diminuir a progressão da doença tem eficácia restrita. Existe uma urgência na busca de novas medidas terapêuticas adaptadas para os

indivíduos afetados (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). Em meio à procura de substâncias que possam levar a uma melhora no quadro da DMD, o ácido ursólico tem ganhado destaque nos últimos anos como um potencial agente anabólico no tratamento de perda muscular devido à sua habilidade em aumentar a massa muscular, a área de fibra muscular e a força de camundongos (KUNKEL et al, 2011).

No presente estudo, o efeito anabólico do AU foi avaliado *in vitro* sobre células provenientes de biópsias musculares, de forma que as células foram tratadas com doses crescentes de AU. Foram avaliados parâmetros de viabilidade celular e produção de proteínas. Nossos resultados mostraram que o tratamento das células com AU apresentou efeitos importantes na produção de proteínas, de forma que, com a dosagem de 10 μ M, pode-se identificar aumento na produção de proteínas, entretanto, sem que houvesse diminuição da viabilidade celular, o que pode estar relacionado com a estabilidade das células em cultivo.

Em 2012, Figueiredo e Nader avaliaram os possíveis efeitos diretos do AU em células musculares *in vitro* para identificar se os efeitos observados *in vivo* eram respostas secundárias a mudanças neurais ou sistêmicas. Como resultado, os efeitos anabólicos foram detectados após 48 horas de incubação apenas em meio de cultivo contendo soro fetal bovino, penicilina/streptomicina e L-glutamina, sugerindo que o efeito do AU tem uma relação de dependência em relação ao tempo, à fatores de crescimento e nutrientes para que exista um acréscimo de proteína às fibras musculares. Esse mesmo estudo também mostrou que o AU apresenta efeito anabólico em miotubos, sem precisar da presença de outros órgãos ou células de suporte como, por exemplo, dos fibroblastos e não induzir a produção ribossômica *de novo* (FIGUEIREDO; NADER, 2012).

Em resumo, os autores sugerem que o AU pode estimular o desenvolvimento de miotubos diferenciados de maneira direta sem afetar o conteúdo ribossomal. Além disso, a proliferação de mioblasto não foi afetada pelo AU e, portanto, qualquer envolvimento das células satélites na hipertrofia induzida por AU *in vivo* pode acontecer devido ao efeito de diferenciação/fusão (FIGUEIREDO; NADER, 2012). Essas evidências levaram os autores a considerar que embora o AU possa promover aumento de proteínas, um efeito tóxico foi observado em altas doses tanto em mioblastos quanto em miotubos, destacando a necessidade de cuidados ao

considerar o uso deste componente como um agente terapêutico na prevenção de perda muscular em condições catabólicas.

Alguns estudos tem avaliado a toxicidade do AU em diferentes tecidos, de froma que já foi relatado o AU pode ter papel na inibição de proteases do HIV, além de citotoxicidade para células tumorais (LUI et al., 1995; LEE et al., 1998; KASHIWADA et al., 2000; ZHU et al., 2001). Com isso, estudos sugerem que o AU tem esse efeito devido a um estímulo para produção de NO, o que parece ser um mecanismo similar à forma como um tumor afeta um tecido funcional sadio, além de ser inclusive um dos tipos de estímulo para o recrutamento de células-satélites musculares (HONDA et al., 2000).

Em nossos estudos, o AU apresentou-se tóxico às células cultivadas *in vitro* quando em baixas concentrações, para animais portadores e afetados com 6 meses de idade. No entanto a produção de proteína das células resistentes foi maior, indicando a necessidade de mais estudos para determinar a concentração e tempo ideais para que o AU induza um aumento da produção de proteínas sem prejuízo a viabilidade celular.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

Foi possível isolar os mioblastos provenientes de músculo esquelético, para posterior avaliação dos efeitos do ácido ursólico *in vitro*.

As análises dos níveis de metilação e hidroximetilação sugerem que as células musculares de animais portadores apresentam maiores níveis de hidroximetilação, em geral, o que pode estar associado com a estabilidade e capacidade de reparo celular.

O tratamento com ácido ursólico *in vitro*, aumentou a concentração de proteínas sobre as células cultivadas.

- O ácido ursólico apresentou-se tóxico às células cultivadas *in vitro* quando em baixas concentrações, para animais portadores e afetados com 6 meses de idade.
- O ensaio de viabilidade celular demonstrou que o ácido ursólico pode ser tóxico em determinada concentração, quando comparado com o controle, entretanto, a utilização deste componente parece ser favorável às células.

Referências

REFERÊNCIAS

- AARTSMA-RUS, A.; VAN DEUTEKOM, J. C. T.; FOKKEMA, I. F.; VAN OMMEN, G. J.; DEN DUNNEN, J. T. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. **Muscle Nerve**, v. 34, n. 2, p. 135 – 144, 2006.
- ANNEXSTAD, E. J.; LUND-PETERSEN, I.; RASMUSSEN, M. Duchenne muscular dystrophy. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v. 134, n. 14, p. 1361-1364, 2014.
- BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 21, n. 2, p. 243–251, 2009.
- BERG, Z.; BEFFA, L. R.; COOK, D.P.; CORNELISON, D. D. Muscle satellite cells from GRMD dystrophic dogs are not phenotypically distinguishable from wild type satellite cells in ex vivo culture. **Neuromuscular Disorders**, v. 21, n. 4, p.282-290, 2011.
- BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin- deficient muscular dystrophy in Labrador Retriever. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2002.
- BOLDRIN, L.; ZAMMIT, P. S.; MORGAN, J. E. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. **Stem Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 20 - 29, 2014.
- BRINKMEYER-LANGFORD, C.; KORNEGAY, J. N. Comparative genomics of X-linked muscular dystrophies: the golden retriever model. **Current Genomics**, v. 14, n. 5, p. 330-342, 2013.
- BUSHBY, K.; MUNTONI, F.; BOURKE, J. P. 107th ENMC international workshop: the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, the Netherlands. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, n. 2, p. 166 – 172, 2003.
- BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D. J.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C.; DMD CARE CONSIDERATIONS WORKING GROUP. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77 – 93, 2010.
- CHARGÉ, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.
- COLLINS, C. A.; OLSEN, I.; ZAMMIT, P. S.; HESLOP, L.; PETRIE, A.; PARTRIDGE, T. A.; MORGAN, J. E. Stem cell function, selfrenewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**, v.122, n. 2, p. 289–301, 2005.

COLUSSI, C.; MOZZETTA, C.; GURTNER, A.; ILLI, B.; ROSATI, J.; STRAINO, S.; RAGONE, G.; PESCATORI, M.; ZACCAGNINI, G.; ANTONINI, A.; MINETTI, G.; MARTELLI, F.; PIAGGIO, G.; GALLINARI, P.; STEINKULHER, C.; CLEMENTI, E.; DELL' AVERSANA, C.; ALTUCCI, L.; MAI, A.; CAPOGROSSI, M. C.; PURI, P. L.; GAETANO, C. HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United of América*, v. 105, n. 49, 2008. doi: 10.1073/pnas.0805514105. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/105/49/19183.short>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

CONNOLLY, A. M.; KEELING, R. M.; MEHTA, S.; PESTRONK, A.; SANES, J. R. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin alpha2-deficient mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 8, p. 703-712, 2001.

COSSU, G.; BIRESSI, S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: Possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 4-5, p. 623-631, 2005.

DELLAVALLE, A.; MAROLI, G.; COVARELLO, D.; AZZONI, E.; INNOCENZI, A.; PERANI, L.; ANTONINI, S.; SAMBASIVAN, R.; BRUNELLI, S.; TAJBAKHSH, S.; COSSU, G. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. **Nature Communications**, n. 2, p. 499, 2011.

DOLINOY, D. C.; JIRTLE, R. L. Environmental epigenomics in human health and disease. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, n. 1, p. 4-8, 2008.

EAGLE, M.; BAUDOUIN, S. V.; CHANDLER, C.; GIDDINGS, D. R.; BULLOCK, R.; BUSHBY, K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, n. 10, p. 926 – 929, 2002.

EMERY, A. E. H. **Duchenne muscular dystrophy**. New York :Oxford University Press, 1993.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **Lancet**, n. 359, p. 687-695, 2002.

ERVASTI, J. M.; SONNEMANN, K. J. Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. **International Review of Cytology**, n. 265, p. 191-225, 2008.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews Genetics**, n. 13, p. 97-109, 2012.

FIGUEIREDO, C. V.; NADER, A. G. Ursolic acid directly protein accretion in myotubes but does not affect myoblast proliferation. **Cell Biochemistry & Function**, v. 30, n. 5, part 1-2, p. 432-437, 2012. Suplemento 4.

GRADY, R. M.; TENG, H.; NICHOL, M. C.; CUNNINGHAM, J. C.; WILKINSON, R. S.; SANES, J. R. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and

dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 729–738, 1997.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 534–551, 2001.

HOFFMAN, E.; BROWN, R. J.; KUNKEL, L. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**; n. 51, p. 919-928, 1987.

HOLST, D.; LUQUET, S.; KRISTIANSEN, K.; GRIMALDI, P.A. Roles of peroxisome proliferator-activated receptors and in myoblast transdifferentiation. **Experimental . Cell Research**, n. 288, p. 168–176, 2003.

HUANG, M. T.; HO, C. T.; WANG, Z. Y.; FERRARO, T.; LOU, Y. R.; STAUBER, K.; MA, W.; GEORGIADIS, C.; LASKIN, J. D.; CONNEY, A. H. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Research**, n.54, p. 701 –708, 1994.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.

ILNYTSKYY, Y.; KOTURBASH, I.; KOVALCHUK, O. Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue specific manner. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, n. 2, p. 105–113, 2009.

ITAGAKI, Y.; SAIDA, K.; IWAMURA, K. Regenerative capacity of mdx mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. **Acta Neuropathologica**, n. 89, p. 380–384, 1995

JACKSON, K. A.; MI, T.; GOODELL, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United of América**, n. 96, p. 14482–14486, 1999.

JACOB, R. A.; GRETZ, D. M.; TAYLOR, P. C.; JAMES, S. J.; POGRIBNY, I. P.; MILLER, B. J.; HENNING, S. M.; SWENDSEID, M. E. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **Journal of Nutrution**, n. 128, p. 1204–1212, 1998.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, n. 13, p. 484–492, 2012.

JORDE, L. B. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004. p. 111-113.

LEE, K. H.; LIN, Y. M.; WU, T. S. ; ZHANG, D.C. ; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I. H.; CHANG, J. J.; WU, R. Y.; YANG, T. H. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. **Planta Medica**, v. 54, n. 4, p. 308–311, 1988.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E. P.; BERTELSON, C. J.; MONACO, A. P.; FEENER, C.; KUNKEL, L. M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, n. 50, p. 509–517, 1987.

KOENIG, M.; KUNKEL, L. M. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. **Journal of Biological Chemistry**, n. 265, p. 4560–4566, 1990.

KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MILLER, D. M.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle Nerve**, n. 11, p. 1056–1064, 1988.

KUNKEL, S. D.; SUNEJA, M.; EBERT, S. M.; BONGERS, K. S.; FOX, D. K.; MALMBERG, S. E.; ALIPOUR, F.; SHIELDS, R. K.; ADAMS, C. M. mRNA Expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. **Cell Metabolism**, n. 13, p. 627–638, 2011.

LANGEVIN, S.; KELSEY, K. The fate is not always written in the genes: Epigenomics in epidemiologic studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n. 54, p. 533–541, 2013.

LEWIS, C.; CARBERRY, S.; OHLENDIECK, K. Proteomic profiling of x-linked muscular dystrophy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 30, n. 7-8, p. 267-269, 2009.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 49, p. 57–68, 1995.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E. P.; BERTELSON, C. J.; MONACO, A. P. ; FEENER, C. ; KUNKEL, L. M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, n. 50, p. 509–517, 1987.

MANEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RIOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, n. 334, p. 103–105, 1997.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, p. 493–495, 1961.

MENDELL, J. R.; RODINO-KLAPAC, L.; SAHENK, Z.; MALIK, V.; KASPAR, B. K.; WALKER, C. M.; CLARK, K. R. Gene therapy for muscular dystrophy: Lessons learned and path forward. **Neuroscience Letters**, n. 527, p. 90–99, 2012.

MENG, J.; ADKIN, C. F.; XU, S. W.; MUNTONI, F.; MORGAN, J. E. 2011. Contribution of human muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice. **PLoS ONE**, n. 6, p. e17454, 2011.

MENSAERT, K.; DENIL, S.; TROOSKENS, G.; VAN CRIEKINGE, W.; THAS, O.; DE MEYER, T. Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 3, p. 155-170, 2014.

MORGAN, J. E.; ZAMMIT, P. S. Direct effects of the pathogenic mutation on satellite cell function in muscular dystrophy. **Experimental Cell Research**, n. 316, p. 3100–3108, 2010.

MOTOHASHI, N.; ASAKURA, A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. **Frontiers Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 2, p. 1, 2014.

NAJID, A.; SIMON, A.; COOK, J.; CHABLE-RABINOVITCH, H.; DELAGE, C.; CHULIA, A. J.; RIGAUD, M. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. **FEBS Letters**, v. 299, n. 3, p. 213 –217, 1992.

NOVOTNY, L.; VACHALKOVA, A.; BIGGS, D. Ursolic acid: an antitumorigenic and chemopreventive activity. Minireview. **Neoplasma**, n. 48, p. 241–246, 2001.

OHLENDIECK K, MATSUMURA K, IONASESCU VV, TOWBIN JA, BOSCH P, WEINSTEIN SL, SERNETT SW, CAMPBELL KP (1993) Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43:795–800

PFEIFER, G. P.; KADAM, S.; JIN, S. G. 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. **Epigenetics & Chromatin**, n. 6, p. 10, 2013.

RAHBK, J.; WERGE, B.; MADSEN, A.; MARQUARDT, J.; STEFFENSEN, B. F.; JEPPESEN, J. Adult life with Duchenne muscular dystrophy: observations among an emerging and unforeseen patient population. **Pediatric Rehabilitation**, v. 8, n. 1, p. 17 – 28, 2005.

RELAIX, F.; ZAMMIT, P.S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. **Development**, v. 139, n. 16, p. 2845–2856, 2012.

ROSS, S.E.; HEMATI, N.; LONGO, K. A.; BENNETT, C. N.; LUCAS, P. C.; ERICKSON, R. L.; MACDOUGALD, O. A. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. **Science**, n. 289, p. 950–953, 2000.

RYU, S. Y.; OAK, M. H.; YOON, S. K.; CHO, D. I.; YOO, G. S.; KIM, T. S.; KIM, K. M. Antiallergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. **Planta Medica**, n. 66, p. 358 –360, 2000.

SARBASSOV, D.D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, n. 307, p. 1098–1101, 2005.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**, n. 20, p. 1692–1708, 2006.

SICINSKI, P.; GENG, Y.; RYDER-COOK, A. S.; BARNARD, E. A.; DARLISON, M. G.; BARNARD, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science**, n. 244, p. 1578–1580, 1989.

SIEGEL, A. L.; BLEDSOE, C.; LAVIN, J.; GATTI, F.; BERGE, J.; MILLMAN, G.; TURIN, E.; WINDERS, W. T.; RUTTER, J.; PALMEIRI, B.; CARLSON, C. G. Treatment with inhibitors of the NFkappaB pathway improves whole body tension development in the mdx mouse. **Neuromuscular Disorders**, n. 19, p. 131–139, 2008.

SLEE, P. H.; ELIEL, M. R.; NORTIER, J. W.; RODENBURG, C. J. [Taxoids in ovarian and breast carcinoma: the role of the medical profession and the government]. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 142, n. 10, p. 502–504, 1998.

HONDA, T.; ROUNDS, B. V.; BORE, L.; FINLAY, H. J.; FAVALORO JR., F. G.; SUH, N.; WANG, Y.; SPORN, M. B.; GRIBBLE, G. W. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 22, p. 4233–4246, 2000b.

HONDA, T.; GRIBBLE, G. W.; SUH, N.; FINLAY, H. J.; ROUNDS, B. V.; BORE, L.; FAVALORO JR., F.G.; WANG, Y.; SPORN, M. B. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1866–1877, 2000a.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, Y.; OKADA, Y.; ISHIKAWA, T.; SATO, M.; AKATSUKA, A.; ASAHARA, T. Functional recovery of damaged skeletal muscle through synchronized vasculogenesis, myogenesis, and neurogenesis by muscle-derived stem cells. **Circulation**, n. 112, p. 2857–2866, 2005.

TERRAGNI, J.; ZHANG, G.; SUN, Z.; PRADHAN, S.; SONG, L.; CRAWFORD, G. E.; LACEY, M.; EHRLICH, M. Notch signaling genes: myogenic DNA hypomethylation and 5-hydroxymethylcytosine. **Epigenetics**, n. 6, p. 842-850, 2014.

TSUMAGARI, K.; BARIBAULT, C.; TERRAGNI, J.; VARLEY, K. E.; GERT, J.; PRADHAN, S.; BADOO, M.; CRAIN, C. M.; SONG, L.; CRAWFORD, G. E.; MYERS, R. M.; LACEY, M.; EHRLICH, M. Early de novo DNA methylation and prolonged demethylation in the muscle lineage. **Epigenetics**, v. 8, n. 3, p. 317-332, 2013.

UEZUMI, A.; ITO, T.; MORIKAWA, D.; SHIMIZU, N.; YONEDA, T.; SEGAWA, M.; YAMAGUCHI, M.; OGAWA, R.; MATEV MM, MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; TSUJIKAWA, K.; TSUCHIDA, K.; YAMAMOTO, H.; FUKADA, S. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. **Journal of Cell Science**, v. 124, pt 21, p. 3654-3564, 2011.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of Neurological Science**, n. 88, p. 69-81, 1988.

VERTINO, A. M.; TAYLOR-JONES, J. M.; LONGO, K. A.; BEARDEN, E. D.; LANE, T. F.; MCGEHEE JR., R. E.; MACDOUGALD, O. A.; PETERSON, C. A. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. **Molecular Biology Cell**, v. 16, p. 2039–2048, 2005.

WORTON, R. G. Duchenne muscular dystrophy: gene product; mechanism of mutation in the gene. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 15, n. 4, p. 539-550, 1992.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n.3, p.471-484, 2006.

KASHIWADA, Y.; NAGAO, T.; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, H. Y.; OKABE, H.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1619–1622, 2000.

ZHU, Y.-M.; SHEN, J.-K.; WANG, H.-K. ; COSENTINO, L.-M.; LEE, K.-H. Bioorg. **Medical Chemical Letters**, n. 11, p. 3115–3118, 2011.