



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA DISTROFIA MUSCULAR: ESTUDO DO SOCE E TERAPIA FARMACOLÓGICA

VERIDIANA CARVALHO DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: Dr. *Renato Ferretti*

**BOTUCATU – SP
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA DISTROFIA MUSCULAR: ESTUDO DO
SOCE E TERAPIA FARMACOLÓGICA

VERIDIANA CARVALHO DOS SANTOS

DR. RENATO FERRETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: Dr. *Renato Ferretti*

BOTUCATU – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Veridiana Carvalho dos.

Mecanismos de proteção da distrofia muscular : estudo do soce e terapia farmacológica / Veridiana Carvalho dos Santos. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Renato Ferretti

Capes: 20604017

1. Distrofias Musculares. 2. Camundongo. 3. Acido ribonucleico. 4. Canais de Cálcio. 5. Medicamentos - Administração.

Palavras-chave: Camundongo mdx; Distrofia muscular; SOCE; Terapia Farmacológica; microRNA.

Botucatu, 01 de agosto de 2016

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato Ferretti (Orientador)

Assinatura

Dra. Maeli Dal Pai

Assinatura

Dra. Adriana Pertille

Assinatura

Dra. Adriana Fogagnolo Mauricio

Assinatura

Dra. Rosana Macher Teodori

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que são minha âncora, os que mais me ajudaram nessa jornada e em todos momentos da minha vida, sempre que precisei: **aos meus pais, Sonia e Eliseu, e ao meu irmão Mathias.**

Agradecimento especial

Ao **professor Dr. Renato Ferretti** por ter compartilhado o desenvolvimento desse projeto, por todo conhecimento que me ajudou a adquirir, pelo apoio, incentivo, confiança e principalmente pela sua paciência para com meus questionamentos e principalmente comigo. Por aguentar todos os momentos conturbados de dúvidas, inseguranças e medos, mais principalmente por comemorar comigo a cada pequena conquista. Obrigada por ter me orientado e ter sido um excelente orientador, com certeza você foi e é fundamental no meu crescimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida, por sempre guiar minhas escolhas e iluminar as minhas experiências, sem Ele nada seria possível!

Aos **meus pais, Sonia e Eliseu, ao meu irmão, Mathias e a minha vó Benta** e a todos meus tios e primos por todo amor, carinho, apoio, incentivos e esforços que não foram medidos para que eu pudesse realizar meus sonhos e completar mais uma etapa importante em minha vida.

Ao **Rodrigo**, meu namorado, por toda amizade, companheirismo, incentivo, carinho e ajudas, pelo amparo para minhas lágrimas por compartilhar todos os meus risos e conquistas.

À **professora Dra. Cintia Yuri Matsumura**, por todo apoio, confiança, ajuda e disponibilidade de sempre. Pelas técnicas ensinadas, pela paciência e conversas. Pelos conhecimentos compartilhados, pelas sugestões dadas no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço principalmente pela amizade construída e por conseguir me acalmar com a sua serenidade ímpar, muito obrigada por tudo sempre!

À **Profa. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro** (queridíssima Paty) por ter me oferecido a oportunidade de ingressar no programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, pelo incentivo e dedicação sempre que precisei e pelas oportunidades durante meu estágio docência, com toda certeza você fez minha paixão por lecionar anatomia aflorar! Obrigada pelas conversas, conselhos e amizade!

Ao **professor Dr. Robson Francisco Carvalho**, por possuir esse imenso coração, por ter respondido ao meu primeiro e-mail, pela recepção calorosa e mesmo sem me conhecer, pela indicação a outros professores. Obrigada por toda ajuda e pelas conversas. Por ter aceito compor a banca a banca do exame geral de qualificação.

À **professora Dra. Maeli Dal Pai** que esteve presente em todos os momentos importante nessa pós-graduação. Grata pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade sempre que solicitada, por ter aceito ao convite para compor a banca de qualificação e da defesa.

Aos **camundongos** utilizados nesse estudo, meu sincero respeito!

Ao **programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada**, pela oportunidade e pela minha formação acadêmica.

Ao técnico administrativo **Davi Muller**, pela competência e atenção.

Aos professores que compuseram a minha banca do exame geral de qualificação, os já mencionados e a **Dra. Valéria Cristina Sandrini** e aos suplentes, **Dr. Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti e a Dra. Adriana Fogagnolo Mauricio**, todos os comentários, sugestões e questionamentos que foram pertinentes e importantes para a elaboração da minha dissertação.

A professora **Dra. Adriana Pertille**, por ter aceito ao convite para compor a banca examinadora da minha defesa.

Aos **docentes do Departamento de Anatomia**, que me acolheram e contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, **Paulo, Luciano, Marcos, Giva, Vanda** e em especial a **Cristiane e ao Gelson** por terem se tornado grandes amigos, por todos os cuidados, risadas e conselhos!

A todos os meus **colegas e amigos** que compartilharam o espaço no laboratório de pesquisa da **Anatomia**, por todo aprendizado diário.

Aos amigos **Fabiana de Campos Gomes, Luiz Antonio Lupi Junior, Carla de Moraes e Marina Galleazo** pelos bons conselhos, paciência, ajuda nas rotinas de laboratório e troca de informações!

Aos alunos de capacitação e iniciação científica que passaram pelo nosso grupo de pesquisa, carinhosamente a **Roberta Selingardi, Marina Zanicheli Barbosa e Ananda Barbosa Muniz**, obrigada pela paciência, aprendizado e ajuda no desenvolvimento desse projeto, vocês foram cruciais para o meu crescimento profissional e pessoal!

Aos **professores, funcionários e laboratórios do Departamento de Morfologia**, em especial ao **LBME** por ter concedido o espaço, tempo e equipamentos para o aprendizado e execução de técnicas.

Aos **discentes que participaram e ainda participam do LBME**, em especial a **Sarah, Carlos, a Paula Freire, Grasieli, Bruno Duran, Rafaela Nunes, Ivan e a Raquel Bertaglia** por terem me ensinado, acompanhado e participado do meu aprendizado compartilhando erros e acertos, risos e lágrimas.

Aos meus **amigos do LabMEC e agregados**, meus mais sinceros agradecimentos pelo acolhimento e por me permitir fazer parte dessa grande família...tudo teria sido ainda mais difícil se vocês não estivessem nessa jornada junto comigo.

Ao laboratório de pesquisa **NeoGene, da FMB**, em especial a profa. **Dra. Patrícia Pintor dos Reis** e ao **Marcio**, pela disponibilidade do laboratório e equipamentos.

Aos **docentes das disciplinas** que cursei durante o mestrado, muito obrigada por toda informação e conhecimento compartilhado.

Aos meus, sempre e eternos meus Ourinhenses, **Natália Gimenes, Samuel Lima, Karen Campos, Karina Lopes, Gabriela Ezaki, Leila Rosa e Gabriela Cipolla**, por compreenderem minha ausência e principalmente por sempre estarem presente por mensagens, telefonemas...!

As minhas eternas amigas fruto da UENP/CCHE, **Dra. Thaís Saad Szczepansk, Ana Paula Paschoal, Ana Cláudia Neves e Jenifer Gomes**, a todas obrigada por todo incentivo!

As amizades que surgiram além das dependências do IB, **Ana Carolina Lina Camargo** (Galah), **Dra. Julhiany Ap. Silva, Mara Rúbia, Mariane Risso, Carla Regina Barbieri, Danilo Miralha Franco (Turbo), Bruno Castilho (Casti), Marcos Edgar Herkenhoff (Alemão), Marcos Oliveira, Arno Butze, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa e Daniela Fossato**. Agradeço pelos “*happy-hours*”, pelos finais de semana, pelas experiências únicas que proporcionaram viver, pelos cuidados de família e principalmente pela confiança construída, nossos momentos e cada um de vocês foram essências nessa jornada!

Aos **colegas do processo seletivo - 2º semestre/2014 do PG em BGA** por compartilharem esse período.

A **todos que não mencionei** mais que de alguma forma contribuíram para eu estar aqui sempre apoiando as minhas escolhas, meu mais sincero agradecimento!

À **CAPES** pela bolsa de pós-graduação, **ICR PROPE/UNESP (2052/002/14)** e a **FAPESP (2013/10633-0)** pelo auxílio financeiro concedido.

“Uma vez fixada à meta, ainda que o céu venha abaixo, é preciso olhar para ela, sempre para ela. ”

São José Marelllo

"É necessário se espantar, se indignar e se contagiar, só assim é possível mudar a realidade."

Nise da Silveira

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
ASPECTOS GERAIS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Músculo estriado esquelético e regulação pós-transcricional.....	20
1.2 Distrofia Muscular de Duchenne.....	22
1.3 Modelo experimental da DMD: camundongo mdx.....	27
1.4 Terapia Farmacológica	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais e desenho experimental.....	31
3.2 Grupos experimentais	31
3.3 Aspectos histopatológico.....	32
3.3.1 Análise de Creatina Kinase (CK) no plasma sanguíneo.....	32
3.3.2 Marcação com o Corante Azul de Evans.....	32
3.3.3 Coleta e Processamento dos Músculos para análises histológicas	33
3.4 Extração de proteínas.....	33
3.5 Western Blotting.....	33
3.6 Extração de RNA total.....	34
3.7 Análise da qualidade do RNA total	34
3.8 Tratamento do RNA com DNase.....	35
3.9 Reação de Transcrição Reversa (miRNA).....	35
3.10 PCR quantitativo em Tempo Real (miRNA).....	35
3.11 Reação de Transcrição Reversa (mRNA).....	36
3.12 PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA).....	36
3.13 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 <i>Diferenças na expressão dos miRNAs nos ILM</i>	<i>38</i>
4.2 <i>Diferenças no SOCE nos Intrínsecos da Laringe dos camundongos Ctrl e mdx</i>	<i>40</i>

4.3 Aspectos histopatológicos da terapia farmacológica com Ômega-3 em camundongos mdx	42
4.3.1 Massa corporal.....	42
4.3.2 Análise de creatina kinase (CK).....	42
4.3.3 Análise morfológica qualitativa	42
4.4 Efeitos do Ômega-3 no SOCE dos camundongos mdx.....	46
5. DISCUSSÃO	48
5.1 Diferenças na regulação pós-transcricional nos Músculos Intrínsecos da Laringe de camundongos Ctrl	48
5.2 Expressão do SOCE nos ILM Ctrl e mdx	49
5.3 Efeito do ômega-3 nos animais distróficos e no SOCE	51
6. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS	55
MATERIAL SUPLEMENTAR	69
ANEXO.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Interações da Distrofina com Complexo Distrofina-Glicoproteínas e moléculas sinalizadoras	23
Figura 2 – Esquema ilustrativo da sinalização de cálcio na fibra muscular	24
Figura 3 – Esquema ilustrativo do SOCE.....	26
Figura 4 – Expressão gênica relativa e níveis proteicos de <i>Stim1</i> , <i>Orai1</i> e <i>Trpc1</i> nos músculos intrínsecos da laringe (ILM) em relação ao diafragma (DIA) de camundongos controles Ctrl e <i>mdx</i>	41
Figura 5 – Fotomicrografias de cortes transversais dos grupos controle (Ctrl), <i>mdx</i> e <i>mdx</i> tratado com ômega-3 (<i>mdx</i> Ω3).....	44
Figura 6 – Fotomicrografias de cortes transversais dos grupos controle (Ctrl), <i>mdx</i> e <i>mdx</i> tratado com ômega-3 (<i>mdx</i> Ω3).....	45
Figura 7– Expressão gênica relativa e níveis proteicos de <i>Stim1</i> , <i>Orai1</i> e <i>Trpc1</i> nos músculos diafragma (DIA) e Intrínsecos da Laringe (ILM) de camundongos controle (Ctrl), <i>mdx</i> e <i>mdx</i> tratados com ômega-3 (<i>mdx</i> Ω3).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes e informações dos iniciadores utilizados na RT-qPCR	37
Tabela 2. MicroRNAs com expressão alterada nos ILM do grupo Controle	39
Tabela 3. Massa corporal.....	42
Tabela 4. Níveis plasmáticos de CK (U/L) em camundongos Ctrl, mdx e <i>mdx</i> Ω3.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - Azul de Evans
AO - músculo aritenóide oblíquo
B2m - beta-2 microglobulin
b-DG - beta-distroglicana
Ca²⁺ - cálcio
CDG - complexo distrofina-glicoproteínas
CDK6 - Cyclin-dependent kinase 6
CK - Creatina Kinase
CT - músculo cricotireóideo,
Ctrl - Grupo controle
DHA - ácido docosahexaenóico
DHPRs - dihidropiridina
DIA - músculo diafragma
DMD - Distrofia Muscular de Duchenne
EOM - músculos extraoculares
EPA - ácido eicosapentanóico
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IA - músculo interaritenóide
IGF-1 - fatores de crescimento semelhante a insulina tipo 1
ILM - Músculos Intrínsecos da Laringe
IP3RII - receptor tipo II de inositol 1,4,5-trisfosfato
LCA - músculo cricoaritenóide lateral
LTA - músculo tiroaritenóide lateral
mdx - murine dystrophin X chromosome linked
mdxΩ3 - Grupo mdx tratado com ômega-3
miRNA – microRNA
mRNA – RNA mensageiro
MTA - músculo tiroaritenóide medial
NF- κB - fator nuclear κB
NFAT - fator Nuclear das células T ativadas
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
Ω3 - ômega-3

PCA - músculo cricoaritenóide posterior
PUFAS - ácidos graxos poli-insaturados
RIN - número da integridade do RNA
RNA- ácido ribonucleicos
rRNA - RNA ribossomais
RS - retículo sarcoplasmático
RyR - rianodina
SAC - canal de Ca^{2+} ativados pelo estiramento
SERCA – Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático
SIN - sintrofinas
SOCE - canal de entrada de Ca^{2+} operados por estoque
STIM1 – *Stromal Interaction Molecule 1*
TA - músculo aritenóide transversal
TRPC - *Transient Receptor Potential Canonical*

ASPECTOS GERAIS

O presente trabalho analisou e relacionou a expressão diferenciada de microRNAs à diferentes processos biológicos nos músculos intrínsecos da laringe (ILM), com o objetivo de identificar as diferenças nas regulações pós-transcricionais existente em músculos que possuem características estruturais e funcionais únicas em condições normais.

Adicionalmente, avaliou a expressão do canal de influxo de cálcio, SOCE (composto por STIM1, ORAI1 e TRPC1), relacionando as características fisiológicas e biológicas dos músculos intrínsecos da laringe comparado ao músculo diafragma. Nesse estudo foi constatado adaptações na expressão gênica e proteica de componentes do SOCE em ambos músculos. Nas fibras musculares distróficas e no SOCE nos camundongos *mdx* com a administração de ômega-3.

RESUMO

A compreensão da regulação dos processos biológicos por mecanismos pós-transcricionais pelos miRNAs permite o entendimento das diferenças dos músculos intrínsecos da laringe (ILM) aos demais músculos, como o diafragma (DIA), em condições normais e patológicas. Na distrofia muscular de Duchenne (DMD) observa-se desregulação da homeostase do cálcio (Ca^{2+}) e consequente mionecrose em alguns músculos. A prevenção da mionecrose por terapias farmacológicas é importante e tem sido intensamente desenvolvida, bem como a compreensão do porque alguns músculos, como os ILM, não apresentam sinais histopatológicos de necrose. A terapia com ômega-3 ($\Omega 3$) parece proteger as fibras musculares distróficas da mionecrose e regular a homeostase do cálcio pela expressão das proteínas relacionada ao estoque Ca^{2+} (SOCE). Nesse estudo, os objetivos foram identificar as diferenças na expressão de microRNA nos ILM, avaliar a expressão do SOCE nos músculos normais e distróficos e o efeito do $\Omega 3$ nas fibras musculares distróficas. A expressão dos miRNAs foi analisada por microarray e identificação de 23 miRNAs diferencialmente expressos nos ILM, destacando 9 relacionados aos processos de miogênese e 5 aos processos regeneração. Após análise histopatológica, RT-qPCR e Western blot foi confirmado as diferenças dos ILM em comparação com DIA pela redução da expressão dos componentes do SOCE, podendo estar relacionadas as características deste grupo muscular. A terapia com $\Omega 3$ reduziu os níveis de creatina Kinase no plasma sanguíneo, melhorou os aspectos histopatológicos da mionecrose e alterou a expressão de proteínas do SOCE nos ILM. Concluimos que os ILM possuem um perfil diferenciado de regulação pós-transcricional que podem participar da regulação da miogênese e da regeneração, mesmo em condições fisiológicas. As proteínas do SOCE, STIM1 e TRPC1, auxiliam na adaptação dos ILM contra a mionecrose na ausência da distrofina. A terapia com $\Omega 3$ protegeu a fibra muscular distrófica e altera a expressão de componentes do SOCE nos ILM.

Palavras chave: Distrofia muscular, camundongo mdx, SOCE, microRNA, Terapia farmacológica

ABSTRACT

The biological processes are regulated by post-transcriptional microRNAs (miRNAs) that allows understanding differences between intrinsic laryngeal muscles (ILM) and other muscles, such as the diaphragm (DIA) in normal and pathological conditions. In Duchenne muscular dystrophy (DMD) is observed deregulation of calcium homeostasis (Ca^{2+}) that results in myonecrosis in some muscles. Pharmacological therapies and protection of myonecrosis in the ILM have been recently described and developed. Omega-3 ($\Omega 3$) therapy appears to protect dystrophic muscle fibers from myonecrosis and regulate calcium homeostasis by proteins, such store operated calcium entry (SOCE). In this study we identify differences in microRNA expression in ILM, we evaluated the SOCE expression in normal and dystrophic muscles and the effect of $\Omega 3$ in the dystrophic muscle fibers. The miRNAs expression by microarray and we identified 23 miRNAs differentially expressed in ILM, up to 9 related to myogenic processes and 5 miRNAs related to regeneration process. Histopathological analysis, RT-qPCR and western blot confirmed the distinct ILM profile compared with DIA, by reduction of SOCE components, which may be related to their unique characteristics. $\Omega 3$ therapy shown reduced creatine kinase levels in blood plasma, improved histopathological aspects of myonecrosis and altered expression of SOCE in the ILM. We concluded that the ILM have different post-transcriptional miRNA profile that may be related to the regulation of myogenesis and regeneration in normal physiological conditions. The SOCE components, STIM1 and TRPC1, contribute ILM adaptation against myonecrosis in the absence of dystrophin. $\Omega 3$ therapy protects the dystrophic muscle fibers and ILM have better calcium handling by SOCE.

Key words: Muscular dystrophy, *mdx* mice, SOCE, microRNA, Pharmacological therapy

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*
Marie Curie

1. INTRODUÇÃO

1.1 Músculo estriado esquelético e regulação pós-transcricional

Nos vertebrados, o músculo estriado esquelético é um dos tecidos mais abundante e compreende cerca de 50% da massa corporal humana. As funções dos músculos compreendem locomoção, respiração e metabolismo energético (revisado em ROSSI; MESSINA, 2014; WESTERBLAD; BRUTON; KATZ, 2010).

O desenvolvimento do músculo é controlado por mecanismos reguladores da miogênese, maturação e diferenciação das fibras musculares que ocorrem durante períodos embrionários e pós-natal (revisado em ROSSI e MESSINA, 2014). A regulação gênica garante as características das fibras musculares e abrangem diferenças funcionais aos músculos em situações normais (fisiológicas) e adversas (patológicas) (revisado em BRAUN; GAUTEL, 2011; BUCKINGHAM; RIGBY, 2014).

Os músculos da cabeça e do pescoço diferem dos músculos esqueléticos pelo distinto desenvolvimento. Estes apresentam origem embriológica dos arcos faríngeos, propriedades contráteis distintas, possuindo expressão de isoformas de miosinas específicas e um tempo de contração e relaxamento rápido, padrão de inervação especializado, podendo possuir múltiplas junções neuromusculares em um única fibra, arquitetura das fibras musculares com pequeno diâmetro, perfil metabólico e capacidade regenerativa distinta dos demais músculos (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994; SPLETTER; SCHNORRER, 2014).

Os músculos intrínsecos da laringe (ILM, do inglês *Intrinsic Laryngeal Muscles*) possuem origem e inserção nas cartilagens laríngeas e atuam principalmente na fonação, auxiliam na respiração, proteção das vias aéreas e na deglutição. Estes compreendem oito músculos: cricoaritenóide posterior (PCA), cricoaritenóide lateral (LCA), cricótireóideo (CT), tiroaritenóide lateral (LTA), tiroaritenóide medial (MTA), interaritenóide (IA), aritenóide transversal (TA) e oblíquo (OA). Baseado em sua característica funcional, os ILM podem ser divididos em abdutores (PCA, LCA e CT), adutores (LTA, MTA, TA, IA e OA) e tensor da corda vocal (CT) (HINRICHSEN; DULHUNTY, 1982; PRETTERKLIEBER, 2003).

As características celulares e bioquímicas dos ILM os aproximam dos músculos extraoculares (EOM, do inglês *Extraocular Muscles*; MCLOON et al., 2007) e os diferem dos

músculos do pescoço e demais regiões do corpo. Os ILM apresentam tempo de contração e relaxamento super rápido, fibras musculares inervadas por múltiplas junções neuromusculares (HOH, 2005), pequeno diâmetro da fibra (ANDRADE; PORTER; KAMINSKI, 2000) e cadeia pesada de miosina do tipo extraocular (MyHC-EO do inglês, *Myosin Heavy Chain Extraocular*) (BRIGGS; SCHACHAT, 2000).

Em condições normais fisiológicas, os ILM apresentam maior habilidade de manter a homeostase intracelular do Ca^{2+} (FERRETTI et al., 2015) e os fatores miogênicos, MyoD e miogenina, são diferentemente regulados (GODING; AL-SHARIF; MCLOON, 2005; MCLOON et al., 2007; SHINNERS; GODING; MCLOON, 2006), além de possuir constante ativação de células satélites, sendo um indicativo de contínua capacidade regenerativa que é inerente desses músculos (MCLOON et al., 2007). Apesar do termo regeneração ser aplicado apenas a processos relacionados após uma lesão e/ou degeneração, os ILM mantem constante remodelação das suas fibras musculares, semelhante ao que ocorre após ao processo de degeneração.

O exato mecanismo que controla a expressão gênica nos ILM não é totalmente entendido. Entretanto, o perfil gênico destes músculos parecer ser altamente conservado entre as espécies, tornando suas características biológicas e adaptativas particularmente interessantes pela regulação transcricional e pós-transcricional (BAIN et al., 2001).

Nos mamíferos, os genes codificadores de proteínas apresentam regulação pós-transcricional por microRNAs (miRNA). Os microRNAs (miRNAs) são pequenos ácido ribonucleicos (RNA) não codificantes, com tamanho aproximado de 22 nucleotídeos (revisado em BARTEL, 2004; LEE, 1993).

A regulação gênica ocorre pela associação dos miRNAs aos RNAs mensageiros (mRNA) por complementaridade de bases (da sequência *seed* dos nucleotídeos 2 a 8 da região 5' do miRNA preferencialmente com a região 3' não traduzida (3'UTR) dos mRNAs alvo). Os miRNAs clivam ou impedem a tradução do mRNA em proteína (GUO et al., 2010; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; WILLIAMS et al., 2009). Um miRNA possui múltiplos genes alvos e um alvo pode ser regulado por diversos miRNAs, desse modo um miRNA pode participar da regulação de diferentes dos processos biológicos e patológicos (FRIEDMAN et al., 2009; LEWIS et al., 2003).

Diversos miRNAs são considerados tecido muscular esquelético específico, os “*myomiRs*”. Dentre os conhecidos até o momento, destacam-se os miR-1, miR-133a, miR133b, miR-206 e miR-499, pois desempenham papel crucial estimulando ou reprimindo a miogênese, progressão do ciclo celular e diferenciação muscular (revisto em CACCHIARELLI et al.,

2011), participando do controle do fenótipo e da especialização de suas fibras musculares (revisado em ROSSI; MESSINA, 2014).

Durante a miogênese o aumento do miR-1 e miR-206, promovem a diferenciação celular e auxiliam no processo de regeneração muscular (CHEN et al., 2010). O aumento do miR-34c parece controlar a progressão do ciclo celular induzindo à diferenciação das células progenitoras musculares, as células satélites, em fibras musculares maduras (GRECO et al., 2009; PURI; SARTORELLI, 2000).

A adaptação do fenótipo muscular pode ser controlado pela redução do miR-133a, por promover aumento da expressão de genes fundamentais no processo de regeneração (MCCARTHY; ESSER, 2007), já os miR-208 e o miR-499 participam da determinação do tipo de fibra e função, inibindo a programação genica para fibras rápidas, assim provem o fenótipo lento (VAN ROOIJ et al., 2009).

A compreensão da regulação dos processos biológicos por mecanismos pós-transcricional dos miRNAs nos ILM possibilitará o melhor entendimento de suas características impares e possíveis adaptações decorrentes de situações patológicas.

1.2 Distrofia muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é clinicamente caracterizada pela fraqueza progressiva e perda de função do músculo esquelético. Trata-se de uma distrofinopatia recessiva ligada ao cromossomo X considerada a mais incidente e devastadora, afetando 1 em cada 3500 meninos nascidos vivos (BLAKE et al., 2002; ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2004).

A DMD é causada pela mutação no gene da distrofina, maior gene do genoma humano (1.2Mb, 79 éxons), que codifica a maior proteína estrutural do citoplasma, a proteína distrofina (DIS) (KUNKEL et al., 2006). As alterações musculares da doença manifestam-se na infância, incapacitando o indivíduo de andar próximo da puberdade e levando ao óbito por volta da terceira década de vida, geralmente por falência respiratória e/ou cardíaca (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994).

A associação da proteína DIS a outras glicoproteínas forma o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), que conecta o citoesqueleto à matriz extracelular e permite a estabilidade da membrana da fibra muscular, o sarcolema. O CDG é constituído pelas distroglicanas, sarcoglicanas, sarcospan e outras proteínas relacionadas, como distrobrevina, sintrofinas, caveolina-3 e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (RANDO, 2001) (Figura 1).

Além de conferir a estabilidade estrutural do sarcolema das fibras musculares, o CDG é um importante sinalizador celular, pois conecta-se a canais iônicos da membrana plasmática. As proteínas beta-distroglicana (b-DG) e as sintrofina (SIN) regulam a entrada de íons cálcio (Ca^{2+}) durante as contrações musculares, através de canais Ca^{2+} -dependentes (LARICCIA et al., 2014; SACCHETTO et al., 1996).

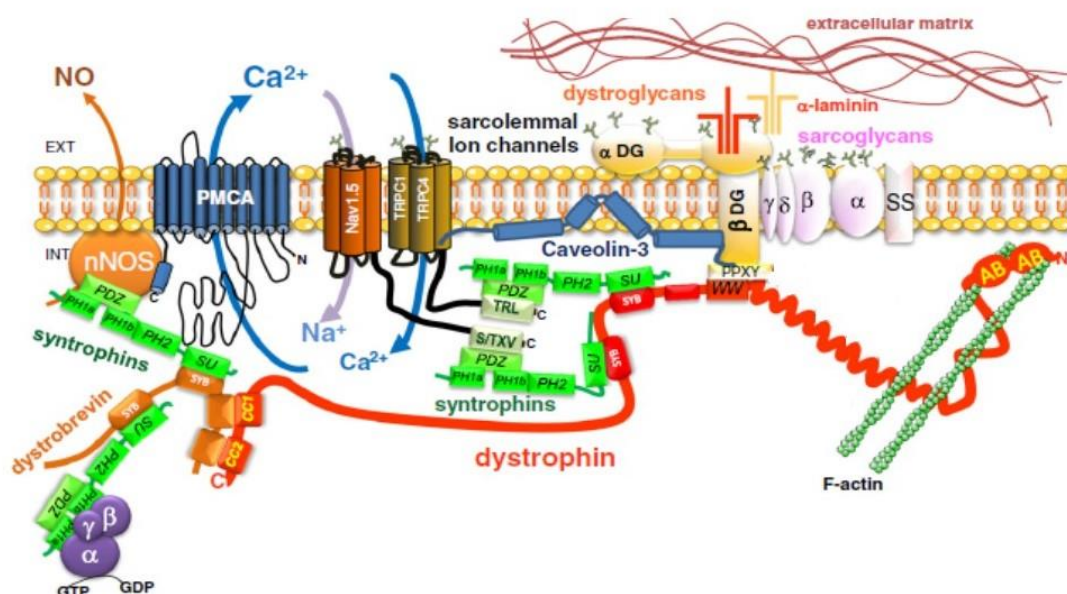


Figura 1. Interações da Distrofina com Complexo Distrofina-Glicoproteínas e moléculas sinalizadoras. A proteína distrofina (*dystrophin*) é responsável por garantir a estabilidade da fibra muscular, pois essa une o citoesqueleto (F-actin) ao meio extracelular (α laminin e extracellular matrix), através das proteínas distroglicanas (*dystroglycans*; α e β DG), sarcoglicanas (*sarcoglycans*), distrobrevinas (*dystrobrevin*) e sintrofina (*syntrophins*). Adicionalmente a o complexo Distrofina-Glicoproteínas pode regular alguns canais iônicos através da sintrofina (*syntrophins*), como os de sódio (Nav1.5) e Ca^{2+} (TRPC1, TRPC4 e PMCA) e ao mesmo tempo regular atividades de algumas enzimas de sinalização como óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). (modificado de CONSTANTIN, 2014).

Na patogênese da DMD, a ausência da DIS leva à alteração do CDG, o sarcolema se torna frágil e susceptível ao estresse mecânico, permitindo o influxo exacerbado de Ca^{2+} , resultando na mionecrose (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994). Outros mecanismos parecem estar relacionados à mionecrose, tais como sinalização celular alterada (RANDO, 2001), diminuição da homeostase do Ca^{2+} , resposta inflamatória exacerbada, aumento do estresse oxidativo, com consequente aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica (WHITEHEAD; YEUNG; ALLEN, 2006).

A alteração na dinâmica do Ca^{2+} é essencial para a função contrátil, relaxamento, diferenciação, metabolismo e regulação da expressão gênica das fibras musculares (revisado em CHIN, 2010; TU et al., 2016). Em músculos normais, o aumento transitório de Ca^{2+} decorre da liberação dos íons pelos estoques intracelular, do retículo sarcoplasmático (RS). Durante a

contração muscular, à despolarização da membrana sarcoplasmática leva o acoplamento dos canais dihidropiridina (DHPRs) aos receptores de rianodina (RyR), liberando íons Ca^{2+} do RS para a ação muscular (FRANZINI-ARMSTRONG; JORGENSEN, 1994; MARTONOSI, 1984; VALLEJO-ILLARRAMENDI et al., 2014).

O relaxamento das fibras musculares decorre da redução do nível de Ca^{2+} intracelular, que retornam para o RS pelas bombas Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA) (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; VALLEJO-ILLARRAMENDI et al., 2014) e/ou para o meio extracelular pela ativação das bombas Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (SACCHETTO et al., 1996) (Figura 2).

O Ca^{2+} pode entrar na célula por outros canais, como o canal de Ca^{2+} ativados pelo estiramento (SAC, do inglês *stretch-activated channels*) (GUHARAY; SACHS, 1984), por canais de cátions não seletivos como tipo *leak* (HOPF et al., 1996) e pelo canal de entrada de Ca^{2+} operados por estoque (SOCE do inglês, *Store-Operated Ca^{2+} Entry*) (CLAPHAM et al., 2001).

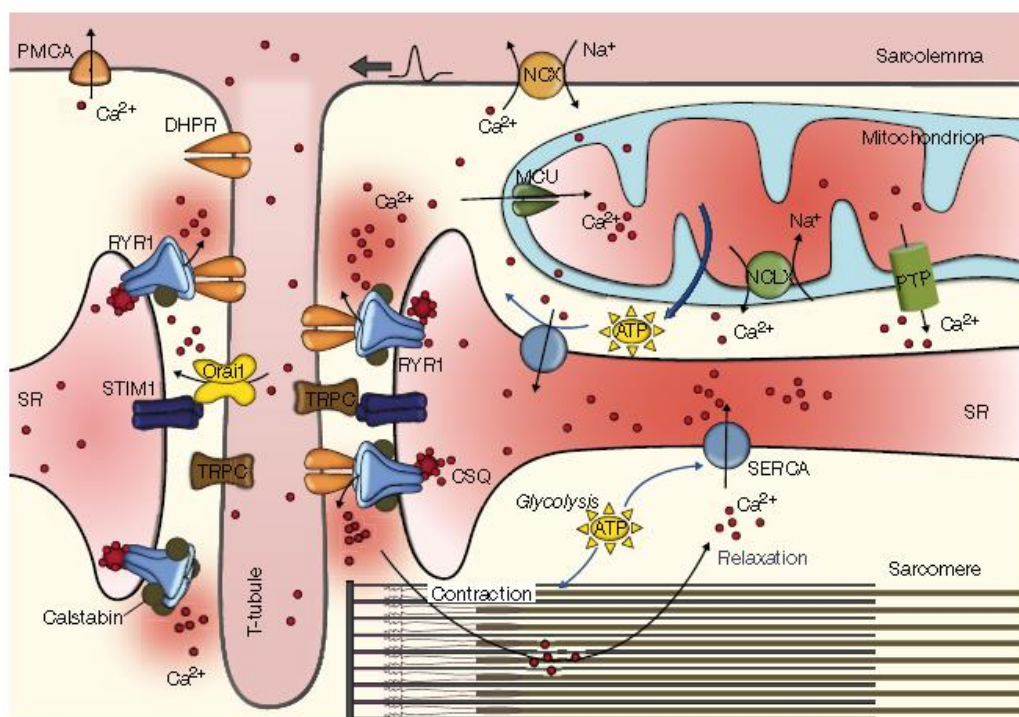


Figura 2. Esquema ilustrativo da sinalização de cálcio na fibra muscular. A despolarização do sarcolema (*sarcolemma*) nos túbulos T (*T-tubule*) leva a uma alteração dos canais DHPRs e ao acoplamento desses aos RyR1, resultando na liberação de íons de Ca^{2+} do Retículo Sarcoplasmático (SR). O Ca^{2+} promove a interação entre os filamentos no sarcomero (*sarcomere*) resultando na contração muscular (*contraction*). O relaxamento (*relaxation*) ocorre devido ao retorno dos íons de Ca^{2+} para o SR pela SERCA ou pelo efluxo desse para o meio extracelular através da PMCA e NCX presentes do sarcolema (*sarcolemma*). A redução nos níveis de Ca^{2+} no SR, são percebidos pela proteína STIM1, que leva ao influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para ao meio intracelular através de Orai1 e TRPC1. A mitocôndria também armazena o Ca^{2+} , o influxo desse para essa organela ocorre através de MCU, levando a produção de ATP, que é necessário para futuras contrações musculares e os íons de Ca^{2+} podem ser liberados dessa organela através de NCLX e PTP (VALLEJO-ILLARRAMENDI et al., 2014).

Destaca-se os componentes do SOCE, sendo STIM1, ORAI1 E TRPC. As proteínas STIM1 (do inglês, *Stromal Interaction Molecule 1*) e a ORAI1 são as principais proteínas que compõem o SOCE (SOBOLOFF et al., 2006). STIM1 leva à abertura dos canais de ORAI1 na membrana plasmática (HOOVER; LEWIS, 2011). A interação ORAI1 e STIM1 resulta na ativação do SOCE e da TRPC (do inglês, *Transient Receptor Potential Canonical*) (LIAO et al., 2008; ZHANG et al., 2008) (Figura 3).

Os canais TRPC são necessários para regulação do influxo de Ca^{2+} nos músculos esquelético (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012; MAROTO et al., 2005) e os níveis da proteína TRPC1 variam com o acometimento do músculo, podendo estar relacionados à distintos fenótipos das fibras musculares distróficas (MATSUMURA et al., 2011).

Apesar da interação entre as proteínas do SOCE, STIM1, ORAI1 e TRPC1 ser conhecida, ainda é incerto o papel desse canal no acometimento ou proteção da fibra muscular à necrose (ZHAO et al., 2012).

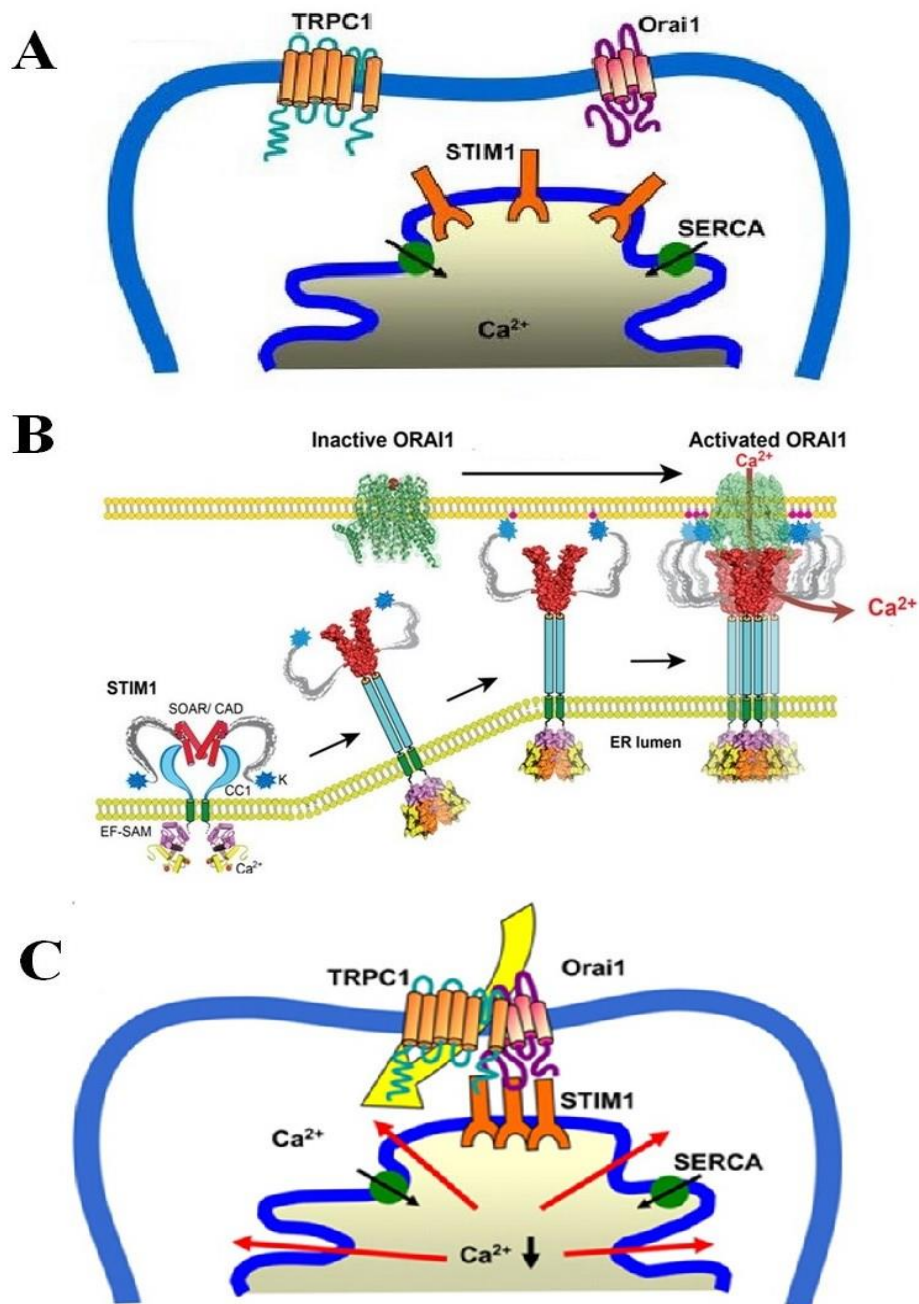


Figura 3. Esquema ilustrativo do SOCE. A) O SOCE é composto pelas proteínas STIM1, presente retículo sarcoplasmático, e pelas proteínas Orai1 e TRPC1 presente no sarcolema, que em níveis normais de Ca^{2+} encontra-se em repouso. B) A redução nos níveis de Ca^{2+} decorrente da liberação desse íon do Retículo Sarcoplasmático, é percebido pelo domínio EF-SAM proteína STIM1, que sofre uma alteração conformacional, translocando-se e unindo-se a outras proteínas STIM1, esse processo leva ao influx de Ca^{2+} através de Orai1, que é o canal seletivo para íons de Ca^{2+} . C) O canal TRPC1 também é ativado por durante esse processo possibilitando o influxo de Ca^{2+} (Modificado de MA et al., 2015; ONG et al., 2007).

1.3 Modelo experimental da DMD: camundongo *mdx*

Avanços no entendimento dos fenômenos biológicos da fibra muscular distrófica ocorrem graças à existência de modelos experimentais da DMD (GROUNDS et al., 2008). A linhagem de camundongos *mdx* (*murine dystrophin X chromosome linked*) (BULFIELD et al., 1984) apresenta mutação do gene distrofina e acometimento das fibras musculares semelhante aos portadores de DMD. No entanto, ciclos sucessivos de regeneração parecem compensar a degeneração muscular nestes animais, sendo menos agressiva comparado aos seres humanos (YABLONKA-REUVENI; ANDERSON, 2006).

As fibras musculares dos camundongos *mdx* apresentam os primeiros sinais de degeneração por volta dos 20 dias de vida, provavelmente devido ao aumento da atividade muscular, resultando em maior susceptibilidade a lesão. O pico de necrose ocorre entre 35 e 90 dias de vida, e após 120 dias a incidência de fibras necróticas diminui (DISATNIK et al., 1998; TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986). O *mdx* apesar de apresentar algumas limitações, tornou-se o modelo mais utilizado pelo fácil manejo e baixo custo (GROUNDS et al., 2008).

Os músculos de diferentes regiões corpóreas apresentam origem embrionária distintas, diferentes estruturas anatômicas, padrões de inervação, capacidade contrátil e de regeneração (RANDOLPH; PAVLATH, 2015; WILTING et al., 1995). Estas condições resultam em diferentes respostas e capacidades adaptativas frente aos quadros patológicos.

Na DMD, as fibras musculares de contração rápida, são preferencialmente acometidas em estágios iniciais da doença (LJUBICIC; BURT; JASMIN, 2014; WEBSTER et al., 1988). Dentre os músculos acometidos, destaca-se o diafragma (DIA), por apresentar intenso acometimento das fibras musculares quando comparado aos demais músculos estriados esquelético, provavelmente pela sua constante atividade durante a respiração (KIM et al., 2012; MULLER et al., 2001).

Diferenças funcionais no músculo DIA dos camundongos *mdx* podem estar relacionadas a alterações metabólicas, redução na capacidade proliferativa, diferenciação de suas células e alterações no perfil de expressão de proteínas reguladores de Ca^{2+} (ROUGER et al., 2002).

Alguns músculos tanto em portadores da DMD, quando em modelos animais, não apresentam sinais de mionecrose durante o curso da doença mesmo na ausência da proteína DIS, como os músculos extraoculares (EOM) (KHURANA, 1995). Diversos fatores são apontados como possíveis mecanismos de proteção, tais como o pequeno diâmetro da fibra (ANDRADE; PORTER; KAMINSKI, 2000), o aumento da expressão da proteína utrofina (PORTER et al., 1998), a quantidade elevada de células satélites em atividade (KALLESTAD

et al., 2011) e a capacidade desses músculos manterem a homeostase do Ca^{2+} (KHURANA, 1995).

Os músculos ILM, assim como os EOMs, são protegidos da mionecrose em camundongos *mdx* (FRY et al., 2010; MARQUES et al., 2007; THOMAS et al., 2008). Os ILM dos camundongos distróficos parecem apresentar maior homeostase do Ca^{2+} , pela expressão e nível de SERCA1 e Calsequestrina (FERRETTI et al., 2009). O estudo dos músculos protegidos tem importância, pois permite elucidar possíveis mecanismos da proteção contra a mionecrose e estabelecer novas medidas terapêuticas para as distrofinopatias (KHANNA et al., 2003; PORTER; KARATHANASIS, 1998).

1.4 Terapia Farmacológica

Diversas estratégias terapêuticas têm sido propostas para corrigir os efeitos da ausência da distrofina na fibra muscular. As terapias farmacológicas, atualmente utilizadas, se baseiam fundamentalmente no uso de anti-inflamatórios esteroides (MANZUR et al., 2008), que postergam temporariamente a perda de força e massa muscular (ESCOLAR et al., 2011). Devido a necessidade de uso contínuo destas drogas pelos pacientes com DMD, os efeitos colaterais são significativos. A busca por fármacos que possam substituir os corticóides tem sido incentivada e é de grande importância clínica para os pacientes DMD.

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês, *polyunsaturated fat acids*) são ácidos essenciais não produzidos no organismo humano. O ômega-3 ($\Omega 3$), é metabolizado pelos animais por dessaturação, sendo um precursor para a síntese de ácido eicosapentanóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (ARTERBURN; HALL; OKEN, 2006; CALDER, 2012).

Estudos demonstraram benefícios do EPA no metabolismo e função do músculo esquelético, como controle do equilíbrio entre anabolismo e catabolismo (RYAN et al., 2009) e a diminuição da necrose em fibras distróficas (MACHADO et al., 2011). A proteção das fibras musculares distróficas parece estar relacionada à redução da ativação da via fator nuclear κB (NF- κB) em consequência à redução nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ (MACHADO et al., 2011; MAURICIO et al., 2013).

Os ácidos graxos poli-insaturados, como o $\Omega 3$ podem alterar as proteínas da membrana plasmática (KIM et al., 2010), resultando em uma alteração na concentração dos íons de Ca^{2+} , via translocação da proteína STIM1 (LEFKIMMIATIS et al., 2009; ROY et al., 2010) e relocação de TRPC1 (YE et al., 2010).

A terapia com $\Omega 3$ na regulação da homeostase do Ca^{2+} , pelas proteínas que compõe o SOCE, poderá esclarecer o papel do mecanismo relacionado à proteção ou acometimento dos músculos distróficos.

“Sua viagem para a realização é impulsionada pelos objetivos que você determina ao longo do caminho.”
Chérie Carter-Scott

2. OBJETIVOS

- Relacionar o perfil de expressão pós-transcricional dos microRNAs em músculos intrínsecos da laringe com processos biológicos;
- Caracterizar as diferenças na expressão gênica e níveis proteicos do SOCE (STIM1, ORAI1 e TRPC1) em músculos intrínsecos da laringe;
- Analisar a expressão dos canais SOCE em músculos de camundongos distróficos *mdx*;
- Avaliar o efeito da terapia com ômega-3 na expressão do SOCE nos músculos distróficos.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista”
Bill Gates

3. MATERIAIS E MÉTODOS

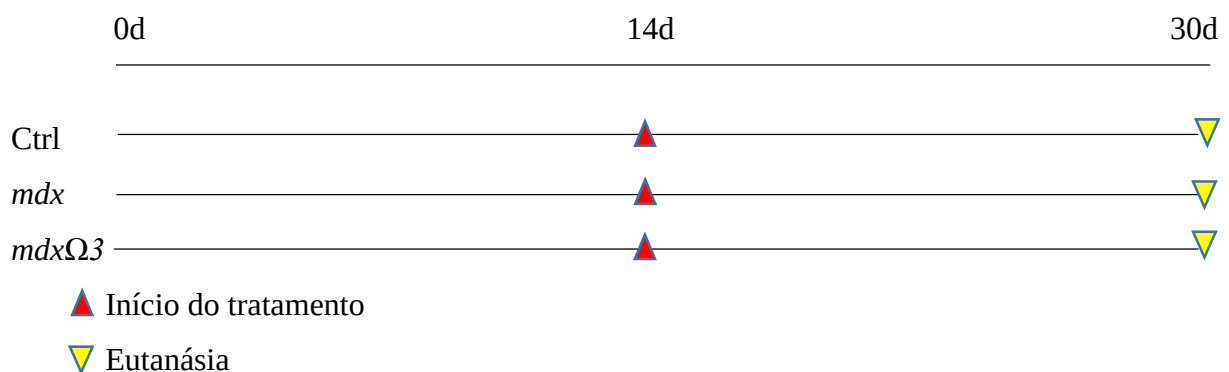
3.1 Animais e desenho experimental

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas das linhagens C57BL/10-ScCr/PasUnib e C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), UNICAMP. Os animais foram transportados para a Unesp, campus Botucatu e durante todo o experimento foram mantidos em mini isoladores, acomodados em racks ventiladas (Alesco AL-21), em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal do Instituto de Biociências (Processo 461) da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IBB-Unesp) (ANEXO).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais e submetidos a eutanásia aos 30 dias de idade com anestesia intraperitoneal de cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg).

- Grupo controle (Ctrl): animais controle da linhagem C57BL/10-ScCr/PasUnib, tratados com Nujol (n =49).
- Grupo *mdx* controle (*mdx*): animais da linhagem *mdx* (C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib), tratados com Nujol (n =49).
- Grupo *mdx* tratado (*mdx*Ω3): animais da linhagem *mdx* submetidos ao tratamento com Ω3 (n =49).



Os camundongos do grupo *mdx* Ω 3 receberam 300 mg/Kg/dia de Omega-3 (FDC Vitaminas, Inc., Miami, FL, EUA; Omega-3 EPA 1000 mg) contendo 0,4 g de EPA, 0,2 g de DHA, 2 mg vitamina E, 0,9 g de proteínas, 2,0 g de gorduras totais, 0,4 g de gordura saturada, 0,0 g gordura trans, 0,0 g de gordura monoinsaturada e 1,0 g de gordura poli-insaturada três vezes na semana, via gavagem durante 15 dias (MATSUMOTO et al., 2009; MAURICIO et al., 2013).

O grupo Ctrl e *mdx* receberam o mesmo volume de óleo mineral (Nujol, Mantecorp, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda, SP, Brazil) composto por petrolato líquido (100% óleo mineral), pela mesma via e período.

3.3 Aspectos histopatológico

3.3.1 Análise de Creatina Kinase (CK) no plasma sanguíneo

A análise de CK é um parâmetro bioquímico utilizado para quantificar a degeneração muscular e provável início de mionecrose. Realizamos a quantificação de CK nos grupos Ctrl (n=12), *mdx* (n=12) e *mdx* Ω 3 (n=12). No 30º dia de vida pós-natal, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (130 mg/kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg) e o sangue foi coletado pela veia cava caudal. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos. O plasma foi separado e utilizado para quantificação de CK (CK-NAC Cinético Crystal, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, BR). As absorbâncias das amostras foram lidas a 25 °C utilizando-se espectrofotômetro UV (Genesys 20, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) com comprimento de onda de 340 nm.

3.3.2 Marcação com o Corante Azul de Evans

A técnica de coloração com Azul de Evans (AE; *tetrasodium diazo salt Evans blue dye*), permite verificar a integridade do sarcolema e mionecrose, uma vez que o corante AE possui alta afinidade com a albumina e é impermeável à membrana citoplasmática não penetrando em células com a membrana plasmática íntegra. Dessa forma, a marcação *in vivo* com este corante evidencia a alteração de permeabilidade do sarcolema de fibras em degeneração (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; STRAUB et al., 1997). Para isso, solução de 1% de AE em PBS (NaCl 0,15 M, tampão fosfato 10 mM, pH 7,4) filtrada em membrana de 2 μ m e foi injetada na cavidade intraperitoneal na concentração de 0,1 g/kg de peso do animal. Após 12 horas da injeção os animais foram sacrificados (MARQUES; MATSUMURA; SANTO NETO, 2007; STRAUB et al., 1997).

3.3.3 Coleta e Processamento dos Músculos para análises histológicas

Os ILM e os músculos DIA foram coletados e mantidos em solução fisiológica durante todo o procedimento. As amostras dos ILM foram posicionadas verticalmente e horizontalmente, e o hemi-diafragma foi enrolado, para permitir o posicionamento vertical das fibras. Os músculos foram fixados em suportes de madeira com *tragacanth gum*, submersos em Hexano (Andriol, Diadema, SP) refrigerado por 1 minuto e imediatamente colocados em nitrogênio líquido, conservados no briofreezer -80°C até a obtenção dos cortes.

Os músculos foram seccionados transversalmente em criostato (Leica, CM 1800) na espessura de 10 µm, à -20° C, 8 cortes por lâmina de um mesmo animal.

As lâminas com cortes dos animais que receberam AE, foram devidamente preparadas e montadas para análise em microscópio de fluorescência (Zeiss, Axiophot 2).

Para a identificação de áreas de inflamação e degeneração/ regeneração foi realizada a coloração de Hematoxilina e eosina. Os cortes dos músculos presentes nas lâminas foram fixados com solução de Bouin por uma hora e, em seguida, lavados com etanol 70% por 12 horas. Posteriormente foram lavados em água corrente por 2 minutos, em seguida submersas em hematoxilina de Harris por 1 minutos e 30 segundos e finalmente por 1 minuto e 20 segundos em eosina. Depois, os cortes foram desidratados em etanol e diafanizados em xilol, e as lâminas montadas em *Permout*. As imagens foram obtidas em microscópio (Olympus) para análise de histopatológica realizada às cegas.

3.4 Extração de proteínas

Os ILM e o DIA dos animais Ctrl e *mdx* foram homogeneizados em solução tampão refrigerada a 4 °C (Tris-HCl 100 mM pH 7,4, Triton X-100 1%, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina) com o auxílio de um homogeneizador em velocidade máxima (Polytron IKA T10 *basic Ultra Turrax*). Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise do extrato total. A quantificação da proteína total foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Cabe ressaltar que cada amostra experimental dos ILM foi composta por 7 amostras biológicas, havendo 3 amostras experimentais.

3.5 Western Blotting

Os extratos proteicos foram tratados com tampão fosfato de sódio 1 M pH 7,0 contendo azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50%, SDS 10% e ditiotreitol 100 mM (Laemmli, 1970), aquecidas a 100 °C por 5 min em banho seco. Quinze microgramas de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida à 10 e 12%, utilizando-se um protocolo com os respectivos tempos e voltagens: 15 minutos em 30V, 15 minutos em 60V e aproximadamente 90 minutos em 120 V. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada a 120 V por 90 minutos em cuba úmida.

O bloqueio foi realizado com leite desnatado a 3% em solução basal (Tris base 1M, NaCl 5M e Tween 20) por 1 h, a fim de reduzir as ligações inespecíficas de proteínas. Em seguida, a incubação com anticorpo primário *Anti-Stromal Interaction molecule 1* (STIM1 – ab108994) (1:1000), *Anti-Orai1* (ab59330) (1:500) e *Anti- Transient Receptor Potential Canonical 1* (TRPC1- ab63074) (1:2000) diluídos em solução basal contendo 1% de leite desnatado, a 4°C, *overnight*, sob agitação. As membranas foram lavadas por 30 min com solução basal, incubadas com anticorpo secundário *Goat anti-rabbit IgG-HRP* (SC-2004) (1:5000) diluído em solução basal contendo 1% de leite desnatado por 90 min, em temperatura ambiente e novamente lavadas por 30 min com solução basal.

A detecção das bandas imunorreativas foi obtida no fotodocumentador G-box chemi após exposição das mesmas a solução de quimioluminescência ECL (GE Healthcare Life Scienc). Os valores obtidos para cada banda foram normalizados pelos valores de *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (GAPDH – SC-25778) (1:1000) proteína endógena, pois essa não se alterou em diferentes condições. Todos experimentos foram repetidos 3 à 5 vezes.

3.6 Extração de RNA total

A extração do RNA foi realizada utilizando Trizol (Ambion, EUA) segundo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, EUA). As amostras de RNA foram tratadas com *DNA-free™ Kit* (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. Cada amostra experimental dos ILM foi constituída por 4 amostras biológicas, havendo 4 amostras experimentais.

3.7 Análise da qualidade do RNA total

A integridade do RNA total foi determinada pela análise qualitativa das bandas RNA ribossomais (rRNA) 18s e 28s utilizando-se gel de agarose 1% (Figura suplementar 1). Para confirmar os resultados obtidos, verificou-se o número da integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA Integrity Number*) utilizando-se do sistema Bioanalyzer (Agilent, EUA) que também analisa a integridade e a proporção dos rRNA 18s e 28s. O Bioanalyzer fornece um RIN que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA íntegro (FLEIGE et al., 2006), sendo aceito apenas as amostras que obtiveram um RIN de no mínimo 7 (Tabela suplementar 1).

3.8 Tratamento do RNA com DNase

As amostras de RNA foram tratadas com *DNA-free™ Kit DNase Treatment and Removal Reagents* (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico, conforme as informações do fabricante. 10 ug do RNA total foi transferido para um microtubo estéril, no qual foi adicionado 5 µL do tampão de DNase I (10x), 2 µL de rDNase I e a reação foi completada para 50 µL com água livre de nucleases (SIGMA), em seguida foi incubada à 37°C por 30 minutos. Por fim, foi adicionado 5 µL do reagente de inativação de DNase e incubado à temperatura ambiente por 2 minutos. A solução foi submetida a centrifugação de $10,000 \times g$ por 1,5 minuto e o RNA foi transferido para um novo microtubo e armazenado à -80°C.

3.9 Reação de Transcrição Reversa (miRNA)

A transcrição reversa dos miRNAs dos músculos ILM e DIA dos animais controle foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Stem-loop Megaplex™ RT Primers (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permitiu a transcrição reversa apenas de miRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico. Para a reação foram utilizados 3 µL (330 ng) de RNA total ao qual foram adicionados os seguintes componentes do kit: Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs with dTTP (100 mM), MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 10X RT Buffer, RNase Inhibitor (20 U/µL) e o volume completado para 4,5 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16 °C por 2 min., 42 °C por 1 min. e 50 °C por 1 segundo seguido, da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

3.10 PCR quantitativo em Tempo Real (miRNA)

Cada amostra de cDNA foi analisada com o *TaqMan Low Density Array Rodent MicroRNA A+B Cards Set v3.0* (Life Technologies, EUA), constituído por duas placas de PCR de 384 poços com primers e sondas de hidrólise específicos, permitindo a cobertura de 641 microRNAs para camundongos. Cada ensaio (primers e sonda) é capaz de discriminar miRNAs maduros que diferem em apenas uma base, utilizando-se pequena quantidade de RNA inicial. Para cada placa, foram utilizados 450 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X), 6 µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 900 µL com água livre de nucleases. Os cartões foram centrifugados duas vezes a 331 g durante 1 minuto, selados e colocado do termociclador QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min. A análise do perfil de expressão dos miRNAs foi realizada utilizando-se o *software ExpressionSuite* (Life Technologies, EUA), através da quantificação relativa pelo método Cq comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e para a normalização foi adotado a opção de normalização global no *ExpressionSuite Software* (v1.0.3) (MESTDAGH et al., 2009).

3.11 Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

A transcrição reversa dos mRNAs obtidos dos músculos foi realizada utilizando o *kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 1,5 µg de RNA, 2 µL de Tampão para Transcrição Reversa (10X), 0,8 µL de dNTPs (25X), 2 µL de Random Primers (10X), 1 µL da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase e o volume completado para 20 µL com água livre de nucleases (SIGMA). A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 10 min., 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min. O cDNA foi armazenado à -20°C.

3.12 PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA)

Para cada reação foram empregados 10 µL de Master Mix (Life Technologies, EUA), baseado na química SYBR Green (Applied biosystems), 2 µL da reação de Transcrição Reversa e 2 µL de iniciador “sense” e 2 µL de iniciador “anti-sense” a 5 µM e o volume foi completado para 20 µL com água livre de nucleases. As condições de ciclagem foram de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A amplificação das amostras foi realizada com Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, USA) em triplicata. A placa foi selada, centrifugada à 1500g por 15 segundos e colocadas termociclador QuantStudio

12K Flex Real-Time PCR System. Os iniciadores para os genes foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 e o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 1). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (2- $\Delta\Delta C_t$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) pelo software Data Assist 3.0.1 (Life Technologies) e foi utilizado como gene de referência o *B2m* (do inglês, *beta-2 microglobulin*).

Tabela 1. Genes e informações dos iniciadores utilizados na RT-qPCR

GENE	NCBI REF SEQ		SEQUÊNCIA INICIADORES	AMPLICON (PB)
<i>Stim1</i>	NM_009287.4	F	CTTGTCCATGCAGTCCCCC	81
		R	CTCTGAGATCCCAGGCCAAG	
<i>Orai1</i>	NM_175423.3	F	CCTGGCGCAAGCTCTACTTA	90
		R	CCATCGCTACCATGGCGAA	
<i>Trpc1</i>	NM_011643.2	F	GGATGTGTCTTTGCCCAAGC	97
		R	ACGAAACCTGGAATGTCTGAGG	
<i>B2m</i>	NM_009735.3	F	CACTGAATTCACCCCCACTGA	93
		R	TCTCGATCCCAGTAGACGGT	

3.13 Análise Estatística

Foram utilizados os seguintes testes Teste t de *Student* para analisar a expressão gênica, o nível das proteínas e diferenças na massa corporal dentro de um mesmo grupo. O teste ANOVA foi utilizado para comparar a massa corporal entre os grupos, os níveis de CK, avaliação da permeabilidade de membrana, expressão gênica e o nível das proteínas para mais 3 grupos. Para ambos os testes foi considerado $p < 0,05$ e os testes foram executados no Sigma *SigmaPlot 12.5* e *GraphPad Prism 6*.

*“Antes de criar, precisamos parar no espaço entre o que
a gente vê no mundo e o que esperamos ver”
Julie Burstein*

4. RESULTADOS

4.1 Diferenças na expressão dos miRNAs nos ILM

O perfil de expressão dos miRNAs entre os ILM e o DIA dos animais controle revelou 24 miRNAs desregulados, sendo 12 miRNAs reduzidos e 12 miRNAs aumentados (*fold change* 2.0 e $p < 0,05$; Tabela 2). Dos quais, 9 foram identificados em vias relacionadas ao processo de miogênese, 5 no processo de regeneração, 3 no processo de inflamação e os demais distribuídos nos processos de fibrose, neuroplasticidade, autofagia, permeabilidade mitocondrial e sistema imunológico.

Tabela 2. MicroRNAs com expressão alterada nos ILM em relação ao DIA do grupo Controle. microRNAs separados em *fold change* menor que 2 (vermelho) e maior que 2 (verde). Classificados de acordo com o processo biológico que possivelmente regulam.

miR	Fold Change (log2)	p-value (<0.05)	Processo Biológico	Referência
hsa-miR-190b	-8,48	0,012	Neuroplasticidade	(PIETRZYKOWSKI e SPIJKER, 2014)
mmu-miR-410	-7.41	0,001	Miogênese	(CLARK; NAYA, 2015)
mmu-miR-133a	-4.02	0,005	Miogênese	(CHEN et al., 2006; ROBERTS et al., 2012)
mmu-miR-376a	-3.94	0,010	Autofagia	(KORKMAZ et al., 2013)
mmu-miR-337-5p	-2.60	0,041	Regeneração	(LIU et al., 2014)
mmu-miR-805	-2.53	0,034	Sistema Imunológico	(WEISS et al., 2012)
mmu-miR-30c	-2.48	0,009	Miogênese	(Guess et al., 2015)
mmu-miR-433	-2.31	0,039	Miogênese	(SNYDER et al., 2013)
hsa-miR-299-5p	-2.28	0,038	Miogênese	(PORTILHO et al., 2015)
mmu-miR-223	-2.22	0,006	Inflamação	(GRECO et al., 2009; ROBERTS et al., 2012)
mmu-miR-128a	-2.16	0,047	Miogênese	(MCCARTHY, 2008; MOTOHASHI et al., 2013)
mmu-miR-382	-2.00	0,018	Regeneração	(HAMRICK et al., 2010)
rno-miR-204	2,145	0,028	Miogênese	(DMITRIEV et al., 2013)
mmu-miR-204	2,181	0,030	Miogênese	(DMITRIEV et al., 2013)
mmu-miR-720	3,871	0,049	Regeneração	(AOI et al., 2010)
mmu-miR-872	3,906	0,001	Inflamação	(CHAVALI, TYAGI, e MISHRA, 2014)
mmu-miR-467c	4,571	0,001	Desconhecido	(FORTERRE et al., 2014)
mmu-miR-221	4,646	0,039	Miogênese	(CARDINALI et al., 2009)
mmu-miR-7a	4,736	0,041	Permeabilidade mitocondrial	(CHAUDHURI et al., 2016)
mmu-miR-182	28,018	0,008	Regeneração	(OLIVIERI et al., 2014)
mmu-miR-34c	48,553	0,021	Regeneração	(GRECO et al., 2009; ROBERTS et al., 2012)
mmu-miR-200a	53,448	0,016	Fibrose	(WANG et al., 2011)
hsa-miR-200b	95,025	0,037	Miogênese	(YAO et al., 2013)
hsa-miR-200c	236,877	0,040	Inflamação	(ANDROSAVICH et al., 2012; REDDY et al., 2012)

4.2 Diferenças no SOCE nos Intrínsecos da Laringe dos camundongos Ctrl e *mdx*

Na comparação da expressão relativa de *Orai1*, *Stim1* e *Trpc1* entre os ILM e DIA, a expressão de *Orai1* foi reduzida nos ILM dos camundongos controle (Ctrl) (Figura 4A) e *mdx* (Figura 4B), e *Stim1* e *Trpc1* não apresentou diferenças nos animais Ctrl ($p > 0,05$; figura 4A), porém estavam aumentadas nos ILM dos camundongos *mdx* (Figura 4B). Demonstrando que os ILM apresentam transcrição dos componentes do SOCE diferente do DIA em situações normais e na ausência da distrofina.

Os níveis das proteínas, STIM1, ORAI1, TRPC1 foram avaliadas para compreensão da reposta do SOCE, pela técnica de *Western blot*. Os ILM de camundongos Ctrl apresentou um aumento na expressão de STIM1 (Figura 4C), enquanto que nos ILM dos *mdx* houve uma redução dos níveis dessa proteína em relação com o DIA *mdx* (Figura 4D). Os níveis de ORAI1 e TRPC1 não apresentaram diferença estatística significativa nos ILM dos Ctrl e *mdx* ($p > 0.05$; figura 4C e 4D).

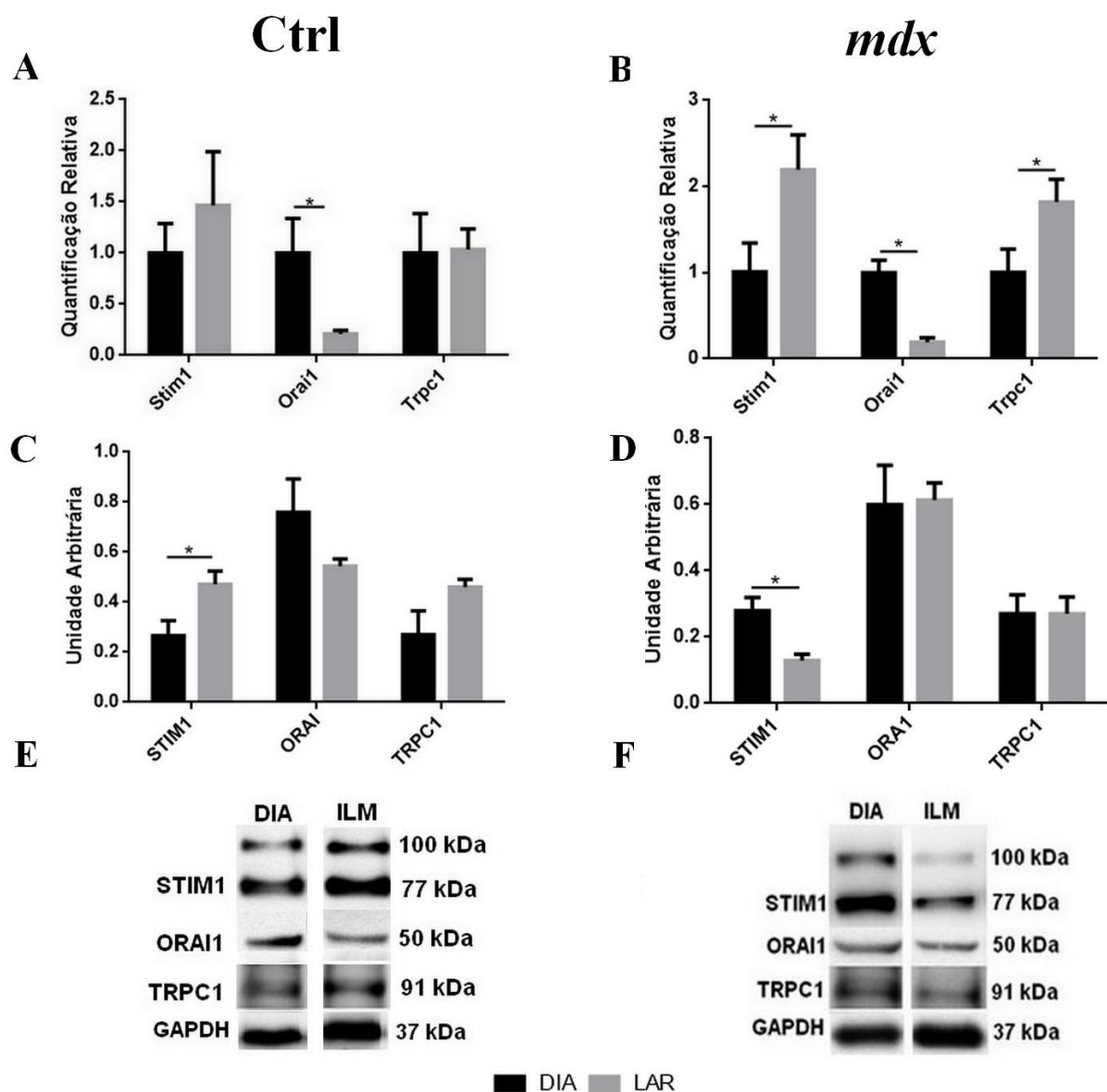


Figura 4. Expressão gênica relativa e níveis proteicos de *Stim1*, *Orai1* e *Trpc1* nos músculos intrínsecos da laringe (ILM) em relação ao diafragma (DIA) de camundongos controles Ctrl e *mdx*. A: expressão relativa no grupo Ctrl B: expressão relativa no grupo *mdx* C: Níveis de proteína no grupo Ctrl D: Níveis de proteína no grupo *mdx*. E: representação das bandas das proteínas analisadas grupo Ctrl. F: representação das bandas das proteínas analisadas grupo *mdx*. Diferença na expressão dada em média e desvio padrão (média $\pm$ desvio padrão) (n=4 por grupo) na expressão gênica, e média e erro padrão (média $\pm$ erro padrão) (n=3 por grupo) nos níveis proteicos * Diferença estatística significativa comparada ao DIA $p < 0,05$ (Test *t* de Student, $p < 0,05$).

4.3 Aspectos histopatológicos da terapia farmacológica com Ômega-3 em camundongos *mdx*

4.3.1 Massa corporal

No início do tratamento, no 14º dia de vida pós-natal, e ao final aos 30 dias de vida, foram mensuradas a massa corporal dos animais. Não foi observado diferenças significativa na média da massa entre os grupos estudados no início e o final do tratamento. Houve diferença em todos os grupos quando comparado a massa corporal final com a inicial (Tabela 3), demonstrando que $\Omega 3$ não alterou a massa corporal.

Tabela 3. Massa corporal (g)

	Início (g)	Término (g)	Diferença (g)
Ctrl	7,22 ± 1,62	16,10 ± 2,27	8,88 ± 3,11 *
<i>mdx</i>	7,35 ± 1,18	14,69 ± 1,70	7,34 ± 1,64 *
<i>mdx</i>$\Omega 3$	7,50 ± 0,37	13,28 ± 1,59	5,78 ± 1,70 *

Valores são expressos como Média ± Desvio Padrão do ganho de massa corporal (g) no início e ao final do tratamento.

* p < 0.05 comparando massa final e inicial dentro do mesmo grupo (n=6 por grupo).

4.3.2 Analise de creatina kinase (CK)

Nos camundongos *mdx* houve um aumento nos níveis séricos de CK (1244.58%) em relação aos animais Ctrl e uma redução significativa nos *mdx* $\Omega 3$ (44,91%) quando comparado ao grupo *mdx* (Tabela 4). Indicando que $\Omega 3$ melhorou os aspectos bioquímicos relacionados a mionecrose.

Tabela 4. Níveis plasmáticos de CK (U/L) em camundongos Ctrl, *mdx* e *mdx* $\Omega 3$.

	Ctrl	<i>mdx</i>	<i>mdx</i> $\Omega 3$
U/L	138,65±113,17	1864,27± 605,57*	1027,10±502,77*#

Valores expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa * p<0.0001 em relação ao Ctrl e

#p<0.001 em relação ao *mdx* (n=12 por grupo).

4.3.3 Análise morfológica qualitativa

Os ILM apresentaram características histológicas semelhantes entre os grupos Ctrl, *mdx* e *mdx* $\Omega 3$. Foram observadas fibras com núcleo periféricos, em formato poligonal e pequeno diâmetro. Não possuía fibras em processo de degeneração (diâmetro pequeno e núcleo central), fibras regeneradas (núcleo central) e processo inflamatório (Figura 5 A, B, C).

O músculo DIA no grupo *mdx* apresentou áreas com infiltrado inflamatório, fibras em processo de degeneração/regeneração e fibras regeneradas (presença de núcleo central) (Figura 5 E). No músculo DIA do *mdx* $\Omega 3$, havia áreas pontuais com infiltrado inflamatório e poucas fibras

com núcleo central (Figura 5 F). O $\Omega 3$ nas fibras musculares distróficas acometidas atenuou os aspectos histopatológicos da mionecrose.

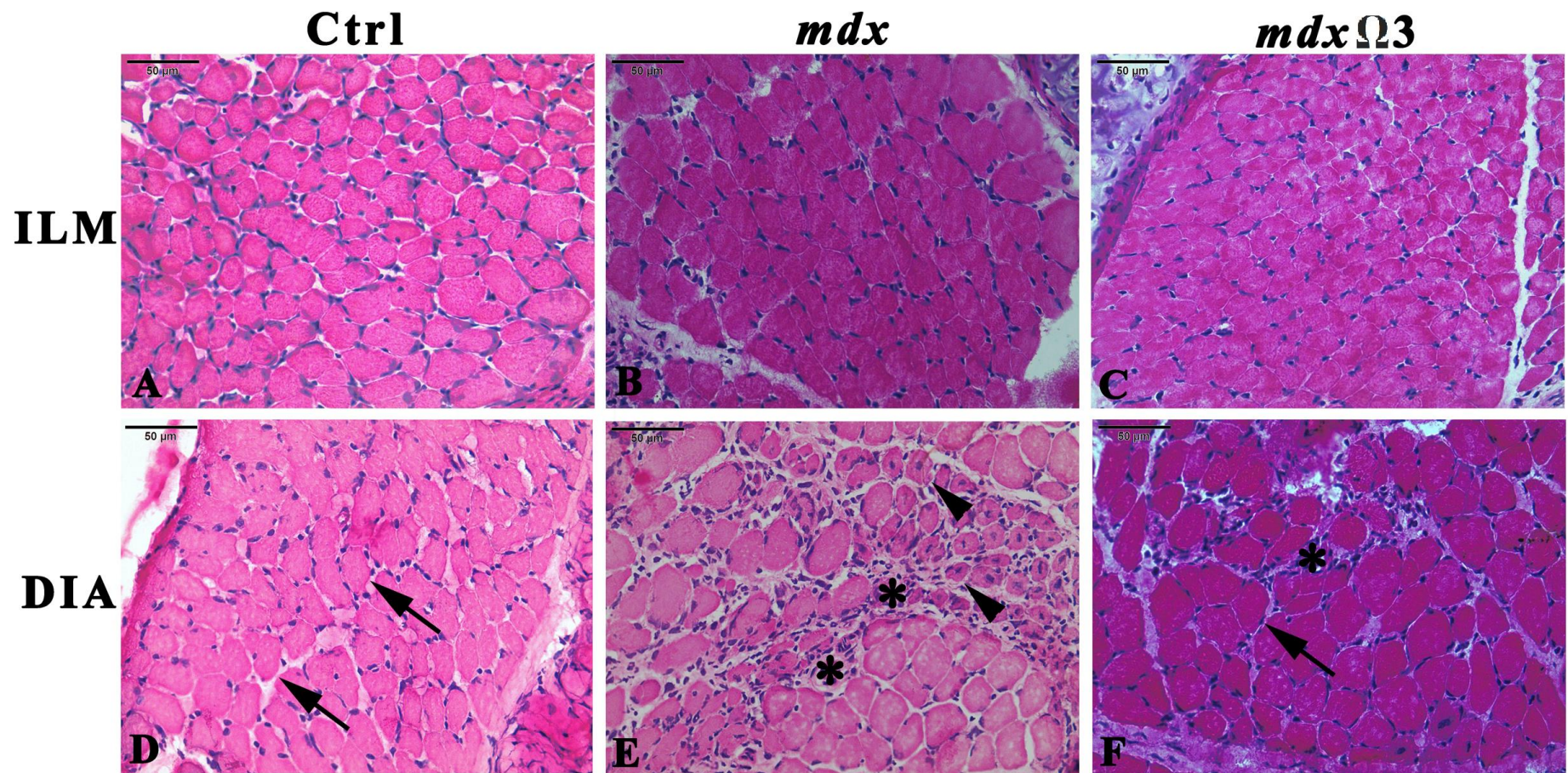


Figura 5. Fotomicrografias de cortes transversais dos grupos controle (Ctrl), *mdx* e *mdx* tratado com ômega-3 (*mdxΩ3*) A. Músculos intrínsecos da laringe (ILM) grupo Ctrl, B. ILM do grupo *mdx*. C. ILM do grupo *mdxΩ3*. D. Diafragma (DIA) Ctrl. E DIA *mdx*. F. DIA *mdxΩ3*. Núcleos periféricos (seta), núcleos centrais (cabeça de seta) e processos inflamatórios (*). Barra de escala em μm .

A permeabilidade do sarcolema apresentou-se alterada no grupo *mdx* (Figura 6B), evidenciada pela coloração em vermelho brilhante em relação ao grupo Ctrl. Observou-se uma redução significativa na porcentagem das fibras permeadas com o AE no grupo *mdxΩ3* (Figura 6C) em relação a área total do grupo *mdx* (Figura 6D).

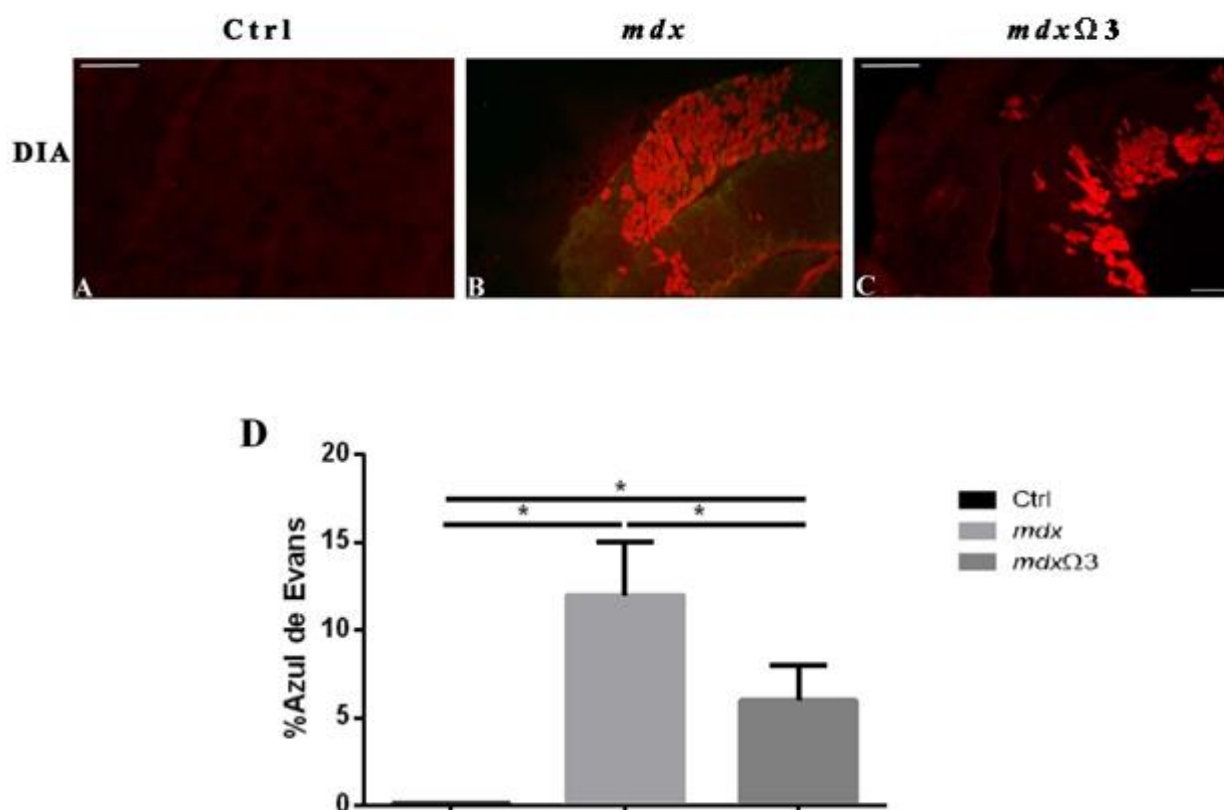


Figura 6. Fotomicrografias de cortes transversais dos grupos controle (Ctrl), *mdx* e *mdx* tratado com ômega-3 (*mdxΩ3*) A. Marcação de Azul de Evans (AE) no DIA do grupo Ctrl. B. AE no grupo *mdx*. C. AE no grupo *mdxΩ3*. D. Porcentagem de fibras marcadas pelo azul de Evans. * $p < 0,05$ (Teste Anova one-way)

4.4 Efeitos do Ômega-3 no SOCE dos camundongos *mdx*

O músculo DIA dos camundongos *mdx* e *mdx*Ω3 apresentou uma redução na expressão gênica relativa de *Stim1* e *Trpc1* em comparação ao DIA dos camundongos Ctrl ($p < 0.05$; Figura 7A), enquanto que *Orai1* mostrou-se aumentada no DIA *mdx* em relação ao Ctrl ($p < 0.05$; Figura 7A). Não houve diferença estatística significativa no DIA *mdx*Ω3 em relação aos demais grupos (Figura 7A). Nos ILM *mdx* e *mdx*Ω3 houve um aumento na expressão de *Orai1* em relação ao ILM Ctrl (Figura 7B), os demais genes analisados não apresentaram diferença estatística significativa nos ILM ($p > 0,05$ Figura 7B).

As proteínas STIM1, ORAI1 e TRPC1 não apresentaram diferença entre os grupos no DIA (Figura 7C). Enquanto que os níveis de STIM1 e TRPC1 foram reduzidos nos ILM dos camundongos *mdx* em relação ao Ctrl ($p < 0,05$; figura 7D), e aumentadas nos ILM dos *mdx*Ω3 em relação ao ILM *mdx* (Figura 7D). Os níveis de ORAI1 não apresentou diferença nos ILM (Figura 7D). Demonstrando que o Ω3 não altera a expressão proteica do SOCE nos músculos acometido pela mionecrose e que os ILM apresentam características adaptativas na expressão do SOCE mediante ao tratamento com Ω3.

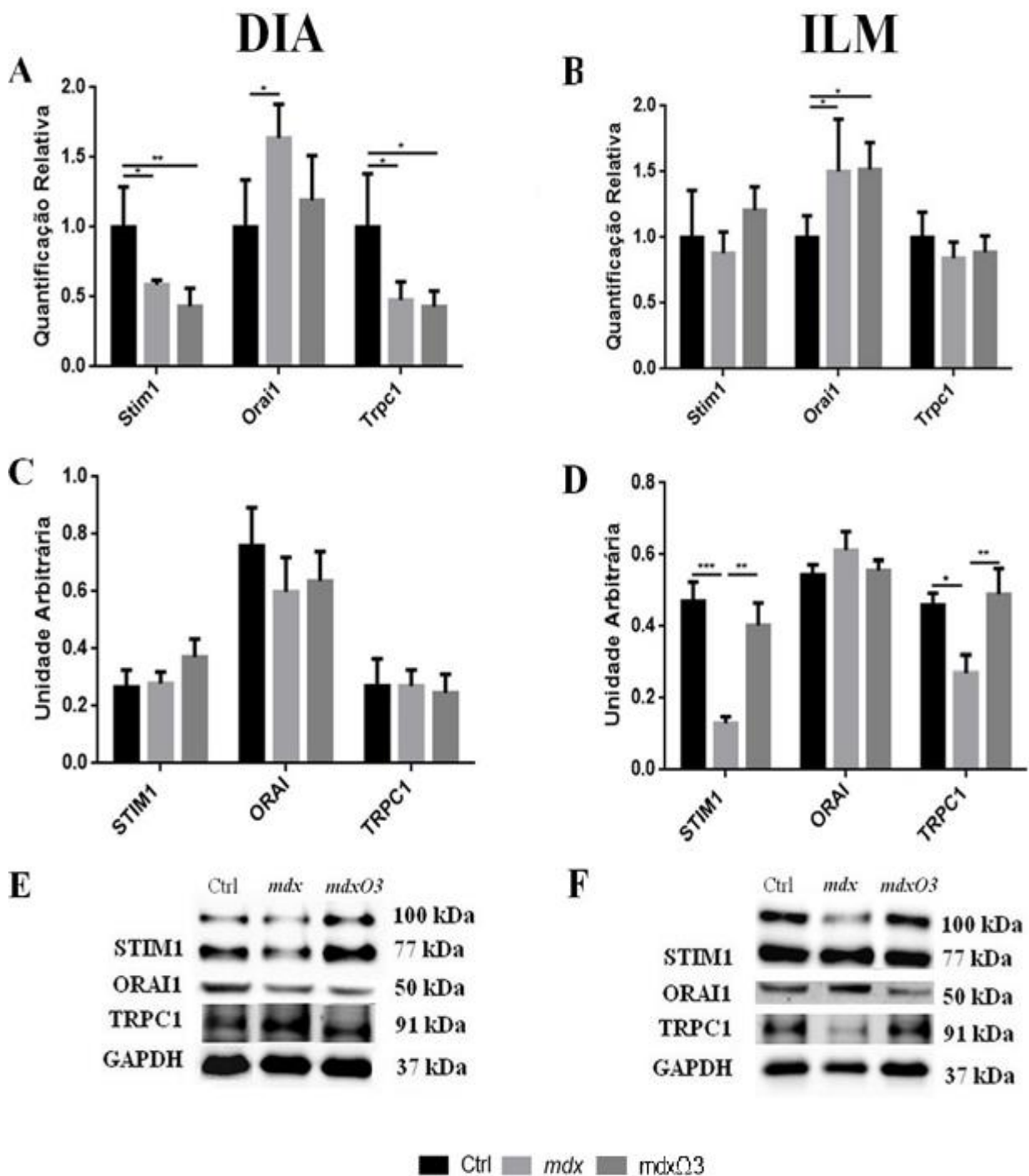


Figura 7. Expressão gênica relativa e níveis proteicos de *Stim1*, *Orai1* e *Trpc1* nos músculos diafragma (DIA) e Intrínsecos da Laringe (ILM) de camundongos controle (Ctrl), *mdx* e *mdx* tratados com ômega-3 (*mdxΩ3*). A: expressão relativa no DIA B: expressão relativa no ILM C: Níveis de proteína no DIA. D: Níveis de proteína no ILM. E: representação das bandas das proteínas analisadas DIA F: representação das bandas das proteínas analisadas nos ILM. Diferença na expressão dada em média e desvio padrão (média ± desvio padrão) (n=4 por grupo) na expressão gênica, e média e erro padrão (média ± erro padrão) (n=3 por grupo) nos níveis proteicos * Diferença estatística significativa p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 (Teste de variância Anova one-wa seguido de teste de Tukey).

“Pensar é alcançar algo até então desconhecido, tendo a certeza de que não há saber pronto e acabado”
Marilena Chaui

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observado que os ILM apresentam características ímpares na expressão de miRNAs em condições normais e que canais reguladores da homeostase do Ca^{2+} estão diferentemente expressos em condições patológicas, como na DMD. Adicionalmente, verificamos que o $\Omega 3$ protegeu a fibra muscular nos aspectos histopatológicos da mionecrose e atuou na regulação do SOCE nos ILM.

5.1 Diferenças na regulação pós-transcricional nos Músculos Intrínsecos da Laringe de camundongos Ctrl

Os miRNAs participam da regulação de diversos processos biológicos essenciais para o estabelecimento e manutenção do tipo celular (GÜLLER; RUSSELL, 2010), sendo considerado um mecanismo de regulação pós transcricional (SÆTROM; SNØVE JR; ROSSI, 2007).

Diversos miRNAs são expressos em tecido específico (BABAK et al., 2004) inclusive no tecido muscular esquelético em diferentes espécies (MCCARTHY, 2008). Esses desempenham papel crucial na miogênese e diferenciação muscular (CESANA et al., 2011) e no estabelecimento de um fenótipo muscular específico (MCCARTHY; ESSER, 2007).

Diferentes músculos podem apresentar expressão distinta de um mesmo miRNA em condições normais ou patológicas (MCCARTHY; ESSER; ANDRADE, 2007) podendo este estar relacionado a características como: tipos de fibras, metabolismo, sinalização e angiogênese (ZEIGER e KHURANA, 2010).

Nesse estudo identificou-se os padrões distintos de expressão dos miRNAs nos ILM em relação ao DIA e relações à vias de diferentes processos biológicos já identificados no tecido muscular esquelético. Apesar de alguns miRNAs identificados não serem considerados músculo específico (*myomiRs*), a maior parte desses contribuem para o processo de miogênese e regeneração. Os alvos específicos dos miRNAs podem atuar como reguladores da modificação da cromatina e ciclo celular. (ERRIQUEZ; PERINI; FERLINI, 2013).

Os miRNAs podem contribuir para características dos ILM, como continua diferenciação celular e maior capacidade regenerativa. O aumento do miR-34c parece regular e reduzir a expressão de CDK6 (do inglês, *Cyclin-dependent kinase 6*) (GRECO et al., 2009), que são essenciais para a progressão do ciclo celular e indução de diferenciação (PURI; SARTORELLI, 2000).

Enquanto que a redução do miR-133a pode ser um indicativo de adaptação para promover a expressão de genes necessários para o processo de regeneração (MCCARTHY; ESSER, 2007), como fatores de crescimento semelhante a insulina (IGF-1, do inglês *insulin-like growth factors* 1)(SCICCHITANO; RIZZUTO; MUSARÒ, 2009), que parecem favorecer a programação miogênica através do aumento de fatores transcricionais MEF2 (do inglês, *myocyte specific enhancer factor 2*) (MUSARÒ, 2014; PELOSI et al., 2015). Os ILM tem a expressão de *Myf5* aumentada em relação aos músculos dos membros (BAIN et al, 2001) que pode ocorrer devido a redução da expressão do miR-128a (SHI et al, 2015). A família de miRNA-30 tem se mostrado importante regulador da sinalização de Ca^{2+} via Calcineurina (WU et al., 2015) , enquanto o miR-133a parece regular a expressão do receptor tipo II de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3RII) (DRAWNEL et al., 2012).

Os ILM possuem um perfil de regulação pós-transcricional que favorecem as características de contínua capacidade proliferativa e regenerativa. Entretanto estudos futuros deverão identificar os alvos regulados por esses miRNAs, validar a interação entre eles e analisar em diferentes espécies e condições patológicas. A expressão dessas moléculas caracterizará um possível perfil de expressão conservado e auxiliará na identificação de prováveis alvos terapêuticos.

5.2 Expressão do SOCE nos ILM Ctrl e mdx

O ILM, semelhante ao EOM, é constituído por fibras musculares de tamanho pequeno que possuem um grande volume de RS (SPENCER; PORTER, 1988). Apresentam características moleculares, bioquímicas, fisiológicas particulares (MCLOON et al., 2007) e uma melhor homeostase do Ca^{2+} quando comparados a outros músculos (FERRETTI et al., 2009, 2015; KHURANA, 1995).

A principal organela de armazenamento de Ca^{2+} em estado de repouso no músculo esquelético de mamíferos é o RS (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MÜNTENER, 2000; SOMLYO et al., 1981), liberando esse íon para o citosol quando necessário para o processo de contração (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MÜNTENER, 2000). A redução nos níveis de Ca^{2+} no RS resulta na ativação uma via de sinalização denominada SOCE (PUTNEY, 1986).

A ausência da distrofina na maioria das fibras musculares dos camundongos *mdx* resulta em diversos processos que agravam o quadro patofisiológico da DMD (DECONINCK; DAN, 2007) dentre esses, o maior influxo de Ca^{2+} pode estar relacionado a disfunção de alguns canais iônicos (TUTDIBI et al., 1999).

Os ILM são protegidos no processo de mionecrose (MARQUES et al., 2007; THOMAS et al., 2008) e apresentam regulação diferenciada de alguns canais de Ca^{2+} comparado a músculos apendiculares (BARROS MARANHÃO et al., 2015; FERRETTI et al., 2009, 2015).

A expressão dos genes e proteínas responsáveis pela codificação do SOCE possui uma grande importância para a formação, diferenciação e desempenho das funções das células musculares (DARBELLAY et al., 2009). A interação das proteínas STIM1/ORAI1 é dependente do nível dessas proteínas isoladas (ZHENG et al., 2008). O equilíbrio entre elas resulta na ativação do SOCE e na homeostase do Ca^{2+} durante o processo de contração e relaxamento (SCRIMGEOUR et al., 2009). A ativação de TRPC1 tem se mostrado dependente da interação junto a STIM1 (PANI; BOLLIMUNTHA; SINGH, 2012; PANI et al., 2009).

Durante o processo de ativação do SOCE, a proteína transmembrana STIM1 77kDa, sofre modificações pós-translacionais aumentando seu peso para 100 kDa (DZIADEK; JOHNSTONE, 2007), do mesmo modo a proteína ORAI1 inicialmente com 33 kDa, e ao ser ativada passa a pesar 50 kDa (ZHAO et al., 2012). As diferenças observadas nos sugerimos que uma regulação pós-transcricional pode ter ocorrido, resultando na diferença entre os dados.

A *Stim1* é considerada uma dos principais componentes do SOCE (KIVILUOTO et al., 2011), pois sua expressão apresenta correlação positiva à diferenciação celular acelerada de mioblastos (DARBELLAY et al., 2009; ONOPIUK et al., 2015). Sua expressão também tem sido considerada um importante fator molecular para ativação de Fator Nuclear das células T ativadas (NFAT do inglês, *Nuclear Factor of Activated T cells*). Já a expressão de *Trpc1* é dependente da via calcineurina-NFAT e tem relação direta com o alteração (aumento e/ou redução) na concentração de Ca^{2+} intracelular (LOUIS et al., 2008; PIGOZZI et al., 2006).

No tecido muscular, a expressão genica de *Stim1* e *Trpc1* atuam principalmente nas etapas de diferenciação no processo de miogênese (PHUONG et al., 2013; STIBER et al., 2008) e na regeneração pós-natal do músculo esquelético (SAKUMA et al., 2003). Quando a *Trpc1* não é expressa resulta em miotubos reduzidos e pouco nucleados (ANTIGNY et al., 2013).

O aumento da expressão gênica de *Stim1* e *Trcp1* nos ILM dos camundongos *mdx* em relação ao DIA *mdx*, pode ser relacionada à maior habilidade de contínua diferenciação celular que esses músculos possuem (MCLOON et al., 2007).

A redução na expressão de *Stim1* parece reduzir a expressão de *Serca1* (KIVILUOTO et al., 2011). Ferretti e colaboradores (FERRETTI et al., 2015) constataram não haver diferença entre os níveis de expressão de *Serca1* nos ILM quando comparado ao músculo tibial anterior, sendo possível que nos ILM dos camundongos Ctrl a expressão de *Stim1* regule a expressão de *Serca1* e consequentemente maior regulação nos níveis de Ca^{2+} do RS.

O aumento nos níveis da proteína STIM1 nos ILM dos Ctrl, pode estar diretamente associado a demanda funcional desses músculos, contribuindo para a contração super rápida (HOH, 2005). Todavia, mediante a ausência da distrofina, ocorre uma redução nos níveis de STIM1. Níveis reduzidos de Ca^{2+} foram observados em células musculares que possuíam uma deficiência na expressão da proteína STIM1 (LI et al., 2012). Sugerimos que essa seja uma resposta adaptativa, na tentativa de melhorar a homeostase do Ca^{2+} , mecanismo esse pouco esclarecido até o presente momento.

O mRNA *Orai1* transcreve um canal regulador de Ca^{2+} da membrana plasmática (FESKE et al., 2006) considerado essencial para a expressão de genes dependente de Ca^{2+} (KAR; PAREKH, 2013). No presente estudo os ILM apresentam redução na expressão de *Orai1* em relação ao DIA no grupo Ctrl e *mdx*, podendo estar associado a uma redução na mobilidade do Ca^{2+} (ARIMILLI et al., 2010) e ao melhor controle do influxo desse íon para o meio intracelular nos ILM.

Diferente de estudo publicado por Ferretti e colaboradores (FERRETTI et al., 2015) onde foi observado um aumento de ORAI1 nos ILM e no EOM em relação ao tibial anterior de ratos Wistar, neste estudo não foi observado diferença no nível dessa proteína em relação ao ILM e DIA nos camundongos Ctrl e *mdx*. A diferença dentre os resultados pode ser explicada pelo grupo de músculos utilizados, pois o cricotireóideo foi analisado isoladamente, pela idade dos animais (60 dias de idade) e pelo estado de ativação da proteína analisada.

Portanto, sugere-se que o SOCE possui um papel importante nas adaptações fisiológicas e patológicas nos ILM. No entanto estudos relacionados a funcionalidade desse canal, inibindo seus componentes e análises da interação entre as proteínas são necessárias para maiores esclarecimentos.

5.3 Efeito do ômega-3 nos animais distróficos e no SOCE

O tratamento com $\Omega 3$ não alterou a massa corporal entre os grupos, diferindo-se dos tratamentos realizado com anti-inflamatórios esteroides, os glicocorticoides, que são normalmente utilizados para o tratamento da DMD. Os glicocorticoides desencadeiam diversos efeitos colaterais (BONIFATI et al., 2000), resultando na redução da massa corporal dos camundongos *mdx* (PEREIRA; MARQUES; SANTO NETO, 2015), como o tratamento com deflazacorte (KARIMZADEH; GHAZAVI, 2012). Foi constatado um aumento da massa corporal final comparada à inicial entre os animais do mesmo grupo, indicando que a dosagem administrada e/ou a manipulação durante o período experimental não alterou a taxa de crescimento dos camundongos. Corroborando com nossos dados, estudos anteriores também não observaram diferenças na massa

corporal durante o tratamento com EPA e $\Omega 3$ (DE CARVALHO et al., 2013; MACHADO et al., 2011; MAURICIO et al., 2013).

Os níveis de CK no soro se encontram elevados quando o músculo sofre algum tipo de injúria ou lesão, como no DMD. A instabilidade no sarcolema, leva a mionecrose e aumento dessa enzima está relacionando a gravidade do fenótipo (ZATZ et al., 1991). O tratamento com ômega-3 reduziu significativamente os níveis de CK, sugerindo melhora da mionecrose. A redução nos níveis de CK corrobora com efeitos benéficos do tratamentos com $\Omega 3$ (FOROUGHINIA; SALAMZADEH; NAMAZI, 2013; MAURICIO et al., 2013).

A marcação com o corante AE permite verificar alteração integridade e na permeabilidade do sarcolema de fibras dos camundongos *mdx* (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; STRAUB et al., 1997). A redução das fibras positivas ao AE confirma a redução da permeabilidade da membrana e a diminuição da mionecrose com o tratamento com $\Omega 3$ (MAURICIO et al., 2013).

A diminuição da inflamação no DIA, assim como redução na quantidade de núcleos centrais, corroboram com achados anteriores com tratamento com $\Omega 3$ e EPA purificado (MACHADO et al., 2011; MAURICIO et al., 2013). As características histopatológicas podem estar associadas a regulação dos íons de Ca^{2+} intracelular, uma vez que o $\Omega 3$ pode alterar canais iônicos através das alterações que gera na membrana fosfolipídica (ENDO; ARITA, 2015; POUND; KANG; LEAF, 2001).

Ainda não há um consenso sobre a expressão e os níveis das proteínas componentes do SOCE com relação a fisiopatologia da mionecrose. Foi constatado não haver alterações nos níveis de STIM1 e um aumento no nível de ORAI1 nos músculos distróficos (ZHAO et al., 2012). Outro estudo mostrou os níveis de STIM1 aumentados em mioblastos distróficos (ONOPIUK et al., 2015) e Edwards e colaboradores (EDWARDS et al., 2010) observaram aumento nos níveis de STIM1 e ORAI1 em células isoladas do músculo EDL de *mdx*.

A expressão gênica de *Trpc1* varia durante a miogênese pós natal (ANTIGNY et al., 2013) e os níveis da proteína TRPC1 parecem ter relação com as diferentes respostas de músculos apresentando-se aumentada nos músculos distróficos acometidos, (GERVÁSIO et al., 2008; MATSUMURA et al., 2011).

O papel do SOCE é considerado como uma dos responsáveis pela alteração na homeostase do Ca^{2+} via SOCE nos camundongos *mdx* através do aumento do gene *Orai1* (ZHAO et al., 2012) e sua transcrição parece ser dependente de algumas subunidades do fator nuclear de transcrição NF- κ B (EYLENSTEIN et al., 2012), que se encontra em níveis elevados no músculo diafragma do camundongo *mdx* (KUMAR; BORIEK, 2003).

No presente estudo identificou-se o aumento da expressão de *Orai1* no DIA e no ILM distrófico em relação ao normal, sendo consistente com o observado por Zhao e colaboradores (2012). Adicionalmente a expressão do gene *Orai1* parece controlar o início do processo de diferenciação em mioblastos humanos (DARBELLAY et al., 2009), de modo que ablação genética de *Orai1* resultou em alteração no crescimento de alguns animais (VIG et al., 2008). Sugerimos que o aumento da expressão do gene *Orai1* no DIA e no ILM, possa preceder a regulação de vias necessárias para o processo de regeneração, não analisados nesse trabalho.

Camundongos *knockdown* para *Trpc1* (*Trpc1*^{-/-}) apresentaram níveis elevados de TNF- α circulante (MEDIC et al., 2013) que se encontra aumentada no músculo diafragma distrófico (BARROS MARANHÃO et al., 2015) e reduzido nos músculos distróficos quando tratados com $\Omega 3$ (MAURICIO et al., 2013). Diferindo dos nossos resultados observados do DIA *mdx* em relação ao Ctrl, a expressão aumentada de *Trpc1* foi observada no músculo quadríceps de pacientes distróficos (KIVILUOTO et al., 2011) e em camundongos *mdx* (VANDEBROUCK et al., 2002).

As diferenças em relação a dados existente em sobre a expressão dos componentes do SOCE no processo de mionecrose de músculos distróficos acometidos pode ser justificado pelo músculo utilizado e por diferenças nas idades dos camundongos.

O SOCE é importante para a fisiologia da fibra muscular, controlando a entrada de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e ativação de genes (PAREKH; PUTNEY JR, 2005; ROOS et al., 2005; XING et al., 2014). Apesar de estudos mostrarem que outras proteínas reguladoras de Ca^{2+} apresentam diferentes níveis entre músculos protegidos e músculos acometidos (FERRETTI et al., 2015; ZEIGER; MITCHELL; KHURANA, 2010), o SOCE nos camundongos *mdx*, parece não ser a principal via de proteção a mionecrose, porém contribui para a habilidade de homeostase de Ca^{2+} nos ILM. Sugerimos que estudo do SOCE deva ser realizado em outras idades dos camundongos *mdx* para avaliar a regulação de seus componentes ao longo dos processos de degeneração/regeneração dos músculos distróficos.

O tratamento alterou significativamente os níveis de STIM1 e TRPC1 no ILM dos *mdx* $\Omega 3$, corroborando com o observado por Roy e colaboradores (2010), onde o EPA induziu a um aumento nos níveis da translocação de STIM1. Adicionalmente, estudo recente propôs que PUFAs inibem o acoplamento STIM1-ORAI1 e induz a associação STIM1-STIM1 (HOLOWKA et al., 2014). Sugerimos que o aumento de STIM1 e TRPC1 observado no ILM *mdx* $\Omega 3$, possa levar a regulação de alguns canais de Ca^{2+} e que essa regulação contribui para melhor homeostase de Ca^{2+} nos em músculos distróficos protegidos.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”
Paulo Freire

6. CONCLUSÕES

- Os ILM possuem o perfil diferenciado de microRNAs que podem participar da regulação dos processos de miogênese e regeneração.
- STIM1 e TRPC1 auxiliam na homeostase do Ca^{2+} e na adaptação dos ILM contra a mionecrose na ausência da distrofina. Entretanto o SOCE não tem relação direta com o processo de mionecrose nos camundongos *mdx* aos 30 dias de idade.
- O ômega-3 protege o músculo distrófico da mionecrose e altera a expressão de STIM1 e TRPC1 nos ILM.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. H.; PORTER, J. D.; KAMINSKI, H. J. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? **Microscopy Research and Technique**, v. 48, n. 3-4, p. 192–203, 2000.
- ANDROSAVICH, J. R. et al. Disease-linked microRNA-21 exhibits drastically reduced mRNA binding and silencing activity in healthy mouse liver. **RNA**, v. 18, n. 8, p. 1510-1526, 2012..
- ANTIGNY, F. et al. During post-natal human myogenesis, normal myotube size requires TRPC1- and TRPC4-mediated Ca^{2+} entry. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 11, p. 2525–2533, 2013.
- AOI, W. et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 4, p. E799-E806, 2010.
- ARIMILLI, S. et al. Pivotal Advance: Nonfunctional lung effectors exhibit decreased calcium mobilization associated with reduced expression of ORAI1. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 6, p. 977–988, 2010.
- ARTERBURN, L.; HALL, E.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n– 3 fatty acids in humans. **The American Journal of Cinical Nutrition**, v. 83, p. 1467S–1476S, 2006.
- BABAK, T. et al. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 11, p. 1813–1819, 2004.
- BAIN, N. L. et al. Adult Mouse Intrinsic Laryngeal Muscles Express High Levels of the Myogenic Regulatory Factor , MYF · 5. **Journal of Medical Speech-Language Pathology**, v. 9, n. 3, p. 157–167, 2001.
- BARROS MARANHÃO, J. et al. Changes in calsequestrin, TNF- α , TGF- β and MyoD levels during the progression of skeletal muscle dystrophy in mdx mice: A comparative analysis of the quadriceps, diaphragm and intrinsic laryngeal muscles. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, p. 285–293, 2015.
- BARTEL, D. P. **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function**Cell, 2004.
- BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MÜNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiological reviews**, v. 80, n. 3, p. 1215–1265, 2000.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 7, p. 517–529, 2003.
- BLAKE, D. J. et al. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 291–329, 2002.

BONIFATI, M. D. et al. A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & nerve**, v. 23, n. 9, p. 1344–1347, 2000.

BRADFORD, M. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRAUN, T.; GAUTEL, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 6, p. 349–361, 2011.

BRIGGS, M. M.; SCHACHAT, F. Early specialization of the superfast myosin in extraocular and laryngeal muscles. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 16, p. 2485–2494, 2000.

BUCKINGHAM, M.; RIGBY, P. W. J. **Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis** *Developmental Cell*, 2014.

BULFIELD, G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 4, p. 1189–1192, 1984.

CACCHIARELLI, D. et al. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 5, p. 258–265, 2011

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645-662, 2012.

CARDINALI, B. et al. Microrna-221 and Microrna-222 Modulate Differentiation and Maturation of Skeletal Muscle Cells. **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7607, 2009.

CESANA, M. et al. A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 947, 2011.

CHAUDHURI, A. D. et al. MicroRNA-7 regulates the function of mitochondrial permeability transition pore by targeting VDAC1 Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 6483–6393, 2016.

CHAVALI, V.; TYAGI, S. C.; MISHRA, P. K. Differential Expression of Dicer, miRNAs, and Inflammatory Markers in Diabetic Ins2^{+/-} Akita Hearts. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 1, p. 25–35, 2014.

CHEN, J. F. et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 5, p. 867–879, 2010.

CHEN, J.-F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 228–233, 2006.

CHIN, E. R. Intracellular Ca²⁺ signaling in skeletal muscle: decoding a complex message. **Exercise**

and sport sciences reviews, v. 38, p. 76–85, 2010.

CLAPHAM, D. E. et al. The trp ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 387–396, 2001.

CLARK, A. L.; NAYA, F. J. MicroRNAs in the myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-regulated Gtl2-Di Ω 3 noncoding RNA locus promote cardiomyocyte proliferation by targeting the transcriptional coactivator Cited2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 38, p. 23162–23172, 2015.

CONSTANTIN, B. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 2, p. 635–642, 2014.

DARBELLAY, B. et al. STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 5370–5380, 2009.

DE CARVALHO, S. C. et al. EPA protects against muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by promoting a shift from the M1 to M2 macrophage phenotype. **Journal of Neuroimmunology**, v. 264, n. 1-2, p. 41–47, 2013.

DECONINCK, N.; DAN, B. **Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses** *Pediatric Neurology*, 2007.

DISATNIK, M. H. et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **Journal of the neurological sciences**, v. 161, n. 1, p. 77–84, 1998.

DMITRIEV, P. et al. Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. **BMC genomics**, v. 14, n. 0, p. 265, 2013.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. The other side of cardiac Ca(2+) signaling: transcriptional control. **Frontiers in physiology**, v. 3, n. 2, p. 452, 2012.

DRAWNEL, F. M. et al. Mutual antagonism between IP3R2 and miRNA-133a regulates calcium signals and cardiac hypertrophy. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 5, p. 783–798, 2012.

DZIADEK, M. A.; JOHNSTONE, L. S. Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. **Cell Calcium**, v. 42, n. 2, p. 123–132, 2007.

EDWARDS, J. N. et al. Upregulation of store-operated Ca²⁺ entry in dystrophic mdx mouse muscle. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 299, n. 1, p. C42–C50, 2010.

ENDO, J.; ARITA, M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Cardiology**, v. 67, p. 22–27, 2015.

ENGEL; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K. H. **Dystrophinopathies**. New York: McGraw-Hill, Inc: In Myology, 1994.

ERRIQUEZ, D.; PERINI, G.; FERLINI, A. Non-coding RNAs in muscle dystrophies.

International journal of molecular sciences, v. 14, n. 10, p. 19681–19704, 2013.

ESCOLAR, D. M. et al. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 77, n. 5, p. 444–452, 2011.

EYLENSTEIN, A. et al. Transcription factor NF- κ B regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2719–2730, 2012.

FERRETTI, R. et al. Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum CA²⁺-atpase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice. **Muscle and Nerve**, v. 39, n. 5, p. 609–615, 2009.

FERRETTI, R. et al. Expression of calcium-buffering proteins in rat intrinsic laryngeal muscles. **Physiological Reports**, v. 3, n. 6, p. e12409, 2015.

FERRETTI, R.; NETO, H. S.; MARQUES, M. J. Expression of Utrophin at Dystrophin-Deficient Neuromuscular Synapses of mdx Mice: A Study of Protected and Affected Muscles. **Anatomical Record**, v. 294, n. 2, p. 283–286, 2011.

FESKE, S. et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 179–185, 2006.

FLEIGE, S. et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1601–1613, 2006.

FOROUGHINIA, F.; SALAMZADEH, J.; NAMAZI, M. H. Protection from procedural myocardial injury by omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs): Is related with lower levels of creatine kinase-MB (CK-MB) and troponin I? **Cardiovascular Therapeutics**, v. 31, n. 5, p. 268–273, 2013.

FORTERRE, A. et al. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. **Cell Cycle**, v. 13, n. 1, p. 78–89, 2014.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; JORGENSEN, A O. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. **Annual review of physiology**, v. 56, p. 509–534, 1994.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

FRY, L. T. et al. Effect of dystrophin deficiency on selected intrinsic laryngeal muscles of the mdx mouse. **Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR**, v. 53, n. 3, p. 633–647, 2010.

GERVÁSIO, O. L. et al. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of cell science**, v. 121, p. 2246–2255, 2008.

GODING, G. S.; AL-SHARIF, K. I.; MCLOON, L. K. Myonuclear addition to uninjured laryngeal

myofibers in adult rabbits. **Annals of Otolaryngology and Laryngology**, v. 114, n. 7, p. 552–557, 2005.

GRECO, S. et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 10, p. 3335–3346, 2009.

GROUND, M. D. et al. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 1, p. 1–19, 2008.

GUESS, M. G. et al. miR-30 Family microRNAs Regulate Myogenic Differentiation and Provide Negative Feedback on the microRNA Pathway. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0118229, 2015.

GUHARAY, F.; SACHS, F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 352, p. 685–701, 1984.

GÜLLER, I.; RUSSELL, A. P. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. **The Journal of physiology**, v. 588, n. 21, p. 4075–4087, 2010.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–840, 2010.

HAMRICK, M. W. et al. The adipokine leptin increases skeletal muscle mass and significantly alters skeletal muscle miRNA expression profile in aged mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 400, n. 3, p. 379–383, 2010.

HINRICHSSEN, C.; DULHUNTY, A. The contractile properties, histochemistry, ultrastructure and electrophysiology of the cricothyroid and posterior cricoarytenoid muscles in the rat. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 3, n. 2, p. 169–190, 1982.

HOH, J. F. Y. Laryngeal muscle fibre types. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 183, n. 2, p. 133–149, 2005.

HOLLOWKA, D. et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit stimulated coupling between the ER Ca²⁺ sensor STIM1 and the Ca²⁺ channel protein Orai1 in a process that correlates with inhibition of stimulated STIM1 oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 8, p. 1210–1216, 2014.

HOOVER, P. J.; LEWIS, R. S. Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p. 13299–13304, 2011.

HOPF, F. W. et al. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by

the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 37, p. 22358–22367, 1996.

KALLESTAD, K. M. et al. Sparing of extraocular muscle in aging and muscular dystrophies: A myogenic precursor cell hypothesis. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 6, p. 873–885, 2011.

KAR, P.; PAREKH, A. B. STIM proteins, Orai1, and gene expression. **Channels**, v. 7, n. 5, p. 374–378, 2013.

KARIMZADEH, P.; GHAZAVI, A. Comparison of deflazacort and prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 6, n. 1, p. 5–12, 2012.

KHANNA, S. et al. Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: Partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 5, p. 1918–1926, 2003.

KHURANA, T. S. et al. Absence of Extraocular Muscle Pathology in Duchenne ' s Muscular Dystrophy : Role for Calcium Homeostasis in Extraocular Muscle Sparing. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 467–475, 1995.

KIM, J. H. et al. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2012.

KIM, W. et al. Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. **Progress in Lipid Research**, v.49, p. 250-261, 2010.

KIVILUOTO, S. et al. Skeletal-Muscle Development and Function. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 16, 2011.

KORKMAZ, G. et al. MIR376A is a regulator of starvation-induced autophagy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82556, 2013.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, 2010.

KUMAR, A.; BORIEK, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 3, p. 386–396, 2003.

KUNKEL, L. M. et al. Diagnosis and cell-based therapy for Duchenne muscular dystrophy in humans, mice, and zebrafish. **Journal of Human Genetics**, v.51, p. 395-406, 2006.

LARICCIA, V. et al. Identification and functional analysis of a new putative caveolin-3 variant found in a patient with sudden unexplained death. **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 58, 2014.

LEE, R. C. et al. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEFKIMMIATIS, K. et al. Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1. **Nature cell biology**, v. 11, n. 4, p. 433–442, 2009.

LEWIS, B. P. et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787–798, 2003.

LI, T. et al. STIM1-Ca²⁺ Signaling Is Required for the Hypertrophic Growth of Skeletal Muscle in Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 15, p. 3009–3017, 2012.

LIAO, Y. et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 2895–2900, 2008.

LIU, H. L. et al. Identification of the microRNA Expression Profile in the Regenerative Neonatal Mouse Heart by Deep Sequencing. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 70, n. 1, p. 635–642, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LJUBICIC, V.; BURT, M.; JASMIN, B. J. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 2, p. 548–568, 2014.

LOUIS, M. et al. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. **Journal of cell science**, v. 121, n. 23, p. 3951–3959, 2008.

MA, G. et al. Inside-out Ca²⁺ signalling prompted by STIM1 conformational switch. **Nature communications**, v. 6, p. 7826, 2015.

MACHADO, R. V. et al. Eicosapentaenoic acid decreases TNF- α and protects dystrophic muscles of mdx mice from degeneration. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, n. 1-2, p. 145–150, 2011.

MANZUR, A. Y. et al. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.1, p. CD003725, 2008.

MAROTO, R. et al. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. **Nature cell biology**, v. 7, n. 2, p. 179–185, 2005.

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

MARQUES, M. J.; MATSUMURA, C. Y.; SANTO NETO, H. Alterations in the permeability of dystrophic fibers during neuromuscular junction development. **Acta biologica Hungarica**, v. 58, n.

1, p. 1–9, 2007.

MARTONOSI, A N. Mechanisms of Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 1240–1320, 1984.

MATSUDA, R.; NISHIKAWA, A.; TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with evans blue: Evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 5, p. 959–963, 1995.

MATSUMOTO, T. et al. Eicosapentaenoic acid improves imbalance between vasodilator and vasoconstrictor actions of endothelium-derived factors in mesenteric arteries from rats at chronic stage of type 2 diabetes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 329, n. 1, p. 324–334, 2009.

MATSUMURA, C. Y. et al. Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 301, n. 6, p. C1344–1350, 2011.

MAURICIO, A. F. et al. Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 636–642, 2013.

MCCARTHY, J. J. MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomiR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 11, p. 682–691, 2008

MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 1, p. 306–313, 2007.

MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A; ANDRADE, F. H. MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 293, n. 1, p. C451–457, 2007.

MCLOON, L. K. et al. Myogenic precursor cells in craniofacial muscles. **Oral Diseases**, v. 13, n. 2, p. 134–140, 2007.

MEDIC, N. et al. Knockout of the Trpc1 gene reveals that TRPC1 can promote recovery from anaphylaxis by negatively regulating mast cell TNF- α production. **Cell Calcium**, v. 53, n. 5–6, p. 315–326, 2013.

MESTDAGH, P. et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome biology**, v. 10, n. 6, p. R64, 2009.

MOTOHASHI, N. et al. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. **Journal of cell science**, v. 126, n. 12, p. 2678–2691, 2013.

MULLER, J. et al. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 22,

n. 2, p. 133–139, 2001.

MUSARÒ, A. The Basis of Muscle Regeneration. **Advances in biology**, v. 2014, p. 1–16, 2014.

OLIVIERI, F. et al. Hormone replacement therapy enhances IGF-1 signaling in skeletal muscle by diminishing miR-182 and miR-223 expressions: A study on postmenopausal monozygotic twin pairs. **Aging Cell**, v. 13, n. 5, p. 850–861, 2014.

ONG, H. L. et al. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx: Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 9105–9116, 2007.

ONOPIUK, M. et al. Store-operated calcium entry contributes to abnormal Ca^{2+} signalling in dystrophic mdx mouse myoblasts. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 569, p. 1–9, 2015.

PANI, B. et al. Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 47, p. 20087–20092, 2009.

PANI, B.; BOLLIMUNTHA, S.; SINGH, B. B. The TR (i)P to Ca^{2+} signaling just got STIMy: an update on STIM1 activated TRPC channels. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 1, p. 805–823, 2012.

PAREKH, A. B.; PUTNEY JR, J. W. Store-operated calcium channels. **Physiological reviews**, v. 85, n. 2, p. 757–810, 2005.

PELOSI, L. et al. MicroRNAs modulated by local mIGF-1 expression in mdx dystrophic mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 1–11, 2015.

PEREIRA, J. A.; MARQUES, M. J.; SANTO NETO, H. Co-administration of deflazacort and doxycycline: a potential pharmacotherapy for Duchenne muscular dystrophy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 7, p. 788–794, 2015.

PERTILLE, A. et al. Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **International journal of experimental pathology**, v. 91, n. 1, p. 63–71, 2010.

PHUONG, T. T. T. et al. Positive feedback control between STIM1 and NFATc3 is required for C2C12 myoblast differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 2, p. 722–728, 2013.

PIETRZYKOWSKI, A. Z.; SPIJKER, S. Impulsivity and comorbid traits: A multi-step approach for finding putative responsible microRNAs in the amygdala. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 1–18, 2014.

PIGOZZI, D. et al. Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 proteins in LNCaP prostate cancer cell line. **Cell Calcium**, v. 39, n. 5, p. 401–415, 2006.

PORTER, J. D. et al. The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking

utrophin and dystrophin. **Journal of cell science**, v. 111, p. 1801–1811, 1998.

PORTER, J. D.; KARATHANASIS, P. Extraocular muscle in merosin-deficient muscular dystrophy: cation homeostasis is maintained but is not mechanistic in muscle sparing. **Cell and tissue research**, v. 292, n. 3, p. 495–501, 1998.

PORTILHO, D. M. et al. miRNA Expression in Control and FSHD Fetal Human Muscle Biopsies. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0116853, 2015.

POUND, E. M.; KANG, J. X.; LEAF, A. Partitioning of polyunsaturated fatty acids, which prevent cardiac arrhythmias, into phospholipid cell membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 3, p. 346–351, 2001.

PRETTERKLIEBER, M. L. Functional anatomy of the human intrinsic laryngeal muscles. **European Surgery**, v. 35, n. 5, p. 250–258, 2003.

PURI, P. L.; SARTORELLI, V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 185, n. 2, p. 155–173, 2000.

PUTNEY, J. W. A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 1986.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle & nerve**, v. 24, n. 12, p. 1575–1594, 2001.

RANDOLPH, M. E.; PAVLATH, G. K. A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, p. 190, 2015.

REDDY, M. A. et al. Pro-Inflammatory Role of MicroRNA-200 in Vascular Smooth Muscle Cells From Diabetic Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 3, p. 721–729, 2012.

ROBERTS, T. C. et al. Expression Analysis in Multiple Muscle Groups and Serum Reveals Complexity in the MicroRNA Transcriptome of the mdx Mouse with Implications for Therapy. **Molecular Therapy — Nucleic Acids**, v. 1, n. 8, p. e39, 2012.

ROOS, J. et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 3, p. 435–445, 2005.

ROSSI, G.; MESSINA, G. Comparative myogenesis in teleosts and mammals. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 16, p. 3081–3099, 2014.

ROUGER, K. et al. Global/temporal gene expression in diaphragm and hindlimb muscles of dystrophin-deficient (mdx) mice. **AJP - Cell Physiology**, v. 283, n. 3, p. C773–C784, 2002.

ROY, J. et al. The {omega}-3 fatty acid eicosapentaenoic acid elicits cAMP generation in colonic epithelial cells via a “store-operated” mechanism. **American journal of physiology**.

Gastrointestinal and liver physiology, v. 299, n. 3, p. G715–G722, 2010.

RYAN, A. M. et al. Enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid (EPA) preserves lean body mass following esophageal cancer surgery: results of a double-blinded randomized controlled trial. **Annals of surgery**, v. 249, n. 3, p. 355–363, 2009.

SACCHETTO, R. et al. Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 237, n. 2, p. 483–488, 1996.

SÆTROM, P.; SNØVE JR, A.; ROSSI, J. J. Epigenetics and microRNAs. **Pediatric Research**, v. 61, n. 5 PART 2 SUPPL., p. 17–23, 2007.

SAKUMA, K. et al. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. **Acta neuropathologica**, v. 105, n. 3, p. 271–280, 2003.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 77, n. 2, p. 493–501, 1994.

SCICCHITANO, B. M.; RIZZUTO, E.; MUSARÒ, A. Counteracting muscle wasting in aging and neuromuscular diseases: the critical role of IGF-1. **Aging**, v. 1, n. 5, p. 451–457, 2009.

SCRIMGEOUR, N. et al. Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. **The Journal of physiology**, v. 587, n. 12, p. 2903–2918, 2009.

SHARPE, K. M.; PREMSUKH, M. D.; TOWNSEND, D. Alterations of dystrophin-associated glycoproteins in the heart lacking dystrophin or dystrophin and utrophin. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 34, n. 5-6, p. 395–405, 2013.

SHI, L. et al. MicroRNA-128 targets myostatin at coding domain sequence to regulate myoblasts in skeletal muscle development. **Cellular signalling**, v. 27, n. 9, p. 1895–1904, 2015.

SHINNERS, M. J.; GODING, G. S.; MCLOON, L. K. Effect of recurrent laryngeal nerve section on the laryngeal muscles of adult rabbits. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 134, n. 3, p. 413–418, 2006.

SNYDER, C. M. et al. MEF2A regulates the Gtl2-Di Ω 3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 1, p. 31–42, 2013.

SOBOLOFF, J. et al. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 30, p. 20661–20665, 2006.

SOMLYO, A. V. et al. Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study. **Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 3, p. 577–594, 1981.

SPENCER, R. F.; PORTER, J. D. Structural organization of the extraocular muscles. **Reviews of oculomotor research**, v. 2, p. 33–79, 1988.

SPLETTER, M. L.; SCHNORRER, F. Transcriptional regulation and alternative splicing cooperate in muscle fiber-type specification in flies and mammals. **Experimental Cell Research**, v. 321, n. 1, p. 90–98, 2014.

STEFFEN, J. et al. EXPRESSION OF ORAI1-3, STIM1 AND STIM2 IN SKELETAL MUSCLE OF DYSTROPHIN-DEFICIENT MDX MICE. **Acta Physiologica**, v. 189, n. 653, p. P16–L5–09, 2007.

STIBER, J. et al. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. **Nature cell biology**, v. 10, n. 6, p. 688–697, 2008.

STRAUB, V. et al. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. **The Journal of cell biology**, v. 139, n. 2, p. 375–385, 1997.

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

THOMAS, L. B. et al. Laryngeal muscles are spared in the dystrophin deficient mdx mouse. **Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR**, v. 51, n. 3, p. 586–595, 2008.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Evolving therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: Targeting downstream events. **Pediatric Research**, v. 56, n. 6, p. 831-841, 2004.

TU, M. K. et al. Calcium signaling in skeletal muscle development, maintenance and regeneration. **Cell Calcium**, v. 59, n. 2, p. 91–97, 2016.

TUTDIBI, O. et al. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. **The Journal of physiology**, v. 515, n. 3, p. 859–868, 1999.

VALLEJO-ILLARRAMENDI, A. et al. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 16, p. e16, 2014.

VAN ROOIJ, E. et al. A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. **Developmental Cell**, v. 17, n. 5, p. 662–673, 2009.

VANDEBROUCK, C. et al. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. **The Journal of cell biology**, v. 158, n. 6, p. 1089–1096, 2002.

VIG, M. et al. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. **Nature immunology**, v. 9, n. 1, p. 89–96, 2008.

WANG, B. et al. MiR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- β 2 expression. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 280–287, 2011.

WEBSTER, C. et al. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 52, n. 4, p. 503–513, 1988.

WEISS, J. B. et al. MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury. **American journal of cardiovascular disease**, v. 2, n. 3, p. 237–247, 2012.

WESTERBLAD, H.; BRUTON, J. D.; KATZ, A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Experimental cell research**, v. 316, n. 18, p. 3093–3099, 2010.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 33, n. 7, p. 657–662, 2006.

WILLIAMS, A. H. et al. MicroRNA control of muscle development and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 3, p. 461–469, 2009.

WILTING, J. et al. Angiogenic potential of the avian somite. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 202, n. 2, p. 165–171, 1995.

WU, J. et al. MicroRNA-30 family members regulate calcium/calcineurin signaling in podocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 11, p. 4091–4106, 2015.

XING, J. et al. Role of Orai1 and store-operated calcium entry in mouse lacrimal gland signalling and function. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 5, p. 927–939, 2014.

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

YAO, C.-X. et al. miR-200b targets GATA-4 during cell growth and differentiation. **RNA biology**, v. 10, n. 4, p. 465–480, 2013.

YE, S. et al. Polyunsaturated docosahexaenoic acid suppresses oxidative stress induced endothelial cell calcium influx by altering lipid composition in membrane caveolar rafts. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, n. 1, p. 37–43, 2010.

ZATZ, M. et al. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 102, n. 2, p. 190–196, 1991.

ZEIGER, U.; E KHURANA, T. S. Distinctive Patterns of MicroRNA Expression in Extraocular Muscles. **Physiol Genomics**, v. 41, n. 3, p. 289–296, 2010.

ZEIGER, U.; MITCHELL, C. H.; KHURANA, T. S. Superior calcium homeostasis of extraocular muscles. **Experimental Eye Research**, v. 91, n. 5, p. 613–622, 2010.

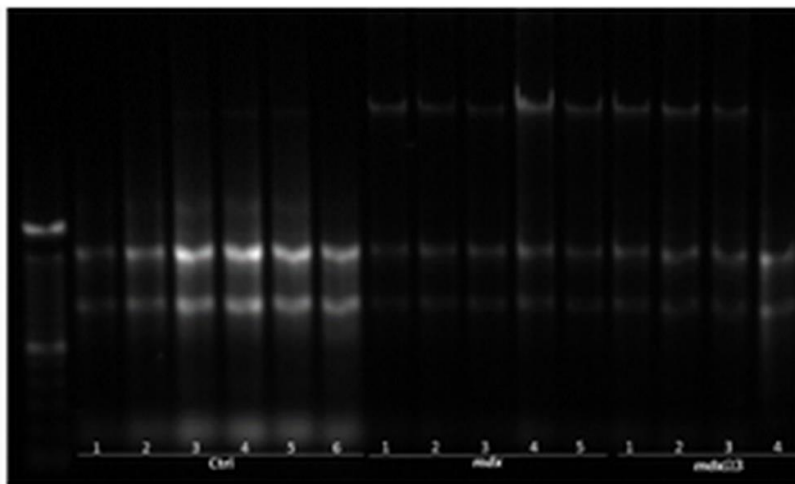
ZHANG, S. L. et al. Store-dependent and -independent modes regulating Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity of human Orai1 and Orai3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17662–17671, 2008.

ZHAO, X. et al. Orai1 mediates exacerbated Ca^{2+} entry in dystrophic skeletal muscle. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49862, 2012.

ZHENG, L. et al. Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca^{2+} sensory region of STIM1 and STIM2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 1, p. 240–246, 2008.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Diafragma



Músculos Intrínsecos da Laringe

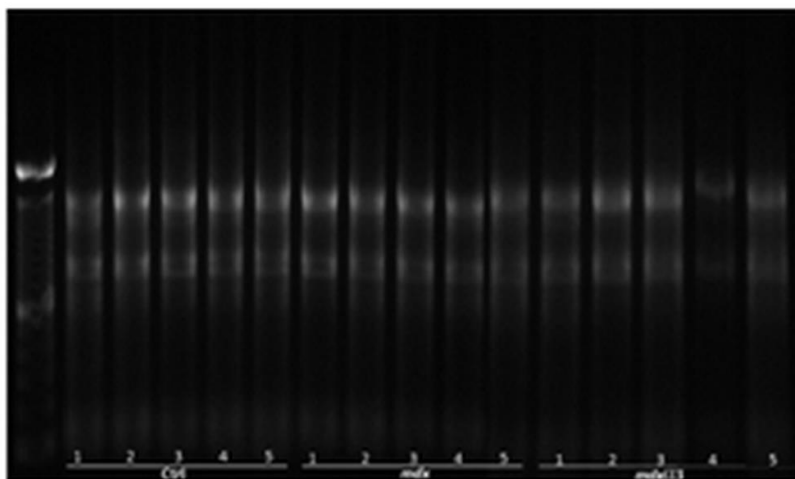


Figura suplementar 1. Gel de agarose das amostras RNA do músculo diafragma (DIA) e dos músculos intrínsecos da laringe (ILM) de camundongos C57BL/10 (Ctrl), *mdx* (*mdx*) e *mdx* tratado com ômega 3 (*mdxΩ3*).

Tabela suplementar 1. RIN: *RNA Integrity Number* (número de integridade do RNA) de camundongos C57BL/10 (Ctrl), *mdx* (*mdx*) e *mdx* tratado com ômega 3 (*mdxΩ3*), do músculo diafragma (DIA) e dos músculos intrínsecos da laringe (ILM).

Grupo	Músculo	Amostra	[ng/ul]	260/280 nm	RIN
Ctrl	ILM	1	1750	1.800	8
		2	1765	1.880	8.5
		3	1707	1.873	8.7
		4	1722	1.889	8.5
	DIA	1	1008	1.832	8.3
		2	1050	1.899	8.3
		3	1859	1.950	7.7
		4	757.6	1.896	8.2
<i>mdx</i>	ILM	1	1160	1.853	9.1
		2	1970	1.840	8.1
		3	1901	1.809	8.8
		4	1904	1.920	8.6
	DIA	1	850.0	1.850	7.6
		2	1040	2.047	7.9
		3	938	1.957	6.7
		4	718	2.028	7.6
<i>mdxΩ3</i>	ILM	1	1063	1.907	8
		2	1236	1.848	7.8
		3	1485	1.886	9.1
		4	1315	1.835	8.3
	DIA	1	625.6	2.052	7.8
		2	655.2	2.051	7.3
		3	622.4	2.045	7.7
		4	607.6	2.053	8



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **461-CEUA**, sobre "Mecanismos de proteção da distrofia muscular: estudo molecular e terapia farmacológica", sob a responsabilidade de **Renato Ferretti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 16 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA