

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

ANA LUCIA SOARES CAMARGO FAGUNDES

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À DISTROFIA
MUSCULAR: EVIDÊNCIAS A PARTIR DE UM MODELO
ANIMAL DE DISTROFIA DE DUCHENE E DE UMA
AMOSTRA CLÍNICA PARA DISTROFIA MIOTÔNICA**

CRICIÚMA

2017

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

ANA LUCIA SOARES CAMARGO FAGUNDES

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À DISTROFIA
MUSCULAR: EVIDÊNCIAS A PARTIR DE UM MODELO
ANIMAL DE DISTROFIA DE DUCHENE E DE UMA
AMOSTRA CLÍNICA PARA DISTROFIA MIOTÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês da Rosa

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarissa Martinelli Comim

CRICIÚMA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F156a Fagundes, Ana Lucia Soares Camargo.
Alterações comportamentais e neuroquímicas associadas à distrofia muscular : evidências a partir de um modelo animal de distrofia de Duchene e de uma amostra clínica para distrofia miotônica / Ana Lucia Soares Camargo Fagundes. – 2017.
94 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Maria Inês da Rosa.

Co-orientação: Clarissa Martinelli Comim.

1. Distrofia muscular de Duchene. 2. Distrofia miotônica. 3. Sistema nervoso central. 4. Depressão. 5. Ansiedade. 6. Citocinas. 7. Doenças psiquiátricas. 8. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I. Título.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Ana Lucia Soares Camargo Fagundes** sob o título “**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À DISTROFIA MUSCULAR: EVIDÊNCIAS A PARTIR DE UM MODELO ANIMAL DE DISTROFIA DE DUCHENNE E DE UMA AMOSTRA CLÍNICA PARA DISTROFIA MIOTÔNICA**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 28 de agosto de 2017.

Prof.^a **Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**
Membro Relator – UNESC

Prof. Dr. **EDUARDO PACHECO RICO**
Membro Interno – UNESC

Prof. Dr. **JACKS SORATTO**
Membro Externo – UNESC

Prof.^a **Dra. GISLAÏNE TEZZA REZIN**
Membro Externo – UNISUL

Prof.^a **Dra. Maria Inês da Rosa**
Orientadora

Prof.^a **Dra. Josiane Budni**
Coordenadora Adjunta do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) e na Associação Sul Catarinense de Distrofias Musculares Progressivas (ASCADIM).

Dedico este trabalho a todos os portadores de Distrofias Musculares.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelas lições de vida e otimismo.

Ao meu marido Marco Antônio, companheiro de todas as horas, pelo incentivo e apoio incondicional.

Ao meu filho Marco Aurélio por me fazer ver a vida por outro ângulo, pela parceria constante e, inclusive pelo apoio técnico.

Aos meus irmãos Josué e Luciana, grandes incentivadores em toda a minha trajetória profissional.

A minha orientadora Prof^ª Dr^ª Maria Inês Rosa por ter me aceito no seu grupo e por dividir comigo um pouco do seu vasto conhecimento como pesquisadora.

A minha co-orientadora Prof^ª Dr^ª Clarissa Comim por ter incentivado o meu ingresso no doutorado, pelo apoio técnico compartilhando sua vivência e conhecimento na temática estudada.

A Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

Aos pacientes da ASCADIM que me mostram como devemos dar valor às pequenas coisas e que a felicidade está em cada pequena conquista, vivendo sempre um dia após o outro.

A uma força espiritual que me impulsiona em toda a caminhada.....DEUS!!!

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvarem diante da divindade”.

Voltaire

RESUMO

As distrofias musculares progressivas (DMP) incluem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias que se caracterizam pela degeneração progressiva do músculo esquelético e comprometimento multisistêmico incluindo o sistema nervoso central (SNC). Neste contexto, foram abordadas a distrofia muscular de Duchene (DMD) e a distrofia miotônica (DM). A DMD está ligada ao cromossoma X, possui caráter recessivo e geralmente se manifesta na primeira infância. Apresenta deficiência na produção de distrofina que é uma proteína localizada na superfície interna do sarcolema. No presente estudo, foi avaliado o envolvimento do SNC e os processos inflamatórios envolvidos nos distúrbios cognitivos da DMD em modelo animal. Em relação a DM, que é de herança autossômica dominante, foi avaliada a interação entre biomarcadores e transtornos psiquiátricos em pacientes com DM. O presente estudo foi dividido em duas etapas: 1) um estudo pré-clínico utilizando camundongos mdx e Wild-type (selvagens) e; 2) a fase clínica, em que foram avaliados pacientes com DM. No estudo pré-clínico, camundongos mdx foram submetidos a testes para avaliação da memória e comportamentos relacionados à depressão e ansiedade. Após os testes comportamentais, os animais foram mortos para análise dos níveis de citocinas, atividade da mieloperoxidase (MPO) da Sinaptofisina e PSD 95. Em relação ao estudo clínico, foi realizado com pacientes da Associação Sul Catarinense de Distrofias Musculares Progressivas (ASCADIM). Nestes pacientes foram aplicados testes para avaliação de memória, avaliação clínica para doenças psiquiátricas e dosagem do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), enolase e S100 β . No estudo pré-clínico, os resultados foram significativos para habituação ao campo aberto mostrando prejuízo na memória de habituação. No teste de esQUIVA inibitória, houve comprometimento da memória aversiva e no teste de reconhecimento de objetos, mostraram comprometimento

da memória de reconhecimento de objetos de curto e longo prazo. Não apresentaram comportamento relacionado com ansiedade, mas sim do tipo depressivo. Os níveis de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL-1 β), mostraram-se aumentados nos animais mdx e o mesmo ocorreu com a atividade da mieloperoxidase. Sinaptofisina e PSD-95, não mostraram alterações. Em relação ao estudo clínico, nos pacientes com DM, cinco pacientes apresentaram transtornos psiquiátricos e baixos níveis séricos de BDNF. Este estudo mostrou que camundongos mdx apresentam comprometimento na memória de habituação, memória aversiva e memória de reconhecimento de objetos. Também foi observado que não apresentam comportamento do tipo ansioso, mas apresentaram comportamento do tipo depressivo, constatando assim o efeito isolado da perda de distrofina no comprometimento neurocognitivo. No estudo clínico, observamos que a maioria dos pacientes com DM apresentam importante envolvimento do SNC caracterizado por transtornos psiquiátricos, comprometimento cognitivo e baixos níveis de BDNF.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchene, Distrofia Miotônica, avaliação psiquiátrica, testes cognitivos, cérebro, BDNF, citocinas.

ABSTRACT

Progressive muscular dystrophies (WMD) include a heterogeneous group of hereditary diseases characterized by progressive degeneration of skeletal muscle and multisystemic involvement including the central nervous system (CNS). In this context, Duchene muscular dystrophy (DMD) and myotonic dystrophy (DM) were addressed. DMD is attached to the X chromosome, has a recessive character and usually manifests in early childhood. It presents deficiency in the production of dystrophin which is a protein located on the inner surface of the sarcolemma. In the present study, the involvement of the CNS and the inflammatory processes involved in the cognitive disorders of DMD in the animal model were evaluated. Regarding DM, which is of autosomal dominant inheritance, the interaction between biomarkers and psychiatric disorders in patients with DM was evaluated. The present study was divided into two stages: 1) a preclinical study using mdx and wild-type mice; 2) the clinical phase, in which patients with DM were evaluated. In the preclinical study, mdx mice underwent tests for memory evaluation and behaviors related to depression and anxiety. After the behavioral tests, the animals were killed for analysis of cytokine levels, myeloperoxidase activity, Synaptophysin and PSD 95. In relation to the clinical study, it was performed with patients from the Southern Catarinense Association of Progressive Muscular Dystrophies (ASCADIM). In these patients, tests were applied for memory evaluation, clinical evaluation for psychiatric diseases and the measurement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), enolase and S100 β . In the preclinical study, the results were significant for habituation to the open field showing impairment in habituation memory. In the inhibitory avoidance test, there was impairment of aversive memory and in the object recognition test, they showed impairment of the recognition memory of short and long term objects. They did not present an anxiolytic type of behavior, but rather of the depressive type. The levels of cytokines such as

tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin (IL-1 β) were increased in mdx animals, as did myeloperoxidase activity (MPO). Synaptophysin and PSD-95, showed no alterations. Regarding the clinical study, in patients with DM, we have that five patients presented psychiatric disorders and low serum levels of BDNF. This study showed that mdx mice present memory impairment of habituation, aversive memory and object recognition memory. It was also observed that they did not present an anxious type behavior, but presented a depressive type behavior, thus confirming the isolated effect of dystrophin loss on neurocognitive impairment. In the clinical study, we observed that the majority of patients with DM present an important CNS involvement characterized by psychiatric disorders, cognitive impairment and low levels of BDNF.

Key-words: Duchenne muscular dystrophy, Myotonic dystrophy, psychiatric evaluation, cognitive tests, brain, BDNF, cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Habituação ao campo aberto	49
Figura 2 - Esquiva Inibitória	50
Figura 3 - Nado Forçado	52
Figura 4 - Labirinto em Cruz elevado	52
Figura 5 - Teste de Habituação ao Campo Aberto	60
Figura 6 - Teste de Esquiva Inibitória	61
Figura 7 - Teste de Esquiva Inibitória de Múltiplos Treinos.	62
Figura 8 - Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos. ..	63
Figura 9 - Teste de labirinto em cruz elevada.	64
Figura 10 - Teste de Nado Forçado	65
Figura 11 - Níveis de Citocinas Pró-Inflamatórias.	65
Figura 12 - Atividade da Mieloperoxidase.	66
Figura 13 - Sinaptofisina e PSD-95.	66
Figura 14 - Níveis séricos de BDNF, NSE e S100 β	69
Figura 15 - Níveis séricos de BDNF e transtorno psiquiátrico. .	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idade, MEEM, CGI e Diagnósticos Psiquiátricos....	67
Tabela 2 – Avaliação da Cognição	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCADIM	Associação Sul Catarinense de Distrofias Musculares Progressivas
APC	Células apresentadoras de antígeno
AV	Átrio ventricular
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês: <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CID-10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e de Problemas Relacionados à Saúde
CGI	Avaliação Clínica global
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPK	Creatinofosfoquinase
DM	Distrofia Miotônica ou de Steinert
DMB	Distrofia Muscular de Becker
DMED	Distrofia de Emery – Dreifus
DMD	Distrofia muscular de Duchene
DMP	Distrofias musculares progressivas
DMPK	Distrofia miotônica ligado a proteína quinase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSM	Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, do inglês: <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition</i>

ECG	Eletrocardiograma
IL	Interleucinas
IL-1 β	Interleucina-1 Beta, do inglês: <i>Interleukin-1 beta</i>
IL -6	Interleucina 6, do inglês: <i>Interleukin 6</i>
LPT	Potencial de Longa Duração
MEEM	do ingles: <i>Minimetal State Examination</i>
MINI	Escala de Avaliação Psiquiátrica, do inglês: <i>Mini International Neuropsychiatric Interview</i>
MPO	Mieloperoxidase
NSE	Enolase específica do neurônio
QI	Coefficiente de inteligência
SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
SNC	Sistema nervoso central
TDHA	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês: <i>Tumor necrosis factor</i>
UNISUL	Universidade do Sul de Santa Catarina
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense
WMS-R	Teste de Memória de Wechsler Revisado, do inglês <i>Wechsler Memory Scale - Revised</i>
WAIS	Escala de Inteligência Wechsler para Adultos, do inglês <i>Wechsler Adult Intelligence Scale</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
1.1. Distrofia Muscular de Duchene	34
1.1.1 Inflamação na Distrofia Muscular de Duchenne.....	35
1.1.2 Comprometimento do Sistema Nervoso Central na Distrofia Muscular de Duchenne	38
1.2.3 Modelo Animal de Distrofia Muscular de Duchenne	41
1.1.3 Distrofia Miotônica.....	42
1.1.3.1 Comprometimento do Sistema Nervoso Central na Distrofia Miotônica	43
1.3 Justificativa	44
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo Geral.....	46
2.2 Objetivos Específicos.....	46
3 METODOLOGIA	47
3.1 Estudo Pré-Clínico	47
3.1.1 Tipo de Pesquisa	47
3.1.2 Aspectos Éticos	47
3.1.4 Delineamento	48
3.1.5 Testes e Técnicas	48
3.1.5.1 Habituação ao campo aberto	48
3.1.5.2 Esquiva Inibitória.....	49
3.1.5.3 Esquiva Inibitória de Treinos Contínuos.....	50
3.1.5.4 Reconhecimento de Objetos.....	50
3.1.5.5 Teste do Nado Forçado	51
3.1.5.6 Labirinto em Cruz Elevado.....	52
3.1.5.7 Análise dos Níveis de Citocinas.....	53
3.1.5.8 Atividade da Mieloperoxidase	53
3.1.5.9 Avaliação da Sinaptofisina e PSD-95	53
3.1.5.10 Dosagens de Proteínas	53
3.2 Estudo Clínico.....	54
3.2.1 Tipo de Pesquisa	54
3.2.2 Aspectos Éticos.....	54
3.2.3 Sujeitos.....	54
3.2.5 Análises e Técnicas.....	56
3.2.5.1 Avaliação dos níveis de BDNF, Enolase e S100β	56

3.2.5.2 Dosagens de Proteínas	56
3.2.5.4 Teste de Memória de Wechsler Revisado - WMS-R.....	57
3.2.5.3.1 Teste de Memória Verbal	57
3.2.5.3.2 Teste de Memória Visual.....	58
3.2.5.3.3 Escala de Inteligência Wechsler para Adultos – WAISS	58
3.3 Análise Estatística.....	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Estudos Pré-Clínicos.....	60
4.1.1 Teste de Habituação ao Campo Aberto	60
4.1.2 Teste de Esquiva Inibitória	60
4.1.3 Teste de Esquiva Inibitória de Múltiplos Treinos.....	61
4.1.4 Teste de Reconhecimento de Objetos.....	62
4.1.5 Teste de Labirinto em Cruz Elevada.....	63
4.1.6 Teste de Nado Forçado	64
4.1.7 Avaliação dos níveis de TNF- α e IL-1 β	65
4.1.8 Atividade da Mieloperoxidase.....	66
4.1.9 Sinaptofisina e PSD-95.....	66
4.2 Estudo Clínico	67
4.2.1 Idade, MEEM, CGI e Diagnósticos Psiquiátricos	67
4.2.2 Avaliação da Cognição	68
4.2.3 Níveis de BDNF, Enolase e S100 β	69
4.2.4 Interação entre os Níveis de BDNF e Transtornos Psiquiátricos.....	69
5 DISCUSSÃO.....	71
6 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO	92

1 INTRODUÇÃO

As Distrofias Musculares Progressivas (DMP) englobam um grupo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração do tecido muscular. A apresentação clínica exibe um espectro variável, tanto no que diz respeito à musculatura envolvida, complicações cárdio-pulmonares, idade de início dos sintomas, velocidade de progressão, quanto no modo de herança genética (Bischoff, 1991). São consideradas miopatias porque não há sinais de desnervação ou déficit sensitivo e histologicamente apresentam degeneração irreversível da musculatura esquelética (Caromano, 1999).

Existem diferentes formas de DMP, que se diferenciam de acordo com a musculatura comprometida, a forma de herança genética, a idade de início da sintomatologia e velocidade de evolução. As DMPs podem ser classificadas de acordo com o tipo de herança genética:

a) Formas recessivas ligadas ao cromossoma X:

Distrofia muscular do tipo Duchene;

Distrofia muscular tipo Becker

Distrofia de Emery-Dreyfuss

b) Formas autossômicas recessivas:

Distrofia muscular de tipo Cintura

Distrofia muscular congênita

Distrofia muscular da primeira infância

c) Formas autossômicas dominantes:

Distrofia Miotônica

Distrofia muscular do tipo Fascioescapuloumeral;

Distrofia muscular distal

Distrofia muscular Oculofaríngea.

O foco deste estudo foi a distrofia muscular de Duchene (DMD) e a distrofia Miotônica. Ambas possuem progressão rápida e como as demais, ainda desafiam os pesquisadores e terapeutas quanto ao padrão degenerativo e terapêutico. Em uma revisão sistemática realizada entre 1960 e 2013, onde foram incluídos 38 artigos de 19 países, a prevalência combinada total para todas as distrofias variou entre 19,8 e 25,1 por 100.000 apresentando valores de 1,7 -4,2 para DMD e 0,5-18,1 para DM. A variabilidade foi atribuída a uma grande variedade na metodologia dos estudos em relação aos procedimentos diagnósticos das populações estudadas, o que contribuiu para a alteração da prevalência (Theadom et.al., 2014). Outra revisão sistemática incluindo 167 artigos, no período entre 1985 a 2011, mostrou uma prevalência global

combinada de 16,14 por 100.000, sendo 8,26 para DM (Mah, et.al., 2014).

1.1. Distrofia Muscular de Duchene

A DMD é uma das DMP ligadas ao cromossoma X, de caráter recessivo e atinge principalmente indivíduos do sexo masculino. Geralmente se apresenta na primeira infância, caracterizada por atraso nos marcos de desenvolvimento motor. A DMD leva ao enfraquecimento da musculatura esquelética e é conhecida por ser o tipo mais comum e grave, pelo seu início precoce e pela rapidez da evolução dos sintomas (Matthew, 2013; Ljubicic et.al., 2014; Topaloglu, 2013).

A DMD ocorre pela anormalidade genética no braço curto do cromossomo X (lócus Xp21.2), responsável pela produção da proteína distrofina. Devido à complexidade e tamanho do gene, ocorre uma parada prematura da sua transcrição gênica e codificação anormal da proteína, facilmente degradada por proteases endógenas (Seixas et.al., 1997; Kaplan e Hamroun, 2013). A proteína distrofina, associada em trama com a matriz extracelular, forma o complexo oligomérico de glicoproteínas, localizada na superfície interna do sarcolema e responsável pela manutenção do bom funcionamento muscular. Portanto, a deficiência desta proteína leva a uma hipersensibilidade da fibra muscular, deixando-as suscetíveis à lise osmótica (Kaplan e Hamroun, 2013).

A distrofina é uma proteína localizada na superfície interna do sarcolema, e sua principal função é a de possibilitar uma conexão da membrana celular ao mecanismo contrátil da actina e aos filamentos de miosina e, externamente, com a membrana basal. A distrofina liga-se a um amplo complexo glicoproteico que envolve o sarcolema e liga-se à lâmina basal, na matriz extracelular. A organização e as propriedades características de articulação das moléculas de distrofina conduzem ao nível de elasticidade da membrana celular. Assim, ela protege a integridade da membrana durante os processos de contração e relaxamento.

A mutação patogênica do gene DMD causa alteração na expressão da distrofina, e quando esta proteína não é sintetizada, ocorre uma diminuição da permeabilidade da membrana muscular, permitindo que uma quantidade excessiva de cálcio se acumule no interior da célula. Essa condição leva a uma supercontratura miofibrilar, degradação das fibrilas e distúrbios metabólicos que culminam com a morte da fibra muscular (Belanto et.al., 2014; Anderson et.al., 2002).

De acordo com Belanto (2014), no músculo distrófico, a diminuição da síntese de distrofina se correlaciona com vários fenótipos fisiopatológicos, incluindo uma dramática redução do potencial de contração e regeneração muscular, levando ao acúmulo de tecido adiposo e conjuntivo.

A DMD afeta toda a musculatura esquelética de forma degenerativa e progressiva sendo que as primeiras manifestações clínicas ocorrem por volta dos três anos de idade quando a criança passa a apresentar dificuldade para erguer-se do chão sem auxílio e usando as mãos como apoio. Quedas frequentes, dificuldade para subir escadas, correr e levantar do chão também estão presentes (Dubowitz, 1995).

O comprometimento muscular é simétrico e inicia pelos músculos da cintura pélvica e posteriormente para os membros superiores, enquanto a debilidade muscular agrava de forma progressiva levando a incapacidade de deambular por volta dos 10 anos a partir do início dos sintomas. Em torno da segunda, início da terceira década, os pacientes vão a óbito por falência respiratória e cardíaca (Kwon et al., 2012; Allen et al., 2013).

O diagnóstico é realizado a partir do quadro clínico, dosagem da creatinoquinase (CPK) no soro, biópsia muscular e exame de DNA para investigação da deleção no gene da distrofina (Ciafoloni et al., 2009). A abordagem terapêutica inclui o uso de corticóide e tratamento fisioterápico, sendo que os glicocorticóides retardam a progressão da doença e melhoram a função motora em curto prazo, porém, o uso continuado deste, leva aos efeitos colaterais conhecidos e que devem ser monitorados (Manzur et al., 2008). A corticoterapia deve ser iniciada a partir do momento em que o desenvolvimento motor do paciente piora e antes que inicie a perda das habilidades (Bushby, et al., 2010).

1.1.1 Inflamação na Distrofia Muscular de Duchenne

Por consequência das alterações da membrana celular causadas pela ausência da proteína distrofina, uma série de distúrbios fisiológicos ocorre em pacientes com DMD. Devido a uma resposta de defesa do organismo após um dano celular, pacientes com DMD apresentam um quadro crônico de inflamação no tecido muscular e cerebral (Oqura et al., 2014). A reação inflamatória caracteriza-se por um evento interrelacionado, com o aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, exsudação de fluido, acúmulo de leucócitos e macrófagos, formação de tecido de granulação e reparo tecidual. Durante o processo

inflamatório, monócitos não diferenciados passam a ser chamados de macrófagos, e possuem papéis fisiológicos importantes participando na fase final do processo inflamatório agudo, fagocitando patógenos, detritos celulares ou contribuindo para o reparo tecidual através da liberação de citocinas que induzem revascularização ou recrutamento de fibroblastos com formação da matriz extracelular (Lima et.al., 2007).

As citocinas são polipeptídeos produzidos por diversos tipos de células no local da lesão e pelo sistema imunológico, e com frequência são formadas em sistema de cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas. Elas por sua vez, se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros que regulam a transcrição gênica, influenciam a proliferação, diferenciação, atividade e sobrevivência da célula imunológica, além de regular a atividade de citocinas pró e anti-inflamatória (Oliveira et.al., 2011).

A interleucina IL-1 β e TNF- α são produzidos por praticamente todos os tipos de células nucleares, incluindo macrófagos, monócitos, linfócito B, células natural Killer (NK), astrócitos, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais e células de musculatura lisa. A IL-1 β é uma citocina que se liga a diferentes receptores celulares e sua importância nas respostas imunológicas baseia-se na sua capacidade de aumentar a ativação de linfócitos T auxiliares (Th). É secretada pelas células apresentadoras de antígeno (APC) em contato com uma célula Th antígenoespecífica e específica para o complexo principal de histocompatibilidade. Através da sua capacidade de potencializar a ativação das células Th, a IL-1 β e o TNF- α podem promover respostas imunes tanto humorais quanto celulares. Entre os principais efeitos da IL-1 β está, além da co-estimulação das APC e células T, o crescimento das células B e produção de Ig, ativação de fagócitos e da inflamação. O TNF- α possui efeito semelhante à IL-1 β , além de contribuir na trombose vascular e necrose tumoral (Oliveira et.al., 2011; Stites et.al., 2000).

Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α são capazes de ativar células endoteliais e conseqüentemente, promover a marginação e migração de neutrófilos para uma área inflamada. Ambos induzem a produção de fatores de crescimento endotelial e possuem atividade angiogênica. De maneira sinérgica e mediados através do hipotálamo, atuam como pirogênicos endógenos e estimulam a secreção do fator de liberação da corticotropina, que por sua vez estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico da hipófise, induzindo a produção de glicocorticoides pelas supra-renais.

Esta ativação de eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal possui efeitos anti-inflamatórios, visto que os glicocorticoides suprimem a produção de

IL-1 β e TNF- α (Stites et.al., 2000). Já a interleucina IL-10 é produzida tardiamente no processo de ativação por células TH2, células T CD8, monócitos, queratinócitos e células B ativadas. É originalmente denominada como fator inibidor da síntese de citocinas, por possuir capacidade de inibir a produção de citocinas por linfócitos T ativados. Por outro lado, a IL-10 também possui um efeito co-mitogênico direto sobre os mastócitos, as células T e as células B, além de promover a produção de anticorpo pelas células B. Ou seja, inibem a ação das citocinas IL-1 β e TNF- α , além de estimular a produção endógena de outras citocinas anti-inflamatórias (Stites et.al., 2000).

Na DMD, a lesão muscular é exacerbada por um processo inflamatório crônico, do qual participam citocinas e demais células do sistema imunológico. Dentre elas, destacam-se os mastócitos que se acumulam no sítio da lesão, liberando mediadores como TNF- α , IL-1 β e IL-10. No músculo distrófico, macrófagos produzem níveis elevados de interleucinas e enzima arginase, que converte arginina em ornitina e uréia, aumentando o processo inflamatório (Tidball et.al., 2010). No camundongo mdx, observa-se a presença de macrófagos no tecido muscular já na fase inicial da doença, e parecem desempenhar um papel alterado no músculo distrófico, diferente das lesões agudas, onde macrófagos entram no local após ocorrer a lesão (Gordon et.al., 2005).

Estudos recentes mostram que a inflamação tem um papel importante no processo fisiopatológico da DMD e a importância da distrofina na aprendizagem e na memória é avaliada, assim como o papel dos mediadores inflamatórios encontrados elevados nas distrofinopatias (Rae e O'Malley, 2016). Já MPO tem seu envolvimento descrito em uma série de doenças tais como a Aterosclerose, Doença de Alzheimer e Esclerose Múltipla (Hoy et al 2005).

O envolvimento de reações inflamatórias associadas a espécies antioxidantes e mieloperoxidase na doença de Alzheimer, também foram questionados por Lefkowitz & Lefkowitz (2008), propondo que esta enzima seja alvo de estudo em doenças neurodegenerativas.

Hodgetts et.al. (2006) apresentaram em seu estudo aumento dos níveis de TNF- α durante a necrose de músculos gastrocnêmios em camundongos mdx. Além disso, a eficiência no reparo do músculo esquelético em camundongos distróficos mdx demonstrou ser dependente do controle da produção de TNF- α local. Esta alteração também foi encontrada em pacientes com DMD, quando Abdel-Salam et.al. (2009) encontraram no soro desses pacientes um aumento de nos níveis de TNF- α , quando comparado com o grupo controle.

Os mecanismos que conduzem às lesões do SNC na DMD ainda são

desconhecidos, apesar dos esforços para identificar a localização da distrofina e suas isoformas no cérebro. Nico et.al. (2004) demonstraram que camundongos mdx apresentam uma barreira hematoencefálica funcional e estruturalmente alterada, com aumento da permeabilidade vascular e alterações ultraestruturais e moleculares graves das células gliais e endoteliais. Uma das teorias para o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica na DMD é a ativação do sistema imunológico na periferia, aumentando a passagem de citocinas pró-inflamatórias para o SNC e iniciando um processo neuroinflamatório que pode ser associado à disfunção cognitiva (Marin e Kipnis, 2013).

1.1.2 Comprometimento do Sistema Nervoso Central na Distrofia Muscular de Duchenne

Entende-se por aprendizagem, o mecanismo através do qual adquirimos o conhecimento. Já a memória é o processo que codifica e retém o conhecimento (Kandel et al, 2007). A memória pode ser subdividida em implícita e explícita, porém, nem sempre isto ocorre. Ao lembrar como realizar alguma tarefa, está em ação a memória implícita, ou seja, é a recordação inconsciente. Esta compreende habilidades reflexas motoras ou preceptorais e é controlada pela estrutura do corpo estriado e conexões. Já o reconhecimento de pessoas, lugares e a relação entre estes fatos, é a chamada memória explícita, consciente e que depende da integridade do hipocampo e estruturas relacionadas ao lobo temporal e leva a recordação consciente sobre fatos e eventos (Milner et al , 1998). São processos que ocorrem por circuitos cerebrais que incluem o hipocampo e conexões (Izquierdo, 2002).

Alguns estudos considerados pioneiros mostram evidências de comprometimento da função cognitiva na DMD, comprovando declínio do desenvolvimento global, principalmente na área da linguagem e locomoção (Smith et.al. 1990). Mesmo antes disso, Karagan e Zellweger (1980), mostraram que a expressão verbal e a memória também estavam envolvidas. Vermasch et.al. (1966), demonstravam em estudos neuropatológicos, emaranhados de neufibrilas em várias regiões do cérebro de pacientes com DMP especialmente na região do hipocampo.

Pacientes com DMD que apresentam atraso mental somam 30% dos indivíduos diagnosticados, prevalência maior do que a população em geral, que possui taxa de aproximadamente 1%. Outra medida de comparação é o coeficiente de inteligência (QI), onde pacientes afetados

apresentam índice de 85, enquanto a população geral oscila entre 90 e 120 (Nardes et.al., 2012).

Em estudos mais recentes avaliando portadores de DMD, constatou-se que os déficits podem ser mais amplos afetando os processos de informação, memória de curto prazo e funções executivas, mas, a natureza da disfunção cognitiva associada com a distrofina, ainda não está clara (Claussent et.al., 2015). Logo, o entendimento de todas as características clínico-patológicas destas lesões e seus mecanismos, torna-se importante para o diagnóstico e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Yamamoto et.al., 2014). Além do comprometimento cognitivo, observa-se nesses indivíduos maior frequência de doenças psiquiátricas, como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (Nardes et.al., 2012), além de outros transtornos psiquiátricos como fobia, transtornos do humor e transtornos de ansiedade que também foram evidenciados (Duonil et.al., 2012).

Tanto a distrofina como a utrofina, proteína homóloga à distrofina e também localizada na região subsarcolemal, estão presentes no SNC. A distrofina encefálica está localizada na membrana pós-sináptica cortical e nos neurônios do cerebelo. O cerebelo expressa uma isoforma de distrofina, a P-distrofina, diferindo em apenas poucos aminoácidos e se localiza após as células de Purkinje. A C-distrofina se expressa nas células piramidais do córtex e no hipocampo, ao longo da membrana do corpo celular e dendritos. Sendo assim, a ausência da distrofina pode estar relacionada a alterações da função neuronal (Anderson et.al., 2002).

Além disso, a ausência da distrofina em tecido encefálico de animais mdx é associada a alterações importantes como o estresse oxidativo (Comim et.al., 2009), diminuição dos níveis de BDNF (Comim et.al., 2009) e da atividade da acetilcolinesterase (Comim et.al., 2011), alteração do metabolismo energético (Tuon et.al., 2010) e da atividade das enzimas do ciclo de Krebs (Comim et.al., 2016). Estudos mostraram que a deficiência de distrofina em estruturas encefálicas como o hipocampo e neocórtex, está relacionada a prejuízos na retenção de memória e atrasos nas tarefas de aprendizagem (Nardes et.al., 2012).

A falta de distrofina altera a homeostase do cálcio e a função neuronal do hipocampo, relacionando-se a déficits na memória de longa duração. Em camundongos mdx, evidencia-se encolhimento neural de até 50% no córtex e tronco encefálico (Anderson et.al., 2002), e a bioenergética do SNC mostra aumento do nível de fosfato inorgânico, indicativo de patologia no encéfalo (Anderson et.al., 2002). Em pacientes, há evidências de alterações na arquitetura do SNC, anormalidades nos

dendritos e perda de neurônios (Anderson et.al., 2002). Além disso, o eletroencefalograma mostra-se alterado devido a ausência de distrofina na função sináptica (Brandsema et.al., 2015).

Neste sentido os estudos têm sugerido que a distrofina possa desempenhar um papel estabilizador nos neurônios, semelhante à sua função na célula muscular, contribuindo, assim, para a integridade das sinapses. A distrofina está localizada nos dendritos e tende a se agregar nas densidades pós-sinápticas, sugerindo seu possível papel na transmissão neural e nos processos de aprendizado e memória (Billard et.al., 1992). Na DMD, prejuízo no aprendizado e na memória vem sendo descritos tanto em estudos pré-clínicos como clínicos (Billard et.al., 1992; Anderson et.al., 2002; Nardes et.al., 2012).

A falta de distrofina em camundongos mdx também pode alterar a proliferação, a sobrevivência e/ou a diferenciação de neurônios (Deng et.al., 2009; Licursi et.al., 2012) além de modificar a migração neuronal (Waite, 2012). Esta hipótese também é apoiada por vários estudos neuroanatômicos em camundongos mdx apontando para a presença de reorganizações arquitetônicas em redes neuronais e/ou interneuronais em áreas corticais e hipocampais (Carretta et.al., 2004; Del Tongo et.al., 2009; Minciacchi et.al., 2010).

Uma parte significativa dos déficits de aprendizagem e memória em pacientes com DMD (Lorusso et.al., 2013) e camundongos mdx (Vaillend et.al., 2004) estão relacionados a disfunção do hipocampo. Um recente estudo demonstrou uma redução significativa no número de neurônios corticais e hipocampais em camundongos mdx (Miranda et.al., 2016). Vaillend et.al. (2004) demonstraram um aumento anormal do potencial de longa duração (LTP) na região CA1 do hipocampo em camundongos mdx, afetando a fase de manutenção da LTP tanto na eficácia sináptica como na excitabilidade neuronal, alterando a função sináptica e os processos de aprendizado e memória.

A memória consiste em um processo cognitivo que pode ser definida como a capacidade de aquisição, formação, conservação e evocação de informações, sendo este um sistema complexo e multifacetado, que envolve uma variedade de mecanismos neurais. A memória serve de base para a aprendizagem, podendo ser definida como uma mudança de comportamento que apresenta como principal característica a aquisição de uma determinada informação sendo necessário para que isto ocorra, que as funções sinápticas envolvidas no processo exerçam suas funções sem alterações (Izquierdo, 2011; Fuentes et.al., 2014; Alberto et.al., 2015).

O processo de sinaptogênese caracteriza-se por mudanças bioquímicas e morfológicas em elementos pré e/ou pós-sinápticos. Como exemplo desses elementos pode-se citar as proteínas de vesículas pré-sinápticas, como a sinaptofisina que está envolvida na formação e na plasticidade das sinapses (Kim et.al., 2003). A sinaptofisina desempenha importante função tanto na biogênese quanto na exo-endocitose das vesículas sinápticas (Ferreira, 2006).

Outra proteína importante para os processos sinápticos é a proteína de densidade pós-sináptica PSD-95. A PSD é uma rede protéica composta por proteínas estruturais e de ancoramento, moléculas de adesão e enzimas de sinalização celular. A PSD organiza e reúne receptores, canais iônicos, proteínas quinases e fosfatases. Normalmente, a área de PSD é proporcional ao número de receptores pós-sinápticos (Nusser et.al., 1998). Sendo assim, a força da sinapse pode ser estimada pelo tamanho da PSD. A proteína PSD-95 é importante no ancoramento de receptores de glutamato às proteínas de sinalização e ao citoesqueleto neuronal (Hering a Sheng, 2001; Gerrow et.al., 2006).

1.2.3 Modelo Animal de Distrofia Muscular de Duchenne

Pesquisas realizadas com animais sempre foram polêmicas e repletas de controvérsias. No entanto, estratégias de tratamento de doenças osteomusculares estão sendo validadas através de estudos em animais e sobre seus resultados existem poucas contradições. A partir da identificação do gene defeituoso da DMD em humanos, tornou-se possível encontrar o mesmo defeito em outros animais, como cão, gato e camundongo. Entre as espécies pesquisadas, chegou-se ao consenso que o camundongo mdx possui o maior número de características em comum, ainda que haja diferenças importantes na fisiopatologia de ambos (Partridge, 2013).

Estudos genéticos mostraram que o camundongo mdx possui mutação no gene da distrofina, assim como em humanos. Ele também apresenta intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, mas difere dos humanos por não apresentar intensa fibrose e depósito de tecido adiposo no músculo. A degeneração e fibrose do tecido do diafragma são muito semelhantes entre os dois, assim como o processo de envelhecimento e sobrevivida diminuída. Portanto, o camundongo mdx é considerado o modelo animal mais aceito para estudos de doenças que tem como principal causa a deficiência da distrofina. Esses animais permitem a realização de estudos criteriosos com a utilização de agentes

moduladores, capazes de modificar o curso da doença e possibilitar avanços no tratamento da DMD (Kaplan, 2013).

O sistema músculo esquelético do camundongo mdx sofre degeneração e ciclos de regeneração semelhante aos humanos com DMD, de forma mais aguda entre as idades de 3 e 10 semanas. Observa-se melhora do processo degenerativo após 10 semanas de idade e é atribuída a supra-regulação da proteína utrofina, um homólogo da distrofina. Outro modelo animal que apresenta a fisiopatologia semelhante à DMD é o modelo canino do *golden retriever* (GRMD), cujas características se aproximam do camundongo mdx, mas devido a limitada disponibilidade destes animais e os custos de manutenção, a sua utilização seria limitada (McDonald, 2013). Portanto, levando em consideração todos estes critérios, o modelo com roedores é o mais utilizado.

1.1.2 Distrofia Miotônica

A DM é a DMP mais comum em adultos. Atinge ambos os sexos e sua herança é autossômica dominante resultante de uma repetição de nucleotídeos CTG, na região três do gene da distrofia miotônica ligado a proteína quinase (DMPK) no cromossoma 19 (Brook et.al., 1992), sendo a probabilidade de uma criança herdar distrofia miotônica de um dos pais portadores de 50%.

Pessoas portadoras do gene alterado (DMPK) podem permanecer assintomáticas durante toda a vida ou apresentar apenas sinais leves, porém o número de repetições CTG tende a aumentar com o passar de gerações, ou seja, a mutação tende a se expandir. Este mecanismo dinâmico de apresentação da mutação pode explicar a antecipação clínica, parte da variabilidade clínica e também a ocorrência de formas congênicas graves quase que exclusivamente em famílias de mulheres afetadas (Varinzof e Zatz, 2003).

A doença é classificada em três formas clínicas principais sendo a forma clássica a mais prevalente. Atinge adolescentes ou adultos jovens e se caracteriza por fraqueza muscular e fenômenos miotônicos. Pode ocorrer ainda ptose palpebral, calvície precoce no sexo masculino, dificuldade na fala e deglutição, alterações hormonais e cardíacas enquanto que a forma leve, de início tardio, apresenta pouca ou nenhuma manifestação muscular. A forma congênita que é a mais grave se caracteriza por hipotonia muscular ao nascimento, retardo no

desenvolvimento neuropsicomotor e problemas relacionados ao aparelho respiratório e digestório (Varinzof e Zatz, 2003).

A miotonia (dificuldade de relaxamento muscular) é uma das características da doença e é importante salientar o padrão de fraqueza que acomete os portadores comprometendo principalmente os músculos da face e da mandíbula, assim como a ptose palpebral e a fraqueza dos músculos do pescoço, sendo que no início, a musculatura da coxa, ombro e tronco são poupados (Varinzof e Zatz, 2003).

Em relação ao comprometimento cardíaco, ocorre uma perturbação do ritmo detectável ao eletrocardiograma (ECG) que vai mostrar atraso de condução, podendo estar associado com morte súbita e os preditores deste evento são: taquiarritmias atriais, intervalo PR superior a 240 milisegundos, QRS de condução aberrante e diferentes graus de bloqueio sendo que o distúrbio de condução AV está associado a um risco maior de arritmias ventriculares (Benhayon et.al., 2015).

Já no sistema respiratório, como há comprometimento do diafragma e dos músculos intercostais, ocorre dificuldade de eliminação de secreções levando aos quadros infecciosos de repetição. No sistema digestório, a deglutição pode apresentar alterações decorrentes da miotonia dos músculos responsáveis pelo processo e episódios de dor em cólica ocorrem pela contração desordenada dos músculos da parede intestinal o que já levou pacientes a cirurgia por dificuldade diagnóstica (José B. et al , 2003).

1.1.3.1 Comprometimento do Sistema Nervoso Central na Distrofia Miotônica

A maior parte dos estudos sobre o envolvimento do SNC nas DMP estão vinculadas a DMD, entretanto, alguns estudos evidenciam também alterações na DM. Os sintomas neurológicos são atualmente reconhecidos como características clínicas frequentes da doença (Emery, 1991; Brook et.al., 1992; Meola e Sandone, 2007), e a disfunção cognitiva na DM está associada a lesões da substância branca cerebral e atrofia cerebral (Minnerop et.al., 2011, Jakkani et.al., 2012). Os sintomas no SNC podem incluir desde um comprometimento cognitivo à hipersonolência, sensibilidade aumentada a agentes anestésicos, hipoventilação central, disfunção neuroendócrina e distúrbios de personalidade e comportamento (D'Angelo e Bresolin, 2006).

Na DM, os pacientes apresentam deterioração significativa nas funções linguísticas, além de um declínio nas habilidades executivas, confirmando assim, o envolvimento das funções cognitivas (Modoni

et.al., 2008). Neste contexto, pesquisas recentes sugerem anormalidades cerebrais difusas entre pacientes com DM como alterações do sistema glutamatérgico (Takado et.al., 2015), e disfunções de memórias visuoespaciais e executivas (Meola et.al., 1999; Modoni et.al., 2008).

Neste contexto, estudos mostram que três substâncias presentes no plasma de indivíduos saudáveis, quando são encontradas em níveis alterados, são associadas a dano neuronal: o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), enolase específica de neurônio (NSE) e S100 β (Lewin e Barde, 1996; Kochanek et.al., 2008). O BDNF é um membro importante da família das neurotrofinas e tem muitos efeitos no SNC, particularmente no crescimento neuronal, diferenciação e reparo (Kochanek et.al., 2008). A NSE é a subunidade γ da enolase presente principalmente no citoplasma dos neurônios (Lewin e Barde, 1996). Já o S100 β é uma proteína dimérica de ligação ao cálcio com subunidades α e β . A subunidade β é altamente específica para o cérebro e é sintetizada em células gliais ao longo do SNC (Lewin e Barde, 1996). As medições dos níveis de BDNF, NSE e S100 β têm sido utilizadas como biomarcadores de danos neuronais e gliais em pacientes com uma variedade de doenças graves (Lewin e Barde, 1996; Kochanek et.al., 2008). Comim et.al., (2015) verificaram que pacientes com DM apresentaram níveis baixos de BDNF em comparações com sujeitos controles. O BDNF está envolvido na plasticidade sináptica e em mecanismos de aprendizagem, como a LTP e a consolidação da memória (Nestler et.al., 2002).

1.2 Justificativa

As DMP em suas formas mais graves como a DMD e DM, cursam com envolvimento sistêmico e pela sua característica de doença incapacitante, leva o paciente à perda da qualidade de vida precocemente. Devido ao envolvimento da musculatura esquelética que leva a incapacidade, inúmeros são os estudos já publicados em relação a este comprometimento, porém, há poucos estudos de investigação clínica sobre o papel da distrofina nas alterações cognitivas dos pacientes portadores de DM.

Embora as DMP sejam muitas vezes subdiagnosticadas, o impacto que esta condição pode ter sobre a vida dos pacientes e da sociedade pode ser profundo e demanda atenção. Sem cura ainda definida, os tratamentos concentram-se na gestão dos sintomas e atraso na progressão da doença.

Sabemos que muitas doenças psiquiátricas estão associadas à incapacidade física e ao envolvimento emocional em doenças crônicas graves e que ainda não está claro o envolvimento do SNC no processo degenerativo. Este estudo objetivou avaliar o envolvimento cognitivo e psiquiátrico correlacionando com achados bioquímicos de envolvimento do tecido cerebral que podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e melhoria da qualidade de vida dos mesmos. A pesquisa básica e clínica neste sentido pode contribuir também na tentativa de sensibilizar os gestores para o desenvolvimento de políticas públicas que venham a contemplar a necessidade do cuidado multiprofissional que estes pacientes necessitam.

Esta sensibilização aos gestores passa por maiores esclarecimentos sobre a patologia tentando ampliar os conhecimentos a respeito do tema e com isso pensar em espaços adequados de atendimento, capacitação de profissionais para o manejo das complicações e acesso aos métodos diagnósticos. Com isso, esperamos poder minimizar o sofrimento de portadores e familiares de doentes com DMP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações comportamentais e neuroquímicas associadas à Distrofia Muscular de Duchene em modelo animal e em pacientes portadores de Distrofia Miotônica.

2.2 Objetivos Específicos

Estudo pré-clínico:

- Avaliar a memória e aprendizado em um modelo animal de DMD
- Avaliar o comportamento relacionado à ansiedade em um modelo animal de DMD
- Analisar o comportamento relacionado à depressão em um modelo animal de DMD
- Verificar os níveis de IL-1 β , TNF- α em tecido cerebral de um modelo animal de DMD
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase em tecido cerebral de um modelo animal de DMD
- Analisar a expressão da sinaptofisina e da PSD- 95 em tecido cerebral de um modelo animal de DMD

Estudo clínico:

- Analisar os transtornos psiquiátricos encontradas nos pacientes portadores de DM
- Avaliar o comprometimento cognitivo em pacientes portadores de DM.
- Analisar os níveis de BDNF, enolase e S100 β em soro de pacientes portadores de DM.

3 METODOLOGIA

Esta tese de doutorado é dividida em estudos pré-clínicos (parte I) e estudo clínico (parte II).

3.1 Estudo Pré-Clínico

3.1.1 Tipo de Pesquisa

Estudo experimental pré-clínico realizado no Laboratório de Neurociências Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina.

3.1.2 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os estudos pré-clínicos foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). As análises foram realizadas após aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA da Universidade do Sul de Santa Catarina, conforme Registro 16.003.4.01.IV.

3.1.3 Animais

Utilizou-se camundongos machos mdx e *wild-type* (selvagens) da linhagem C57BL/6 com 60 dias de vida, pesando entre 18-23g, procedentes (doação) da USP – São Paulo, que não possuíam qualquer anormalidade anatômica, funcional e/ou doenças e machucados. Os animais foram mantidos no Biotério e acondicionados em 5 animais por caixa, sob regime cíclico de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e com livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$. Os animais foram aclimatados ao laboratório por pelo menos 1h antes dos testes comportamentais, que foram realizados entre 8h00min e 12h00min.

O número de animais por grupo foi calculado em $n=8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) X d/]^2$ para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%.

3.1.4 Delineamento

Ao completarem 60 dias de vida, os animais (mdx e selvagens) foram separados em sete grupos experimentais (n=08). Seis grupos foram submetidos aos testes comportamentais: habituação ao campo aberto; esQUIVA inibitória; esQUIVA inibitória de múltiplos treinos; reconhecimento de objetos; labirinto de cruz elevada e nado forçado. As análises comportamentais foram realizadas em uma sala isolada de sons no horário entre 8h00min e 12h00min, um animal de cada vez e a mesma pessoa executou os testes. Um grupo experimental (mdx e selvagens) foi submetido à morte indolor assistida (MIA), recebendo injeção de uma dose excessiva de anestésico, de acordo com a resolução 1000 de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob a supervisão do médico veterinário responsável. Após, foi retirado a estrutura cerebral para as análises.

3.1.5 Testes e Técnicas

3.1.5.1 Habituação ao campo aberto

Teste utilizado para análise da atividade exploratória e locomotora, bem como a memória de habituação.

Realizado em campo aberto de 40x60 cm cercado por paredes de 50 cm de altura, com três paredes de madeira e uma parede frontal de vidro. O piso dividido em 16 retângulos iguais por linhas negras.

Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais retornaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de “rearings” foram avaliados em ambas as sessões. Crossing: atividade motora, Rearings: atividade exploratória (Leussis e Bolivar, 2006).

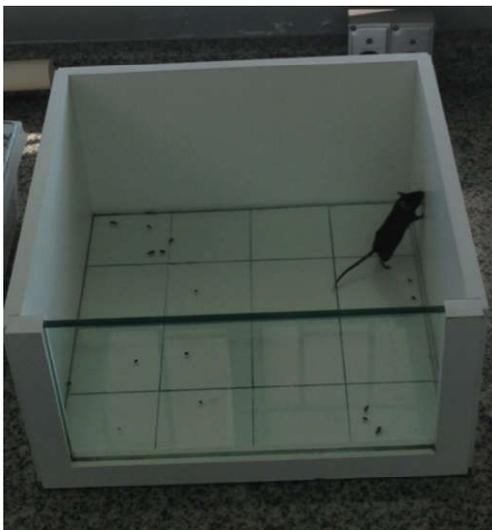


Figura 1 - Habituação ao campo aberto

3.1.5.2 Esquiva Inibitória

O aparelho consiste em uma caixa de acrílico de 50x25x25 cm, e pavimento de barras paralelas de aço inox (1 mm de diâmetro), e espaçadas a 1 cm. Uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de altura foi colocada no chão da caixa contra a parede esquerda.

A esquiva inibitória avalia a memória aversiva dos animais e na sessão de treino os animais são colocados sobre a plataforma e mede-se o tempo que o mesmo leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebe um choque de 0,3 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele leva para descer (latência), porém não é administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Quanto mais o animal reter a memória formada durante o treino, maior será a latência de descida da plataforma no momento do teste. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 24 horas para memória de longa duração (De Boer e Koolhaas, 2003).



Figura 2 - Esquiva Inibitória

3.1.5.3 Esquiva Inibitória de Treinos Contínuos

Nesse teste usa-se também a esquiva inibitória, com o mesmo aparelho descrito anteriormente e mantendo as mesmas características. Na sessão de treinamento o animal foi colocado na plataforma e imediatamente depois de pisar nas barras de metal, recebeu um choque 0.3 mA, durante 2.0 segundos. Este procedimento continuou até que o animal permanecesse na plataforma por 50 segundos. O animal foi devolvido então à sua caixa moradia. Vinte e quatro horas após o treino, o animal foi recolocado na plataforma e contou-se o tempo de permanência do animal sobre a plataforma (tempo limite sobre a plataforma 180 segundos), o animal que desceu da plataforma antes de completar os 180 segundos não foi administrado choque (De Boer e Koolhaas, 2003).

3.1.5.4 Reconhecimento de Objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) é um teste comportamental utilizado para avaliar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido.

Para a realização deste teste, utilizou-se a caixa do teste de habituação ao campo aberto. No primeiro dia realizou-se o treino onde o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, e a partir do qual explorou o ambiente por 5 minutos. O primeiro dia serve como habituação do animal. No segundo dia o animal foi recolocado no aparelho, no qual estavam dois objetos iguais, o objeto A e objeto B (forma, tamanho e cor iguais), colocados em dois cantos

adjacentes, a 10 cm da parede. No teste de memória de reconhecimento de curto prazo contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos após, testou-se a memória de curta duração, o animal explora novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e um novo objeto (objeto C), contou-se novamente o tempo total que o animal explorou cada objeto avaliando quantas vezes este explora os objetos durante 5 minutos. No dia seguinte (24 horas após) avaliou-se a memória de longa duração onde foi feito o mesmo procedimento trocando o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A), contou-se o tempo de exploração de cada objeto. O objeto C e D deve ser diferente do Objeto A e B (forma, tamanho e cores iguais). Este teste avalia as memórias de curta e longa duração. Um índice de reconhecimento é calculado para cada animal e relatado como: $TB / (TA + TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto explorando o objeto novo). No cálculo, o objeto B, deve ser substituído pelos objetos C para o cálculo do índice de reconhecimento da memória de curta duração e D para o cálculo do índice de reconhecimento da memória de longa duração (Cohen e Stackman, 2015).

3.1.5.5 Teste do Nado Forçado

Este teste avalia sintomas de comportamento depressivo. Consiste em colocar o animal em um cilindro com água a 23° C, a água suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. O teste tem duração total de 7 minutos. Nos dois primeiros minutos não foi contabilizado o tempo de imobilidade, apenas foi contabilizado nos últimos 5 minutos. O tempo de imobilidade é considerado quando o animal não realizou quaisquer movimentos com os membros, ou seja, permanece flutuando com a cabeça acima do nível da água (Porsolt, 1979).



Figura 3 - Nado Forçado

3.1.5.6 Labirinto em Cruz Elevado

Teste utilizado para avaliar comportamento relativo à ansiedade. O aparelho utilizado em modelos animais consta de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central (5 x 5 cm). Os experimentos foram conduzidos em sala escura com luz vermelha posicionada a 50 cm de altura da plataforma central. Os animais foram colocados na plataforma central e tiveram 5 minutos para explorar o aparelho. Os parâmetros avaliados foram: número de entradas e tempo de permanência no braço aberto e fechado, e número total de entradas em ambos (Pellow et.al., 1985).



Figura 4 - Labirinto em Cruz elevado

3.1.5.7 Análise dos Níveis de Citocinas

Foram avaliados os níveis de TNF- α e IL-1 β através de análise por imunoensaio (ELISA Sanduíche) por kits da Chemicon International conforme recomendações do fabricante.

3.1.5.8 Atividade da Mieloperoxidase

Como um índice da quantidade de neutrófilos na infiltração foi medido a atividade da mieloperoxidase como se segue. Brevemente, os extratos do tecido foram homogeneizados (50 mg/mL) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugado a 15.000g durante 40 min. Uma alíquota do sobrenadante foi misturado com uma solução de tetrametilbenzidina a 1,6 mM e 1 mM de H₂O₂. A atividade foi medida no leitor de ELISA como a variação de absorvância a 650 nm a 37°C.

3.1.5.9 Avaliação da Sinaptofisina e PSD-95

O tecido foi macerado em tampão RIPA. As amostras (50 μ g) foram diluídas em tampão de lise, desnaturadas à 100°C por 5 minutos e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %) durante 1h e 30 min à 110 V, seguido de transferência para membrana PVDF em sistema semi-dry (BioRad) a 90 A. Após a transferência, seguiu-se o bloqueio da membrana em tampão TBS contendo 0,2 % de Tween 20 (TBST) e albumina 5 % (1 hora) em seguida adicionou-se o anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-Sinaptofisina e anti PSD-95, Abcam, 1:1000 em tampão de bloqueio), que permaneceu sob agitação por 2h e como controle de carregamento, foi utilizado a anti-beta-actina (1:10000). Após este período foi adicionado o anticorpo secundário anti-rabbit e anti-mouse infravermelho (Uniscience), diluído em TBST (1:20000, 30 min). Após este procedimento, a membrana foi então submetida a scan em fotodocumentador (Odyssey LI-COR Biosciences) e a densitometria realizada pelo programa Image Studio (LI-COR Biosciences).

3.1.5.10 Dosagens de Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método BCA e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.2 Estudo Clínico

3.2.1 Tipo de Pesquisa

Estudo clínico caso-controle realizado na Associação Sul Catarinense de Pais e Amigos dos Portadores de Distrofias Musculares Progressivas (ASCADIM), Brasil. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

3.2.2 Aspéctos Éticos

O estudo foi submetido ao CEP da Universidade do Extremo Sul Catarinense e aprovado sob o número de protocolo 176.306. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi oferecido a todos os candidatos para a participação do estudo. Apenas participaram deste estudo, os sujeitos que assinaram o TCLE, que aborda todas as questões que cercam o projeto, bem como quanto à garantia de confidencialidade. Este termo de consentimento consta de objetivos, justificativas, procedimentos, garantias individuais, contribuições da pesquisa e telefone do pesquisador responsável. Este documento era assinado e, após, era fornecida uma cópia ao participante. Não foram identificados riscos ou danos possíveis para os participantes que se submeteram a avaliação cognitiva, tampouco à coleta de sangue para realização das mensurações além do desconforto da coleta sanguínea. Quanto ao desconforto e tempo despendido no exame cognitivo e no preenchimento do TCLE, estes foram considerados toleráveis. Os pesquisadores se comprometeram com a confidencialidade das informações relativas à identidade ou de informações pessoais que pudessem identificar o entrevistado. O presente trabalho à medida que presa pela avaliação de fatores auxiliares no tratamento e bem estar da população em estudo, sem violação da moral e invasão dos indivíduos, é pautado na ética vigente.

3.2.3 Sujeitos

Os sujeitos com diagnóstico comprovado de DM foram convidados a participarem do estudo. Os sujeitos recrutados para o estudo faziam parte do cadastro da Associação Sul Catarinense de Pais e Amigos dos Portadores de Distrofias Musculares Progressivas (ASCADIM), Brasil. O diagnóstico de DM foi estabelecido por exame clínico e neurológico, história familiar, biópsia muscular com análise imuno-histoquímica e

testes genéticos quando a biópsia muscular com análise imuno-histoquímica não foi conclusiva. Os casos foram todos os sujeitos da ASCADIM, num total de 9 pacientes (amostra censitária), com diagnóstico de DM (4 homens e 5 mulheres com idade média de 31,1 (\pm 9,79) anos. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos sujeitos após a natureza do estudo ser minuciosamente explicada. O grupo de controle consistiu em pessoas saudáveis sem qualquer doença, pareadas por sexo e idade.

3.2.4 Delineamento

Mediante autorização para acesso ao banco de dados da ASCADIM, foram contatados por telefone e convidados a participarem deste estudo todos os pacientes com diagnóstico comprovado de DM. Ao total, foram 9 pacientes. Todos os casos tiveram o diagnóstico confirmado de DM do tipo 1 através de teste genético. Foram feitos contatos telefônicos com os pacientes ou seus familiares. Neste contato, a pesquisadora responsável por este estudo se identificava como aluna do Programa de Pós-Graduação em nível de doutorado em Ciências da Saúde Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC descrevia sumariamente o desenho do estudo e sua confidencialidade. Após, era questionado sobre sua disponibilidade para participar do estudo. Uma vez aceito o convite, o pesquisador responsável combinava uma data e local na ASCADIM para, após ter assinado o TCLE, realizar a coleta de sangue para análise do BDNF, S100 β e Enolase séricos e os testes cognitivos para avaliação da cognição. A pesquisa ocorreu entre agosto e dezembro de 2015.

Apenas participaram deste estudo (critérios de inclusão) os sujeitos com diagnóstico comprovado de DM. Não participaram do estudo (critérios de exclusão), os pacientes que não apresentaram confirmação do diagnóstico. Como casos controle, participaram deste estudo, sujeitos da comunidade (escolhidos aleatoriamente), sadios, sem diagnóstico de doenças neuromusculares ou outra doença sistêmica de cunho infeccioso e/ou neuronal e psiquiátrica, pareados por sexo e idade.

Os 9 pacientes que participaram deste estudo, foram convidados a retornar a ASCADIM em dia e horário previamente agendado pelos pesquisadores. Antes da realização da coleta, os sujeitos receberam novamente uma explicação prévia dos objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Uma cópia do termo ficou com os sujeitos onde constavam os contatos dos pesquisadores. Após, foi coletado 5 ml de sangue periférico para dosagem dos níveis de

BDNF, Enolase e S100 β . Também foram coletados 5 ml de sangue periférico de sujeitos sadios que formaram o grupo de sujeitos controles. Após a coleta, o sangue foi armazenado em um local apropriado para o transporte e enviado ao Laboratório da Universidade do Extremo Sul Catarinense onde foi centrifugado e o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C para a análise dos níveis de BDNF, Enolase e S100 β . Em um segundo momento, os sujeitos foram submetidos aos testes cognitivos para avaliação da memória através do teste de Memória de Wechsler Revisado – WMS-R (do inglês *Wechsler Memory Scale - Revised*) e da Escala de Inteligência Wechsler para Adultos - WAISS (do inglês *Wechsler Adult Intelligence Scale*).

3.2.5 Análises e Técnicas

3.2.5.1 Avaliação dos níveis de BDNF, Enolase e S100 β

Após as coletas de sangue, o mesmo foi centrifugado (5000 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C. As análises foram feitas por imunoenensaio (ELISA Sanduíche) através dos kits da Chemicon International. Placas para microtitulação (96 poços fundo plano) foram revestidas por 24 horas com as amostras diluídas na proporção de 1:2 e a curva padrão na faixa de 7.8 a 500 pg de BDNF, Enolase e S100 β . As placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem, sendo adicionados os anticorpos anti-BDNF Enolase e S100 β de coelho (diluído 1:1000) e incubados por 3 horas à temperatura ambiente. Depois de lavadas, uma segunda incubação com anticorpos anti-coelho conjugados com peroxidase (diluído 1:1000) por 1 hora a temperatura ambiente foi adicionada. Após a adição de estreptavidina, substrato e solução preparada, a quantidade de BDNF Enolase e S100 β foram determinadas (absorbância em 450nm). A curva padrão demonstra a relação direta entre a densidade ótica (DO) e a concentração de BDNF: isto é, quanto maior a DO maior a concentração de BDNF, Enolase e S100 β na amostra.

3.2.5.2 Dosagens de Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método BCA e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.2.5.3 Mini-Exame do Estado Mental

O MEEM (“*Minimal State Examination*”) foi publicado em 1975 por Folstein et.al. Consiste de um teste composto por 30 itens que procura examinar de forma relativamente simples e rápida as funções cognitivas. Sua aplicação é simples e concisa, dispendendo cerca de 5 a 10 minutos. Neste teste avalia-se a orientação temporal, orientação espacial, memória imediata, atenção e cálculo, memória de evocação e linguagem (Nitrini, et al 2003).

3.2.5.4 Avaliação Psiquiátrica

A Escala de Avaliação Psiquiátrica – *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI), entrevista diagnóstica padronizada, breve, compatível com os critérios do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition* (DSM – IV) e Classificação Estatística Internacional de Doenças e de Problemas Relacionados à Saúde (CID – 10), para obtenção de diagnósticos de transtornos psiquiátricos no momento da aplicação (Amorin, 2000).

3.2.5.4 Teste de Memória de Wechsler Revisado - WMS-R

O teste utilizado para avaliar a memória foi o teste de Memória de Wechsler Revisado –WMS-R (do inglês *Wechsler Memory Scale-Revised* - WMS-R) (Wechsler, 1987). O WMSR é uma bateria de testes de memória, constituída por testes de memória verbal e visual. Nessa pesquisa foi utilizado um teste verbal (denominado de memória lógica) e um visual (denominado de reprodução visual). Os escores foram determinados de acordo com a idade, conforme a tabela do manual do WMS-R, e transformados em desvios padrões do escore bruto do sujeito (ES). É subtraída a média do escore da tabela do teste de acordo com a idade (EM) e dividida esta diferença pelo desvio padrão dos escores padronizados da tabela (SD) $ES - EM / SD$. Escores $< -1,0$ DP são considerados inferiores e escores $>$ ou igual a $-1,0$ DP são considerados normais (Weschler, 1987).

3.2.5.3.1 Teste de Memória Verbal

A descrição dos testes consiste na leitura de duas histórias onde a audição tem papel central e após a leitura verifica-se o que o indivíduo conseguiu reter de informações. A aplicação foi da seguinte maneira:

são duas histórias diferentes a serem lidas (Historia A e Historia B). A leitura da Historia A era feita de forma pausada e com entonação normal de voz e o indivíduo devia permanecer atento. Após a leitura da primeira história pedia-se que o indivíduo contasse toda a história que acabara de ouvir e se verificava o que ele conseguiu reter de informação. Cada acerto é registrado nos trechos da história. Parte-se então para leitura da Historia B, onde o procedimento é o mesmo. Este teste consiste na aplicação da Memória Verbal I (Imediata). Após 20 minutos pede-se ao paciente para recordar as histórias que foram lidas (A e B), o que consiste na Memória Verbal II (Tardia). A partir deste ponto foram comparados os resultados da aplicação dos dois testes (Nitrini, et al 2003)

3.2.5.3.2 Teste de Memória Visual

Para avaliação da memória visual, foram apresentados aos sujeitos quatro cartões com desenhos geométricos, mostrados durante dez segundos cada um, tendo sido solicitado ao mesmo que reproduzisse cada um, separadamente, após sua apresentação (memória imediata). Para avaliar a memória visual tardia, solicitou-se, após vinte minutos, que ele os reproduzisse novamente (sem nova apresentação dos estímulos) (Nitrini, et al 2003)

3.2.5.3.3 Escala de Inteligência Wechsler para Adultos – WAISS

Desenvolvida a partir da concepção da inteligência como entidade agregada e global, isto é, como a capacidade do indivíduo em raciocinar, lidar e operar com propósito, racionalmente e efetivamente com o seu meio ambiente, a Escala de Inteligência Wechsler é composta por 13 subtestes. Estes subtestes avaliam diferentes aspectos da inteligência e compõe as escalas Verbal e de Execução. A escala Verbal envolve a capacidade de lidar com símbolos abstratos e avalia a qualidade de educação formal e a estimulação do ambiente, bem como examina a compreensão, a memória e a fluência verbal. A escala de Execução avalia o grau e a qualidade de contato não verbal com o ambiente; a capacidade de integrar estímulos perceptuais e respostas motoras pertinentes; a capacidade de trabalhar em situações concretas e a capacidade de avaliar informações visuo-espaciais. Estudos nacionais e internacionais utilizam combinações de subtestes das escalas Wechsler para estimar o nível de inteligência global de adultos (Mantoan & cols., 2006; Thompson & cols.,2004). Este método é utilizado quando se

deseja avaliar a inteligência de um indivíduo sem a necessidade de utilizar uma bateria completa como as escalas Wechsler de Inteligência (Nascimento & Figueiredo, 2002a).

Para este estudo utilizou-se uma bateria de uma hora de testes neuropsicológicos composta de 6 subtestes da versão revisada da Escala de Inteligência Wechsler para Adultos (WAIS-III) (Guertin, Ladd et.al. 1966). Estes subtestes avaliam diferentes áreas da cognição descritas a seguir:

1 – Semelhanças – para avaliação do *score* de pensamento lógico e abstrato e fluência verbal.

2 – Vocabulário – utilizado pela sua alta correlação com a soma da escala verbal, o que torna uma medida adequada de inteligência basal. O desempenho nesse subteste depende do conhecimento semântico, estimulação do ambiente e aprendizagem escolar do sujeito.

3 – Aritmética – avaliação do *score* de aprendizado e memória.

4 – Dígitos – avalia funções como atenção a estímulos verbais, memória auditiva de curta duração e memória de trabalho.

5 – Cubos – identifica a capacidade de análise, síntese e organização visuomotora.

3.3 Análise Estatística

Após serem analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, os dados dos testes de habituação ao campo aberto, número de tentativas do teste de esquiwa inibitória de múltiplos treinos, teste de labirinto em cruz elevada, teste de natação forçada e as análises bioquímicas foram expressos através de média e desvio padrão e analisados através do teste *t* para amostras independentes e amostras pareadas. Os dados dos testes de esquiwa inibitória, tempo de permanência do teste de esquiwa inibitória de múltiplos treinos e o teste de reconhecimento de objetos foram expressos através de mediana e intervalo interquartil e analisados através dos testes de *Mann-whitney* e *Wilcoxon*. Em todas as análises, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados das avaliações cognitivas foram analisados e interpretados conforme manual de cada teste não sendo necessária a utilização de testes estatísticos.

4 RESULTADOS

4.1 Estudos Pré-Clínicos

4.1.1 Teste de Habituação ao Campo Aberto

Na sessão de treino, não houve diferença entre o número de *crossing* e *rearings* entre o grupo mdx e o grupo selvagem, mostrando que não há alteração da atividade locomotora. Quanto ao grupo selvagem, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o treino e o teste tanto no número de *crossing* e no número de *rearings*, demonstrando que houve alteração da atividade locomotora. No grupo mdx, não houve diferença estatística entre o número de *crossing* e *rearings* entre o treino e o teste, ou seja, houve prejuízo na memória de habituação ao campo aberto (Figura 5).

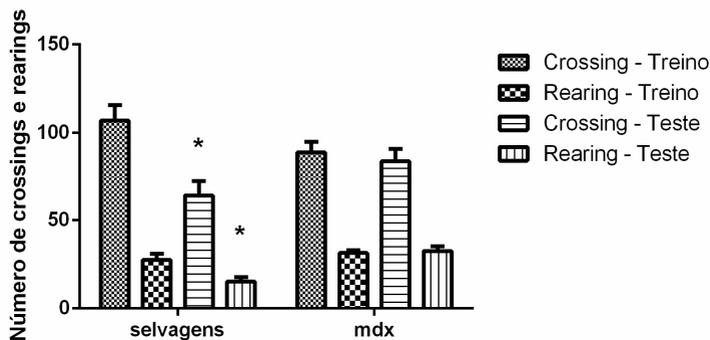


Figura 5 - Teste de Habituação ao Campo Aberto.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. treino.

4.1.2 Teste de Esquiva Inibitória

No teste de esquiva inibitória, não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de latência entre o treino e o teste do grupo de animais selvagens e mdx. Porém, houve diferença estatisticamente significativa no grupo de animais selvagens, demonstrando um comprometimento da memória aversiva nos animais mdx (Figura 6).

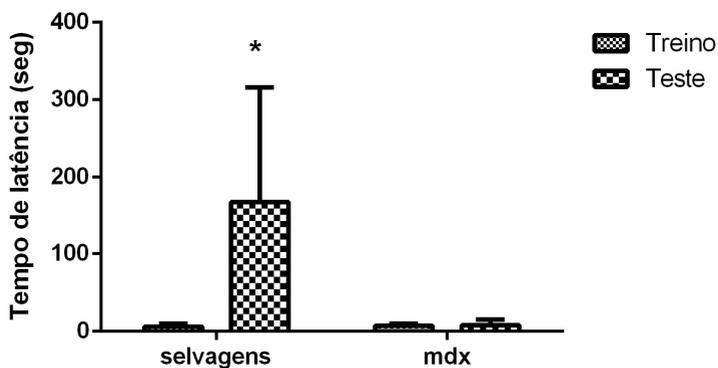


Figura 6 - Teste de Esquiva Inibitória.

Legenda: Os dados são expressos em mediana e desvio interquartil. * $p < 0.05$ vs. treino.

4.1.3 Teste de Esquiva Inibitória de Múltiplos Treinos

O teste de esquiva inibitória de múltiplos treinos (Figura 7) pode-se observar que houve uma diferença estatisticamente significativa no número de tentativas que os animais mdx precisaram para conseguir permanecer 50 segundos na plataforma quando comparado com os animais selvagens (Figura 7A). Entretanto, quando avaliado o tempo de latência, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, demonstrando que os animais mdx aprendem a tarefa, mas precisam de um número de tentativas maior que os animais selvagens (Figura 7B).

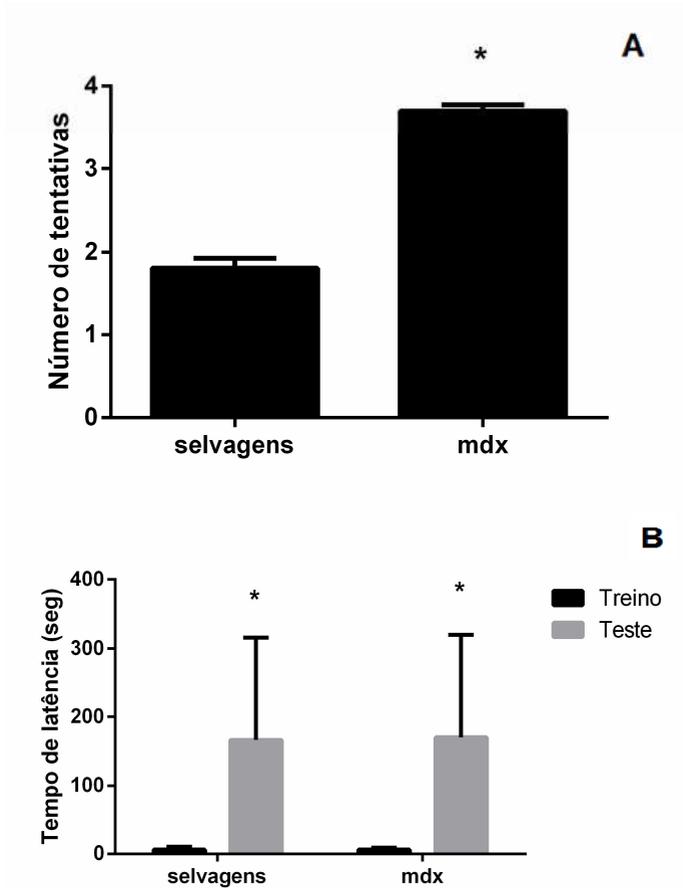


Figura 7 - Teste de Esquiva Inibitória de Múltiplos Treinos.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão para o número de tentativas (A) e mediana e desvio interquartil para o tempo de latência (B).

* $p < 0.05$ vs. treino.

4.1.4 Teste de Reconhecimento de Objetos

No teste de reconhecimento de objetos, o grupo de animais selvagens mostrou uma diferença estatisticamente significativa no índice de reconhecimento do teste quando comparado com o treino, tanto na memória de curto quanto a longo prazo, ou seja, os animais aprenderam

a tarefa proposta. O grupo de animais mdx não apresentou diferença significativa nas memórias de curto e longo prazo, mostrando um comprometimento da memória de reconhecimento de objetos de curto e longo prazo (Figura 8).

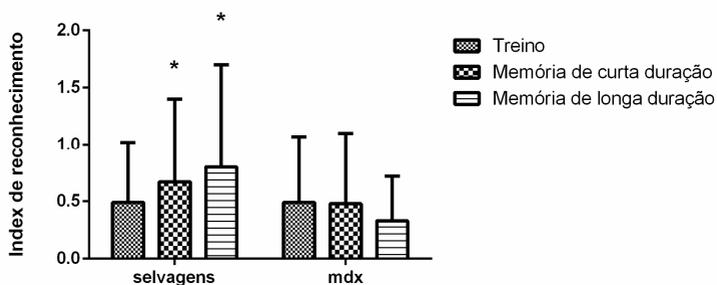


Figura 8 - Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos. Os dados são expressos em mediana e desvio interquartil. * $p < 0.05$ vs. treino.

4.1.5 Teste de Labirinto em Cruz Elevada

Após a realização do teste de labirinto em cruz elevada (Figura 9), pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados quanto ao número de entradas nos braços abertos e fechados (Figura 9A) e tempo de permanência dos braços abertos e fechados (Figura 9B), ou seja, os animais mdx não apresentaram comportamento relacionado a ansiedade.

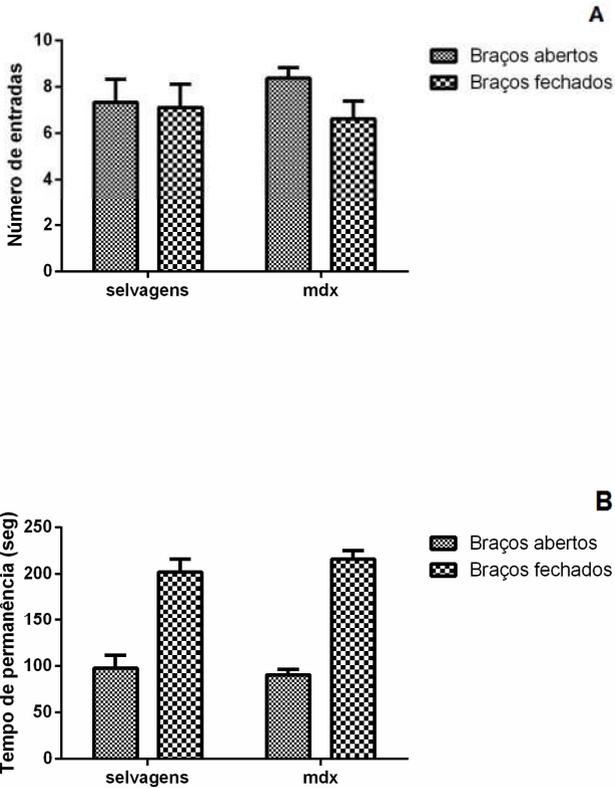


Figura 9 - Teste de labirinto em cruz elevada.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão.

4.1.6 Teste de Nado Forçado

No teste de nado forçado, houve uma diferença significativa no tempo de imobilidade do grupo de animais mdx quando comparado ao grupo de animais selvagens, mostrando que os animais mdx apresentam um comportamento relacionado à depressão (Figura 10).



Figura 10 - Teste de Nado Forçado.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. selvagens.

4.1.7 Avaliação dos níveis de TNF- α e IL-1 β

Pode-se observar que houve um aumento significativo dos níveis de TNF- α em tecido cerebral total dos animais mdx adultos em comparação com os animais selvagens. No que se refere aos níveis de IL-1 β , também houve um aumento significativo em tecido cerebral total dos animais mdx quando comparados aos animais selvagens (Figura 11).

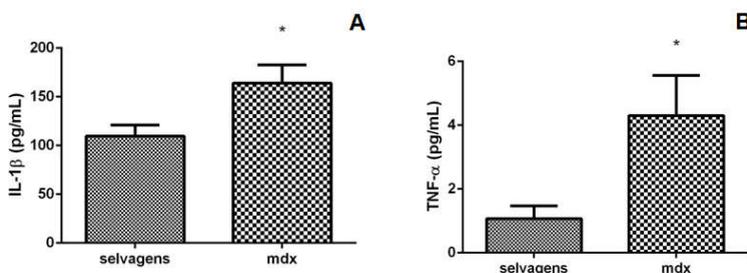


Figura 11 - Níveis de Citocinas Pró-Inflamatórias.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. selvagens.

4.1.8 Atividade da Mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase também foi avaliada em tecido cerebral total. Foi observado um aumento da atividade nos animais mdx em comparação aos animais selvagens (Figura 12).

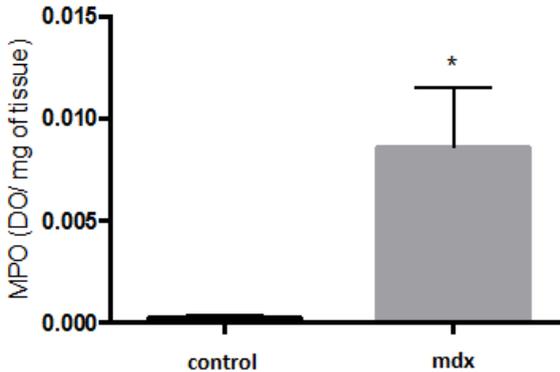


Figura 12 - Atividade da Mieloperoxidase.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. selvagens.

4.1.9 Sinaptofisina e PSD-95

Foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa quando aos valores da sinaptofisina (Figura 13A) e da PSD-95 (Figura 13B) entre os grupos de animais avaliados.

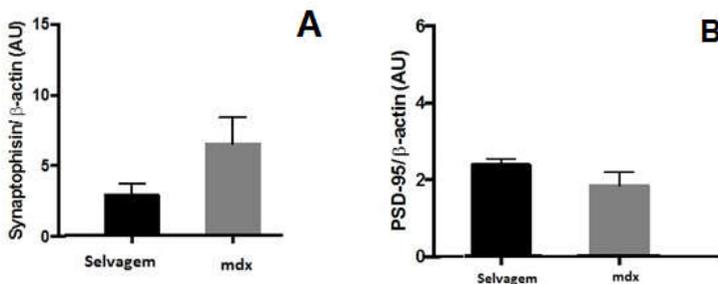


Figura 13 - Sinaptofisina e PSD-95.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão.

4.2 Estudo Clínico

4.2.1 Idade, MEEM, CGI e Diagnósticos Psiquiátricos

Os diagnósticos psiquiátricos podem ser observados na Tabela 1. O presente estudo incluiu 18 indivíduos (nove casos e nove controles). Não houve diferença estatística em relação à idade em todos os grupos. Nos que pontuaram no MEEM, acima do ponto de corte, (23 pontos), todos foram encaminhados para avaliação psicológica. Na avaliação CGI, seis pacientes apresentaram CGI=1 (normal ou não doente); um paciente apresentou CGI= 2 (limítrofe doente mental) e dois pacientes com CGI = 3 (levemente doente). Cinco pacientes apresentaram alterações psiquiátricas após a avaliação clínica. Os transtornos foram: Transtorno de Ansiedade Generalizada (dois pacientes), Transtorno Depressivo maior (um paciente), específico fobia (um paciente), fobia social (um paciente), agorafobia (um paciente), hiperatividade ou déficit de atenção (um paciente) e quatro pacientes não apresentaram diagnóstico psiquiátrico (Tabela1).

Tabela 1 – Idade, MEEM, CGI e Diagnósticos Psiquiátricos

Sujeitos	Idade (anos)	MEEM	CGI	Diagnóstico psiquiátrico
1	19	24	3	Transtorno depressivo maior, Fobia específica /generalizada e Transtorno de ansiedade
2	38	30	3	Fobia social
3	43	28	2	Agorafobia
4	18	24	3	Transtorno de deficit de atenção e hiperatividade
5	46	28	1	-
6	32	27	2	Transtorno de ansiedade generalizada
7	28	30	1	-
8	26	28	1	-
9	30	30	1	-

Fonte: dados da pesquisadora

4.2.2 Avaliação da Cognição

O resultado da avaliação da cognição é demonstrado na Tabela II. No teste WAISS –III, os escores abaixo de oito são considerados inferiores para a idade. No vocabulário, quatro pacientes apresentaram escore baixo. Em semelhança, três pacientes são inferiores; Em cubos, três pacientes são inferiores e na aritmética, também três pacientes são inferiores, o mesmo acontecendo para os dígitos onde três são inferiores. Um paciente mostrou escore inferior em todos os subtestes, um paciente mostrou pontuação inferior em quatro subtestes, um paciente em dois subtestes e cinco pacientes não apresentaram pontuação inferior nos subtestes. Na avaliação da memória lógica WMS-R, quatro pacientes demonstraram memória inadequada para a idade (escore menor que um) para MI e MT. Na memória visual WMS-R, três pacientes apresentaram memória inadequada para a idade (escore menor que um) para MT e cinco demonstraram memória inadequada para a idade (escore menor que um) para IM. Apenas um sujeito apresentou memória inadequada para a idade (escore menor que 1) para MI e MT juntos, significando alterações no teste para a memória lógica e visual, tanto imediata quanto tardia.

Tabela 2 – Avaliação da Cognição

S	WAIS					WMS-R			
	V	Sm	C	A	D	Memória lógica		Memória visual	
						MI	MT	MI	MT
1	1*	5*	11	7	9	0.6#	0.67#	0.8#	1.03
2	5*	11	5*	6*	5*	3.10	1.8	1.2	0.4
3	1*	5*	11	7	9	1.3	1,7	0.09#	1.05
4	6*	6*	5*	3*	5*	3.10	1.8	1.2	0.4#
5	9	9	11	8	10	0.6#	0.67#	0.8#	1.03
6	11	13	8	11	11	0.8#	0.6#	0.8#	0.3#
7	13	13	9	11	8	0.8#	0.4#	0.8#	2.6
8	7	9	9	9	13	1.8	1,5	1.07	1.3
9	11	10	12	12	12	2.25	1.6	1.03	0.7#

Legenda: S: Sujeito; V: Vocabulário; Sm.: Similaridades C: Cubos; A: Aritmética; D: Dígitos *Escore abaixo de 8; #escores abaixo de 1.

Fonte: dados da pesquisadora

4.2.3 Níveis de BDNF, Enolase e S100 β

Os níveis séricos de BDNF, NSE e S100 β foram demonstrados na Figura 14. Houve redução dos níveis de BDNF (Figura 14A) no soro de pacientes portadores comparados com o grupo controle. Não houve diferença significativa nos níveis de NSE (Figura 14B) e S100 β (Figura 14C) no soro de pacientes com DM comparados com o grupo controle.

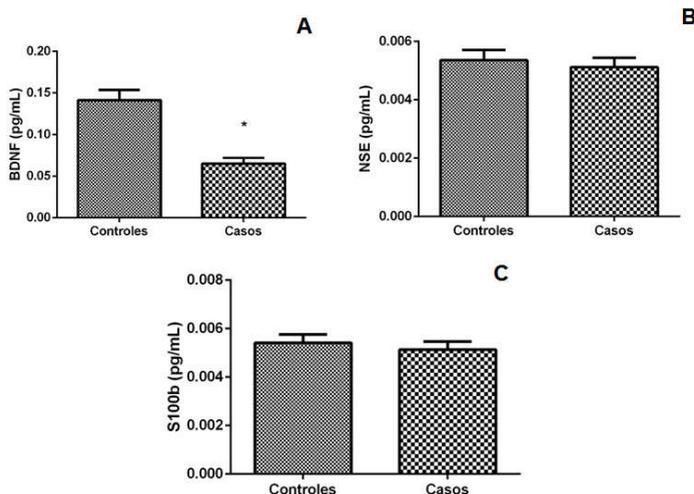


Figura 14 - Níveis séricos de BDNF, NSE e S100 β .

Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. Controles.

4.2.4 Interação entre os Níveis de BDNF e Transtornos Psiquiátricos

A Figura 15 mostra os níveis de BDNF em pacientes portadores de DM. Os resultados foram relatados quanto à alterações nos níveis de BDNF em pacientes com DM com ou sem transtornos psiquiátricos (Figura 15A). Os pacientes portadores de DM com transtornos psiquiátricos demonstraram baixos níveis de BDNF no soro quando comparados com os sujeitos que não apresentavam transtorno psiquiátrico. As Figuras 15B e 15C mostram a diferença entre os valores séricos de BDNF de sujeitos com DM com transtorno psiquiátrico e controles e sujeitos com DM sem transtorno psiquiátrico, respectivamente. Podemos observar que tanto os sujeitos com DM sem transtorno psiquiátrico e com transtorno psiquiátrico, mostram baixos níveis de BDNF quando comparados com controles.

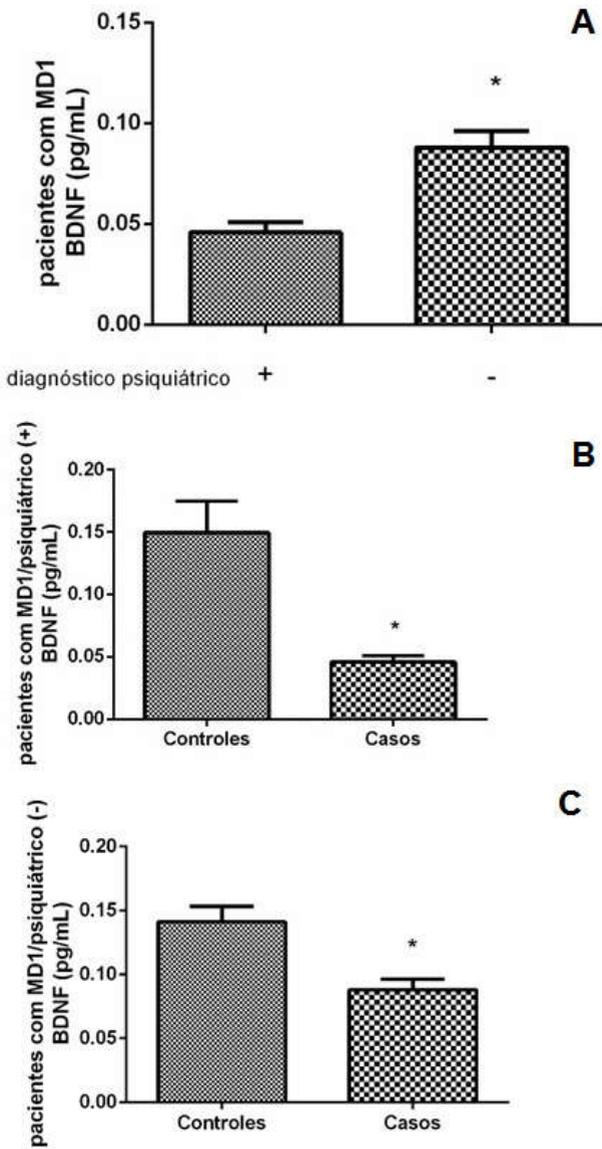


Figura 15 - Níveis séricos de BDNF e transtorno psiquiátrico.

Legenda: Os dados são expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. Controles.

5 DISCUSSÃO

Os estudos pré-clínicos demonstram que os animais mdx quando adultos apresentaram alteração nos processos de aprendizado e memória e no comportamento semelhante à depressão. No entanto, não apresentaram comportamento semelhante à ansiedade. Além disso, houve um aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α em tecido cerebral. Entretanto, não houve alteração nas proteínas sinaptofisina e PSD-95 também em tecido cerebral. Já no estudo clínico com sujeitos com diagnóstico de DM, houve uma diminuição dos níveis séricos de BDNF sem alterar os níveis de enolase e s100 β . Alterações cognitivas também foram evidenciadas nestes indivíduos bem como alguns diagnósticos de importantes transtornos psiquiátricos.

A interação entre o indivíduo e o meio ocorre através de seus sistemas sensoriais ou de representações internas (cognição e emoção). Isto constitui a base do processo de aprendizagem e que possibilita a aquisição de novas informações, além de estabelecer as relações com aprendizagem prévia (Izquierdo, 2002). O hipocampo, estrutura associada com processos de aprendizagem e memória, expressa a distrofina, uma proteína estrutural que conecta a matriz extracelular ao citoesqueleto, fornecendo proteção contra danos celulares (Rae e O'Malley, 2016). Tanto o hipocampo como o córtex frontal, facilitam os processos de aprendizagem e de memória e pacientes com DMD apresentam disfunção cognitiva com déficits em memória verbal, de curto prazo e de trabalho (Hinton et.al., 2000, 2001, Snow et.al., 2013; Billard et.al., 1998,; Hinton et.al. 2000; 2001; Roccella et.al. 2003).

Pacientes com DMD exibem graus variáveis de comprometimento cognitivo (Anderson et.al., 2002; Bresolin et.al., 1994). Além disso, muitos deles têm dificuldade em se comunicar. Eles exibem problemas de comportamento social e têm pouco reconhecimento de afetos faciais (Hinton et.al., 2006, 2007). Curiosamente, a expressão de Dp71, um produto proteico produzido através de uma mutação no gene da distrofina e apenas expressa no SNC, foi associada à deficiência intelectual sem um fenômeno da DMD associada (de Brouwer et.al., 2014).

Nos animais mdx, foram testados alguns tipos de comportamentos, pois assim como os pacientes com DMD, animais mdx não possuem distrofina no tecido muscular esquelético e no tecido cerebral. Devido a isso, presume-se que a pesquisa do comprometimento cognitivo utilizando um modelo animal, fornece informações sobre o desenvolvimento de déficits cognitivos observados em portadores de

DMD , ressaltando que sem repertório linguístico, os animais não podem ser avaliados através de alterações cognitivas, mas sim através de características comportamentais não linguísticas (Muntoni et.al., 1991;Rodriguez e Wetsel, 2006;Vaillend et.al., 1995).

A DMD caracteriza-se pela ausência de distrofina, uma proteína estrutural que conecta a matriz extracelular ao citoesqueleto da célula e fornece proteção contra danos induzidos pela contração nas células musculares esqueléticas. Contudo, a distrofina também é expressa em neurônios em regiões cerebrais específicas, incluindo o hipocampo, uma estrutura associada ao aprendizado e formação de memória (Hinton et.al. 2000,2001; Snow et.al., 2013). Estudos mostram que meninos com DMD, exibem disfunção cognitiva não progressiva, com déficits na memória verbal, de curto prazo e de trabalho. As alterações no desempenho da memória de curto e longo prazo são consistentemente relatadas e incluem déficits na memória operacional e espacial (Billard et.al., 1998; Hinton et.al. 2000; 2001;Roccella et.al., 2003).

Neste estudo, foi avaliada a memória de habituação, memória aversiva e memória de reconhecimento de objetos e observou-se o comprometimento nas três formas. A habituação se define como a redução da resposta provocada pela exposição repetida a um novo estímulo sem qualquer consequência biológica relevante, seja positiva ou negativa como com um choque. Trata-se de uma forma primitiva de aprendizagem não associativa (Leussis e Bolivar, 2006). Já a memória aversiva representa um dos principais determinantes do comportamento de sobrevivência em todas as espécies (Gold 1986), correspondendo a muitos exemplos importantes de aprendizado em seres humanos. A memória de reconhecimento de objetos emergiu como um método popular para testar a memória não espacial em roedores, avaliando a tendência natural dos mesmos para explorar novos itens. (Cohen e Stackman, 2015).

No presente estudo, os animais mdx, também apresentaram comportamento relacionado com a depressão e não com a ansiedade, avaliado através de tarefas como o nado forçado e o labirinto em cruz elevada. A comorbidade com distúrbios psiquiátricos tem sido documentada incluindo TDHA, transtornos obsessivo-compulsivo, autismo, epilepsia e ansiedade em pacientes com DMD (Banihani et.al. 2015; Hendriksen & Vies; Roccella et.al., 2003).

A ansiedade é um fenômeno complexo que não pode ser descrito em um único teste, no entanto, houve poucos estudos que apresentaram sintomas parecidos com a ansiedade em humanos e em modelos animais com DMD. Autores referem que depressão e ansiedade estão

moderadamente relacionadas com a qualidade de vida em pacientes com doenças neuromusculares (Rose et.al. 2012). Neste sentido, ressalta-se a importância de estudos visando o diagnóstico em pacientes em pacientes com DMP. Já a depressão, parece ser subdiagnosticada em pacientes com doenças somáticas crônicas (Nuyen et.al.,2005). Estudos recentes demonstram que pacientes com DMD apresentam ansiedade (24%) e depressão (19%) ao longo do curso da doença (Panggalila et.al., 2015). Neste modelo não estudamos todos estes mecanismos potenciais responsáveis pelas alterações de longo prazo nos seres humanos, mas apenas o efeito isolado da perda de distrofina no comprometimento neurocognitivo.

Outro ponto avaliado neste estudo foi o perfil inflamatório em tecido cerebral através da avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e a atividade da MPO. Houve um aumento significativo nos níveis de IL-1 β e TNF- α e da atividade da mieloperoxidase dos animais mdx quando comparado aos animais selvagens. A inflamação crônica é um sintoma chave e um fator contributivo na patogênese da DMD, devido em parte à secreção de mediadores imunes pró-inflamatórios de fibras musculares deficientes em distrofina (De Paepe e De Bleecker 2013, Porter et.al., 2002). Citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α (Kuru et.al., 2003; Porreca et.al., 1999), IL-1 β (Evans et.al., 2009), IL-6 (Messina et.al., 2011; Rufo et.al. 2011), e IL-17 (De Pasquale et.al., 2012) estão elevados em biópsias musculares de pacientes com DMD. Este é o primeiro estudo a evidenciar um aumento de citocinas pró-inflamatórias e da atividade da MPO em SNC de animais mdx. Os mecanismos que conduzem às lesões do SNC na DMD ainda são desconhecidos. Entretanto, estas evidências sugerem que possa haver um processo neuroinflamatório no SNC durante o curso da doença. Estudos apontam que a neuroinflamação pode contribuir significativamente para a progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, Esclerose múltipla, Doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (Wei Wei et.al., 2016; Hagberg et.al., 2015; Amor et.al., 2010; Doorn et.al., 2012; Hurley et.al., 2013).

Comim et.al. (2015) demonstraram que pacientes com DMD adultos jovens apresentaram um aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α e uma diminuição de IL-10. Essas moléculas de sinalização também possuem ações neuromoduladoras. Além das células imunes, os neurônios, a glia e as células endoteliais da microvasculatura no SNC secretam citocinas e também expressam receptores para esses mediadores imunes. Há uma

relação significativa entre os sistemas imunológico e nervoso, uma vez que as citocinas podem ter efeitos indiretos na atividade neuronal, estimulando a secreção de moléculas neuromoduladoras da glia ou células endoteliais (Allan e Rothwell, 2001; Montgomery e Bowers 2012). Além disso, eles podem se ligar diretamente aos receptores nos neurônios, onde suas ações neuromoduladoras podem subsequentemente influenciar a função cognitiva. O hipocampo, uma estrutura em que a aquisição de novas memórias declarativas é absolutamente dependente, expressa receptores para IL-1 β (Gardoni et.al., 2011), TNF (Sairanen et.al., 2001) e IL-6 (Schobitz et.al., 1993).

A expressão da proteína sinaptofisina e PSD-95 não foram alteradas em tecido cerebral de camundongos mdx. A sinaptofisina é uma molécula crítica na sinaptogênese, sendo necessária para a aprendizagem e a memória. Já a PSD-95 é uma importante proteína de ancoramento na plasticidade sináptica. Ambas estão relacionadas e possuem um papel importante nos processos de aprendizado e memória. Doenças associadas à demência (Garringer et.al., 2013), diabetes do tipo 1 e do tipo 2 (Duarte et.al., 2012), o envelhecimento (Davies et.al., 2003) e a doença de Alzheimer (Callahan et.al., 1999) reduzem a expressão da sinaptofisina.

Embora as DMP tenham sido estudadas principalmente no contexto da disfunção do músculo esquelético, a própria DMD é realmente uma doença multissistêmica, pois a distrofina também é expressa no músculo cardíaco e liso, nas glândulas endócrinas e nos neurônios. Em indivíduos saudáveis, os neurônios no SNC expressam a distrofina. especificamente no hipocampo, cerebelo, córtex cerebral e amígdala (Bies et.al. 1992; Knuesel et.al. 2000; Lidov et.al. 1990, 1993; Sekiguchi et.al. 2009).

No primeiro momento, todos os pacientes que apresentaram MEEM com escore acima de 24 pontos, foram selecionados para ser submetidos à avaliação psiquiátrica. Em segundo, cinco pacientes que apresentaram diagnóstico de transtornos psiquiátricos associado a CGI dois ou três foram analisados juntamente com os dados dos níveis de BDNF. Estes pacientes com diagnóstico de transtornos psiquiátricos demonstraram baixos níveis de BDNF quando comparados com pacientes sem transtornos psiquiátricos. Curiosamente, quando separados, sujeitos portadores de DM com e sem transtornos psiquiátricos e comparados com o grupo controle, ambos demonstraram baixos níveis de BDNF.

Uma revisão recente mostrou que transtornos neurodegenerativos associados ao comprometimento cognitivo tal como na doença de Huntington, doença de Alzheimer e depressão apresentaram baixos

níveis de BDNF no soro (Lu, Nagappan e Lu, 2014). Sabe-se que DM está associada com prejuízo cognitivo causado por lesões da substância branca e atrofia cerebral (Minnerop et.al., 2011; Jakkani et.al. 2012), enquanto outros estudos sugerem que alguns dos déficits cognitivos que estes pacientes apresentam, se relacionam com modificações específicas da estrutura cerebral, e consideram que alterações na substância cinzenta são irrelevantes (Weber et.al.,2006).

No presente estudo, somente níveis séricos de BDNF decresceram quando comparados com grupo controle. Não foram observadas diferenças de NES e S100 β entre os grupos. Entretanto, como já citado, os pacientes portadores de DM com transtorno psiquiátrico associado, comparados aos pacientes sem transtorno psiquiátrico, apresentavam baixos níveis séricos de BDNF e, quando comparados com o grupo controle, ambos mostravam níveis de BDNF baixos, o que demonstra que os baixos níveis de BDNF não estão relacionados aos transtornos psiquiátricos e sim a DM.

A perda de função BDNF é relatada em pacientes com transtornos psiquiátricos como o transtorno de humor bipolar (Scola, et.al. 2015), depressão maior (Shimizu et.al., 2003), esquizofrenia (Lee et.al., 2015), TDHA (Liu et.al. 2015), e outros. Um estudo recente mostra que pacientes portadores de DM apresentam decréscimo dos níveis de BDNF, IL-10 e da atividade da superóxido dismutase e um aumento de IL-1 β (Comim et.al. 2015). Durante o processo de aprendizagem e formação da memória, o BDNF atua em diversas funções. Neste estudo foi observado que pacientes com DM independente do diagnóstico psiquiátrico, apresentavam alterações nos níveis de BDNF séricos. Estes resultados sugerem a possibilidade de envolvimento cerebral durante o processo da doença.

Alguns autores relataram associação entre a expansão de CTG e o nível de cognição global medida pelo WAISS ou pelo MEEM (Perini et.al. 1999; Marchin et.al. 2000). Outro estudo recente mostrou que o comprometimento intelectual é uma característica comum e importante na DM, não só de início precoce no paciente adulto, mas também entre as formas menos severas de DM com base no escore de QI comparado com a população geral (JEAN et.al., 2014). Por outro lado, os estudos sobre os transtornos psiquiátricos em pacientes com DM são poucos. Winblad et.al. mostraram que pacientes portadores de DM mostraram sinais clínicos de depressão (Winblad et.al. 2010). A condição depressiva é, porém, leve a moderada. Transtornos do humor e de personalidade associado à apatia e aversão social é visto de forma recorrente (Winblad et.al. 2005; Med e Sansone, 2007).

Neste estudo, cinco pacientes apresentavam transtornos psiquiátricos após a avaliação clínica. Estes achados mostraram que além dos baixos níveis de BDNF no soro e o desempenho inferior nos testes cognitivos, a maioria dos pacientes apresentou transtorno psiquiátrico associado. Em outro estudo recente, verificou-se que a atrofia cortical e subcortical da substância cinzenta e branca foi significativa em pacientes com DM. Este resultado está associado à deficiência cognitiva, depressão e sonolência diurna, indicando envolvimento parcial das redes neuronais complexas (Schneider e Gold et.al., 2015). Outros autores ainda relatam que a frequência de transtornos do humor em DM não é maior do que na população geral ou em outras doenças neuromusculares que não afetam o cérebro diretamente (Kolkman et.al. 2007; Wimblad et.al. 2010).

Nos testes cognitivos, especialmente o WMS-R, podemos observar que os pacientes mostraram comprometimento da memória de trabalho sendo maior na memória lógica. Os resultados não indicaram que a memória imediata ou a memória tardia são um fator significativo. Isto pode ser corroborado pelo teste WAISS que indica a existência de um déficit em pensamento lógico entre os pacientes avaliados. É necessário dizer que a avaliação cognitiva não se baseia no contexto social e histórico dos pacientes. A consequência disso é a criação de uma variável nos resultados que não poderia ser explorada nem pela escassez de tempo, nem pelo fato que não seria a proposta de pesquisa, realizar questões sociológicas em cada paciente.

6 CONCLUSÃO

Os estudos pré-clínicos demonstram que os animais mdx apresentaram alteração nos processos de aprendizado e memória e no comportamento semelhante à depressão. Além disso, houve um aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α em tecido cerebral. Entretanto, não houve alteração nas proteínas sinaptofisina e PSD-95 também em tecido cerebral. Já no estudo clínico com sujeitos com diagnóstico de DM, houve uma diminuição dos níveis séricos de BDNF sem alterar os níveis de enolase e S100 β . Alterações cognitivas também foram evidenciadas nestes indivíduos bem como alguns diagnósticos de importantes transtornos psiquiátricos. Este é o primeiro estudo a evidenciar um aumento de citocinas pró-inflamatórias e da atividade da MPO em SNC de animais mdx. Os mecanismos que conduzem às lesões do SNC na DMD ainda são desconhecidos. Entretanto, estas evidências sugerem que possa haver um processo neuroinflamatório no SNC durante o curso da doença e que há necessidade de continuidade das pesquisas neste campo.

REFERÊNCIAS

Abdel-Salam E, Abdel-Meguid I, Korraa SS. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 2009; 28:94-100.

Alberto C, Júnior M, Faria NC. Memória Memory. *Psychol Reflexão e Crítica*. 2015;28(4):780–788. doi:10.1590/1678-7153.201528416.

Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2:734–744, 2001.

Amor S, Puentes F, Baker D, Van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010 Feb; 129(2): 154-69. Doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x.

Amorin P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 22:106-15,2000.

Anderson JL, Head SI, Rae C, Morley JW. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*. 2002;125:4-13.

Banihani, Rudaina; Smile, Sharon; Yoon. Grace; Dupuis, Annie; Mosleh, Maureen; Snider, Andrea; Mc Adam, Laura// Cognitive and Neurobehavioral profile in boys with Duchene Muscular Dystrophy *Journal of Child Neurology*; Oct2015, Vol. 30 Issue 11, p1472

Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM, Banks GB, Gardner MG, et.al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *PNAS*. 2014;111(15):5723-5728.

Billard C, Gillet P, Signoret JL, Uicaut E, Bertrand P, Fardeau M, Barthez-Carpentier MA, Santini JJ.. Cognitive functions in duchenne muscular dystrophy: A reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 1992

Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain J S. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 20: 1725–1731, 1992.

Bischoff R. The Satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Farnzini – Armstrong C, editores. *Myology*. New York: Mc Graw-Hill; 1991.p.97-118.

Bolivar, V.J.; Leussis, M. P. Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v. 30, p. 1045-64, 2006.

Brandsema, J. F. & Darras, B. T. *Dystrophinopathies*. 35, 369–384, 2015.

Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T. Molecular basis of myotonic dystrophy:expansion of a trinucleotide (CTG) repeated at the 3'end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*.1992; 68(4);799-808.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchene muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*. 2010;(2): 177-89.

Caramono, FA. Characteristics of the Duchene muscular dystrophy patients. A review. *Arg. Cienc. Saúde.Unipar*. 3(3): 211- 218. 1999.

Callahan LM, Values WA, Coleman PD. Quantitative Decrease in Synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Mar;58(3): 275-87

Carretta D, Santarelli M, Sbriccoli A, Pinto F, Catini C, Minciacchi D. Spatial analysis reveals alterations of parvalbumin- and calbindin-positive local circuit neurons in the cerebral cortex of mutant mdx mice. *Brain Res* 2004;1016:1-11.

Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti PA, Mathews KD, Miller TM, Matthews DJ, Miller LA, Cunniff C, Druschel CM, Moxley RT. Delayed diagnosis in duchene muscular

dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet), *J.Pediatr.* 2009; 155(3):380-5.

Cohen Sj, Stackman RW Jr. *Behav Brain Res.* 2015 May 15:285:105-17. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Constantino LS, Petronilho F, Tuon L, Vainzof M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Oxidative variables and antioxidant enzymes activities in the mdx mouse brain. *Neurochem Int.* 2009 Dec;55(8):802-5.

Comim CM, Tuon L, Stertz L, Vainzof M, Kapczinski F, Quevedo J. Striatum brain-derived neurotrophic factor levels are decreased in dystrophin-deficient mice. 459, 66–68 (2009).

Comim CM1, Moraz T, Abreu I, Fraga DB, Ghedim FV, Mildner N, Tuon L, Vainzof M, Zugno AI, Quevedo J. Reduction of acetylcholinesterase activity in the brain of mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 2011 May;21(5):359-62

Comim CM, Mathia GB, Hoepers A, Tuon L, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Rosa MI. Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies. *An Acad Bras Cienc.* 2015 Sep;87(3):1809-18

Comim CM, Hoepers A, Ventura L, Freiburger V, Domingui D, Mina F, Mendonça BP, Scaini G, Vainzof M, Streck EL, Quevedo J. Activity of Krebs cycle enzymes in mdx mice. *Muscle Nerve.* 2016 Jan;53(1):91-5.

D'angelo MG, Bresolin N. 2006. Cognitive impairment in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 34: 16-33.

Del Tongo C, Carretta D, Fulgenzi G, Catini C, Minciacchi D. Parvalbuminpositive GABAergic interneurons are increased in the dorsal hippocampus of the dystrophic mdx mouse. *Acta Neuropathol* 2009;118:803-12.

De Paepe B, De Bleecker JL. Cytokines and chemokines as regulators of skeletal muscle inflammation: Presenting the case of Duchenne

Muscular Dystrophy. *Mediators Inflamm.* 2012;2013:540370.doi: 10.1155/2013/540370. Epub 2013 Nov 5

De Boer, S.F.; Koolhaas, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):145- 60

Deng B, Glanzman D, Tidball JG. Nitric oxide generated by muscle corrects defects in hippocampal neurogenesis and neural differentiation caused by muscular dystrophy. *J Physiol* 2009;587:1769-78.

Doorn KJ, Lucassen PJ, Boddeke HW, Prins M, Berendse HW, Drukarch B, Van Dam AM. Emerging roles of microglial activation and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2012 Aug; 98(2);222-38.doi:10.1016/pneurobio.2012.06.005. Epub 2012 Jun 23.

Dubowitz V. Muscular dystrophies. In: Dubowitz V. *Muscle Disorder in Childhood.* 2^a ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995

Evans NP, Misyak SA, Robertson JL, Bassaganya-Riera J, Grange RW. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of Duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R* 1: 755–768,2009.

Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases- a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.

Ferreira, LT. Sinais de tráfico envolvidos no endereçamento do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Belo Horizonte, 2006, 137p. Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

Fuentes D, Malloy-Diniz, L.F. Camargo, C.H.P. Consenza RM. *Neuropsicologia - Teoria e Prática.* 2ed. Porto Alegre: Artemed; 2014.

Gardoni F, Boraso M, Zianni E, Corsini E, Galli CL, Cattabeni F, Marinovich M, Di Luca M, Viviani B. Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1 β and NMDA stimulation. *J Neuroinflammation* 8: 14, 2011.

Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C, El-Husseini A (2006). A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron* 49(4): 547-562.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:953-64

Guertin, W. H., Ladd, C. E., Frank, G. H., Rabin, A. I., & Hiester, D. S. (1966). Research with the Wechsler Intelligence Scales for Adults. *Psychological Bulletin*, 66(5), 385-409.

Hering H and Sheng M (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2(12): 880-888.

Hendriksen, J. G. M., & Vles, J. S. H. (2008). Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *J Child Neurol* 23, 477–481.

Hinton VJ, De Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y. Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: The neuropsychological profile of Duchenne muscular dystrophy. *J IntNeuropsychol Soc.* 2001;7:45-54.

Hinton VJ, Fee RJ, Goldstein EM, De Vivo DC. Verbal and memory skills in males with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 2007;49:123-8

Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006;16:591-602.

Hoy A, Leininger – Muller B, Kuttler D, et al. Graving significance of myeloperoxidase in non infections diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40 (1):2-8.

Hurley MJ, Brandon B, Gentleman SM, Dexter DT. Parkinso's disease is associated with altered expression of cav1 channels and calcium-binding proteins. *Brain.*2013 Jul;136 (Pt 7);2077-

97.doi:10.1093/brain/awt134. Epub 2013 Jun 14.

Izquierdo I. Memória. Porto Alegre, Artmed, 2002, 96 p.

Izquierdo I. Memória. Artmed, 2011; 2ed. Porto Alegre.

Jakkani R, Jyoti S, Ahmed M, Thomas MM. 2012. Magnetic resonance imaging findings in adult-form myotonic dystrophy type 1. Singapore Med J 6: 150-152.

Jean S, Richer L, Laberge L, Mathieu J. Comparisons of intellectual capacities between mild and classic adult onset phenotypes of Myotonic Dystrophy Type 1. Orphanet J Rare Dis. 2014 Nov 26;9:186. Doi: 10.1186/s13023-014-0186-5

José Bueno Lledó, Alfonso Serralta Serra, Cristina Ballester Ibáñez, Manuel Planells Roig, Jacinto Galeano Senabre, David Rodero Rodero Cirugía Española, Volume 73, Issue 6, 2003, Pages 375-377.

Kalkman JS, Schillings ML, Zwarts MJ, van Engelen BGM, Bleijenberg G. Psychiatric disorders appear equally in patients with myotonic dystrophy, facioscapulohumeral dystrophy, and hereditary motor and sensory neuropathy type I. Acta Neurol Scand. 2007;115:265–70. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00737

Kandel, Eric R. Em busca de la memoria: el nacimiento de una nueva ciencia de la mente. 1ª ed. Buenos Aires: Katz;2007. (19) 305- 312.

Kaplan JC, Hamroun D. The 2014 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). Neuromusc Disord. 2013;23:1081-1111.

Karagan NJ, Zellweger HU. Early verbal disability in children with Duchene muscular dystrophy. Dev Med Child Neurol. 1978; 20(4):435-41.

Kim JH, Udo H, Li HL, Youn TY, Chen M, Kandel ER, Bailey CH. Presynaptic activation of silent synapses and growth of new synapses contribute to intermediate and long-term facilitation in Aplysia. Neuron. 2003 Sep 25;40(1):151-65.

- Knuesel I, Zuellig RA, Schaub MC, Fritschy JM. Alterations in dystrophin and utrophin expression parallel the reorganization of GABAergic synapses in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 13: 1113–1124, 2001.
- Kochanek PM, Berger RP, Bayir H, Wagner AK, Jenkins LW, Clark RS. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Curr Opin Crit Care* 2008;14:135-41.
- Kuru S, Inukai A, Kato T, Liang Y, Kimura S, Sobue G. Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 2003 Mar;105(3):217-24 Epub 2002 Nov 22.
- Kwon HW, Kwon BS, Kim GB, et al. The effect of enalapril and carvedilol on left ventricular dysfunction in middle childhood and adolescent patients with muscular dystrophy. *Korean Circ J* 2012;42:184-91.doi: 10.4070/kcj.2012.42.3.184
- Lee SJ, Baek JH, Kim YH. Brain-derived Neurotrophic Factor Is Associated with Cognitive Impairment in Elderly Korean Individuals *Clin Psychopharmacol Neurosc.* 2015 Dec 31; 13(3):283-7.doi: 10.9758/cpn.2015.13.03.283
- Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: A deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(5): 726-31.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:289-317.
- Licursi V, Caiello I, Lombardi L, De Stefano ME, Negri R, Paggi P. Lack of dystrophin in mdx mice modulates the expression of genes involved in neuron survival and differentiation. *Eur J Neurosci* 2012;35:691-701.
- Lidov HG, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 348: 725–728, 1990.

Lima RR, Costa AMR, Souza RD, Gomes-Leal W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev Paraense de Med.* 2007;21(2).

Ljubicic V, Burt M, Jasmin BJ. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. *The FASEB Journ.* 2014;28:548-568.

Lorusso ML, Civati F, Molteni M, Turconi AC, Bresolin N, D'Angelo MG. Specific profiles of neurocognitive and reading functions in a sample of 42 Italian boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Child Neuropsychol* 2013;19:350-69.

Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;220:223-50. doi:10.1007/978-3-362-45106-5-9

Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 7: 42–59, 2012.

Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A Systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchene and Becher, muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2014; 24(6): 482-91.

Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchene muscular Dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (1): CD003725

Mantoan, Maria Teresa Eglér. Inclusão escolar- caminhos e descaminhos, desafios, perspectivas. *Ensaio Pedagógicos.* Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Especial, 2006.

Marin II, Kipnis J. Learning and memory ... and the immune system. *Learn Mem.* 2013 Sep 19;20(10):601-6

Matthew PW. The muscular dystrophies. *Continuum Journ.* 2013;19(6):1535- 70.

McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence J, Eagle M,

Gappmaier E, Glanzman AM. The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne muscular dystrophy: reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study. *Muscle Nerve*. 2013;48:357-68.

Meola G, Sansone V, Perani D, Colleluori A, Cappa S, Cotelli M, et.al. Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy. *Neurology* 1999;22:1042-50.

Meola G, Sansone V. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve* 2007;36:294-306.

Messina S, Vita GL, Aguenouz M, Sframeli M, Romeo S, Rodolico C, Vita G .Activation of NF- κ B pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta Myol* 30: 16–23, 2011.

Minciacchi D, Del Tongo C, Carretta D, Nosi D, Granato A. Alterations of the cortico-cortical network in sensori-motor areas of dystrophin deficient mice. *Neuroscience* 2010;166:1129-39

Minnerop M et.al. 2011. The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain* 6: 3530-3546.

Miranda R, Laroche S, Vaillend C. Reduced neuronal density in the CA1 anterodorsal hippocampus of the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*. 2016 Nov;26(11):775-781.

Modoni A, Silvestri G, Vita MG, Quaranta D, Tonali PA, Marra C. Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 (DM1): a longitudinal follow-up study. *J Neurol* 2008;255:1737-42.

Nascimento, Elizabeth do; Figueiredo, Vera Lúcia Marques de. WISC-III e WAIS-III: alterações nas versões originais americanas decorrentes das adaptações para uso no Brasil. *Psicol. Reflex. Crit.*, Porto Alegre; 15(3); 603-612, 2002 .

Nardes F, Araújo PQCA, Gonçalves M. Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr. (Rio J.)* vol.88 no.1 Porto Alegre Jan./Feb. 2012

Nestler EJ; Barrot M; Dileone RJ; Eisch AJ; Gold SJ; Monteggia LM .

Neurobiology of depression. *Neuron* 28:13-25, 2002

Nico B, Paola Nicchia G, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*. 2004;125(4):921-35.

Nitrini R, Caramelli P, Charchat-Fichman H, Porto CS, A reza R. Avaliação da sensibilidade de teste de memória tardia no diagnóstico de doença de Alzheimer leve. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(Supl. 2):S32.

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E and Somogyi P (1998). Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21(3): 545-559.

Nuyen J, Volkers A, Verhaak P, Schellevis F, Groenewegen P, Van den Bos G. Accuracy of diagnosing depression in primary care: the impact of chronic somatic and psychiatric co-morbidity. *Psychol Med* 2005; 35:1185-95

Oqura Y, Tajrishi MM, Sato S, Hindi SM, Kumar A. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. 2014;1:2-11.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(2):255-65.

Pangalila RF, van den Bos GA, Bartels B, Bergen M, Stam HJ, Roebroek ME. Prevalence of fatigue, pain, and affective disorders in adults with duchenne muscular dystrophy and their associations with quality of life. *Arch Phys Med Rehabil*. 2015 Jul;96(7):1242-7.

Partridge TA. The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. *FEBS Journ*. 2013;280:4177-86.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167

Perini GI, Menegazzo E, Ermani M, Zara M, Gemma A, Ferruzza E, Gennarelli M, Angelini C. Cognitive impairment and (CTG)_n expansion in myotonic dystrophy patients. *Biol Psychiatry*. 1999;46:425–431. doi:

10.1016/S0006-3223(99)00016-5

Porreca E, Guglielmi MD, Uncini A, Di Gregorio P, Angelini A, Di Febbo C, Pierdomenico SD, Baccante G, Cuccurullo F. Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients. *Thromb Haemost* 81: 543–546, 1999.

Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, Leahy P, Li J, Guo W, Andrade FH . A Chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in Dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2002 Feb 1:11(3):263-72

Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine.* 1999; 30: 139–140

Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, De Paris F, Izquierdo I, Rose SP Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem.* 1999 Nov-Dec;6(6):600-7.

Rae MG, O'Malley D. Cognitive dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: a possible role for neuromodulatory immune molecules. *J Neurophysiol.* 2016 Sep 1;116(3):1304-15.

Roccella M, Pace R, De Gregorio MT. Psychopathological assessment in children affected by Duchenne de Boulogne muscular dystrophy. *Minerva Pediatrica* 2003;55:267-76.

Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R (2003) Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 341:217–220

Rose M, Sadjadi R, Weinman J, et al. Muscle Study Group: role of disease severity, illness perceptions, and mood on quality of life in muscle disease. *Muscle Nerve* 2012;46:351-9.

Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, Pierroz D, Morandi L, De Simoni M, Rucci N, Bertini E, Bianchi

ML, De Benedetti F, Teti A. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res* 26: 1891–1903, 2011.

Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Carpen O, Siren A
Differential cellular expression of tumor necrosis factor- α and type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *J Neurol Sci* 186: 87–99, 2001.

Scola G, Andreazza AC. The role of neurotrophins in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatric*. 2015 Jan 2;56:122-8.
Doi: 10.2016/j.pnpbp.2014.08.013. Epub 2014 Sep 2

Schneider – Gold C, Bellenberg B, Prehn C, Krogias C, Schneider R, Klein J, Gold R, Lukas C. Cortical and subcortical grey and white matter atrophy in myotonic dystrophies type 1 and 2 is associated with cognitive impairment, depression and daytime sleepiness. 2015 Jun 26;10(6)

Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 5: 1426–1435, 1993.

Sekiguchi M, Zushida K, Yoshida M, Maekawa M, Kamichi S, Yoshida M, Sahara Y, Yuasa S, Takeda S, Wada K. A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain* 132: 124–135, 2009.

Seixas SL, Cândido JL, Savino W, Santos TQ. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. *Arq Neuropsiq*. 1997;55(3-B):610-7.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koile K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Lyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Bio Psychiatry* . 2003 Jul 1;54(1): 70-5

Smith RA, Sibert JR, Harper PS. Early development of boys with Duchene muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 1990;32(6):519-27.

Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2000.

Takado Y, Terajima K, Ohkubo M, Okamoto K, Shimohata T, Nishizawa M, et.al. Diffuse Brain Abnormalities in Myotonic Dystrophy Type 1 Detected by 3.0 T Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Eur Neurol* 2015;73:247-56.

Theadom A, Rodrigues M, Roxburgh R, Balalla S, Higgins C, Bhatta Charjee R, Jones K, Krishnamurthi R, Feigin V. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2014; 43 (3-4): 259-68.

Thompson, A. P., LoBello, S. G., Atkinson, L., Chisholm, V., & Ryan, J. J. (2004). Brief Intelligence Testing in Australia, Canada, the United Kingdom, and the United States. *Professional Psychology: Research and Practice*, 35(3), 286-290

Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:1173-87

Topaloglu H. Epidemiology of muscular dystrophies in the Mediterranean area. *Acta Myolog*. 2013:138-41

Tuon L, Comim CM, Fraga DB, Scaini G, Rezin GT, Baptista BR, Streck EL, Vainzof M, Quevedo J. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in mdx mouse brain. *Muscle Nerve*. 2010 Feb;41(2):257-60

Waite A, Brown SC, Blake, DJ. The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci* 2012;35:487-96

Weber T, Vroemen M, Behr V, Neuberger T, Jakob P, Haase A, Schuierer G, Bogdahn U, Faber C, Weidner N. In vivo high-resolution mr imaging of neuropathologic changes in the injured rat spinal cord. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006 Mar;27(3):598-604.

Winblad S, Jensen C, Mansson JE, Samuelsson L, Lindberg C . Depression in Myotonic Dystrophy type 1: clinical and neuronal

correlates. *Behav Brain Funct.* 2010 May 19;6:25. doi: 10.1186/1744-9081-6-25

Wanda M. Snow, Mark Fry, Judy E. Anderson. Increased density of dystrophin protein in the lateral versus the vermal mouse cerebellum . *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2013,, volume 33, number 4 Page 513.

Wechsler, David. Wechsler memory scale (WMS-III). Vol. 14. San Antonio, TX: Psychological corporation, 1997.

Wei Z, Chen XC, Song Y, Pan XD, Dai XM, Zhang J, Cui XL, Wu XL, Zhu YG. Amyloid B protein aggravates neuronal senescence and cognitive deficits in 5xfad mouse model of Alzheimer's disease. *Chin Med J (Engl)*.2016 Aug 5;129 (15);1835-44

Wheeler TM. Myotonic dystrophy: Therapeutic strategies for the future. *Neurotherapeutics*. 2008; 5(4):592-600.

Winblad S,Lindberg C, Hanse S. Temperament and Character in patients with classical Myotonic Dystrophy type 1. *Neuromuscular Disord*. 2005 Apr; 15(4); 287-92. Epub 2005 Jan 28

Vaillend C, Billard JM, Laroche S. Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiol Dis* 2004;17:10-20.

Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36 (5):543-55.

Vermersch P, Seargeant N, Ruchoux MM, Hofmann-Radvanyi H, Wattez A, Petit H, Dwailly P, Delacourte A. Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology*. 1996; 47(3):711-7

ViannaMR, Alonso M,Viola H, Quevedo J, De Paris F, Furman M, De Stein ML, Medina JH et.al. (2000) Role of hippocampal signaling pathways in longterm memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem* 7:333-340

ANEXOS



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 13 de dezembro de 2016
Registro na CEUA (código): 16.033.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Martinelli Comim Cassol

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Envolvimento do sistema nervoso central na Distrofia Muscular de Duchenne", registrada com o nº 16.033.4.01.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Martinelli Comim Cassol - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13 de dezembro de 2016..

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COGNITIVAS, PSIQUIÁTRICAS E NÍVEIS DE BDNF, NGF E S100 β PLASMÁTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE DISTROFIAS MUSCULARES PROGRESSIVAS: ESTUDO CASO-CONTROLE

Pesquisador: Clarissa Martinelli Comim

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11242812.5.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 176.306

Data da Relatoria: 18/12/2012

Apresentação do Projeto:

adequado

Objetivo da Pesquisa:

adequados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

projeto adequado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48-)3431-2723

Fax: (48-)3431-2750

E-mail: cetica@unesc.net; cep-unesc@unesc.br