

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON OMEGA 3 SOBRE MUSCULO ESQUELETICO
(QUADRICEPS) DE ANIMALES DISTROFICOS ADULTOS DEL LINAJE *mdx*.**

PAULA ANDREA SAENZ SUAREZ

**Trabajo final de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Bióloga**

Director

Ph.D. Maria Julia Marques

Codirector

M.Sc. Hernan Torres Yanguas

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA

IBAGUÉ – TOLIMA

2016

“A mis padres y a mi novio, por el ejemplo de esfuerzo y dedicación, por ser siempre quienes cuidaron con atención mi crecimiento personal y profesional, quienes me apoyaron para que este sueño se convirtiera en realidad”.

Agradecimiento Especial

A la **Ph.D. Maria Julia marques** una mujer e investigadora llena de sabiduría que se ganó mi respeto y admiración, quien desde otras tierras y sin tener mayor conocimiento de mi decidió darme acogida en su departamento y laboratorio, ella quien se convirtió en un apoyo indispensable para mi estancia en Brasil, y permitió que se desarrollara un sueño que poco a poco tomo fuerza.

Gracias por la confianza, la paciencia y el tiempo, por ser esa orientadora inigualable y excepcional que marco mi vida; por haberme permitido conocer un poco de su intelecto y personalidad mientras con su estricta manera de realizar las cosas me enseñó poco a poco la forma correcta para llegar a la meta, Gracias por brindarme conocimientos y haber entregado parte de su tiempo para que este trabajo fuera culminado con éxito. Por eso y mucho más espero de todo corazón que este sea solo el comienzo de un largo camino de trabajo bajo su red de conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

“Uno mira hacia atrás con agradecimiento a los maestros brillantes, pero con gratitud a aquellos que tocaron nuestros sentimientos humanos. El plan de estudios es tanto la materia prima necesaria, pero el calor es el elemento vital de la planta en crecimiento y para el alma del niño”

- **Carl Jung**

A **Dios** por las oportunidades que me fueron regaladas en la vida, por la alegría de vivir su presencia y guiándome con el poder de su saber.

A mis padres, **Angélica Suarez** y **Dagoberto Sáenz** por el don de la vida y por sus enseñanzas.

A mis abuelitos **Amparo Zamora** y **Orlando Suarez** por el cariño y la base que le han dado a tan maravillosa familia.

A **Luisa Sáenz** y **Kristian Alberto Torres**, por el amor, incentivo y apoyo en todos los momentos en los cuales fueron indispensables para la realización de una de las etapas más importantes de mi vida.

Al profesor **Hernán Torres Yanguas.**, de la Universidad del Tolima, por su codirección y asesoría durante el proceso investigativo.

Al **Ph.D. Humberto Santo Neto** por la colaboración, conocimiento y aportes dados durante la realización de este trabajo

A la **Dr. Adriana Fogagnolo Mauricio** y el **Dr. Juliano Alves Pereira**, por el conocimiento compartido durante la estancia realizada en la UNICAMP; por ser esas figuras que tomaron a pecho el querer enseñarme todas y cada una de las técnicas requeridas, por las correcciones y opiniones ofrecidas durante el proceso de desarrollo

de actividades académicas, y en especial por la amistad que me brindaron, por mostrarme cosas nuevas y enseñarme que la investigación es cosa de corazón.

Al **Laboratorio de Biología Estructural de la unión neuromuscular, al Departamento de Biología estructural y funcional y a la Universidad Estadual de Campinas, Brasil** por haberme permitido realizar la estancia académica una experiencia inigualable que trajo consigo tantos frutos intelectuales y personales.

A los funcionarios del departamento de anatomía **Sr. Marco Aurelio Ribeiro de Paula** y Sr. **Walter Ferreira** por la gran acogida que me dieron, siempre ofreciendo su disposición de colaborar con las cosas necesarias para culminar este trabajo.

A mis amigos y colegas del Departamento de Anatomía, **Jessica S. Ferrera, Marcos M. Junior, Renato Rissi, Tulio Hermes y Catharina Nucci** por la importante contribución para la realización de este trabajo, por la amistad y momentos vividos.

Y por último, a la **Universidad del Tolima**, que a través de **la Oficina de Relaciones Internacionales (ORI)** me brindó apoyo económico durante el desarrollo del trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
3. ESTADO DEL ARTE	19
3.1 DISTROFIAS MUSCULARES.....	19
3.2 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD).....	20
3.2.1 complejo Distrofina-Glicoproteína (CDG).....	21
3.3. LESION MUSCULAR.....	22
3.3.1 Inflamación.....	22
3.3.2 Fibrosis.....	24
3.3.3 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS.....	25
3.3.3.1 Tratamiento Actual contra la DMD.....	25
3.3.3.2 Tratamiento a evaluar: OMEGA-3.....	27
4. METODOLOGÍA	29
4.1 Ratón del Linaje <i>mdx</i> como modelo experimental en la DMD.....	29
4.2 UNIDADES EXPERIMENTALES.....	30
4.2.1 Grupo experimental 1.....	32
4.2.2 Grupo experimental 2.....	32
4.2.3 Control	32
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	33
4.3.1 Sacrificio y obtención de músculos cuádriceps.....	33

4.3.2 Análisis Morfométrico.....	34
4.3.3 Western Blot.....	36
4.3.4 Análisis Estadísticos.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Análisis Morfométrico.....	38
5.1.1 Análisis Cualitativo.....	38
5.1.2 Análisis Cuantitativo.....	40
5.2 Western Blot.....	41
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSION	50
RECOMENDACIONES	51
LISTA DE REFERENCIAS	52
ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. División de grupos experimentales usados en la investigación.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organización molecular del complejo distrofina-glicoproteínas en el sarcolema, representando a α - y β - distroglicanas; α -, β -, γ -, δ - sarcoglicanas; α -, β 1-sintrofina; distrobrevina y la distrofina. 28
- Figura 2.** Conversión de los ácidos grasos e mediadores de la inflamación. COX (ciclooxigenasa); LOX (lipoxigenasa); EPA (ácido eicosapentaenoico); DHA (ácido docosaenoico); PGs (prostaglandinas), LTs (leucotrienos).
- Figura 3.** Modelo experimental establecido para el estudio de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). 30
- Figura 4.** Manutención de animales en el Bioterio del departamento de Anatomía, Instituto de biología, UNICAMP. 31
- Figura 5.** Tratamiento de animales dado 2 veces a la semana según grupo experimental. 31
- Figura 6.** Descripción gráfica del proceso de sacrificio y obtención de músculos. 34
- Figura 7.** Descripción gráfica de la metodología para adquisición de los cortes a evaluar. 36
- Figura 8.** Descripción gráfica del procedimiento mediante el cual se realiza la preparación de las muestras para el análisis Morfométrico basado en la técnica histología Hematoxilina & Eosina. 37
- Figura 9.** Descripción gráfica del procedimiento mediante el cual se realiza la preparación de las muestras para el análisis Morfométrico basado en la técnica Tricomico de Masson. * Áreas ocupadas con tejido conjuntivo 40

indicativo de la fibrosis, e indicando con flecha fibras con núcleo periférico. **A.** laminas con cortes listos para la tinción; **B.** Tinción, **C.** laminas listas para análisis morfológico, **D.** observación de láminas.

Figura 10. Descripción Grafica del Proceso de Western Blotting. **A.** Homogenización de las muestras, **B.** preparación, ubicación de geles de poliacrilamida y momento de servir las muestras en los posos. **C.** Electroforesis. **D.** Ubicación de membranas de nitrocelulosa para la transferencia desde el gel. **E.** Transferencia. **F.** incubación de anticuerpos en las membranas.

47

Figura 11. Análisis morfológico cualitativo de musculo esquelético. Corte transversal de musculo cuádriceps de animales C57BL/10 con tinción de Hematoxilina & Eosina (A) y Tricomico de Masson (B) * Fibras musculares con nucleó periférico.

51

Figura 12. Análisis morfológico cualitativo de musculo esquelético. Corte transversal de musculo cuádriceps de animales *mdx* con tinción de Hematoxilina & Eosina (A) y Tricomico de Masson (B) * Fibras musculares con nucleó central. < Áreas de inflamación. ≠ Áreas con tejido fibrotico.

Figura 13. Análisis morfológico cualitativo de musculo esquelético. Corte transversal de musculo cuádriceps de animales *mdx* tratado con omega-3 con tinción de Hematoxilina & Eosina (A) y Tricomico de Masson (B) * Fibras musculares con nucleó central \$ Fibras musculares con núcleo periférico < Áreas de inflamación. ≠ Áreas con tejido fibrotico.

Figura 14. Comparación entre el porcentaje de fibras con núcleo periférico (NP), porcentaje de las fibras con núcleo central (NC), porcentaje del área de inflamación (INFLA) y porcentaje del área de fibrosis (FIBRO) del musculo cuádriceps en animales *mdx* y *mdx* tratado con omega-3 (*Mdx-u3*).* 52

diferencia significativa de los animales mdx tratados con omega-3 y los animales mdx ($p \leq 0,05$).

Figura 15. Immunoblotting de los niveles de proteína presente en los músculos cuádriceps de animales C57BL/10, mdx control y mdx tratados. Bandas inmunoreactivas de TNF- α (A), TGF- β (B), MyoD (C), y NF κ B (D) gráficos representando los niveles de las proteínas expresados en pixeles, los cuales fueron normalizados por el GAPDH (37 kDa). Diferencia significativa * $p \leq 0,05$ comparado con C57 BL/10. ** $p \leq 0,05$ comparado con *mdx* y C57 BL/10.

Figura 16. Immunoblotting de los niveles de proteína presente en los músculos cuádriceps de animales C57BL/10, mdx control y mdx tratados. Bandas inmunoreactivas de MMP-9 Y TIMP-1 y gráficos representando los niveles de las proteínas expresados en pixeles, los cuales fueron normalizados por el GAPDH (37 kDa). Diferencia significativa * $p \leq 0,05$ comparado con C57 BL/10, ** $p \leq 0,05$ comparado con *mdx* y C57 BL/10, *** $p \leq 0,05$ comparado con *mdx*.