

LUIS HENRIQUE RAPUCCI MORAES

**"TRATAMENTO *IN VIVO* E *IN VITRO* COM A
ASSOCIAÇÃO DE N-ACETILCISTEINA E
DEFEROXAMINA EM CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS."**

**"*IN VIVO* AND *IN VITRO* TREATMENT WITH N-
ACETYLCYSTEINE AND DEFEROXAMINE IN
DYSTROPHIC MICE."**

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUIS HENRIQUE RAPUCCI MORAES

**"TRATAMENTO IN VIVO E IN VITRO COM A
ASSOCIAÇÃO DE N-ACETILCISTEINA E
DEFEROXAMINA EM CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS"**

Este exemplar corresponde à redação
final da Tese defendida pelo candidato

Luis Henrique Rapucci Moraes

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientadora: Dra. Elaine Minatel

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M791t Moraes, Luis Henrique Rapucci, 1983-
Tratamento *in vivo* e *in vitro* com a associação de n-acetilcisteína e deferoxamina em camundongos distróficos / Luis Henrique Rapucci Moraes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Elaine Minatel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cultura primária de células. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. N-acetilcisteína. 5. Camundongos endogâmicos mdx. I. Minatel, Elaine, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *In vivo* and *in vitro* treatment with n-acetylcysteine and deferoxamine in dystrophic mice

Palavras-chave em inglês:

Primary cell culture
Muscular dystrophy, Duchenne
Reactive oxygen species
N-acetylcysteine
Mice, inbred mdx

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Elaine Minatel [Orientador]
Valéria Helena Alves Cagnon Quitete
Jesus Carlos Andreo
Maeli Dal Pai
Selma Maria Michelin Matheus

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural


Campinas, 26 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

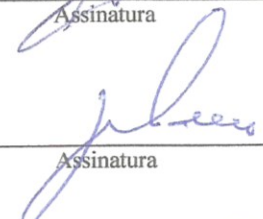
Dra. Elaine Minatel (Orientadora)


Assinatura


Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete


Assinatura


Dr. Jesus Carlos Andreo


Assinatura

Dra. Maéli Dal Pai


Assinatura

Dra. Selma Maria Michelin Matheus


Assinatura

Dra. Adriana Pertille

Assinatura

Dra. Taize Machado Augusto

Assinatura

Dr. Renato Ferretti

Assinatura

RESUMO

Devido ao fato dos camundongos *mdx*, modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne, apresentarem peroxidação lipídica da membrana causada pelo aumento da produção espécies reativas de oxigênio (EROs) no período que antecede o início da degeneração das fibras musculares, sugere-se que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos primários da degeneração muscular distrófica, ao invés de ser um efeito secundário deste processo. Camundongos *mdx* tratados com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) apresentaram diminuição da degeneração muscular. De acordo com a literatura a associação de NAC com Deferoxamina (DFX) produz resultado mais efetivo contra o estresse oxidativo do que a administração de NAC isoladamente. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi de verificar, através de análises morfológica, celular e bioquímica, se o tratamento *in vivo* e *in vitro* com a associação de NAC e DFX diminui a produção das EROs. Para os estudos *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/10 (grupo controle) e camundongos *mdx*, com 14 dias de vida pós-natal. Os camundongos *mdx* e C57BL/10 foram divididos em 4 grupos experimentais: tratados com salina, tratados com NAC+DFX, tratados com DFX e tratados com NAC (150 mg/kg) por 14 dias. Todos os animais foram submetidos à análise de medida de força. Os músculos Esternomastóideo (STN), Diafragma (DIA) e Tibial Anterior (TA) foram retirados e submetidos às técnicas histológicas (HE, azul de Evans e reação de DHE), Western Blotting (TNF- α , NF- κ B, MyoD, MAFbx e 4-HNE). Plasma sanguíneo foram utilizadas para determinação de creatina quinase (CK) e de citocinas inflamatórias. Nos experimentos *in vitro* foram utilizados os músculos do membro pélvico de camundongos C57BL/10 e *mdx* com 14 dias de vida. As culturas de células musculares foram utilizadas para análises de viabilidade celular (Trypan blue, MTT e vermelho neutro), análise de cálcio e Western Blotting após serem tratadas ou não com

NAC e DFX. O tratamento com NAC, DFX e NAC+DFX apresentou efeito benéficos sobre as fibras musculares distróficas, tanto nos experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, reduzindo a degeneração muscular, a inflamação exacerbada, a peroxidação lipídica e a produção de EROs. Tanto o tratamento isolado dos medicamentos quanto a associação apresentou potencial efeito, entretanto em alguns experimentos a associação mostrou-se mais eficaz contra os danos provocados pela distrofia.

Palavras chaves: Cultura primária de célula muscular, Deferoxamina, Distrofia muscular, EROs, N-acetilcisteína, *mdx*.

ABSTRACT

Due the fact of *mdx* mice, an experimental model of Duchenne muscular dystrophy, presenting the lipid peroxidation of membrane caused by increased production of reactive oxygen species (ROS) in the period that precede the onset of muscle fibers degeneration, it is suggested that oxidative stress may be one of the primary mechanisms of dystrophic muscle degeneration, rather than a side effect of this process. *Mdx* mice treated with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) showed a decrease in muscle degeneration. According to the literature the association of NAC with Deferoxamine (DFX) produces more effective results against oxidative stress than NAC alone. Thus, the aim of this study was to verify, through morphological analysis, cellular and biochemistry, if the *in vivo* and *in vitro* treatment with the combination of NAC and DFX decreases the ROS production. For *in vivo* studies were used C57BL/10 mice (control group) and *mdx* mice, with 14 days postnatal. The *mdx* and C57BL/10 mice were divided into 4 experimental groups: treated with saline, treated with NAC + DFX, treated with DFX and treated with NAC (150 mg/kg) for 14 days. All animals were subjected to strength measurement analysis. The Sternomastoid (STN), Diaphragm (DIA) and Tibialis anterior (TA) muscles were removed and submitted to histological techniques (HE, Evans blue dye and DHE reaction), Western Blotting (TNF- α , NF-kB, MyoD, MAFbx and 4-HNE). Blood plasma was used for determination of Creatine kinase (CK) and inflammatory cytokines. In the *in vitro* experiments, the muscles of the pelvic limb of C57BL/10 and *mdx* mice with 14 days postnatal were used. The muscles culture cells were used for cell viability analysis (Trypan blue, MTT and Neutral red), calcium analysis and Western blotting after being treated or not with NAC and DFX. Treatment with NAC, DFX and NAC + DFX showed benefic

effect on dystrophic muscle fibers, both in vivo and in vitro experiments, reducing muscle degeneration, exacerbated inflammation, lipid peroxidation, and ROS production. Either the isolated or the combination treatment of medication showed a potential effect, however in some experiments the combination was more effective against the damage caused by the disease.

Key Word: Primary muscular culture cells, Deferoxamine, muscular Distrophy, ROS, N-acetylcysteine, *mdx*.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
AGRADECIMENTOS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XXI
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	1
1.2 MODELO EXPERIMENTAL DA DMD: A LINHAGEM <i>MDX</i>	3
1.3 AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE....	4
1.4 ANTIOXIDANTES	6
1.4.1 <i>N-Acetilcisteína (NAC)</i>	6
1.4.2 <i>Deferoxamina (DFX)</i>	8
2.0 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 ANIMAIS	13
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL “ <i>IN VIVO</i> ”	13
3.2.1 <i>Grupos experimentais</i>	13
3.2.2 <i>Tratamento in vivo</i>	15
3.2.3 <i>Medição da Força Muscular</i>	15
3.2.4 <i>Procedimento cirúrgico para retirada dos músculos para análise histológica (HE e azul de Evans)</i>	16
3.2.5 <i>Dosagem de Creatina-Quinase (CK), TNF-α, NF-κB e IL-1β em amostras de sangue</i>	18
3.2.6 <i>Quantificação de TNF-α, NF-κB (p65), MyoD, 4-HNE e MAFbx/Atrogin</i>	19
3.2.7 <i>Análise histológica do fígado</i>	21
3.2.8 <i>Determinação da atividade enzimática da glutathiona reduzida (GSH)</i>	22
3.2.9 <i>Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical OH)</i>	22
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL “ <i>IN VITRO</i> ”	23
3.3.1 <i>Isolamento e cultura primária de células musculares</i>	23
3.3.2 <i>Análise da viabilidade celular</i>	24
3.3.3 <i>Tratamento in vitro</i>	26
3.3.4 <i>Análise do cálcio nas culturas de células (FLUO-4)</i>	27
3.3.5 <i>Detecção H₂O₂ (Amplex Red)</i>	28

3.3.6	<i>Quantificação de TNF-α, NF-κB, MyoD e 4-HNE</i>	28
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA (TRATAMENTO IN VIVO E IN VITRO)	28
4.0	RESULTADOS	31
4.1	EXPERIMENTOS “ <i>IN VIVO</i> ”	31
4.1.1	<i>Peso corporal</i>	31
4.1.2	<i>Análise de Força</i>	32
4.1.3	<i>Análise Qualitativa (Citotoxicidade) do Tecido Hepático</i>	33
4.1.4	<i>Análise Qualitativa do Tecido Muscular</i>	34
4.1.5	<i>Análise Quantitativa do Tecido Muscular</i>	39
4.1.6	<i>Análise de CK</i>	42
4.1.7	<i>Análise de Citocinas inflamatórias no plasma</i>	43
4.1.8	<i>Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical OH)</i>	44
4.1.9	<i>Análise de GSH em extrato muscular</i>	45
4.1.10	<i>Western Blotting</i>	46
4.2	EXPERIMENTOS “ <i>IN VITRO</i> ”	52
4.2.1	<i>Análise da viabilidade celular</i>	52
4.2.2	<i>Análise de Cálcio nas culturas de células (FLUO-4)</i>	54
4.2.3	<i>Amplex Red</i>	56
4.2.4	<i>Western Blotting</i>	57
5.0	DISCUSSÃO	59
6.0	CONCLUSÃO	75
7.0	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	77
8.0	ANEXOS	97
	ANEXO 1 – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA.....	97

Dedico...

A minha esposa Fernanda dos Santos Rapucci Moraes e a minha filha Alicia Santos Rapucci Moraes.

A beleza está na simplicidade. Precisamos de pouco para viver, mas corremos atrás de muito. Somos enfeitiçados por um consumo excessivo, onde temos que ter mais a cada dia. Nem sempre o melhor carro, a melhor casa, as belas joias são sinônimos de felicidade. Valorize o amor. Valorize a vida.

Orlando Ferraz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me proporcionar a vida, e se estou enfrentando os obstáculos e as dificuldades diárias, Ele me conforta para seguir em frente lutando!

A tamanha compreensão e infinito apoio da minha esposa **Fernanda dos Santos Rapucci Moraes**, que com a Graça de Deus pode conceder um fruto do nosso matrimônio chamado “**Alicia**”. Saiba que, sem você por perto, tudo seria mais difícil!

Aos meus pais **Oswaldo e Creusa**. Não são nomes científicos, mas são os principais autores para isto acontecer. Obrigado pela educação, amor, carinho e ajuda que me deram, hoje e sempre. Em todos os momentos agradeço infinitamente!

Aos meus irmãos e cunhadas **Luis Gustavo, Luis Eduardo, Ana Caolina e Aline**, obrigado pelo Carinho!

Aos meus sogros **Carlos e Carmen** e cunhados **Vanessa, Fábio e Milena** e ao sobrinho **Luis Eduardo**, obrigado pela compreensão e ajuda que nos proporcionam sempre nas nossas vidas.

Agradeço à orientadora, professora, amiga, conselheira **Dra. Elaine Minatel**, pela presença diária no laboratório, conselhos e ensinamentos que sempre ajudam ao crescimento técnico-científico e acadêmico da minha vida particular e profissional.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos de trabalho do Laboratório de Plasticidade Muscular, **Mestre Rafael Burgos, Mestrando Túlio Hermes e Daniela Mizobuti, Doutoranda Aline Macedo** e aos alunos de iniciação científica, **Amanda Harduim, Aline Reis, Livia, Jean Shiratori, Pamela Dias, Roberta Bolineli e Maria Luiza** obrigado por toda ajuda neste trabalho e as horas de distração que me proporcionaram.

Aos amigos de Pós Graduação, Doutorandos **Adriana Mauricio, Drielen, Juliano, Samara, Isabel e Rodrigo**, aos **Doutores Gustavo, Ana Paula, Cintia, Taize e Renato Ferretti** obrigado pela paciência e ensinamentos de todas as técnicas que puderam me passar.

Aos professores do Departamento de Anatomia, **Dr. Humberto Santo Neto, Dra. Maria Julia Marques, Dra. Valeria Quitete, Dr. Alexandre Leite, Dr. Marco Somazz, Dr. Angelo Camilli, Dr. José Meciano**, obrigado a todos vocês pelos sucessivos ensinamentos.

Ao Professor **Eduardo Caldeira**, pela mão amiga que nunca se cansa de ajudar.

Agradeço aos técnicos e funcionários do Departamento: **Sr. Marcos, Lorivaldo, Toni, Paulo, Walter e Sra. Marlene** pelos auxílios quando requisitados.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em especial a secretária **Liliam Alves Senne Panagio**, muito obrigado pela sua prestação e atenção aos meus pedidos.

A banca examinadora, **Doutores Elaine Minatel, Valéria Quitete, Jesus Andreo, Maeli Dal Pai, Selma Maria, Adriana Pertille, Taize Machado e Renato Ferretti**, por aceitar o convite e colaborar para o crescimento técnico-científico.

Agradeço aos amigos do **ECC – Liceu Salesiano (Grupo Esperança)**, na alegria e na tristeza sempre oraram e acreditaram em meus propósitos.

À **FUNCAMP** pelo auxílio financeiro concedido durante o Programa Estágio Docente (PED).

A **CAPES** e ao **CNPq** pelo subsidio financeiro e agilidade na prestação de seus serviços.

Agradecimento em especial à **Fapesp, processo 2010/01087-4** pela concessão de bolsa e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE - 4-Hidroxinoneal

AA - Ácido ascórbico

AE - Azul de Evans

C57BL/10 - Camundongo controle

Ca²⁺ - Íons cálcio

CDG - Complexo distrofina-glicoproteínas

CK - Creatina quinase

Ctrl - Grupo controle C57BL/10

Cu(II) - Cobre

DFX - Deferoxamina

DIA - Músculo Diafragma

DMD - Distrofia muscular de Duchenne

EROs - Espécies reativas de oxigênio

HE - Hematoxilina-Eosina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HClO - Ácido hipoclorito

Inf/Reg - Área de inflamação e regeneração

IL-1 β - Interleucina 1 beta

L - Radical lipídico

LOO - Radical peroxila

Mdx- Camundongo murine dystrophin X-linked

mdx D - grupo *mdx* tratado com Deferoxamina

mdx N - grupo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína

mdx ND - grupo *mdx* tratado com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina

mdx S - grupo *mdx* controle tratado com solução salina

NAC - N-Acetilcisteína

NAC+DFX - Associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina

NC - Núcleo central

NF-kB - Fator de transcrição nuclear

NP - Núcleo periférico
NO - Óxido nítrico
nNOS - Óxido nítrico sintase neural
O₂- Ânion radical superóxido
O₃ - Ozônio
OH - Hidroxila
OOH - Peroxila
ONOO- Peróxido nitrito
O₂ - Oxigênio
PBS – Phosphate buffer saline (tampão fosfato salina)
Reg - Área de regeneração
RO - Alcoxil
ROOH - Peróxido orgânico
ROS - reactive oxygen species (espécie reativa de oxigênio)
SAC - Canal ativado por alongamento
STN - Músculo esternomastóideo
TA - Músculo tibial anterior
TNF- Fator de necrose tumoral alfa

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) se destaca, dentre as distrofias musculares, por ser a mais comum e a mais devastadora das distrofias. Foi descrita pelo médico Duchenne em 1861, na segunda edição de seu famoso livro de aplicação da eletricidade na medicina. Naquele momento, devido ao prejuízo intelectual da criança, ele sugeriu que a doença devia ter uma origem cerebral. Mas, em 1868 perante a uma série de registros de casos, o autor apontou a musculatura esquelética como o tecido originário da doença (DUCHENNE, 1868).

Além de outros relatos do século XIX, há registros que sugerem a presença da distrofia muscular em sociedades bem mais antigas. Um exemplo é um desenho no templo egípcio da rainha *Hatshepsut*, que reinou entre 1500 e 1480 a.C. Os egípcios fizeram uma expedição para *Punt* e o desenho mostra a rainha de *Punt* e seus familiares dando-lhes as boas vindas – o que chama a atenção é que a rainha e sua filha apresentam anormalidades na musculatura das pernas, na postura e na aparência facial (DUBOWITZ, 1975).

Atualmente o conceito de distrofia muscular engloba mais de 30 diferentes doenças genéticas causadas por mutações em diferentes genes, resultando geralmente em degeneração muscular, prejuízos locomotores e, na maioria dos casos, morte precoce (DALIKILIC; KUNKEL, 2003; DAVIES; NOWAK, 2006).

Esta é uma doença degenerativa progressiva das fibras musculares que atinge cerca de 1 a cada 3.500 indivíduos do sexo masculino; Onde os primeiros sinais clínicos da

doença manifestam-se ao redor dos quatro anos de idade através da dificuldade de caminhar e erguer-se de superfícies, progredindo para escoliose, incapacidade de locomoção e finalmente morte do paciente, que ocorre em geral por volta dos 20 anos de idade, frequentemente por broncopneumonia e/ou falência cardíaca; Esta é uma miopatia ligada ao cromossomo X, que afeta, principalmente, indivíduos do gênero masculino, e que sua anormalidade genética está presente no braço curto do cromossomo X (locus Xp21.1) cujo produto normal é uma proteína denominada distrofina (ENGEL et al., 1994).

A distrofina é encontrada na face citoplasmática do sarcolema, ligada aos miofilamentos da fibra muscular e a um complexo de glicoproteínas da membrana. O complexo distrofina glicoproteínas (CDG) é constituído de proteínas sarcolemas e expresso em alta concentração no músculo esquelético estriado (RANDO, 2001). A falta de distrofina e de componentes do CDG interrompe a ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto da fibra, promovendo a instabilidade do sarcolema durante a contração muscular. Dessa forma, ocorre influxo exacerbado de íons cálcio, hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (BIGGAR et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004).

Embora tenham se passado 150 anos desde a descoberta da doença, ela permanece incurável. Entretanto, os avanços da medicina e das técnicas de reabilitação fornecem suporte para os problemas secundários, como fraqueza muscular e insuficiência respiratória, melhorando a qualidade de vida e prolongando a sobrevivência destes pacientes (BOGDANOVICH et al, 2004).

1.2 Modelo experimental da DMD: a linhagem *mdx*

O conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos na DMD teve um grande avanço com o aparecimento de uma linhagem de camundongos, a linhagem *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) (BULFIELD et al., 1984).

Estudos genéticos demonstraram que, nos camundongos *mdx*, o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD, apresentando também ausência de distrofina, tornando-o um valioso modelo para estudos da DMD. O mutante *mdx* foi, inicialmente, identificado na colônia de camundongos C57BL10/ScSn (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995).

O camundongo *mdx* é o modelo animal preferido da DMD devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986; HAMER et al., 2002). Embora o camundongo *mdx* apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos. Machos e fêmeas são afetados e os músculos do *mdx* regeneram sucessivamente após necrose, pelo menos durante a fase adulta do animal (CULLEN; JAROS, 1988).

Estudos mostraram que no sétimo dia pós-nascimento os camundongos apresentam cerca de 0,62% das fibras musculares regeneradas. No décimo quarto e vigésimo primeiro dias, 2,2% e 5%, respectivamente, período caracterizado como estado pré-necrótico (MINATEL; NETO; MARQUES, 2003; PORTER et al., 2003). No período entre 21 e 28 dias de vida pós-natal, observa-se extensa área de necrose no músculo tibial anterior destes animais (SHAVLAKADZE et al., 2004). A intensa necrose miofibrilar, observada neste período, providencia um excelente modelo para o estudo de intervenções terapêuticas

designadas para prevenir ou reduzir a necrose, uma vez que a redução da miopatia é facilmente identificada (RADLEY; GROUNDS, 2006).

Entre 35 e 90 dias a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras. Neste período encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986).

1.3 As Espécies Reativas de Oxigênio e a Distrofia Muscular de Duchenne

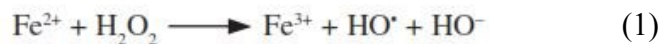
Muitos trabalhos têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia das distrofias musculares. Dentre estes podemos destacar os que enfocam que as células musculares distróficas são mais susceptíveis as espécies reativas de oxigênio (EROs) (RANDO et al., 1998; DISATNIK; DHAWAN; YU, 1998); os que relatam que os radicais livres contribuem para a perda da integridade da membrana nas distrofias musculares (MURPHY; KEHRER, 1989) e os que identificaram marcadores de estresse oxidativo em músculos de pacientes com DMD e de camundongos *mdx* (RAGUSA; CHOW; PORTER, 1997; RODRIGUEZ; TARNOPOLSKY, 2003).

Além disso, outros experimentos também observaram a redução de moléculas antioxidantes (glutathiona, vitamina E) e alterações na concentração de enzimas antioxidantes nas fibras musculares distróficas (MURPHY; KEHRER, 1989; RAGUSA, CHOW, PORTER, 1997). Segundo Whitehead, Yeung e Allen, (2006) as EROs possivelmente são mediadoras da lesão do músculo distrófico. Foi observado que o

aumento da produção das EROs, no período que antecede a qualquer necrose no camundongo *mdx*, causa peroxidação lipídica da membrana (DISATNIK et al., 1998).

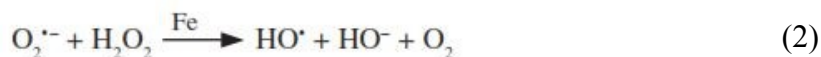
Desta forma, sugere-se que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos primários da degeneração muscular distrófica, ao invés de ser um efeito secundário deste processo. Esta hipótese é suportada por dois estudos *in vivo*, os quais demonstram redução da degeneração muscular em *mdx* tratados com antioxidante derivado do chá verde (BUETLER et al., 2002) ou submetidos a uma dieta pobre em ferro, a qual reduz a produção de radicais hidroxila (BORNAMAM et al., 1998).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado pode ser também potencialmente perigoso se houver metais reduzidos presentes nas células, pois pode se difundir facilmente através das membranas celulares através dos metais de transição a exemplo o cobre (Cu^{1+}) e ferro ferroso (Fe^{2+}). Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade, e no organismo encontra-se complexado com proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (ferritina e hemosiderina). H_2O_2 pode reagir com o Fe^{2+} e produzir o radical hidroxil (OH), (Equação (1), Reação de Fenton) (BARREIROS; DAVID, 2006).



O ânion super óxido ($O_2^{\cdot-}$) pode reduzir ferro férrico (Fe^{3+}) para Fe^{2+} , o que sugere que pode desempenhar dois papéis na produção de radical OH (Equação 2, reação de Haber-Weiss), possui habilidade de liberar Fe^{2+} das proteínas de armazenamento e também reage com o radical OH produzindo oxigênio singleto (O_2) (Equação 3) e com o óxido nítrico (NO) produzindo peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Equação 4) (BARREIROS; DAVID, 2006).

A atuação do radical (O_2^-) como oxidante direto é irrelevante. Dentre os aminoácidos, o único que sofre oxidação com radical O_2^- é a cisteína. A partir dessa reação forma-se um superóxido e o tiol-radical. É eliminado do organismo pela enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de duas moléculas de O_2^- em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Equação 2). E quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase, pode gerar radicais hidroxila (BARREIROS; DAVID, 2006).



O radical hidroxil causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. E quando produzido perto de uma membrana, os lipídeos podem ser oxidados por ele e podem iniciar uma reação em cadeia com radicais livres que danificam a membrana gerando no final um peróxido lipídico (LOOH). Um dos perigos da peroxidação lipídica além do dano à membrana é a produção de subprodutos, tais como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (FORMAN et al., 2009; BARREIROS; DAVID, 2006).

1.4 Antioxidantes

1.4.1 N-Acetilcisteína (NAC)

N-Acetilcisteína (NAC) desenvolvido no ano de 1960 é um tiol composto precursor da L-cisteína e glutatona reduzida nas células, naturalmente encontrado nos vegetais (ZAFARULLAH et al., 2003). É uma fonte de grupos sulfidril e removedores de substâncias reativas com o oxigênio (OH⁻ e H₂O₂), geradas pela reação dos peroxinitritos, como o NO e superóxidos (ARUOMA; HALLIWELL, 1989). O uso deste antioxidante inibe a formação de radicais livres, apresenta resultados positivos no tratamento dos camundongos *mdx*, e tem sido usado terapêuticamente pela propriedade de ser um precursor da glutatona (DE FLORA et al, 1991), que é um dos mais importante sistema antioxidante da maioria dos tipos de tecidos *in vivo* (HALLIWELL; GUTTRIDGE, 1999). Experimentos com camundongos *mdx* demonstraram que o tratamento com NAC previne o aumento da permeabilidade da membrana, reduz o déficit de força associado com dano muscular induzido por estiramento (WHITEHEAD et al., 2008) e reduz os níveis de EROs (WILLIAMS; ALLEN, 2007).

N-acetilcisteína é um antioxidante eficaz para o músculo esquelético. Estudos em músculo isolado demonstraram que o NAC protege contra estresse oxidativo causado por contração induzida (SANDSTROM et al., 2006) e reduz a fadiga muscular (SMITH; REID, 2006). Além disso, após administração oral, apresentou efeitos inibitórios na ativação do NF-kB muscular em camundongo (FARID et al., 2005) e retardou a fadiga muscular em humanos (McKENNA et al., 2006).

Embora os resultados demonstrem que o antioxidante NAC possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular, há hipóteses que o uso de NAC pode ter limitações e apresentar efeitos pró-oxidantes em altas concentrações (550 e 950

mg/kg), devido à facilidade com o qual interage com ferro (SPRONG, et. al., 1998; RITTER; ANDRADES; REINKE, 2004).

1.4.2 Deferoxamina (DFX)

É um quelante hexadentado com uma alta afinidade e seletividade pelo ferro, uma molécula de deferoxamina se liga a um átomo de ferro, formando um complexo estável que é excretado pela bile e pela urina. Utilizado clinicamente há cerca de 35 anos, é altamente efetivo na profilaxia e tratamento da sobrecarga de ferro (SOUTO, 2006; JENSEN, et al., 1996). DFX pode inibir reações geradoras de radicais livres, catalisadas por ferro. Estudos anteriores mostram que DFX pode diminuir o dano oxidativo em modelos animais para muitas doenças humanas (HALLIWEL, 1989).

O peróxido de hidrogênio uma vez formado pode se difundir facilmente através das membranas celulares através dos metais de transição a exemplo o Fe^{2+} , devido a sua maior biodisponibilidade, onde no organismo encontra-se complexado com proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (ferritina e hemosiderina) (WILLIAMS; ZWEIER; FLAHERTY, 1996; SAAD; NAJJAR; AL RIKABI, 2001). O H_2O_2 pode reagir com o ferro ferroso (Fe^{2+}) e produzir o radical hidroxil (OH), um dos grandes causadores da peroxidação lipídica; Quelante de ferro, como deferoxamina, é vastamente utilizado na literatura como antioxidante, retém o ferro do ciclo redox celular e, no entanto, inibe a formação do radical hidroxila pela reação de Fenton ou Haber Weiss (WILLIAMS; ZWEIER; FLAHERTY, 1996; SAAD; NAJJAR; AL RIKABI, 2001).

Desta forma, sugerimos que o uso de um quelante de ferro poderia reduzir este efeito deletério das fibras musculares esquelética do camundongo *mdx*. De acordo com a literatura a associação de NAC e Deferoxamina (DFX), potente quelante de ferro que inibe reações geradoras de radicais livres catalisadas por ferro e que diminui danos oxidativos em modelos animais para muitas doenças (HALLIWEL, 1989; RITTER; ANDRADES; REINKE, 2004), produz resultado mais efetivo contra o estresse oxidativo do que a administração de NAC isoladamente (AGUIAR Jr. et al., 2008; BOER et al., 2009).

No presente trabalho avaliamos os efeitos da associação destes dois antioxidantes sobre as fibras musculares distróficas dos camundongos *mdx*.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente projeto foi analisar os efeitos *in vivo* e *in vitro* da associação dos antioxidantes NAC e DFX sobre o processo de degeneração muscular em camundongos *mdx*.

2.2 Objetivos Específicos

In vivo

- Avaliar a medida de força dos animais antes e após os tratamentos;
- Determinar a concentração de CK e das proteínas inflamatórias TNF- α , NF- κ B e IL-1 β no plasma sanguíneo dos diferentes grupos experimentais;
- Analisar a degeneração muscular nos músculos STN, DIA e TA dos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar se os tratamentos apresentam efeito citotóxico, por meio de análise do fígado dos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a produção de EROs, através das análises do radical OH e do 4-HNE, nos músculos STN, DIA e TA dos diferentes grupos experimentais;
- Determinar a atividade enzimática da glutathiona reduzida (GSH) nos músculos STN, DIA e TA dos diferentes grupos experimentais;

- Determinar o conteúdo de TNF- α , NF- κ B, MyoD e MAFbx/Atrogina nos músculos STN, DIA e TA dos diferentes grupos experimentais.

In vitro

- Determinar a viabilidade celular após os tratamentos;
- Avaliar a produção de EROs, através da análise do H₂O₂ e do 4-HNE nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a concentração de cálcio nos diferentes grupos experimentais;
- Determinar o conteúdo de TNF- α , NF- κ B e MyoD nos diferentes grupos experimentais.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *mdx* e C57BL10 (camundongos heterozigotos para o gene que desencadeia a DMD e que deram origem à linhagem *mdx*), de ambos os gêneros, com 14 dias de vida pós-natal, obtidos de casais mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcioanal do Instituto de Biologia. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, nos experimentos *in vivo*, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 25º dia de vida pós-natal, sendo, posteriormente, separados. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais desenvolveram-se de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEUA-IB/UNICAMP #2128-1).

3.2 Protocolo experimental “*In vivo*”

3.2.1 Grupos experimentais

- 1) Grupo C57BL/10, constituído de camundongos da linhagem C57BL/10, foram utilizados como controle para os grupos *mdx* experimentais:
 - A. Grupo controle tratado com solução salina (CtrlS, n=25);
 - B. Grupo controle tratado com NAC (CtrlN, n=5);

- C. Grupo controle tratado com DFX (CtrlD, n=5);
 - D. Grupo controle tratado com NAC e DFX (CtrlND, n=5).
- 2) Grupo *mdx*, constituído de camundongos da linhagem *mdx*:
- A. Grupo *mdx* tratado com solução salina (*mdxS*, n=25);
 - B. Grupo *mdx* tratado com NAC (*mdxN*, n=25);
 - C. Grupo *mdx* tratado com DFX (*mdxD*, n=25);
 - D. Grupo *mdx* tratado com NAC e DFX (*mdxND*, n=25).

Durante todo o tratamento, do início (14º dia) ao final (28º dia) os animais foram pesados diariamente para readequação da dosagem da droga. E na metade (21º dia) e no final (28º dia) do experimento, todos os animais foram submetidos à análise funcional de força sobre o peso corporal.

Os músculos Esternomastóide (STN), Tibial Anterior (TA) e Diafragma (DIA) de 5 animais de cada grupo experimental (Ctrl e *mdx*) foram utilizados para as análises histológicas.

O plasma sanguíneo e os músculos STN, TA e DIA de 10 animais dos grupos CtrlS, *mdxS*, *mdxN*, *mdxD*, *mdxND* foram utilizados para determinar a concentração de CK, das citocinas TNF- α , NF- κ B e IL-1 β pelo método imunoenzimático e o conteúdo de TNF- α , NF- κ B, 4-HNE, MyoD e MAFbx/Atrogina através do western blotting. Desses mesmos animais, foi retirado o fígado para análise morfológica.

Os músculos STN, TA e DIA de outros 5 animais dos grupos CtrlS, *mdxS*, *mdxN*, *mdxD*, *mdxND* foram utilizados para determinar a concentração do radical OH por meio da reação dihydroetidio (DHE) e outros 5 animais para determinar a atividade enzimática da glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG).

3.2.2 Tratamento *in vivo*

A partir do 14^o dia de vida pós-natal, os animais foram pesados diariamente e tratados por 14 dias consecutivos conforme seu grupo:

- A. grupo *mdxS* e CtrlS - 0,05mL de solução salina administrado por via intraperitoneal (i.p.);
- B. grupo *mdxN* e CtrlN - 150 mg/kg de NAC (Sigma, St. Louis, Mo.) diluído em 0,05mL de solução salina (i.p);
- C. grupo *mdxD* e CtrlID - 150 mg/kg de DFX (Sigma, St. Louis, Mo.) diluído em 0,05mL de solução salina (i.p);
- D. grupo *mdxND* e CtrlIND – 150mg/kg de NAC + 150mg/kg de DFX diluídos em 0,05mL de solução salina (i.p).

3.2.3 Medição da Força Muscular

Para a análise da força dos camundongos foi utilizado um aparelho composto por: uma base onde o animal é colocado, uma barra de tração ligada a um transdutor de força (o

qual mede a força de tração aplicada à barra), e um aparelho chamado amplificador de pico de tração, que apresenta um display digital responsável por registrar a tração máxima (expresso em gramas) aplicada à barra feita pelo animal imediatamente antes dele se soltar. O aparelho é conectado ao transdutor de força através de um cabo. Procedimento: O camundongo foi colocado sobre a base do aparelho, em frente à barra de tração de formato circular. Instintivamente, o camundongo segura o círculo com suas patas dianteiras enquanto é tracionado para trás pela cauda, soltando somente quando é incapaz de manter-se agarrado. Assim que o animal solta o círculo de tração, o resultado foi obtido através da média das três maiores medidas (Figura 1).

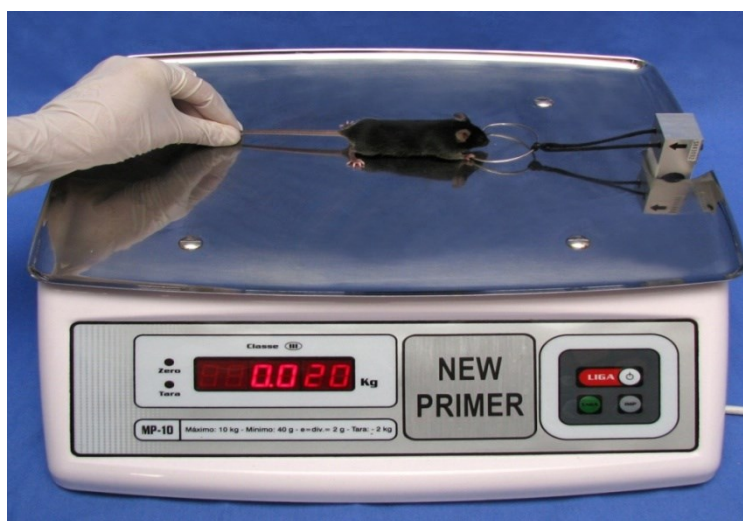


Figura 1. Aparelho utilizado para medir a força muscular.

3.2.4 Procedimento cirúrgico para retirada dos músculos para análise histológica (HE e azul de Evans)

Doze horas antes da eutanásia, os animais foram pesados e 0,1 ml de uma solução a 1% de azul de Evans (AE) para cada 10g de camundongo, foi injetada intraperitonealmente

(solução em PBS: 14g de fosfato de sódio monobásico, 4,3 g de fosfato de potássio dibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em um litro de água destilada; pH 7,5), conforme descrito por Hamer et al (2002) e Matsuda, Nishikawa, Tanaka (1995). Após o tempo acima referido, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com solução de cloridrato de xilazina 2% (*Vyrbaxyl, Virbac*) e cloridrato de quetamina (*Francotar, Virbac*) na proporção de 1:1 e dose de 0,1mL/30g de peso corporal. Os músculos STN, DIA e TA foram retirados, congelados em isopentano, resfriados a (-159⁰C) por nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer a -80°C. Para obtenção dos cortes em criostato (Micom-HS%)%E), os músculos foram mantidos a -23°C, seccionados transversalmente na espessura de 8 µm e coletados em lâmina. Obteve-se 04 lâminas com cerca de 12 cortes dos músculos STN, DIA e TA dos referidos grupos experimentais, dois foram banhadas com acetona por 15 minutos e, posteriormente, montadas em meio de montagem DABCO (Sigma) para visualização das fibras coradas com AE e duas foram coradas com HE e montadas em resina.

Para a verificação da penetração do corante AE nas fibras musculares, os cortes foram analisados em microscópio óptico de fluorescência (Nikon), sendo analisados 02 cortes de cada músculo e o número de fibras coradas foi quantificado e expresso em porcentagem em relação ao número total de fibras da mesma secção. As lâminas coradas com HE foram observadas em microscópio de luz. Avaliou-se o número de fibras que apresentam núcleo central (indicativo de fibras musculares regeneradas – TORRES; DUCHEN, 1987) e de fibras com núcleo periférico (característica de fibras normais). A contagem da população de fibras foi obtida através de um retículo de cem pontos acoplado à ocular do microscópio em objetiva de 20X, com auxílio de um contador manual. Todas as

fibras dos cortes (fibras normais e regeneradas) foram contadas para estimar a população total de fibras de cada músculo, possibilitando a obtenção da porcentagem de fibras normais e regeneradas dos animais empregados no experimento. Quanto à análise da área total e das áreas de inflamação/regeneração, imagens dessas áreas foram capturadas por uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio e analisadas pelo programa Image-Pro Express. A área total da secção transversal do músculo permitiu que fosse feita a estimativa da porcentagem das áreas de inflamação/regeneração dos músculos distróficos analisados.

3.2.5 Dosagem de Creatina-Quinase (CK), TNF- α , NF- κ B e IL-1 β em amostras de sangue

Os animais foram anestesiados conforme descrito no item 3.2.4. A seguir, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Parte das amostras foi utilizada para determinar a atividade de CK e a outra parte para dosagem das citocinas TNF- α , NF- κ B e IL-1 β .

Determinação da atividade de CK

As amostras foram centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18K) a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Utilizou-se o plasma obtido para determinar a atividade de CK através do kit CK Nac Cinético Crystal da Bioclin. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro U.V. (Thermo Electron Corporation® Spectrophotometer Genesys 20) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

Dosagem das citocinas IL-1 β , TNF- α e NF- κ B por método imunoenzimático

Para esta técnica, o mesmo procedimento descrito acima para coleta do plasma sanguíneo foi empregado, e o mesmo foi utilizado para determinar a dosagem de IL-1 β , TNF- α e NF- κ B (PLOMGAARD et al., 2008), utilizando dos reagentes comerciais imunoenzimático da (Invitrogen, Life Tech.). As leituras das absorvâncias das amostras foram feitas pelo leitor de microplacas - Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments) com comprimento de onda de 450 nm.

3.2.6 Quantificação de TNF- α , NF- κ B (p65), MyoD, 4-HNE e MAFbx/Atrogin

Após retirada do sangue, os animais foram perfundidos com PBS e os músculos STN, DIA e TA removidos e, quando coletado o montante de 10 animais, os músculos foram macerados em pequenos pedaços e homogeneizados em 2 ml de tampão (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Kinematica Ag) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11.000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise do extrato total. A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de (BRADFORD, et al. 1976). As amostras do extrato protéico foram armazenadas em biofreezer -80°. Os extrato proteico foram tratados com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH

7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto e armazenadas em biofreezer -80°. A seguir, 30 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução TBS-T (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas, sob agitação. Posteriormente, foram incubadas com 10µg de anticorpo primário: anticorpo policlonal anti-TNF- α , (policlonal de coelho, AB2148P - Millipore); e/ou anticorpo policlonal anti-NF- κ B, (policlonal de cabra p65 (c-20) sc-372 Santa Cruz Biotechnology); e/ou anticorpo policlonal MyoD (policlonal de coelho (M-318) sc-760 Santa Cruz Biotechnology); e/ou anticorpo policlonal anti-4HNE (policlonal de cabra (P-16) sc-130083 Santa Cruz Biotechnology); e/ou anticorpo policlonal MAFbx (policlonal de coelho (H-300) sc-33782 Santa Cruz Biotechnology) diluído em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C “over night”. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução TBS-T e incubadas em 10ml de TBS-T contendo 1% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário (anti-mouse IgG peroxidase; e/ou anti-rabbit IgG Peroxidase; e/ou anti-mouse IgG peroxidase) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce) por 5 minutos, seguidas de exposição no equipamento G-BOX (Syngene) acoplado a um microcomputador. As densidades das bandas e das amostras

foram “salvas” no computador para quantificação, usando o programa GeneTool do próprio equipamento G-BOX.

Para a normalização dos dados obtidos foi realizado o controle interno através da incubação das amostras com o anticorpo GAPDH (FL-335, rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology). O protocolo consiste na reutilização das membranas utilizadas para detecção do TNF- α , NF- κ B, e/ou 4HNE. Para tanto, as referidas membranas foram lavadas com TBS-T (solução basal) três vezes, por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com 10 mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7.5; β -Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1 hora, à 60°C. Após esse período, as membranas foram re-equilibradas e lavadas com TBS-T. A seguir foram incubadas com 10 μ g do anticorpo primário GAPDH e 2,5 μ g do anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG Peroxidase labeled), seguindo o protocolo descrito.

3.2.7 Análise histológica do fígado

Após retirada dos músculos do item 3.2.4, o fígado desses animais foram retirados para análise histológica, com o objetivo de se avaliar possível efeito citotóxico dos tratamentos. O fígado foi coletado e fixado em formaldeído a 10% por um período de 72 h. Após esse período, as amostras foram desidratadas em álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em polímero plástico. Dos blocos foram obtidos cortes com 5 μ m de espessura, os quais foram montados em lâminas e corados com HE. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz da marca Zeiss e os parâmetros avaliados foram as características morfológicas dos hepatócitos, núcleos e dos vasos (TERNEUS et al., 2008).

3.2.8 Determinação da atividade enzimática da glutathiona reduzida (GSH)

Os animais foram anestesiados conforme descrito no item 3.2.4. Os músculos TA, STN e DIA foram retirados e homogeneizados em homogeneizador de tecidos com 1ml de solução tampão fosfato tamponado (PBS). A seguir, as amostras foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-70 °C). Posteriormente foram utilizadas para quantificação da atividade enzimática.

Dosagem de grupamentos sulfidrila – GSH (FAURE; LAFOND, 1995)

As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH = 7,4). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância de 100 mL da amostra, acrescidos de 100 mL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 mL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e então foi feita uma nova leitura (A2), a 412 nm, após 15 min de reação, para determinação de grupamentos sulfidrila não protéicos (GSH). A concentração de grupamentos sulfidrila (tiol) é dada por $(A1-A2) \times 1,57$.

3.2.9 Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical OH)

Os animais foram anestesiados conforme descrito no item 3.2.4. A produção de EROs, radical OH especificamente, foi determinada por incubação dos cortes histológicos dos músculos TA, STN e DIA com 5 µl de DHE em PBS a 37°C durante 30 min. A intensidade de DHE reativo por área do músculo foi quantificada através da mensuração de pixels excedente a um limite (70-255 comprimento de onda), que foi ajustado de forma a eliminar a interferência de qualquer fluorescência de fundo (WHITEHEAD et al., 2008).

3.3 Protocolo experimental “*In vitro*”

3.3.1 Isolamento e cultura primária de células musculares

Foram utilizados 10 camundongos das linhagens *mdx* e C57BL/, de ambos os sexos, com 15 dias de vida pós-natal.

Os animais foram eutanasiados com super-dosagem de uma solução de cloridrato de xilazina 2% (*Vyrbaxyl*, *Virbac*) e cloridrato de quetamina (*Francotar*, *Virbac*) na proporção de 1:1 (intra-peritoneal) e rapidamente os músculos do membro pélvico dos camundongos *mdx* foram isolados em DPBS contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v). Durante 10 minutos. o tecido muscular foi triturado e a suspensão digerida com colagenase II 1,5% (w/v), tripsina 2,5% (w/v) e DNase 0,1% (w/v) em DMEM contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v) a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se em seguida DMEM (15 mL) contendo soro de cavalo 10% (v/v), soro fetal bovino 10% (v/v), L-glutamina 2mM e penicilina 1% (v/v) (meio de crescimento). A suspensão foi centrifugada a 1000rpm, a 4°C por 20 min. e o sobrenadante descartado. Outro 20 mL do meio de crescimento foi novamente adicionado, a suspensão foi filtrada através de um filtro estéril com poros de 50

µm e as células foram sedimentadas em placas de 6 poços cobertos com matrigel 0,1% (w/v) por 24 hs a uma densidade de 6×10^4 células por poço. Entre 48-72h após o início da preparação das culturas, o meio de crescimento foi alterado para meio de fusão contendo soro de cavalo 10% (v/v) e L-glutamina 2mM (LYNGE; JUEL; HELLSTEN, 2001; SILVEIRA et al., 2006). No 6º dia, as culturas de células foram utilizadas segundo os tratamentos propostos.

3.3.2 Análise da viabilidade celular

Células musculares primárias *mdx* e C57BL/10, após 6 dias de incubação, foram tratadas com NAC, DFX e/ou associação de NAC e DFX por 24hs, para verificar a citotoxicidade das drogas. Células *mdx* e C57BL/10 sem tratamento foram utilizadas como controle. A viabilidade celular foi analisada através de três parâmetros: coloração com Trypan Blue, redução do MTT e ensaio com a incorporação do Vermelho Neutro. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Trypan Blue (Azul de Trypan)

Para a determinação da viabilidade celular, após o tratamento proposto foi utilizado o bio-reagente Trypan Blue (Sigma T6146). As células após serem tratadas por 24h com as respectivas drogas propostas, por volta do 7º dia, foram lavadas 2x em PBS, ressuspensas em solução de tripsina (1:10) e deixadas por 3 min. na estufa de CO₂. Em seguida adicionou-se PGM imediatamente, e todo o conteúdo foi transferido para um tubo eppendorf, para centrifugação em 5min. a 200xg. O sobrenadante foi descartado e o

conteúdo celular novamente foi homogeneizado e centrifugado. Após descartar o sobrenadante, o conteúdo celular foi diluído (1:10) em solução de Trypan Blue, e uma quantidade foi pipetada na câmara de Neubauer para contagem de células viáveis e não viáveis para proceder-se com o seguinte cálculo:

Viabilidade Celular (%) = total de células viáveis (não coradas) ÷ total de células (coradas e não coradas) X 100.

Foram utilizadas cultura de células com 95% de células viáveis.

MTT

É uma análise colorimétrica para quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta ao medicamento. O método foi baseado na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] a formazan (SIEUWERTS et al., 1995). Procedimento: Para este experimento as células após serem tratadas, foram incubadas em meio DME sem vermelho de fenol e em seguida foi adicionada uma quantidade de solução MTT (SIGMA M5655) equivalente a 10% do volume de meio celular. E novamente as células retornaram para a incubadora e permaneceram por 3-4 horas. Após incubação, todo o meio foi retirado e foi adicionado uma quantidade igual de solvente MTT (30ml isopropanol : 100µl HCl 37% P.A). A leitura foi feita por espectrofotômetro medindo absorbância em 570nm, utilizando aparelho ELISA (Synergy). As amostras foram feitas em triplicatas.

Vermelho Neutro

É uma análise colorimétrica para quantificação de permeabilidade de membrana e atividade lisossômica de células em resposta ao medicamento utilizado. É um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular, baseado na capacidade das células viáveis de incorporar o vermelho neutro dentro dos lisossomos (GRIFFON, et al. 1995). A quantidade de corante incorporado às células foi medida por espectrometria, a 540 nm, e diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta. Após os devidos tratamentos as placas foram retiradas da incubadora, todo o meio das células foi retirado e foi adicionado uma quantidade igual de solução (25:1 de meio + vermelho Neutro), em seguida foi incubada por 3 horas na incubadora de CO₂ a 37°C. Após 3 horas as células foram lavadas com PBS e em seguida lavada com uma solução de (1% CaCl₂ em Formaldeído 0,5%), após lavagem, adicionou-se solução (1% ácido acético em etanol 50%). As placas foram delicadamente agitadas e colocadas no aparelho Sinergy para leitura por espectrofotômetro a 540nm. As amostras foram feitas em triplicatas.

3.3.3 Tratamento in vitro

Após o período de diferenciação (células musculares diferenciadas com propriedades contráteis, 5^o- 6^o dia), as células da linhagem *mdx* foram tratadas por 24hs com NAC (Sigma, St. Louis, Mo.) 10 mM, segundo (COTTER et al., 2007), DFX (Sigma, St. Louis, Mo.), segundo 10 mM (DONGIOVANNI et al., 2008) e/ou NAC+DFX (COTTER et al., 2007). Como não foram obtidas células viáveis com associação em igual molaridade entre NAC e DFX, no tratamento com associação foi utilizado metade da molaridade do DFX (5

mM). Células não tratadas da linhagem C57BL/10 e *mdx* foram usadas como controle.

3.3.4 Análise do cálcio nas culturas de células (FLUO-4)

Análise qualitativa

Após a diferenciação, culturas de células, tratadas ou não com antioxidante e bloqueador de canal de cálcio, foram incubadas com o indicador de Fluo-4 AM (10 μ M, Molecular Probes) e Pluronic® F-127 por aproximadamente 60 min. A seguir, foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TS100) em objetiva de 4,5X e 10X e comprimento de onda excitação/emissão de 380/340 nm (WILLIANS; ALLEN, 2007).

Análise quantitativa

Após a diferenciação, as culturas de células tratadas ou não com antioxidantes e bloqueador de canal de cálcio, foram incubadas com o indicador de cálcio Fluo-4 AM (10 μ M, Molecular Probes) e Pluronic® F-127 por aproximadamente 60 min. Em seguida, o meio foi retirado; as células foram lavadas com PBS sem cálcio, tripsinizadas com EDTA, centrifugadas e ressuspendidas em meio.

Em seguida, 100 μ L do meio foram coletados e a intensidade de fluorescência determinada em 494 nm de excitação e 516 nm de emissão em equipamento leitor de microplacas Synergy 2 (Bio-Tek Instruments).

3.3.5 Detecção H₂O₂ (Amplex Red)

Culturas de células tratadas ou não com antioxidantes e quelante de ferro foram mantidas a 37°C em solução Krebs Ringer e carregadas com a sonda *Amplex red* (50µM) e horseradish peroxidase (0,1U/mL) por 30 min. Após este período, 100 µL do meio foi coletado e a intensidade de fluorescência determinada em 530 nm de excitação e 590 nm de emissão em equipamento leitor de microplacas Synergy 2 (Bio-Tek Instruments). Como experimento controle, foi preparado controle positivo e negativo. Para o controle positivo foi utilizado 20 mM de H₂O₂ em solução tampão. No controle negativo foi utilizado somente solução tampão. Foram realizadas análises em triplicata.

3.3.6 Quantificação de TNF- α , NF- κ B, MyoD e 4-HNE

Após o último dia com os referidos tratamentos, o meio de cultura foi removido, as culturas lavadas com PBS e as células nas culturas raspadas e homogeneizadas imediatamente em tampão de extração a 4°C usando uma seringa de 20mL. A seguir, os extratos foram processados conforme protocolo descrito anteriormente para os experimentos *in vivo*.

3.4 Análise Estatística (Tratamento in vivo e in vitro)

Para análise dos resultados do experimento in vitro, assim como para os cálculos matemáticos envolvidos nos estudos, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. A partir do programa foi executada uma (*one way*) ANOVA, e quando este resultou em um valor de

$p < 0,05$, diferenças estatísticas foram identificadas pelo procedimento de comparação múltipla de Tukey (Tukey HSD, de *Honestly Significant Difference*)

4.0 RESULTADOS

4.1 Experimentos “*in vivo*”

Obs: Para verificação de eventuais alterações morfológicas decorrentes dos tratamentos utilizados, alguns experimentos (análise histológica do fígado e análise quantitativa morfológica dos músculos) também foram realizados entre os subgrupos do grupo controle (CtrlN, CtrlD e CtrlND). Como não foi constatada nenhuma alteração entre os animais do grupo controle tratados com NAC, DFX e/ou a associação, nos demais experimentos utilizamos somente o grupo CtrlS como controle do grupo *mdx*.

4.1.1 Peso corporal

O peso corpóreo dos animais não diferiu significativamente entre os animais controle CtrlS e os animais *mdx*; *mdxS*, *mdxND*, *mdxN* e *mdxD* (Tabela 1), ($p > 0,05$, *one way* ANOVA).

Grupo	21° Dia	28° Dia
Ctrl S	8,3±0,6	12,7±1,4
<i>mdx S</i>	8,6±1,1	12,0±1,9
<i>mdx N</i>	8,7±0,7	12,3±1,0
<i>mdx D</i>	8,7±0,3	12,6±1,2
<i>mdx ND</i>	7,8±0,4	11,6±0,3

Valores são expressos como média ± desvio padrão. **CtrlS**: camundongo controle tratado com salina (C57BL/10); ***mdxS***: camundongo *mdx* tratado com salina; ***mdxN***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína; ***mdxD***: camundongo *mdx* tratado com Deferoxamina; ***mdxND***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína e Deferoxamina. $p > 0.05$; *one way* ANOVA.

4.1.2 Análise de Força

Após 7 dias de tratamento (21 dias de vida), observou-se redução da força muscular nos camundongos *mdx* tratados com solução salina em relação aos animais controle ($p \leq 0.01$). Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com NAC e/ou DFX ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.05$; respectivamente).

No final do tratamento (28° dia de vida), verificou-se expressiva redução da força muscular nos camundongos *mdx* tratados com solução salina em relação aos animais controle ($p \leq 0.0001$). Os animais tratados com NAC e/ou este associado ao DFX apresentaram significativo ganho de força muscular quando comparados ao grupo *mdx* salina ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.0001$; respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de força entre os grupos experimentais 21° e 28° dia

Grupo	21° Dia	28° Dia
Ctrl S	3,0±0,3	2,5±0,3
<i>mdx</i> S	2,4±0,4 ^a	1,8±0,4 ^a
<i>mdx</i> N	2,7±0,3 ^a	2,3±0,3 ^b
<i>mdx</i> D	2,6±0,2 ^a	2,2±0,4 ^b
<i>mdx</i> ND	2,7±0,1	2,8±0,3 ^b

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n=5 camundongos por grupo). **CtrlS**: camundongo controle tratado com salina (C57BL/10); ***mdxS***: camundongo *mdx* tratado com salina; ***mdxN***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína; ***mdxD***: camundongo *mdx* tratado com Deferoxamina; ***mdxND***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína e Deferoxamina. ^aDifere do CtrlS; ^bDifere do *mdxS* do mesmo período. $p \leq 0.0001$; Anova (*one way*), pós teste de Tukey HSD.

4.1.3 Análise Qualitativa (Citotoxicidade) do Tecido Hepático

Os fígados dos animais C57BL/10 e *mdx* tratados com NAC, DFX e associação NAC e DFX foram avaliados na coloração de HE, representados nas Figuras 2 e 3.

Em ambos animais (C57BL/10 e *mdx*) não foram observadas qualitativamente alterações histológicas no fígado, demonstrando que os tratamentos utilizados não apresentam efeito tóxico ao tecido hepático.

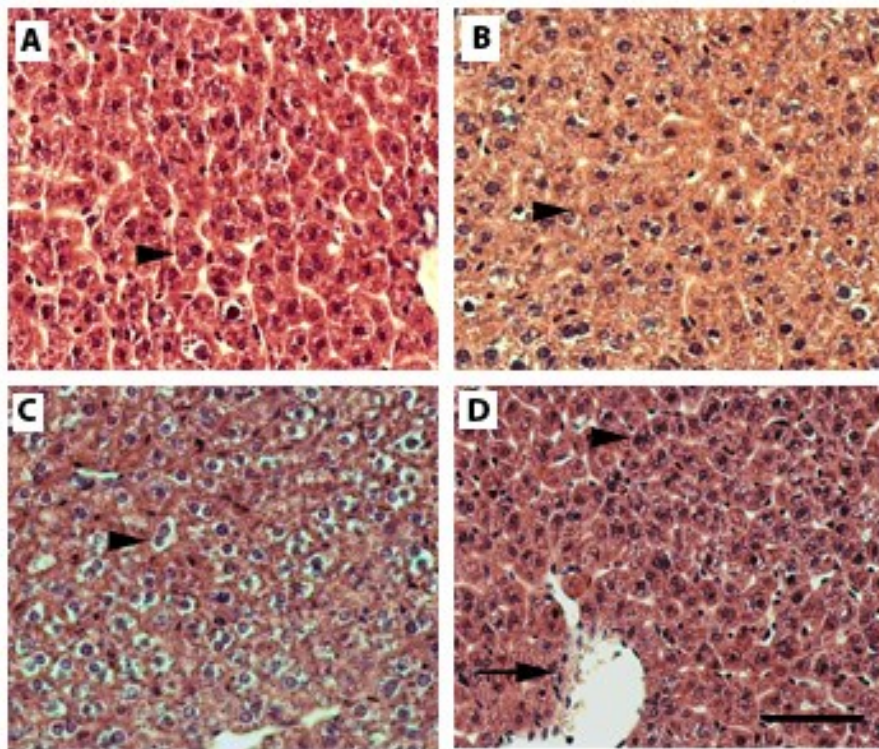


Figura 2. Secções transversais do fígado de animais C57BL/10 em HE. Animal tratado com salina em A; Animal tratado com associação NAC + DFX em B; Animal tratado com NAC em C; Animal tratado com DFX em D: Hepatócitos com núcleo central (cabeças de setas), vasos (seta). Barra 50 μ m.

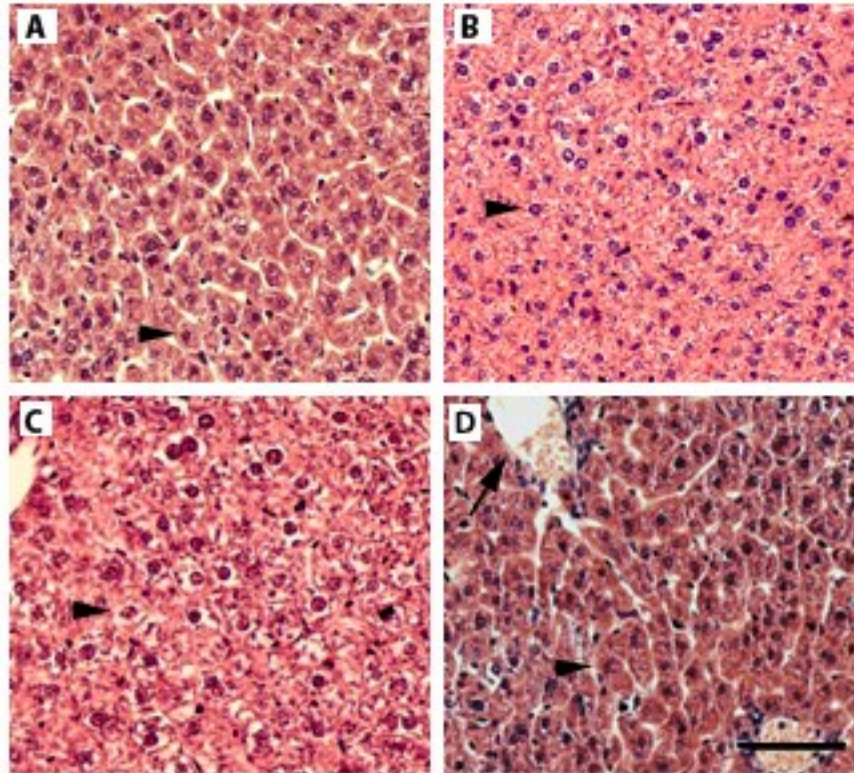


Figura 3. Secções transversais do fígado de animais *mdx* em HE. Animal tratado com salina em A; Animal tratado com associação NAC + DFX em B; Animal tratado com NAC em C; Animal tratado com DFX em D: Hepatócitos com núcleo central (cabeças de setas), vasos (seta). Barra 50 μ m.

4.1.4 Análise Qualitativa do Tecido Muscular

Os músculos STN, TA e DIA dos grupos Ctrl S, *mdx* S, *mdx* N, *mdx* D, *mdx* ND apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras em processo de degeneração, fibras com núcleo periférico, fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras completamente regeneradas (Figura 4, 5 e 6).

As fibras com alteração de permeabilidade ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Figura 4, 5 e 6).

As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com

outras fibras de mesma característica. Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, cromatina condensada, citoplasma eosinófilo e diâmetro próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico.

As áreas de inflamação/regeneração (Figuras 4, 5 e 6) foram caracterizadas pela presença de fibras em estado inicial de regeneração, caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade.

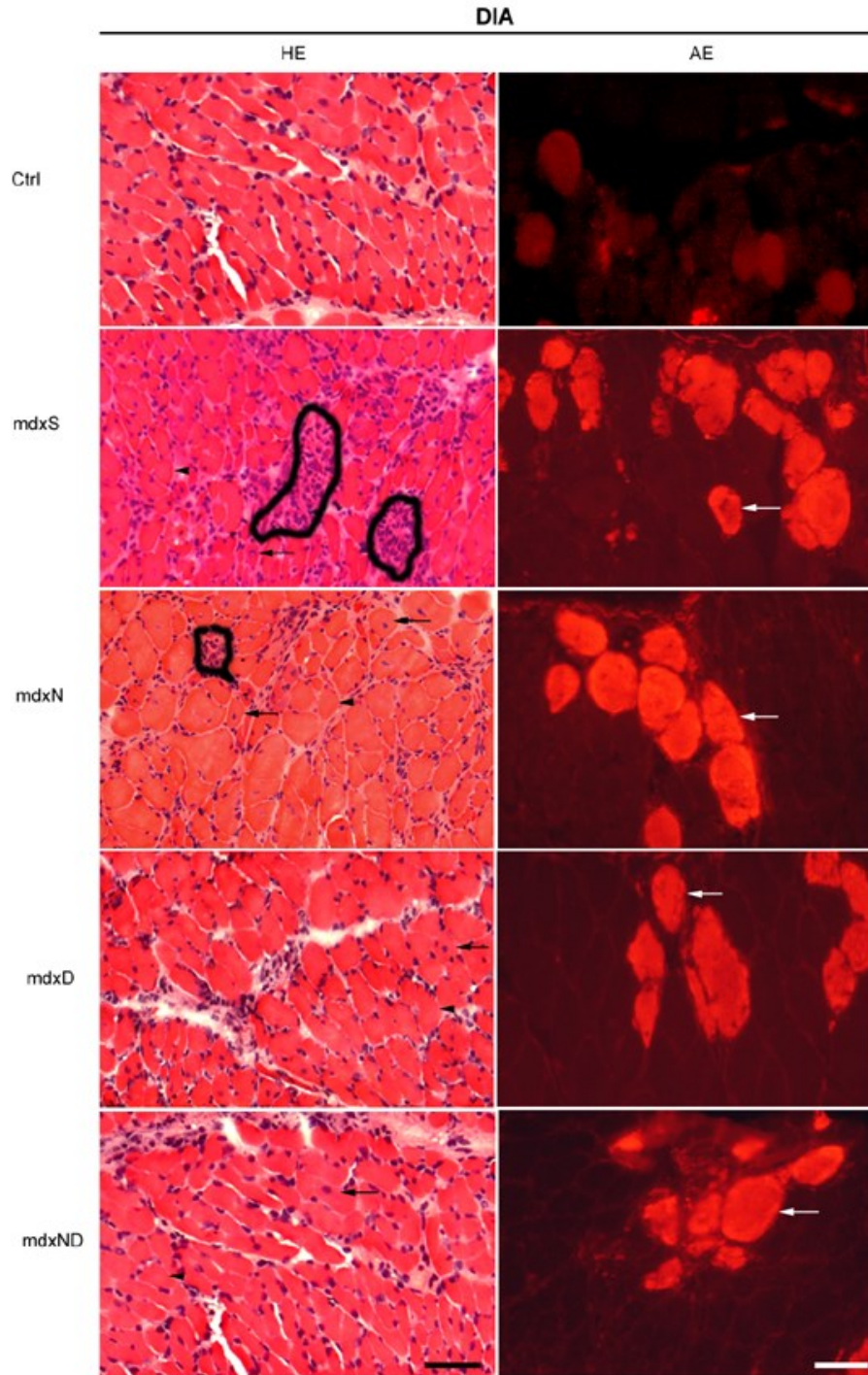


Figura 4. Secções transversais do músculo diafragma (DIA). Em HE: Área de inflamação/regeneração (área demarcada), fibras com núcleo periférico (cabeça de seta) e fibras com núcleo central (seta preta). Em AE: fibras positivas ao azul de Evans (seta branca). No grupo Ctrl (camundongos C57BL/10 tratado com salina), observou-se somente fibras com núcleo periférico e não houve a presença de fibras positivas ao azul de Evans (indicador de degeneração). Barra= HE 25 μ m; AE 50 μ m.

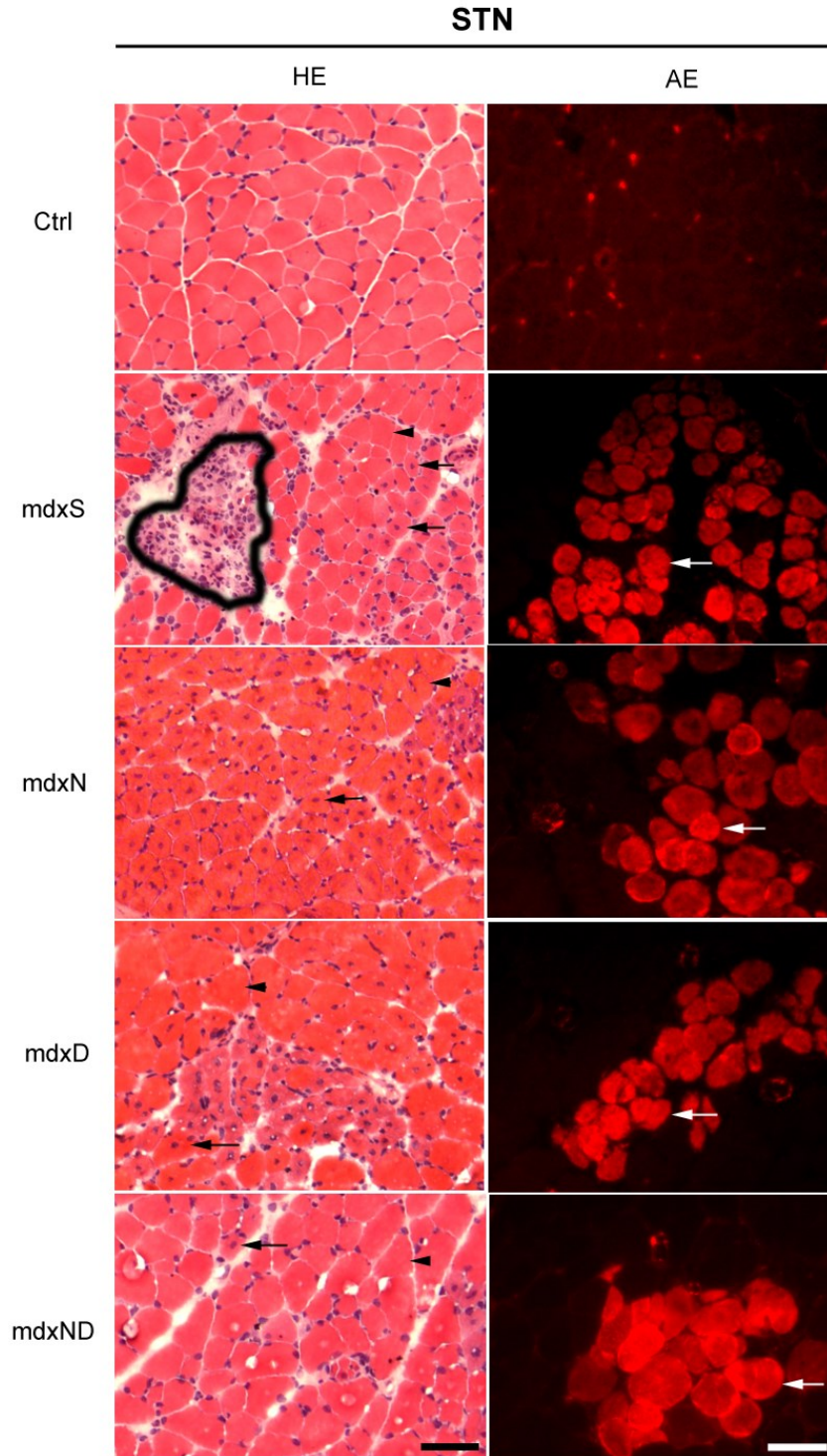


Figura 5. Secções transversais do músculo esternomastóide (STN). Em HE: Área de inflamação/regeneração (área demarcada), fibras com núcleo periférico (cabeça de seta) e fibras com núcleo central (seta preta). Em AE: fibras positivas ao azul de Evans (seta branca). No grupo Ctrl (camundongos C57BL/10 tratado com salina), observou-se somente fibras com núcleo periférico e não houve a presença de fibras positivas ao azul de Evans (indicador de degeneração). Barra= HE 50 µm; AE 100 µm.

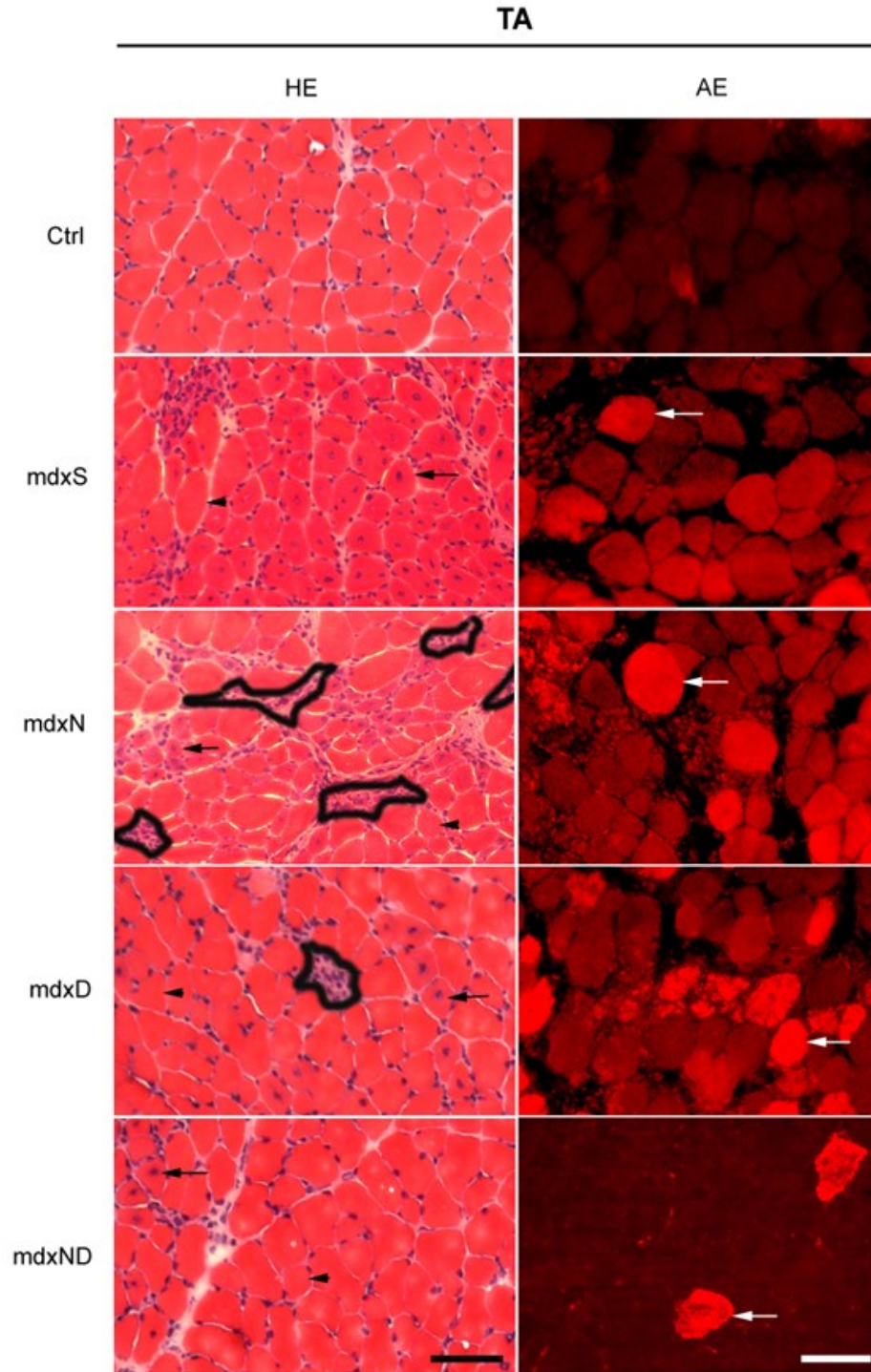


Figura 6. Secções transversais do músculo tibial anterior (TA). Em HE: Área de inflamação/regeneração (área demarcada), fibras com núcleo periférico (cabeça de seta) e fibras com núcleo central (seta preta). Em AE: fibras positivas ao azul de Evans (seta branca). No grupo Ctrl (camundongos C57BL/10 tratado com salina), observou-se somente fibras com núcleo periférico e não houve a presença de fibras positivas ao azul de Evans (indicador de degeneração). Barra= HE 50 μ m; AE 100 μ m.

4.1.5 Análise Quantitativa do Tecido Muscular

Para a análise quantitativa histológica dos grupos experimentais, utilizou-se a média das porcentagens da área de Inflamação/Regeneração (Média % Infl/Reg) sobre a área total de secção transsal dos músculos STN, DIA e TA; a média das porcentagens de fibras com núcleo central (Média % n.c.), núcleo periférico (Média % n.p.) e fibras marcadas por AE (Média % A.E.) em relação ao número total de fibras.

Na Tabela 3 encontra-se a análise histológica quantitativa entre os subgrupos do grupo controle. Não se observou alterações dos parâmetros analisados entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Porcentagem de Inflamação/Regeneração (Infl/Reg%), núcleos centrais (NC%), núcleos periféricos (NP%) e fibras marcadas por AE (AE%) dos grupos C57BL/10 (Ctrl)

		<i>Infl/Reg %</i>	<i>NC %</i>	<i>NP %</i>	<i>AE %</i>
	CtrlS	0,0±0,0	1,0±1,1	98,6±1,2	0,4±0,9
<i>DIA</i>	CtrlIN	0,0±0,0	0,1±0,2	99,8±0,2	0,0±0,0
	CtrlID	0,0±0,0	1,1±1,8	98,7±1,9	0,0±0,0
	CtrlIND	0,0±0,0	0,2±0,1	99,8±0,2	0,0±0,0
<i>STN</i>	CtrlS	0,0±0,0	0,7±0,5	99,3±0,5	0,0±0,0
	CtrlIN	0,0±0,0	0,3±0,3	99,7±0,3	0,0±0,0
	CtrlID	0,0±0,0	1,0±0,5	99,0±0,6	0,0±0,0
	CtrlIND	0,0±0,0	0,1±0,2	99,5±0,3	0,0±0,0
<i>TA</i>	CtrlS	0,0±0,0	0,2±0,1	99,7±0,08	0,0±0,0
	CtrlIN	0,0±0,0	0,2±0,2	99,8±0,2	0,0±0,0
	CtrlID	0,0±0,0	0,3±0,1	99,7±0,3	0,0±0,0
	CtrlIND	0,0±0,0	0,3±0,2	99,6±0,2	0,0±0,0

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n=5 camundongos por grupo). **CtrlS**: camundongo controle (C57BL/10) tratado com salina; **CtrlIN**: camundongo controle tratado com N-Acetilcisteína; **CtrlID**: camundongo controle tratado com Deferoxamina; **CtrlIND**: camundongo controle tratado com N-Acetilcisteína e Deferoxamina. $P \geq 0.05$; *one way ANOVA*.

A análise comparativa morfológica entre os grupos experimentais (CtrlS, *mdxS* e *mdx* tratados com NAC e DFX) estão representadas a seguir (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de Inflamação/Regeneração (Infl/Reg%), núcleos centrais (NC%), núcleos periféricos (NP%) e fibras marcadas por AE (AE%) entre os grupos experimentais

	<i>Infl/Reg %</i>	<i>NC %</i>	<i>NP %</i>	<i>AE %</i>
CtrlS	0,00±0,00	0,97±1,15	98,96±1,19	0,00±0,00
<i>mdxS</i>	5,47±0,81 ^a	9,19±2,09 ^a	90,95±1,8 ^a	2,30±0,33 ^a
DIA <i>mdxN</i>	1,49±0,74 ^b	5,62±2,21 ^a	93,61±2,02 ^a	1,10±0,75
<i>mdxD</i>	1,86±1,52 ^{a,b}	5,08±2,26	93,29±1,22 ^a	1,40±1,54
<i>mdxND</i>	1,84±1,25 ^b	6,42±2,28 ^a	92,38±0,33 ^a	1,10±0,33
CtrlS	0,00±0,00	0,72±0,50	99,28±0,50	0,00±0,00
STN <i>mdxS</i>	14,76±5,30 ^a	36,08±7,60 ^{a,b}	58,75±2,80 ^a	10,92±3,91 ^a
<i>mdxN</i>	3,16±2,50 ^b	25,01±4,20 ^{a,b}	71,53±2,10 ^{a,b}	2,82±3,45 ^b
<i>mdxD</i>	3,10±4,00 ^b	25,18±0,80 ^{a,b}	72,53±4,70 ^{a,b}	2,53±3,14 ^b
<i>mdxND</i>	3,82±0,70 ^b	18,89±4,60 ^{a,b}	76,55±7,40 ^{a,b}	2,38±2,29 ^b
CtrlS	0,00±0,00	0,22±0,10	99,76±0,10	0,0±0,0
<i>mdxS</i>	8,41±3,60 ^a	43,20±14,50 ^a	54,70±15,70 ^a	5,26±2,80 ^a
TA <i>mdxN</i>	1,92±2,70 ^b	10,16±11,00 ^b	92,85±4,40 ^b	0,14±0,10 ^b
<i>mdxD</i>	2,53±2,20 ^b	25,94±10,10 ^a	73,77±9,90 ^a	0,23±0,33 ^b
<i>mdxND</i>	1,33±1,70 ^b	19,51±11,00 ^b	79,06±12,6 ^{a,b}	0,33±0,60 ^b

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n=5 camundongos por grupo). **CtrlS**: camundongo controle (C57BL/10) tratado com salina; ***mdxS***: camundongo *mdx* tratado com salina; ***mdxN***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína; ***mdxD***: camundongo *mdx* tratado com Deferoxamina; ***mdxND***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína e Deferoxamina. ^aDifere do CtrlS; ^bDifere do *mdxS*. p≤ 0.0001; (one way Anova, pós teste de Tukey HSD).

No músculo DIA (Tabela 4), observou-se aumento significativo na porcentagem da área de Infl/Reg (547%) do grupo *mdx* em relação ao grupo Ctrl. Todos os tratamentos demonstraram ser significantemente eficazes na redução da inflamação (p≤ 0.0001). Observou-se aumento significativo na porcentagem de fibras com NC nos animais *mdx* (947%) em relação ao grupo Ctrl. Houve redução na porcentagem de fibras com NC após

todos os tratamentos, porém só o tratamento com DFX não diferiu estatisticamente do grupo Ctrl. Quanto à porcentagem de NP, verificou-se diminuição significativa deste no grupo *mdx* (redução de 10%) quando comparado aos animais controle. Após os tratamentos, não se observou aumento significativo da porcentagem de NP. Em relação à porcentagem de fibras positivas ao AE, observou-se aumento significativo nos camundongos *mdx* (aumento de 117%) em relação aos animais controle. Houve redução nos animais tratados com NAC+DFX, NAC e/ou DFX (86%, 87% e 90%) respectivamente, quando comparado aos animais *mdx* tratados com solução salina.

No músculo STN (Tabela 4), observou-se aumento significativo na porcentagem da área de Infl/Reg (1.476%), na porcentagem de fibras com NC (5.140%) e na porcentagem de fibras positivas ao AE (1.100%) no grupo *mdx* em relação ao grupo Ctrl. Todos os tratamentos demonstraram ser significativamente eficazes na redução dos referidos aumentos. Concomitantemente, também se verificou redução na porcentagem de NP no grupo *mdx* (redução de 41%) quando comparado aos animais controle. Os animais tratados com NAC+DFX, NAC e/ou DFX apresentaram aumento significativo na porcentagem de NP em relação aos *mdx* que não foram tratados (18%, 13% e 17%) respectivamente.

No músculo TA (Tabela 4), observou-se aumento significativo na porcentagem da área de Infl/Reg (840%) nos animais *mdx* em relação ao controle. Os *mdx* tratados com NAC+DFX, NAC e/ou DFX apresentaram significativa redução da inflamação quando comparados ao grupo *mdx*. Resultado semelhante foi verificado para análise de AE. O grupo *mdx* apresentou aumento significativo na porcentagem de fibras com NC (4.300%) com concomitante redução na porcentagem de NP (46%) em relação ao controle. Os animais tratados com NAC+DFX e/ou NAC apresentaram redução significativa de fibras

com NC (66 e 77%) acompanhada pelo aumento de fibras com NP.

4.1.6 Análise de CK

Os animais *mdx* salina apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de CK em relação aos animais controle ($p \leq 0.05$). Os grupos *mdxND*, *mdxN* e *mdxD* apresentaram redução significativa no nível de CK em relação ao grupo *mdx* (*mdx ND*: $p \leq 0.0001$; *mdx N* e *mdx D*: $p \leq 0.01$), (Tabela 5).

Tabela 5. Níveis séricos de Creatina Quinase (U/L)

Grupo	CK
CtrlS	237±56,1
<i>mdxS</i>	1497±108,4 ^a
<i>mdxN</i>	704±559 ^b
<i>mdxD</i>	723±339 ^b
<i>mdxND</i>	642±385 ^b

Níveis plasmáticos de Creatina Quinase (U/L). Valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=5 camundongos por grupo). **CtrlS**: camundongo controle (C57BL/10) tratado com salina; ***mdxS***: camundongo *mdx* tratado com salina; ***mdxN***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína; ***mdxD***: camundongo *mdx* tratado com Deferoxamina; ***mdxND***: camundongo *mdx* tratado com N-Acetilcisteína e Deferoxamina. ^aDifere do CtrlS; ^bDifere do *mdxS* do mesmo período. ($p \leq 0.0001$; Anova (*one way*), pós teste de Tukey HSD).

4.1.7 Análise de Citocinas inflamatórias no plasma

Não houve alteração nas citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e NF- κ B no plasma sanguíneo dos diferentes grupos experimentais (Figura 7).

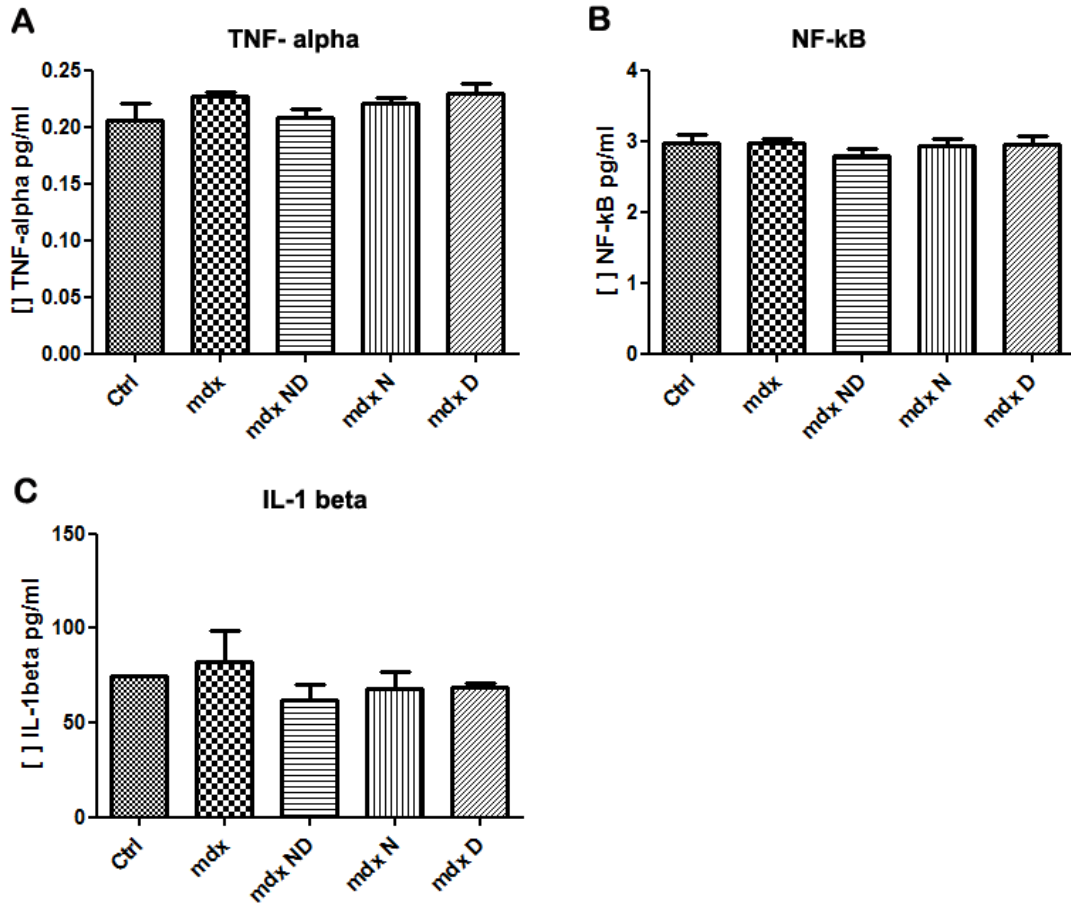


Figura 7. Média e erro padrão do conteúdo de TNF- α (A), NF- κ B (B) e IL-1 β (C) no plasma sanguíneo dos diferentes grupos tratados. **Ctrl:** amostras musculares de camundongos C57BL/10 (controle); **mdx:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratado com solução salina; **mdxND:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina; **mdxN:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com N-Acetilcisteína; **mdxD:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com Deferoxamina. Valores estão evidenciados em [] de citocina pg/ml. ($p \geq 0.05$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

4.1.8 Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical OH)

No músculo DIA, observou-se marcação mais intensa (128%) no grupo *mdx* em relação ao grupo Ctrl. Todos os tratamentos demonstraram ser significativamente eficazes na redução da marcação de DHE ($p \leq 0.0001$), os grupos *mdx* ND e *mdx* D reduziram 50% e o grupo *mdx* N reduziu 64% em relação ao grupo *mdx*.

No músculo STN houve aumento de (100%) na marcação do grupo *mdx* em relação ao grupo Ctrl. Os grupos *mdx* ND e *mdx* N demonstraram ser significativamente eficazes na redução da marcação de DHE ($p \leq 0.01$), reduzindo cerca de 30% e 50% respectivamente.

No músculo TA verificou-se aumento (100%) na marcação de DHE no grupo *mdx* em relação ao grupo Ctrl. Os tratamentos com NAC apresentaram redução (40%) da marcação de DHE em relação aos grupos *mdx* ($p \leq 0.01$) (Figura 8).

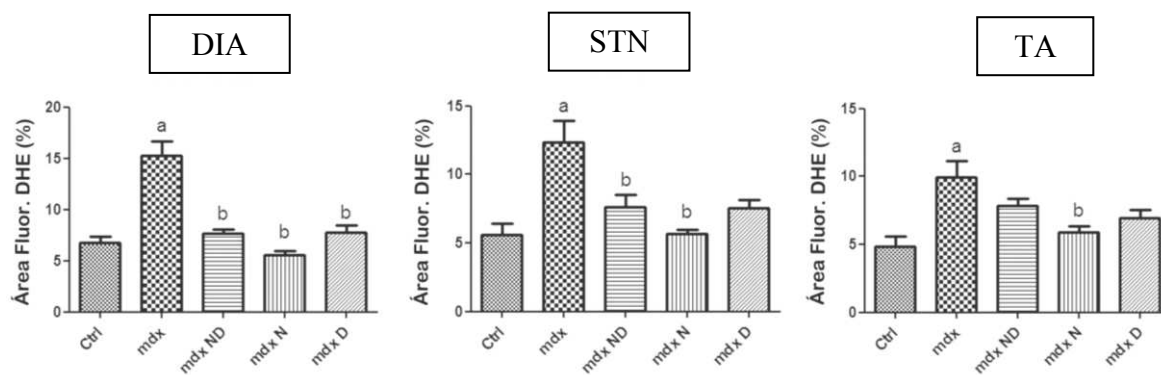


Figura 8. Gráficos dos músculos DIA, STN e TA mostrando a média e erro padrão da fluorescência de DHE nos grupos de camundongos controle C57BL/10 (Ctrl) e camundongos *mdx* tratado com solução salina (*mdx*), tratados com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina (*mdx* ND); tratados com N-Acetilcisteína (*mdx* N) e tratados com Deferoxamina (*mdx* D). Valores representam a área de fluorescência sob um limite específico (70-255 comprimento de onda), expressado como porcentagem de área total do corte muscular. ^a Difere do Ctrl; ^b Difere do *mdx*; ^c Difere do *mdx* ND. ($p \leq 0.05$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

4.1.9 Análise de GSH em extrato muscular

Não houve alteração no conteúdo de GSH entre os diferentes grupos experimentais nos músculos Diafragma, Esternomastóide e Tibial Anterior (Figura 9). Mas foi encontrado diferença significativa desta enzima no músculo Quadríceps, entre os grupos controles *mdx* e C57 (Figura 10).

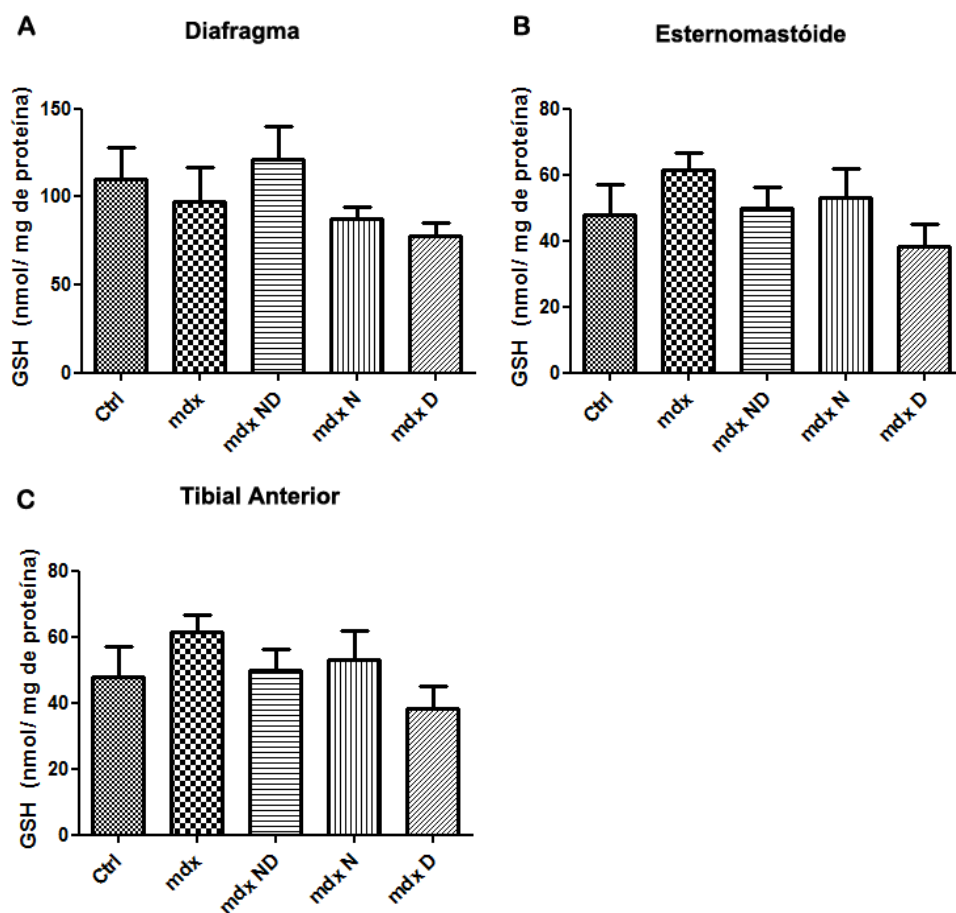


Figura 9. Média e erro padrão do conteúdo de GSH dos músculos Diafragma (A), Esternomastóide (B) e Tibial Anterior (C) nos diferentes grupos tratados. **Ctrl:** amostras musculares de camundongos C57BL/10 (controle); ***mdx*:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratado com solução salina; ***mdxND*:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina; ***mdxN*:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com N-Acetilcisteína; ***mdxD*:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com Deferoxamina. Valores estão evidenciados em nmol/mg de proteína. ($p \geq 0.05$, (one way Anova), pós-teste de Tukey HSD).

4.1.10 Western Blotting

Músculo Diafragma (DIA)

Verificou-se aumento significativo (456%) do conteúdo de TNF- α no músculo DIA dos camundongos *mdx* tratados com solução salina em relação aos animais controle (Figura 10A). Redução de 66% desse conteúdo foi observado após tratamento com associação de NAC e DFX. O tratamento com NAC ou DFX (isoladamente) não apresentou nenhuma alteração em relação ao grupo *mdx* salina.

A análise de NF- κ B (Figura 10B) revelou aumento significativo (282%) conteúdo deste no músculo DIA dos animais *mdx* salina quando comparados ao controle. Tratamento com a associação de NAC e DFX apresentou redução expressiva deste aumento (64%).

Não foi observado nenhuma alteração conteúdo de MyoD (Figura 10C) entre os grupos experimentais analisados.

Considerando a soma de todas as bandas de cada grupo, a análise de 4-HNE (Figura 10D) apresentou aumento do conteúdo deste (205%) no músculo DIA dos animais *mdx* salina quando comparados ao controle. Redução significativa deste aumento foi observada após tratamento com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX (entre 42% e 43%).

O conteúdo de MAFbx (Figura 10E) do grupo *mdx* apresentou aumento de 105% em relação ao grupo Ctrl. O grupo *MdxN* demonstrou redução em 50% comparado ao *mdx*.

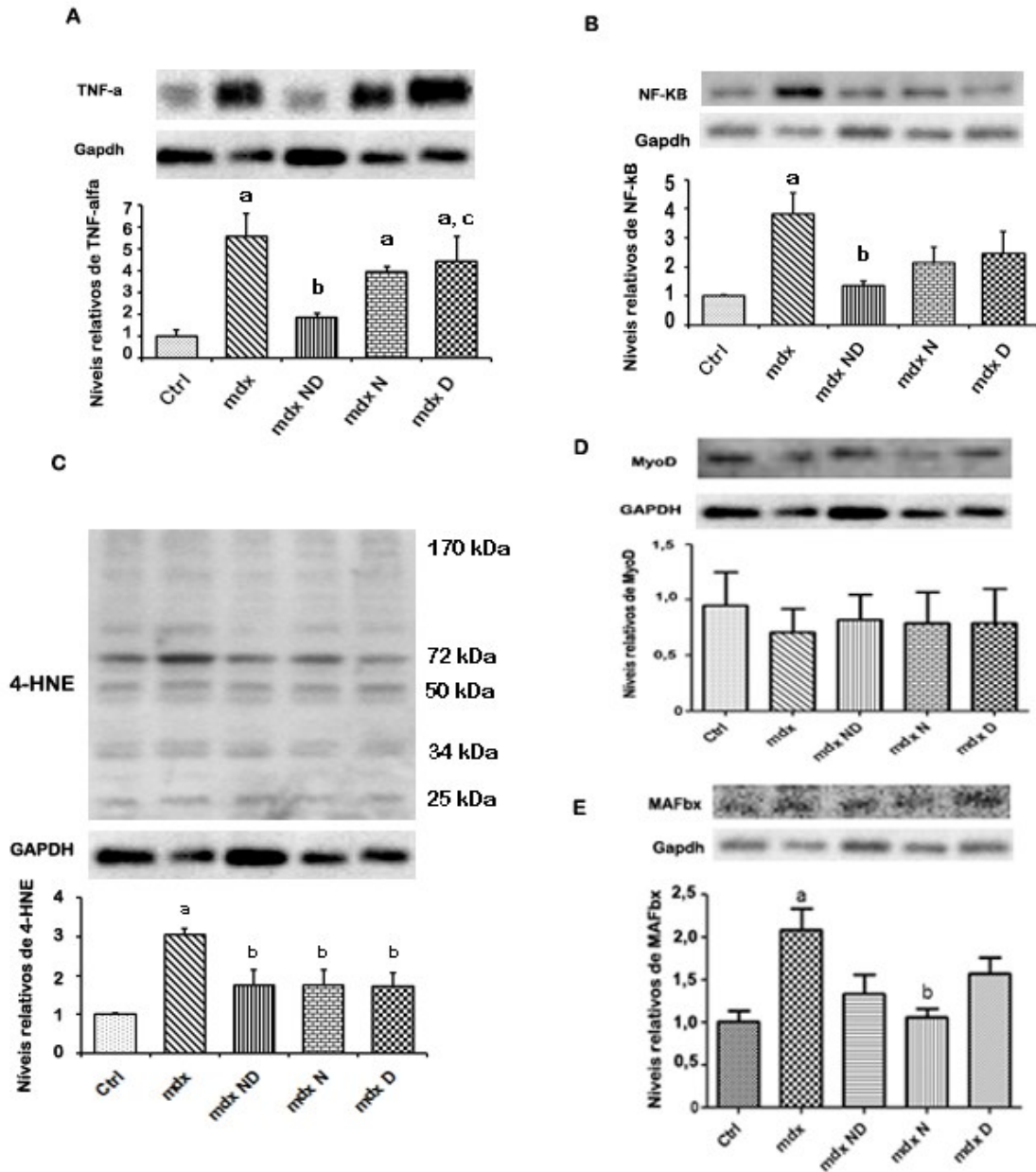


Figura 10: Western Blotting do músculo diafragma; observam-se as bandas imunorreativas para o TNF- α peso 22kDa (**A**), NF- κ B (**B**), 4-HNE (**C**), MyoD peso 45kDa (**D**) e MAFbx peso 42KDa (**E**). **Ctrl**: amostras musculares de camundongos C57BL/10 (controle); **mdx**: amostras musculares de camundongos *mdx* tratado com solução salina; **mdxND**: amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina; **mdxN**: amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com N-Acetilcisteína; **mdxD**: amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com Deferoxamina. ^a Difere do Ctrl; ^b Difere do *mdx*; ^c Difere do *mdx* ND. ($p \leq 0.05$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

Músculo Esternomastóide (STN)

Aumento significativo (569%) do conteúdo de TNF- α foi observado no músculo STN dos camundongos *mdx* salina em relação aos animais controle (Figura 11A). Diminuição significativa deste aumento foi observada após tratamento com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX (redução de 42%, 35% e 64% respectivamente; Figura 11A).

A análise de NF- κ B (Figura 11B) revelou aumento significativo (400%) do conteúdo deste no músculo STN dos animais *mdx* salina quando comparados ao controle. Diminuição significativa deste aumento foi observada após tratamento com NAC, DFX (redução de 50%) e/ou com a associação de NAC e DFX (redução de 60%) (Figura 11B).

Considerando a soma de todas as bandas de cada grupo, a análise de 4-HNE (Figura 11C) apresentou aumento do conteúdo deste (310%) no músculo STN dos animais *mdx* salina quando comparados ao controle. Redução significativa deste aumento foi observada após tratamento com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX (redução de 45%, 36% e 50%, respectivamente; Figura 11C).

A análise da MyoD (Figura 11D) não apresentou nenhuma alteração em relação aos grupos *mdx* e grupo controle.

O conteúdo de MAFbx (Figura 11E) no grupo *mdx* apresentou aumento significativo de 63% e no grupo *mdxN* de 16% em relação ao grupo Ctrl. O grupo *mdxD* apresentou redução de 46% e o grupo *mdxND* de 38% em relação ao grupo *mdx*.

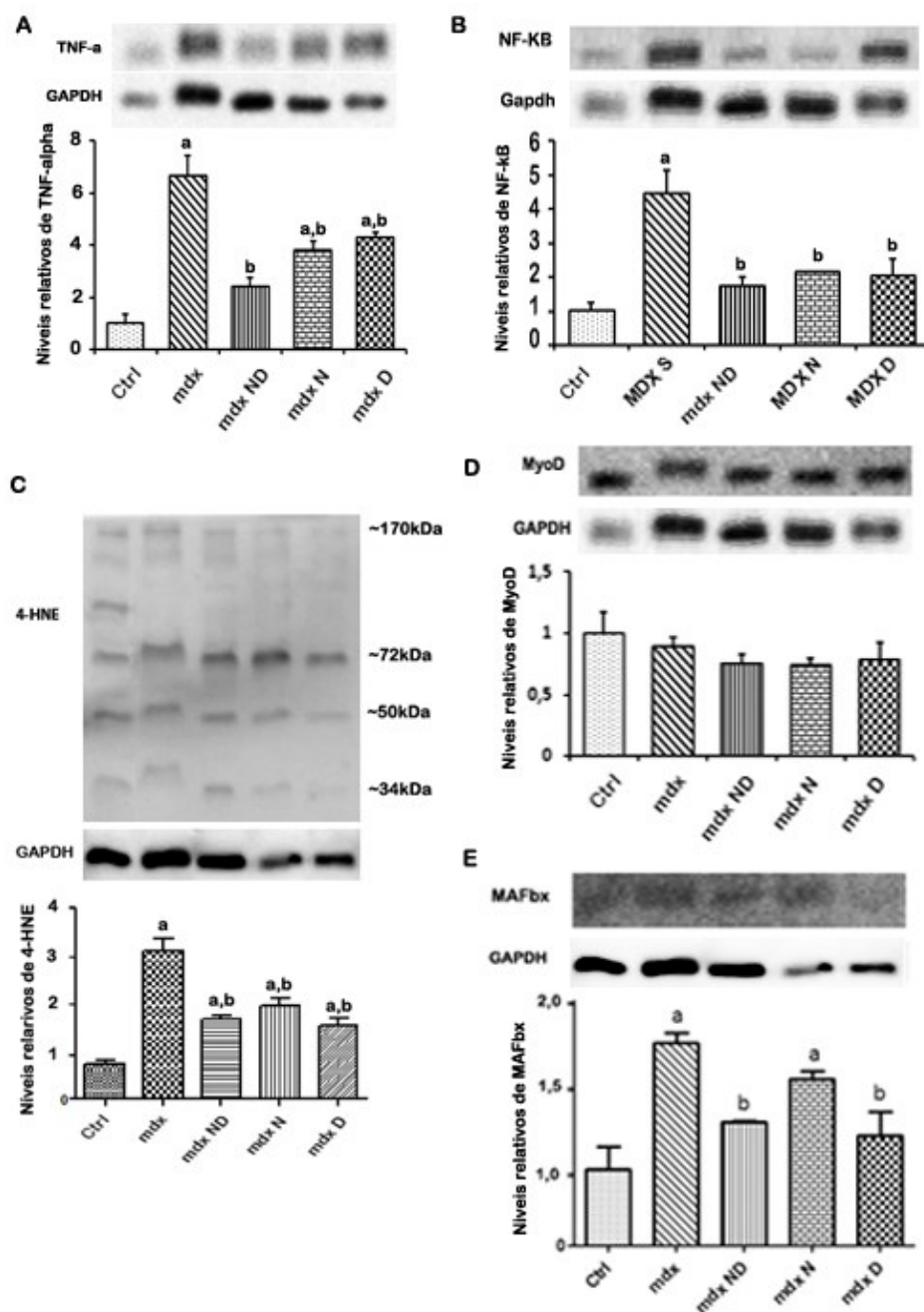


Figura 11: Western Blotting do músculo Esternomastóide; observam-se as bandas imunorreativas para o TNF- α peso 22kDa (A), NF- κ B (B), 4-HNE (C), MyoD peso 45kDa (D) e MAFbx peso 42 KDa (E). Ctrl: amostras musculares de camundongos C57BL/10 (controle); *mdx*: amostras musculares de camundongos *mdx* tratado com solução salina; *mdxND*: amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina; *mdxN*: amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com N-Acetilcisteína; *mdxD*: amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com Deferoxamina. ^a Difere do Ctrl; ^b Difere do *mdx*. ($p \leq 0.05$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

Músculo tibial anterior (TA)

Aumento significativo (885%) do conteúdo de TNF- α foi observado no músculo TA dos camundongos *mdx* salina em relação aos animais controle (Figura 12A). Redução significativa deste aumento foi observada após tratamento com NAC e/ou com a associação de NAC e DFX (redução de 40% e 50%), respectivamente (Figura 12A).

A análise de NF- κ B revelou aumento significativo (72%) do conteúdo deste no músculo TA dos animais *mdx* salina quando comparados ao controle. Apesar de haver redução na expressão de NF- κ B após os tratamentos com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX, esta não foi estatisticamente significativa (Figura 12B).

Considerando a soma de todas as bandas de cada grupo, a análise de 4-HNE o grupo *mdx* obteve aumento significativo (20%) do conteúdo deste no músculo TA quando comparado ao grupo controle. Redução significativa deste aumento foi observada após tratamento com a associação de NAC e DFX e/ou com NAC e DFX, (redução de 10%) (Figura 12C).

A análise da MyoD apresentou diminuição (55%, 40%, 45% e 53%) do conteúdo no músculo TA dos animais *mdx* salina, *mdx* ND, *mdx* N e *mdx* D, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 12D).

O conteúdo de MAFbx (Figura 12E) no grupo *mdx* apresentou aumento significativo de 71% em relação ao grupo Ctrl. O grupo *mdx*ND apresentou redução de 58% em relação ao grupo *mdx*.

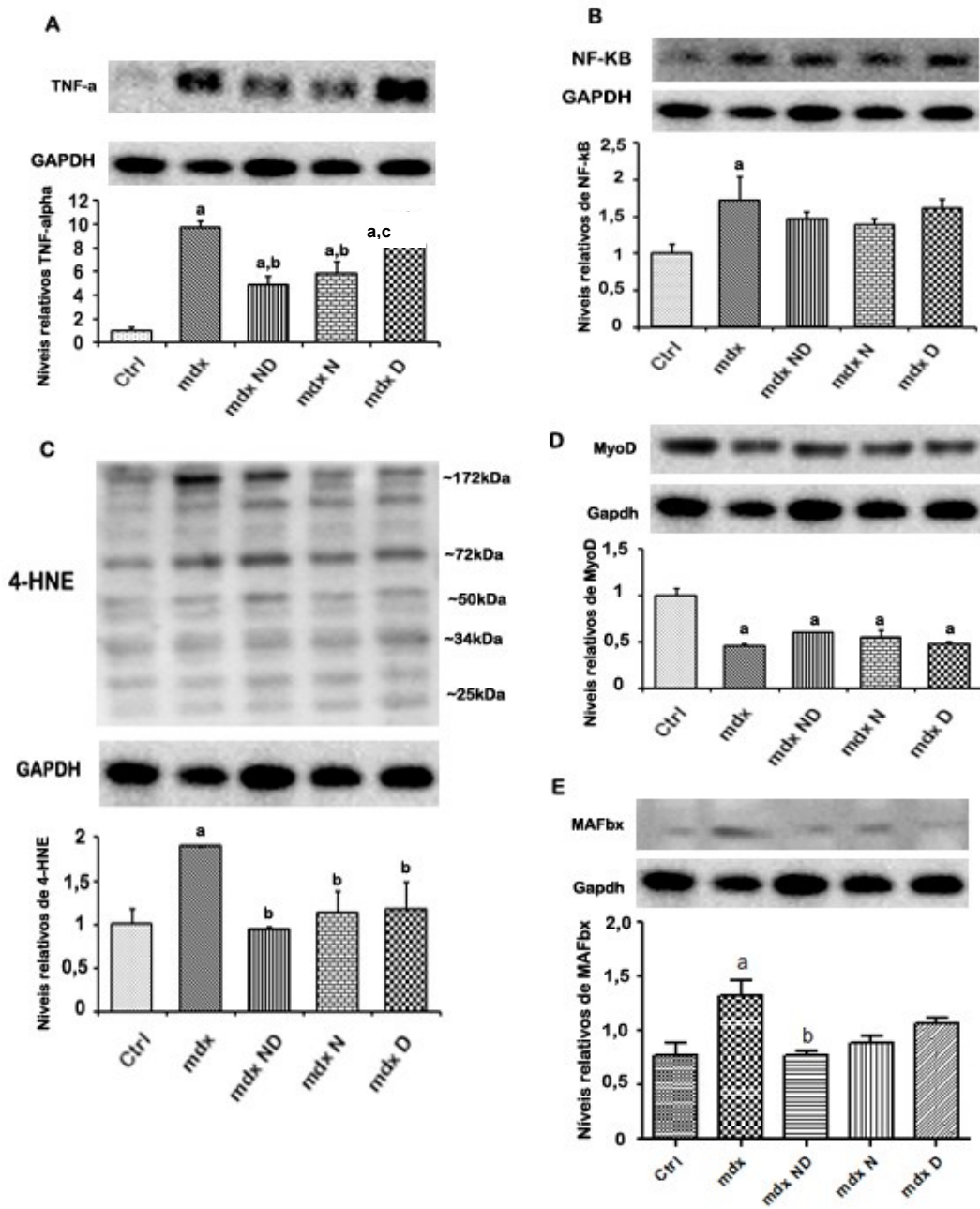


Figura 12: Western Blotting do músculo Tibial Anterior; observam-se as bandas imunorreativas para o TNF- α peso 22kDa (A), NF- κ B (B), 4-HNE (C), MyoD peso 45kDa (D) e MAFbx peso 42 KDa (E). **Ctrl:** amostras musculares de camundongos C57BL/10 (controle); **mdx:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratado com solução salina; **mdxND:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com associação de N-Acetilcisteína e Deferoxamina; **mdxN:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com N-Acetilcisteína; **mdxD:** amostras musculares de camundongos *mdx* tratados com Deferoxamina. ^a Difere do Ctrl; ^b Difere do *mdx*; ^c Difere do *mdxND*. ($p \leq 0.05$, (one way) Anova, pós teste de Tukey HSD).

4.2 Experimentos “*in vitro*”

4.2.1 Análise da viabilidade celular

A viabilidade das células distróficas (*mdx*) e controle (C57BL/10), após tratamento com NAC, DFX e/ou a associação de NAC e DFX, foi avaliada através de 3 parâmetros: marcação do Trypan Blue, redução do MTT e ensaio de incorporação do Vermelho Neutro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Trypan Blue

Verificou-se, através da marcação com Trypan Blue, que todos os grupos experimentais analisados (células *mdx* sem tratamento e/ou tratadas com ND, DFX e NAC; células controle sem tratamento e/ou tratadas com ND, DFX e NAC) apresentaram viabilidade celular acima de 95% (Figura13).

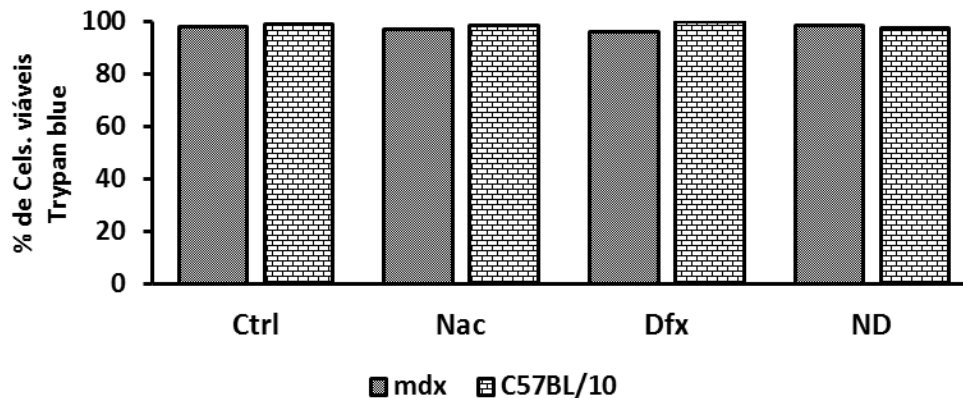


Figura 13: Análise da viabilidade celular com marcador Trypan Blue (Azul de Trypan) em células primárias de camundongos *mdx* e C57BL/10. **Ctrl.** Células sem tratamento; **Nac.** Células tratadas com N-Acetilcisteína 10mM; **Dfx.** Células tratadas com Deferoxamina 5mM; **ND.** Células tratadas com associação de N-acetilcisteína 10mM e Deferoxamina 5mM.

MTT

Na análise colorimétrica para quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta ao medicamento foi utilizado o método do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Nesta técnica, a viabilidade celular de células controle (C57BL/10) e células *mdx* foi avaliada após tratamento com NAC, DFX e/ou associação de NAC e DFX.

Não houve diferença significativa na viabilidade celular, entre os grupos celulares experimentais analisados (Figura 14).

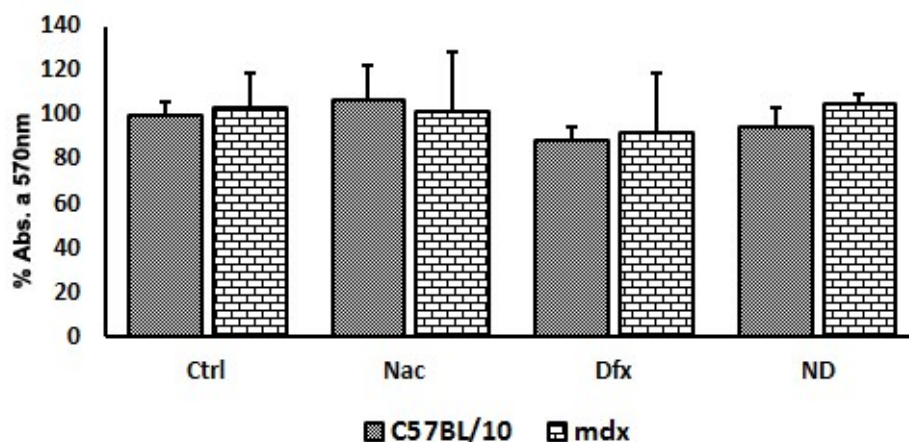


Figura 14: Viabilidade celular medida como absorvância (ensaio MTT) de células primárias de camundongos C57BL/10, e *mdx*. **Ctrl.** Células sem tratamento; **Nac.** Células tratadas com N-Acetilcisteína 10mM; **Dfx.** Células tratadas com Deferoxamina 5mM; **ND.** Células tratadas com associação de N-acetilcisteína 10mM e Deferoxamina 5mM. Tratamento estatístico (*one way* Anova).

Vermelho Neutro

Na avaliação da citotoxicidade celular utilizando o corante vermelho neutro (Figura 15), tanto na linhagem controle (C57BL/10) quanto na linhagem *mdx* não houve diferença para os diferentes tratamentos.

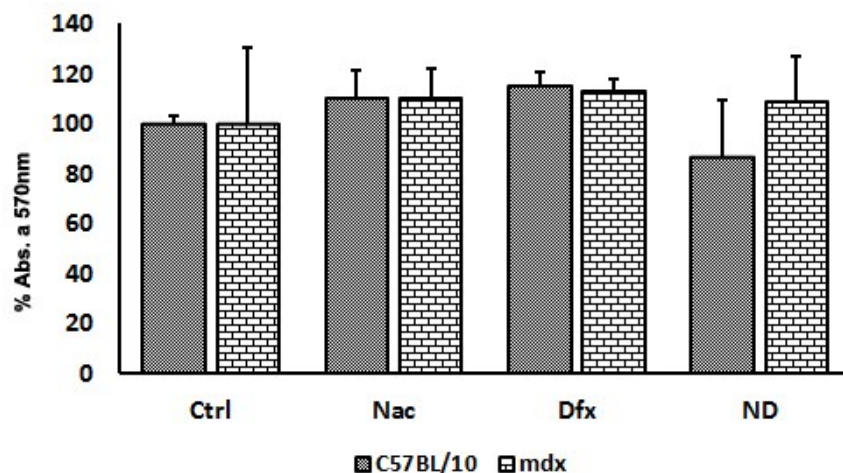


Figura 15: Análise da viabilidade celular por ensaio de incorporação do Vermelho Neutro em células primárias de camundongos *mdx* e C57BL/10. **Ctrl.** Células sem tratamento; **Nac.** Células tratadas com N-Acetilcisteína 10mM; **Dfx.** Células tratadas com Deferoxamina 5mM; **ND.** Células tratadas com associação de N-acetilcisteína 10mM e Deferoxamina 5mM. Tratamento estatístico (*one way* Anova).

4.2.2 Análise de Cálcio nas culturas de células (FLUO-4)

A Figura 16 ilustra as culturas primárias de células musculares em estágio final de formação dos miócitos maduros e incubadas com indicador de cálcio Fluo-4. Como controle negativo, algumas culturas não foram incubadas com o referido indicador (Figura 16B). Pode-se observar a marcação no interior das células (verde) ao que se refere à marcação do Cálcio. Qualitativamente não se verificou diferença na marcação do cálcio nas culturas analisadas.

Quantitativamente, verificou-se aumento da marcação do cálcio intracelular nos grupos *mdx* (80%), *mdxND* (104%), *mdxN* (95%) e *mdxD* (77%) em relação ao grupo Ctrl.

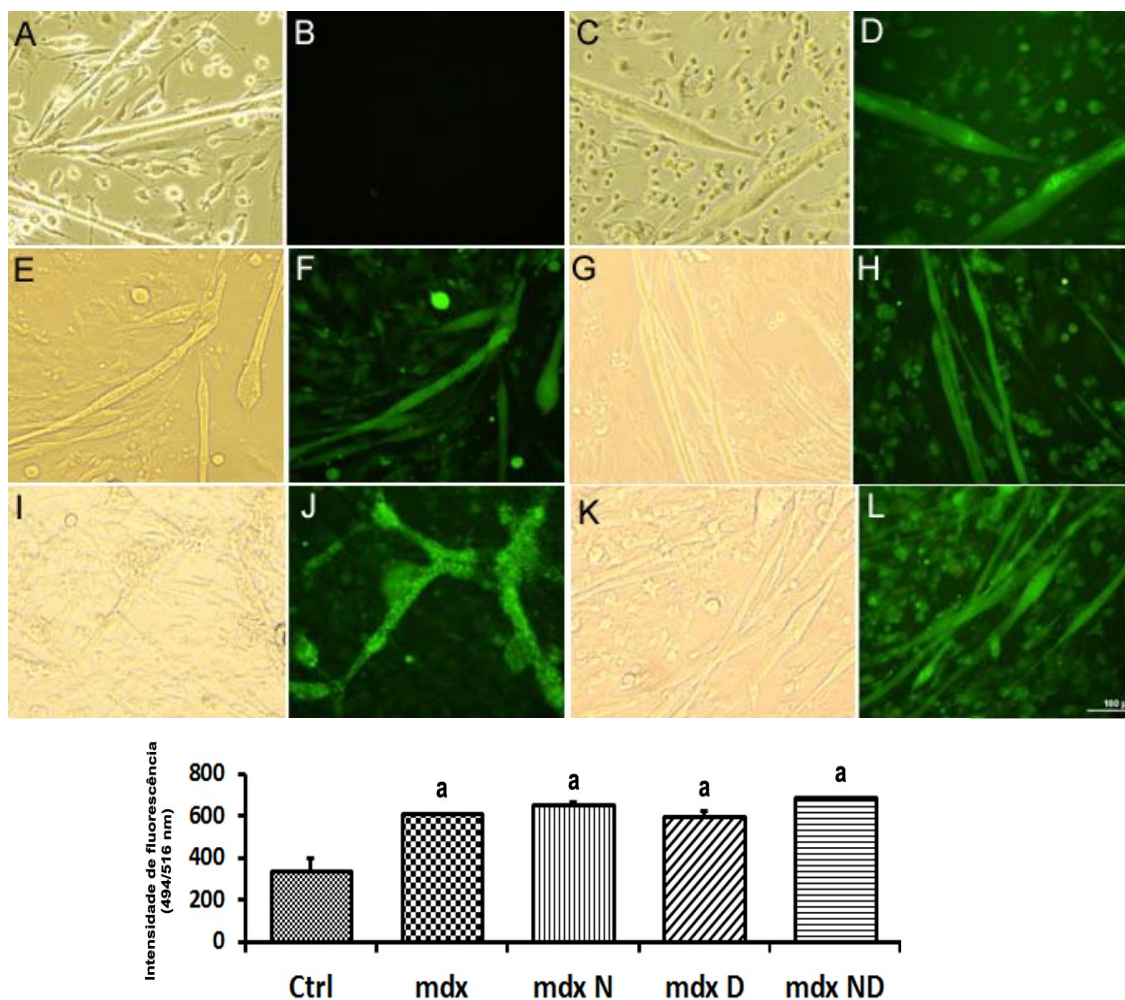


Figura 16. A-L Cultura primária de células musculares. A,C,E,G,I,K (contraste de fase); B,D,F,H,J,L Fluorescência, excitação/emissão de 494/516 nm. A-B Células controle negativo (provenientes de camundongo C57BL/10); A-D Células controle (provenientes de camundongo C57BL/10); E-L Células *mdx* (provenientes de camundongo *mdx*); E-F Células *mdx* sem tratamento; G-H Célula *mdx* tratadas com NAC 10 mM; I-J Células *mdx* tratadas com DFX 10 mM; K-L Células *mdx* tratadas com NAC 10 + DFX 5 mM. Gráfico referem-se a quantificação da intensidade de fluorescência: **Ctrl** Células controle (provenientes de camundongo C57BL/10); ***mdx*** Células *mdx* sem tratamento (provenientes de camundongo *mdx*); ***mdx N*** Célula *mdx* tratadas com NAC 10 mM; ***mdx D*** Células *mdx* tratadas com DFX 10 mM; ***mdx ND*** Células *mdx* tratadas com NAC 10 + DFX 5 mM. ^aDifere do Ctrl. ($p \leq 0.05$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

4.2.3 Amplex Red

O reagente Amplex Red em combinação com HRP (horseradish peroxidase) detecta a liberação de H_2O_2 em amostras biológicas (inclusive de células). No gráfico 1 pode se observar aumento significativo da liberação de H_2O_2 nas células musculares *mdx* quando comparado ao das células obtidas dos camundongos C57BL/10 (controle). Tratamento com 10 mM de NAC apresentou uma diminuição de 24%, com DFX 10 mM houve uma redução de 60% e com a associação de NAC (10 mM) e DFX (5 mM) houve uma redução de 72% da liberação de H_2O_2 nas células *mdx*.

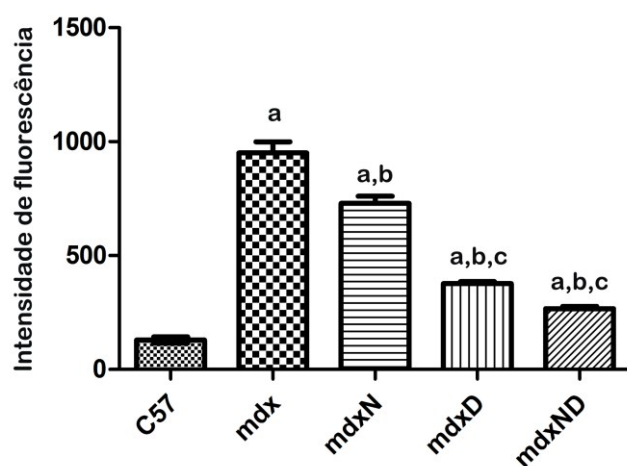


Gráfico 1: Detecção de H_2O_2 utilizando o kit Amplex Red/HRP (horseradish peroxidase) com leitura de intensidade de fluorescência em 530/590 nm de excitação/emissão. **Ctrl:** células musculares de camundongos C57BL/10 (controle); ***mdx*:** células musculares de camundongos *mdx*; ***mdxN*:** células musculares *mdx* tratadas com 10 mM de NAC; ***mdxD*:** células musculares *mdx* tratadas com DFX 10 mM; ***mdxND*:** células musculares *mdx* tratadas com 10 mM de NAC e 5 mM de Deferoxamina **a:** difere do Ctrl; **b:** difere *mdx*; **c:** difere de *mdxN*. $p \leq 0.0001$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

4.2.4 Western Blotting

Verificou-se aumento significativo do conteúdo de TNF- α nas células musculares distróficas sem tratamento (40%) em relação às células controle (Figura 17A). Diminuição deste aumento foi observada após tratamento com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX (redução de 46%, 41% e 44%) respectivamente.

A análise de NF- κ B (Figura 17B) revelou aumento significativo (175%) do conteúdo deste nas células *mdx* quando comparados ao controle. Tratamento com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX respectivamente apresentou diminuição expressiva deste aumento (redução de 88%, 87% e 146%).

Não foi observado nenhuma alteração na expressão de MyoD (Figuras 17C) entre as células dos grupos experimentais analisados.

A análise de 4-HNE (Figura 17D) apresentou aumento do conteúdo deste (31%) nas células *mdx* sem tratamento em relação as células controle. Diminuição significativa dos níveis de 4-HNE nas células *mdx* foi observada após tratamento com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX (redução de 62%, 33% e 71%) respectivamente, quando comparados ao grupo *mdx*.

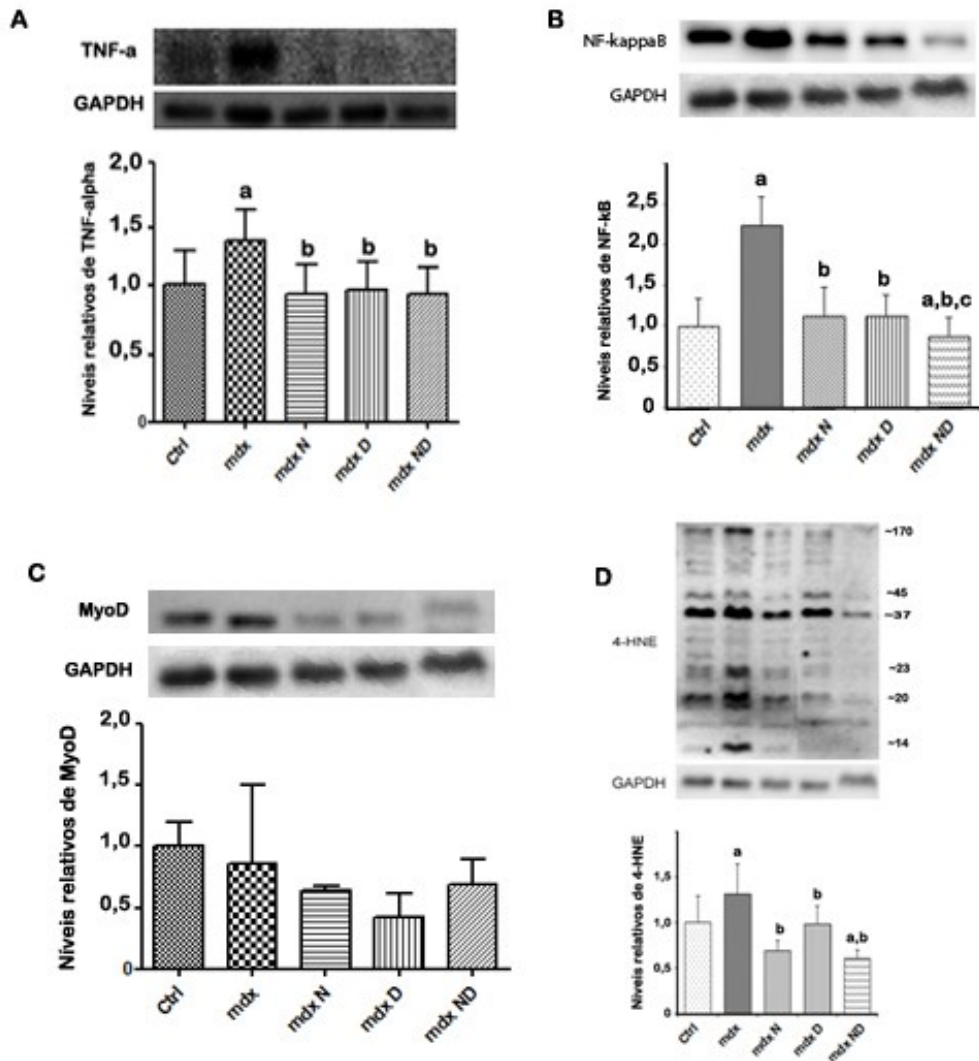


Figura 17. Western Blotting *in vitro*; observam-se as bandas imunoreativas para o TNF- α (A), NF- κ B (B), MyoD (C) e 4-HNE (D). **Ctrl**: células musculares de camundongos C57BL/10 (controle); **mdx**: células musculares de camundongos *mdx* sem tratamento; **mdx N**: células musculares de camundongos *mdx* tratados com N-Acetilcisteína (10mM); **mdx D**: células musculares de camundongos *mdx* tratados com Deferoxamina (5mM); **mdx ND**: células musculares de camundongos *mdx* tratados com associação de N-Acetilcisteína (10mM) e Deferoxamina (5mM). **a**: difere do Ctrl; **b**: difere *mdx*; **c**: difere de *mdxD*. $p \leq 0.05$, (one way Anova), pós teste de Tukey HSD).

5.0 DISCUSSÃO

O estresse oxidativo tem sido considerado um dos mecanismos primários da degeneração muscular distrófica, ao invés de ser um efeito secundário deste processo (WHITEHEAD; YEUNG; ALLEN, 2006). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas, tendo importante função biológica. Normalmente quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. No entanto, em condições de exaustão, é criado um estado de estresse oxidativo, levando a danos no sistema biológico (VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema antioxidante, segundo Zwart; Meerman, (1999) é composto por enzimas e substâncias protetoras não enzimáticas, algumas atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radiculares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os; Outras enzimas, tais como a glutathione peroxidase e catalase, decompõem hidroperóxidos lipídicos e o peróxido de hidrogênio sem gerar radicais livres. Proteínas transportadoras de íons ferro e cobre como a transferrina e a ceruloplasmina, atuam impedindo que estes metais catalisem reações oxidativas, já os carotenóides e a enzima superóxido dismutase atuam suprimindo o oxigênio singlete (O_2) e catalisando a desmutação do ânion radical superóxido, respectivamente (FRIDOVICH, 1998; FANG et al., 2002).

Os antioxidantes sequestradores captam os radicais rapidamente, inibindo a iniciação da cadeia radicalar e/ou interrompendo a propagação da mesma, doando um átomo de hidrogênio para formar um composto estável e um radical derivado do antioxidante; Esses

antioxidantes podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis; Os compostos tais como ascorbato, urato, bilirrubina, albumina e componentes contendo grupamento tiol agem como antioxidantes hidrossolúveis, sendo capazes de sequestrar radicais livres somente no meio aquoso, não podendo sequestrar radicais lipofílicos localizados nas membranas celulares; Já o alfa-tocoferol é conhecido como um importante sequestrador de radicais lipossolúveis, protegendo as membranas celulares contra radicais lipofílicos (HALLIWELL, 1994).

Os componentes do sistema de reparo são enzimas capazes de destruir proteínas danificadas por radicais livres, remover ácidos graxos oxidados presentes nas membranas e reparar lesões no DNA induzidas por radicais livres (HALLIWELL, 1994; SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003). Estes antioxidantes agem cooperativamente protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das EROs.

O estresse oxidativo tem sido relacionado a uma variedade de doenças tais como, aterosclerose (NIGRIS et al., 2003), câncer (GATTI et al., 2004), envelhecimento precoce (LANE, 2003; ZHANG et al., 2004), doenças neurológicas (HAYASHI et al., 2002; ESPOSITO et al., 2002) e distrofinopatias (RANDO, 2001). Sendo assim, muitos trabalhos visam a obtenção de compostos com atividade antioxidante, com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios destas espécies (HALLIWELL, 1994; FREDSTROM, 2002).

Tratamento com antioxidantes que inibem a formação de EROs, como por exemplo, N-Acetilcisteína (NAC) mostraram resultados positivos no tratamento da distrofia muscular; Camundongos *mdx* tratados com NAC demonstraram diminuição da fraqueza muscular e redução do número de fibras musculares em degeneração no músculo extensor longo dos dedos (WHITEHEAD et al., 2008) e no músculo diafragma (PINTO, 2013). Resultado semelhante do tratamento com NAC já havia sido observado em fibras

musculares cardíacas de camundongos distróficos (WILLIAMS; ALLEN, 2007). Embora, o tratamento com NAC tenha demonstrado efeitos benéficos na patofisiologia dos músculos distróficos, Whitehead e colaboradores (2008) sugeriram que a combinação de NAC com outras drogas (outros antioxidantes, bloqueador de cálcio) poderia constituir uma terapia farmacológica mais efetiva no tratamento das distrofias musculares. Neste sentido, analisamos o efeito da associação do antioxidante NAC com o quelante de ferro Deferoxamina (DFX). Em doenças neurodegenerativas, a associação de NAC e DFX (20mg/kg) produziu resultados benéficos contra o estresse oxidativo do que a administração de NAC isoladamente (AGUIAR Jr. et al., 2008; BOER et al., 2009).

O primeiro parâmetro avaliado em nossos experimentos foi a citotoxicidade do NAC e DFX, a qual foi avaliada por experimentos *in vivo* (peso corpóreo e fígado) e *in vitro* (testes de viabilidade celular).

O peso dos animais ao final do tratamento não diferiu entre os grupos experimentais, demonstrando que o tratamento isolado de NAC, DFX ou a associação dos dois medicamentos não apresenta efeito deletério sobre os animais. Especificamente em relação ao NAC, dados semelhantes já foram apresentados em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (PINTO, 2013).

Paralelamente, também verificamos que os tratamentos não alteraram a morfologia hepática, o que está de acordo com o estudo de Heesen (2011). Além disso, vários trabalhos ressaltam que o NAC protege o fígado de lesões (LEE et al., 2012; HEESEN 2011; CAGLIKULEKCI et al., 2004), como por exemplo, no caso de esteatose hepática não alcoólica (CAGLIKULEKCI et al., 2004).

Com relação aos testes *in vitro*, semelhante aos resultados obtidos *in vivo*, também não foi observado efeito citotóxico do NAC, DFX e/ou NAC+DFX em nosso trabalho

(dados Trypan Blue, MTT e Vermelho Neutro) onde ambos não apresentaram diferença estatística para estes testes.

Os ensaios MTT, o Vermelho Neutro e o Trypan Blue são os testes mais utilizados e citados na literatura (MELO 1996; HARBELL et al., 1997; STROBER 2001).

O ensaio do MTT se baseia na redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar como produto o azul de Formazan. O ensaio mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida e ao número de células viáveis em cultura (HARBELL et al., 1997). Com relação ao vermelho Neutro, este em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos, portanto analisa a viabilidade lisossomal das células (HARBELL et al., 1997). Na análise do Trypan Blue, as células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul (STROBER 2001).

O efeito dos tratamentos sobre a degeneração muscular das fibras musculares distróficas foi o segundo parâmetro avaliado. Os resultados foram obtidos a partir de análises funcional, histológica e bioquímica.

A avaliação da força muscular em camundongos é um teste funcional bastante utilizado nos experimentos in vivo (GROUNDS et al., 2008; PAYNE et al., 2006, DE LUCA et al., 2005; DE LUCA et al., 2003; GRANCHELLI et al., 2000). Nossos resultados demonstram que os animais tratados com NAC+DFX apresentaram um ganho de 51% na força muscular em relação aos animais não tratados. Enquanto que, o tratamento isolado com NAC e DFX apresentaram respectivamente um ganho de 25% e 18%.

A utilização de parâmetros histológicos para o estudo das alterações musculares decorrentes da distrofia, tais como o número total de fibras musculares, a porcentagem de fibras com núcleo central, análise da integridade do sarcolema e área de inflamação/regeneração nos fornecem dados que, em conjunto, descrevem o processo de degeneração e regeneração ocorridos ao longo do tempo nos músculos esqueléticos (McGEACHIE et al., 1993; GASCHEN; BURGUNDER, 2001).

No presente trabalho, verificamos que os resultados obtidos referentes a mionecrose para o grupo *mdxS* estão de acordo com a literatura (WEHLING-HENRICKS; LEE; TIDBALL, 2004; WHITEHEAD et al., 2008; PINTO et al., 2013). Comparando-se os músculos STN, DIA e TA observamos uma diferença entre eles quanto a porcentagem de fibras com núcleo periférico (indicativo de fibras que não passaram pelo processo de mionecrose), de fibras positivas ao AE (que indica perda da integridade do sarcolema e mionecrose), de fibras em regeneração e de fibras regeneradas (núcleo central). Estes resultados estão de acordo com o consenso geral de que músculos distróficos respondem com intensidade diferente à falta de distrofina (BRIGUET et al., 2004; GROUNDS; TORRISI, 2004). Existem relatos na literatura que mostram diferenças na evolução e intensidade das lesões musculares de acordo com a função desempenhada pelo músculo tais como locomoção, manutenção postural e respiração (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995) e que alguns grupos musculares não sofrem degeneração, tais como os músculos extra-oculares (MARQUES et al., 2007a) e os músculos intrínsecos da laringe (MARQUES et al., 2007b). Existe ainda a hipótese de que as diferenças entre as proporções dos tipos de fibras musculares existentes em cada músculo podem ser responsáveis pelas características biomecânicas que proporcionam diferentes resistências às lesões decorrentes da distrofinopatia (HASLETT et al., 2005; BANI et al., 2008).

O corante azul de Evans (AE; tetrasodium diazo salt Evans blue dye; Sigma) é uma molécula impermeável à membrana plasmática, não penetrando em fibras musculares esqueléticas de camundongos normais; liga-se a albumina sérica e penetra na fibra muscular quando a membrana não está íntegra; a marcação *in vivo* com este corante possibilita detectar alterações de permeabilidade do sarcolema e fibras em degeneração precocemente, fornecendo informações sobre algumas características dinâmicas e estruturais de músculos esqueléticos normais e portadores de patologias (MATSUDA; NISHIKAWA; TANAKA, 1995; MARQUES et al., 2007). Em relação aos animais tratados, observamos diminuição significativa da mionecrose nos músculos STN e TA nos animais que receberam o tratamento com NAC, DFX e NAC+DFX em relação aos camundongos *mdx* que foram tratados com salina, evidenciado por menor porcentagem de fibras positivas ao AE.

Resultado semelhante ao obtido com o AE foi verificado com a análise de fibras com núcleo central. Observamos após duas semanas de tratamento redução no número de fibras com núcleo centralizado nos músculos STN e TA dos camundongos *mdx* tratados com NAC, DFX e NAC+DFX quando comparados ao grupo *mdx* não tratado. A presença de núcleo central nas fibras musculares é um indicador de regeneração após a degeneração (McGEACHIE et al., 1993).

Em condições patológicas tais como nas miopatias e nas distrofias, a resposta inflamatória excessiva também pode promover mionecrose (para revisão HODGETS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006). A inibição das células inflamatórias pode diminuir a degeneração e a necrose do tecido muscular; Estudos utilizando antiinflamatórios mostraram redução significativa da mionecrose em músculos esqueléticos de camundongos *mdx* (HODGETS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006; TIDBALL; WEHLING-

HENRICKS, 2007; MARQUES et al., 2008). Nossos resultados demonstraram redução na área de inflamação nos músculos TA, STN e DIA dos animais tratados quando comparados ao grupo *mdx* que recebeu salina. Nos músculos DIA e TA, a redução foi mais acentuada no grupo de animais que receberam a associação de NAC e DFX, sendo esta redução de 67% e 85% respectivamente. Estudo recente também constatou diminuição da resposta inflamatória após tratamento com NAC e DFX em ratos nos quais foram retirados parte do fígado (HEESEN et al., 2011).

Outra análise realizada em nossos experimentos foi na determinação de creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo. A enzima CK catalisa a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP), com a formação de creatino-fosfato. Esta enzima está associada com a formação de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte, principalmente nas células musculares. Quando os níveis séricos desta enzima estão aumentados sugere-se que ocorreu lesão muscular, visto que uma das principais localizações da CK é o músculo estriado esquelético (MAGLARA et al. 2003).

Na DMD, a atividade da CK está 50 a 100 vezes acima dos limites superiores dos valores de referência (ENGEL et al., 1994). Em camundongos *mdx*, os níveis de CK também se mostram elevados durante toda a vida do animal (YOSHIDA et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que os animais *mdx* tratados com NAC, DFX e NAC+DFX apresentaram redução de 53%, 52% e 58% respectivamente nos níveis séricos de CK em relação aos camundongos do grupo *mdxS*. Estes dados sugerem que o estresse oxidativo é um fator importante na degeneração muscular do camundongo *mdx* e que o tratamento com NAC e DFX atenua a degeneração no músculo distrófico. Outros trabalhos com NAC, também relataram diminuição da CK em camundongos *mdx* (TERRIL, et al., 2013; PINTO, et al., 2013).

Também avaliamos a concentração de cálcio em nossos experimentos. O íon cálcio (Ca^{2+}) é um importante elemento na constituição e função celular do organismo, envolvendo processos fisiológicos e bioquímicos essenciais para a manutenção do equilíbrio do meio interno. A concentração de Ca^{2+} intracelular é regulada pela interação de múltiplos processos de influxo e efluxo e ocorre em ondas e picos, visto que altas concentrações por longos períodos são tóxicas para as células (BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001).

O influxo, efluxo e estocagem de Ca^{2+} intracelular são realizados por canais voltagem-dependentes, os quais são operados por despolarização; canais de Ca^{2+} capacitativos, operados pela depleção de estoques intracelulares; e canais receptor-operados, que são ativados por mensageiros bioquímicos (FONG et al., 1990; FRANCO-OBREGON; LANSMAN, 1990; VANDEBROUCK et al., 2006). Além desses canais, outros canais também permitem a passagem de Ca^{2+} , como por exemplo, o canal ativado por alongamento (SAC, stretch activated channel) e os canais do tipo leak (RANDO et al., 1998).

Em fibras musculares distróficas alguns trabalhos relatam alteração na concentração do Ca^{2+} (TURNER et al., 1991), que se encontra elevada no citoplasma ou dentro de outros compartimentos celulares, como retículo sarcoplasmático e mitocôndria (MALLOUK et al., 2000; ROBERT et al., 2001). Experimentos com músculo cardíaco de camundongos *mdx* demonstraram que a ausência de distrofina promove alterações nos receptores dihidropiridina e no canal de cálcio tipo-L favorecendo o aumento do influxo de cálcio intracelular (WOOLF et al., 2006). Além dos canais de cálcio tipo L, os canais SAC e leak também parecem estar envolvidos com o aumento de cálcio nas fibras musculares distróficas (RANDO et al., 1998). Também foi observado que a ocorrência desses canais é maior em fibras musculares de *mdx* (VANDEBOUCK et al., 2006).

De acordo com os trabalhos citados acima, observamos alteração (aumento) da concentração de cálcio intracelular entre as células musculares distróficas e controle em nossas condições experimentais. Entretanto, tanto as administrações isoladas ou em conjunto de NAC e DFX não apresentaram efeito sobre a concentração de cálcio nas células musculares distróficas, possivelmente por não terem efeito sobre os canais de cálcio citados anteriormente.

O efeito anti-inflamatório também pode ser uma possível propriedade das drogas utilizadas. A hipótese inflamatória sugere que músculos distróficos apresentam resposta inflamatória excessiva em consequência à lesão das fibras musculares, independente do mecanismo que provoca a lesão. A resposta inflamatória exacerbada é um mecanismo secundário que aumenta a mionecrose e contribui para a progressão da doença (WEHLING-HENRICKS; SPENCER; TIDBALL, 2001; PORTER et al., 2002; HODGETTS et al., 2006). No tecido muscular, a inflamação se inicia logo após a lesão das fibras musculares. Ela compreende uma série de eventos que envolvem a integração do sistema imunológico com o tecido lesado e sua finalidade é o reparo tecidual, para que a regeneração possa acontecer (PRISK; HUARD, 2003). As fibras musculares em degeneração liberam várias substâncias, dentre as quais se destacam as citocinas pró-inflamatórias, proteases, prostaglandinas, collagenases, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento (BONDESEN et al., 2007).

As citocinas pró-inflamatórias e os fatores quimiotáticos estimulam o deslocamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para local da lesão (ROBERTSON et al., 1993; PRISK; HUARD, 2003; TIDBALL, 2005; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007). As prostaglandinas também atuam na quimiotaxia de células inflamatórias e são importantes na ativação, proliferação e diferenciação das células

satélites durante a regeneração muscular (FUNK, 2001; PRISK; HUARD, 2003). Os neutrófilos e macrófagos liberam proteases que degradam os fragmentos celulares e fagocitam estes fragmentos, auxiliando na remoção dos mesmos do local da lesão. As proteases liberadas por estas células podem provocar danos ao tecido muscular íntegro que circunda a lesão e assim aumentar a área da lesão, gerando aumento da resposta inflamatória local (CHEUNG; TIDBALL, 2003; TIDBALL, 2005). Em condições patológicas tais como nas miopatias e nas distrofias, a resposta inflamatória excessiva pode promover mionecrose (HODGETTS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006).

A inibição das células inflamatórias pode diminuir a degeneração e a necrose do tecido muscular. Estudos utilizando anti-inflamatórios mostram redução significativa da mionecrose em músculos esqueléticos de camundongos *mdx* (HODGETTS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007; TONON, et al., 2012; MARQUES et al., 2008). Zafarullah et al. (2003) observaram que o tratamento com NAC em doenças inflamatórias inibe a liberação de TNF- α e a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos. Resultado semelhante foi obtido com o tratamento de NAC/DFX em camundongos submetidos à extração de parte do fígado (HEESEN et al., 2011).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória expressa por células inflamatórias, mioblastos, miotubos e músculo esquelético lesado (KURU et al., 2003). É também produzido por tecido adiposo (WEISBERG; McCANN; DESAI, 2003; FRUHBECK, 2004), o qual é frequentemente pronunciado na DMD (TONON, et al., 2012). Em resposta a menor lesão muscular, o TNF- α é rapidamente liberado por mastócitos e também por neutrófilos, acumulando-se próximo ao local lesado (TIDBALL, 2005; RADLEY; GROUNDS, 2006). Também é um potente fator quimiotático atraindo células inflamatórias para a área lesada (PETERSON et al., 2006). Tem sido proposto que o

aumento exacerbado de TNF- α e de neutrófilos, no início do dano sarcolemal conduz a necrose das fibras musculares distróficas. Reforçando esta hipótese, o bloqueio *in vivo* do TNF- α por cromoglicato de sódio, prevenindo a degranulação de mastócitos que liberam altos níveis de TNF- α (RADLEY; GROUNDS, 2006), depleção de neutrófilos hospedeiros, bloqueio da função do TNF- α com Enbrel (HODGETTS et al., 2006) ou com Remicade (GROUNDS; TORRISI, 2004) protege os camundongos *mdx* da necrose muscular.

Nossos resultados também demonstraram diminuição do conteúdo da citocina pró-inflamatória TNF- α nas células musculares distróficas após tratamento *in vivo* e *in vitro* com NAC, DFX e/ou com a associação de NAC e DFX. Sendo que, nos experimento *in vivo* a redução mais expressiva foi nos animais tratados com a associação dos medicamentos (STN: 64%, DIA: 66% e TA: 50%). Os resultados da quantificação da expressão do NF- κ B, em nossos experimentos, foi similar ao do TNF- α nos músculos DIA e STN.

Estudos sugerem três possíveis mecanismos de como a ativação do fator NF- κ B pode levar a perda muscular. A ativação do NF- κ B pode: (1) aumentar a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, o qual promove a degradação de proteínas musculares e promove perda muscular (REID; LI, 2001); (2) promover o aumento do conteúdo de diversas moléculas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , moléculas de adesão e matrix metaloproteinase-9, as quais podem causar direta ou indiretamente perda muscular (REID; LI, 2001; SENFTLEBEN; KARIN, 2002); (3) interferir no processo de diferenciação do músculo esquelético, o qual é requerido para o reparo do tecido lesado (LANGEN et al., 2001).

No que diz respeito ao sistema via ubiquitina-proteassoma, mecanismo relacionado a atrofia muscular, duas proteínas são comumente utilizadas como marcadores dessa via: a

MAFbx (muscle atrophy F-box), também conhecida como atrogin-1, e a MURF-1 (muscle ring finger 1) (KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Segundo Cai e colaboradores (2004), o fator NF- κ B promove intensa fraqueza muscular mediada em parte pela MURF-1 e não através da atrogin-1. Chen et. al. (2005) demonstraram que não há participação da atrogin-1 em qualquer estágio do processo de degeneração muscular da DMD. Estes autores acreditam que o mecanismo da atrogin-1 não tem papel importante na perda muscular distrófica. Diferindo desses autores, constatamos aumento da MAFbx nos músculos distróficos.

Experimentos com camundongos *mdx* demonstraram que a ativação de moléculas inflamatórias é a principal via de atuação do fator NF- κ B no processo distrófico. Colaborando com nossos resultados, aumento do conteúdo de citocinas pró-inflamatórias reguladas pelo fator NF- κ B, como TNF- α , foi observado nos músculos de camundongos *mdx* antes do período necrótico (KUMAR; BORIEK, 2003, PINTO, 2013). Considera-se também que o TNF- α é um dos mais importantes indutores de NF- κ B, contribuindo para um feedback positivo (MESSINA et al., 2006).

No reparo do tecido muscular, o fator NF- κ B pode inibir a síntese da MyoD (BAKKAR; GUTTRIDGE, 2010). A MyoD é um dos principais fatores de transcrição miogênico que leva a expressão do aumento de genes ligados a diferenciação celular, exercendo um importante papel na ativação de células satélites (HAWKE; GARRY, 2001). Na literatura não há relatos da correlação da ativação do fator NF- κ B com a MyoD em camundongos distróficos. Em nossos experimentos, observamos diferença significativa da MyoD entre os grupos experimentais apenas no músculo TA, uma redução de (55%, 40%, 45% e 53%) do conteúdo da MyoD nos animais *mdx* salina, *mdx* ND, *mdx* N e *mdx* D, respectivamente.

Há evidências de que MAFbx visa MyoD para a degradação, como observado em vários modelos de atrofia muscular. Em culturas, miotubos submetidos à atrofia, houve aumento da expressão de MAFbx, levando a uma transição citoplasma-núcleo de MAFbx e uma supressão seletiva da MyoD (LAGIRAND-CANTALOUBE, et. al. 2009). Em nossos experimentos, essa correlação foi apenas observada com relação ao músculo TA.

Além da MAFbx (componente da via do catabolismo) e do fator transcricional MyoD, aqui analisados em nossos experimentos, é possível que componentes da via do anabolismo, como o fator IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina), também possam estar envolvidos na fisiopatogênese da DMD. Reforçando esta hipótese, recentes trabalhos demonstram o efeito benéfico da administração do IGF-1 sobre as fibras musculares distróficas (SECCO et al., 2013; KUMAR et al., 2011), indicando que a via anabólica também deve ser considerada em futuros estudos do nosso grupo de pesquisa.

Um último parâmetro avaliado em nossos experimentos foi o potencial efeito antioxidante do NAC e DFX, o qual foi verificado através da quantificação dos níveis de 4-HNE (*in vivo* e *in vitro*), reação DHE (*in vivo*) e pela determinação da produção de H₂O₂ (*in vitro*).

O 4-HNE é um dos maiores produtos finais da peroxidação lipídica e tem sido largamente aceito como um indutor de estresse oxidativo, estando envolvido na patogênese de várias doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, aterosclerose e câncer (UCHIDA, 2003; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Inúmeras bandas do 4-HNE entre 26 a 170 kDa foram detectadas nos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os animais tratados com NAC, DFX e NAC+DFX apresentaram redução de 40% a 50% dos níveis de 4-HNE nos músculos DIA e STN. Nos estudos *in vitro*, o tratamento com NAC, DFX e

NAC+DFX promoveu a redução dos níveis de 4-HNE em 47%, 25% e 53%, respectivamente.

Colaborando com nossos resultados, diminuição do nível de 4-HNE foi observada em camundongos *mdx* que receberam NAC (PINTO et al., 2013). Em outros trabalhos, diminuição de radicais livres também foi observada no músculo cardíaco de camundongos *mdx* tratados com NAC, tornando-o semelhante ao observado em animais controle (WILLIAMS; ALLEN, 2007). O efeito antioxidante do tratamento com NAC/DFX também foi constatado em outras doenças envolvidas com estresse oxidativo (TEIXEIRA et al., 2008).

O DHE é comumente usado como indicador de produção de EROs *in vitro* (BENOV; SZTEJNBERG; FRIDOVICH, 1998) e *in vivo* (ROBINSON et al., 2006). Semelhante ao observado por Whitehead, Yeung e Allen, (2006), constatamos aumento na reação de DHE no músculo DIA distrófico, o qual reduziu após os tratamentos. A marcação do DHE também revelou áreas intensamente marcadas, as quais possivelmente células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos. Essas células são conhecidas por produzirem EROs (NGUYEM; TIDBALL, 2003).

Ainda nos estudos *in vitro*, verificamos diminuição significativa da liberação de H_2O_2 nas células musculares distróficas após tratamento com NAC (23%), DFX (60%) e NAC+DFX (71%). Embora o H_2O_2 não seja um radical livre, tem sido considerado uma das mais importantes EROs devido a sua alta capacidade de difusão extracelular (Yu, 1994) e também pela sua alta capacidade de gerar o radical OH, altamente reativo, via reação de Fenton (ARUOMA; HALLIWELL, 1989).

Também avaliamos o sistema antioxidante através da análise da glutathiona reduzida (GSH). O sistema glutathiona é um dos mais importantes sistemas antioxidantes da maioria dos tipos de tecidos *in vivo* (HALLIWELL; GUTTRIDGE, 1999). No músculo esquelético, deficiência do mesmo (o que é exigido para a atividade da Glutathiona Peroxidase GPx para sequestrar radicais livres) leva a degeneração de diversas fibras musculares (SOARES; FOLMER; ROCHA, 2003). A taxa de glutathiona oxidada para reduzida (GSSG/GSH) é vastamente utilizada como indicador do estresse oxidativo em diferentes tipos de células (HALLIWELL; GUTTRIDGE, 1999). GSSG é potencialmente tóxico para as células, mas as células normalmente contêm altas atividades de Glutathiona redutase (GR) (HUANG; HUANG, 2002).

Sob circunstâncias normais, os níveis de GSH intracelular são mantidos via reciclagem do GSSG pela enzima Glutathiona redutase (GR) dependente de NADPH. E na célula muscular, a principal fonte de NADPH para GR é a NADP-ICDH (isocitrato dehydrogenase específica) (LAWLER; POWERS; CRISWELL, 1993; MEIJER, 1991).

Com relação ao sistema antioxidante enzimático, relata-se que este apresenta-se alterado nos músculos de pacientes com DMD (NAKAE, 2004), onde a diminuição da GSH foi encontrado em biopsia muscular de pacientes com idade média de 8 anos (RENJINI 2012). Na literatura encontramos diferentes resultados a respeito desta enzima nos animais *mdx*, quanto aos diferentes músculos e diferentes idades analisadas. Em nossos experimentos encontramos diferença deste conteúdo apenas no músculo Quadriceps, onde o *mdx* apresentou diminuição da GSH. Notamos que os músculos DIA, STN e TA, não tiveram alteração em suas concentrações, nas reações enzimáticas de GSH, o que está de acordo com experimentos recentes (TERRILL et al., 2013).

Diante do exposto, pode se observar que o tratamento com o antioxidante NAC e o quelante de ferro DFX atenua os efeitos deletérios que ocorrem nos animais distróficos. Possivelmente, os efeitos benéficos observados após o tratamento deve-se a propriedade do NAC e DFX de diminuir a produção de EROs e consequentemente inibir a peroxidação lípidica no sarcolema.

6.0 CONCLUSÃO

O tratamento com NAC, DFX e NAC+DFX apresentou efeito benéfico sobre as fibras musculares distróficas, tanto nos experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, reduzindo:

- A degeneração muscular, evidenciada pelo ganho de força, redução de CK e do cálcio intracelular;

- A inflamação exacerbada, a qual foi constatada pela redução da área de inflamação e diminuição do conteúdo de TNF- α e NF-kB;

- A peroxidação lipídica e a produção de EROs, demonstrada pela redução do radical OH, H₂O₂ e do conteúdo de 4-HNE;

Tanto o tratamento isolado dos medicamentos quanto a associação apresentou potencial efeito, entretanto em alguns experimentos a associação mostrou-se mais eficaz contra os danos provocados pela distrofia. Sendo assim, sugerimos que o tratamento em conjunto de NAC e DFX possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular.

7.0 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR Jr., A.S.; TUON, T.; SOARES, F.S.; ROCHA, L.G.C.; SILVEIRA, P.C.; PINHO, R.A. The effect of n-acetylcysteine and deferoxamine on exercise-induced oxidative damage in striatum and hippocampus of mice. **Neurochem Res.** v. 33, p. 729-736, 2008.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic Biol Med.** v.6, n.6, p. 593-597, 1989.

BAKKAR, N.; GUTTRIDGE, D.C. NF-Kb signaling: A tale of two pathways in skeletal myogenesis. **Physiol Ver.** v. 90, p. 495-511, 2010.

BANI, C.; LAGROTA-CANDIDO, J. et al. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. **Muscle Nerve.** v. 37, n. 5, May, p. 583-92, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.** v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENOV, L.; SZTEJNBERG, L.; FRIDOVICH, I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic Biol Med.** v. 25 (Nov), n. 7, p. 826-31, 1998.

BIGGAR, W.D.; KLAMUT, H.J.; DEMACIO, P.C.; STEVENS, D.J. RAY, P.N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clin. Orthop. Relat. Research.** v. 401, p. 88-106, 2002.

BOER, L.A.; PANATTO, J.P.; FAGUNDES, D.A.; BASSANI, C.; JEREMIAS, I.C.; DAUFENBACH, J.F.; REZIN, G.T.; CONSTANTINO, L.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after hepatic failure induced by carbon tetrachloride is reversed by antioxidants. **Brain Research Bulletin**. v.80, p. 75-78, 2009.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J Mol Med**. v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

BONDESEN, B. et al. Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. **FASEB J**. v. 21, p. 3338-3345, 2007.

BOOTMAN, M.D.; LIPP, P.; BERRIDGE, M.J. The organisation and functions of local Ca(2+) signals. **J Cell Sci**, v. 114, n. 12, p. 2213-22, 2001.

BORNHAM, L.; ROWWOW, H.; GERICKE, G.S.; POLLA, B.S. Effects of iron deprivation on the pathology and stress protein expression in murine X-linked muscular dystrophy. **Biochem Pharmacol**. v. 56, p. 751-757, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.72, p.248-254, 1976.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscul Disord**. v. 14 (Oct), n. 10, p. 675-82, 2004.

BROOKES, P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion**. v.3, n.4, p.187-204, 2004.

BUETLER, T.M.; RENARD, M.; OFFORD, E.A.; SCHENEIDER, H.; RUEGG, U.T. Green tea extract decreases muscle necrosis in *mdx* mice and protects against reactive oxygen species. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 75, p. 749-753, 2002.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Science**. v.81, p. 1189-1192, 1984.

CAĞLIKÜLEKCI, M.; PATA, C.; APA, D.D.; DIRLIK, M.; TAMER, L.; YAYLAK, F.; KANIK, A.; AYDIN, S. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on li and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Pharmacol Res**. v. 49, n. 3, p.227-238, 2004.

CAI, D.; FRANTZ, J.D.; TAWA, N.E.; JR MELENDEZ, P.A.; OH, B.C.; LIDOV, H.G.; HASSELGREN, P.O.; FRONTERA, W.R.; LEE, J.; GLASS, D.J.; et al. Kkbeta/NFkappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**. v. 119, p. 285-298, 2004.

CHEN, D.B.; LI, S.M.; QIAN, X.X.; MOON, C.; ZHENG, J. Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells. **Biol Reprod**. v. 73, p. 761-772, 2005.

CHEUNG. E. V.; TIDBALL, J. G. Administration of the non-steroidal anti-inflammatory

drug ibuprofen increases macrophage concentrations but reduces necrosis during modified muscle use. **Inflammation Research**. v. 52, p. 170-176, 2003.

COTTER, M.A.; THOMAS, J.; CASSIDY, P.; ROBINETTE, K.; JENKINS, N.; FLORELL, S.R.; LEACHMAN, S.; SAMLOWSKI, W.E.; GROSSMAN, D. N-acetylcysteine protects melanocytes against oxidative stress/damage and delays onset of ultraviolet-induced melanoma in mice. **Clin Cancer Res**. v. 13 (oct), n. 19, p. 5952-8, 2007.

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

DALKILIC, I.; KUNKEL, L.M. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. **Current opinion in genetics development**. v. 13, n. 3, p. 231-238, 2003.

DAVIES, K.E.; NOWAK, K.J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. **Nature Review Molecular Cell biology**. v. 10, p. 762-773, 2006.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTIN, F. CESARONE, C.F. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. **The American J of Med**. v. 91, p. 122-130, 1991.

DE LUCA, A.; NICO, B.; LIANTONIO, A.; DIDONNA, M.P.; FRAYSSE, B.; PIERNO, S.; BURDI, R. et al.. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic *mdx* mice. **Am J. Pathol**. v. 166, p. 477-489, 2005.

DE LUCA, A.; PIERNO, S.; LIANTONIO, A.; CETRONE, M.; CAMERINO, C.; FRAYSSE, B.; MIRABELLA, M.; SERVIDEI, S.; RUEGG, U.T.; CONTE CAMERINO, D. Enhanced dystrophic progression in *mdx* mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 304, p. 453–463, 2003.

DISATNIK, M.H.; DHAWAN, J.; YU et al. Evidence of oxidative stress in *mdx* mouse muscle: Studies of the pre-necrotic state. **J. Neurol Sci.** v. 161, p. 77-84, 1998.

DONGIOVANNI, P.; VALENTI, L.; FRACANZANI, A.L.; GATTI, S.; CAIRO, G.; FARGION, S. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. **Am J Pathol.** v. 172, n. 3, p. 738-747, 2008.

DUBOWITZ, V. Neuromuscular disorders in childhood – Old dogmas, new concepts. **Archives of Disease in childhood.** v. 50, p. 335-346, 1975.

DUCHENNE, G. B. Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myoesclerosique. **Archives Générales de Médecine.** v. 11, p. 5-16, 1868.

DUCHENNE, G.B. De l'Electrisation Localisee et son Application d la Pathologie et d la Therapeutique. **Balleire et fils.** Paris, 1861, 2nd ed., p. 353.

ENGEL, A.G. YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology.** New York: McGraw-Hill, Inc., 1994, v. 1937, p. 1133-1187. ISBN 0070195595.

ESPOSITO, G; RAPACCIUOLO, A.; NAGA PRASAD, S.V.; ROCKMAN, H.A. Cardiac hypertrophy: role of G protein-coupled receptors. **J Card Fail.** v. 8 (Dec), n. 6, p. S409-14, 2002.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J., ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.** v. 11, p. 81-128, 1991.

FANG, Y-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition.** v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FARID, M.; REID, M.B.; LI, Y.P.; GERKEN, E.; DURHAM, W.J. Effects of dietary curcumin or N-acetylcysteine on NF-kB activity and contractile performance in ambulatory and unloaded murine soleus. **Nutr Metab.** London, v. 2, p. 20, 2005.

FAURE, P.; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Analysis of free radicals in biological systems. FAVIER A. E. *et al.* **Eds. Verla Bostonp**, p. 237-248, 1995.

FONG. P.; TURNER, P.R.; DENETCHAW, W.F. et al. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of duchenne human and *mdx* mouse. **Science.** v. 250, p. 673-676, 1990.

FORMAN, J.H., ZHANG, H., RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 30, p. 1-12, 2009.

FRANCO-OBREGON JR, A.; LANSMAN, J.B. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. **Nature.** v. 344, p. 670-673, 1990.

FREDSTROM, S. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. **Nutrition**. v. 18 (Jun), n. 6, p. 537-9, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. **J Biol. Chem.** v.272, p.18515-18517, 1998.

FRUHBECK, G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 2, p. 197-208, 2004.

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

GASCHEN, F.; BURGUNDER, J.M.; Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. **Acta Neuropathol.** v. 101 (Jun), n. 6, p. 591-600, 2001.

GATTI, R.; BELLETTI, S.; VETTORI, M.V.; SCANDROGLIO, R.; ORLANDINI, G. Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. v. 204, n. 2-3, p. 175-85,2004.

GRANCHELLI, J.A.; POLLINA, C.; HUDECKI, M.S. Pre-clinical screening of drugs using the *mdx* mouse. **Neuromuscul. Disord.** v. 10, p. 235–239, 2000.

GRIFFON, G.; MERLIN, J. L.; MARCHAL, C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. **Anti-Cancer Drugs**, v. 6, p. 115-123, 1995.

GROUND, M.D., TORRISI, J. Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic

skeletal muscle from necrosis. **FASEB Journal**, v. 18, p.676-682, 2004.

GROUNDS, M.D.; RADLEY, H.G.; LYNCH, G.S.; NAGARAJU, K.; DE LUCA, A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiology of Disease**, v. 31, p. 1-19, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev.** v. 52, p. 253-65, 1994.

HALLIWELL B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? **Free Radic Biol Med.** v. 7, p. 645-51, 1989.

HALLIWELL, B.;GUTTRIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford Unisity Press.** 1999.xxxi.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. IRAG working group 4. Cell cytotoxicity assays. Interagency regulatory alternatives group. **Food Chem. Toxicol.** v.35, p.79-126, 1997.

HAMER, P.W.; McGEACHIE, J.M.; DAVIES, M.J.; GROUND, M.D. Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **J Anat.** v. 200 (Jan), n. 1, p 69-79, 2002.

HAWKE T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol.** v. 91, p. 534-551, 2001.

HAYASHI, M.; ARAKI, S.; ARAI, N.; KUMADA, S.; ITOH, M.; TAMAGAWA, K.; ODA, M.; MORIMATSU, Y. Oxidative stress and disturbed glutamate transport in spinal muscular atrophy. **Brain Dev.** v. 24 (Dec), n. 8, p. 770-5, 2002.

HEESEN, M.; HEUSER, M. SEIBERT, K.; SCHEUER, C. et al. Split-Li Procedure and inflammatory response: improvement by pharmacological preconditioning. **Journal of Surgical Research**, v. 168, p. 125–135, 2011.

HASLETT, J.N.; KANG, P.B., et al. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. **Mamm Genome.** v. 16, n. 10, Oct, p. 739-48, 2005.

HODGETTS, S.; RADLEY, H.; DAVIES, M.; GROUNDS, M.D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF- α function with Etanercept in *mdx* mice. **Neuromusc. Disord.** v. 16, p. 591-602, 2006.

JENSEN, P.D.; HEICKENDORFF, L.; PEDERSEN, B.; BENDIX-HANSEN, K.; JENSEN, F.T.; CHRISTENSEN, T. et al. The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. **Br J Haematol.** v. 94, p. 288-99, 1996.

KANDARIAN, S.C.; JACKMAN, R.W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v. 33, p. 155-165, 2006.

KUMAR, A.; BORIEK, A.M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: A possible role in Duchenne muscular dystrophy. **Faseb J.** v. 17, p. 386-396, 2013.

KUMAR, A.; YAMAUCHI, J.; GIRGENRATH, T.; GIRGENRATH, M. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor 1 improves outcome in Lama2Dy-w mice, a model for congenital muscular dystrophy type 1A. **Human Molecular Genetics**. v. 20, p. 2333–2343, 2011.

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 miopathies. **Acta Neuropathol (Berl)**. v. 105, p. 217-224, 2003.

LAGIRAND-CANTALOUBE J, CORNILLE K, CSIBI A, BATONNET-PICHON S, LEIBOVITCH MP, et al. Inhibition of Atrogin-1/MAFbx Mediated MyoD Proteolysis Prevents Skeletal Muscle Atrophy *In Vivo*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3 p. 4973, 2009.

LANE, N. A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. **J Theor Biol**. v. 225 (Dec), n. 4, p. 531-40, 2003.

LANGEN, R.; SCHOLS, A.M.; KELDERS, M.C.; WOUTERS, E.F.; JANSSEN-HEININGER, Y.M. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. **Faseb J**. v. 15, p. 1169-1180, 2001.

LEE, E.J.S.; SILVA, S.M.; SOMÕES, M.J.; MONTERO, E.F.S. Effect of N-acetylcysteine in li ischemia-reperfusion injury after 30% hepatectomy in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 346-349, 2012.

LEFAUCHEUR, J.P.; PASTORET, C.; SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec**. v. 242 (May), n. 1, p. 70-6, 1995.

LYNGE, J.; JUEL, C.; HELLSTEN, Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. **J. Physiology**. v.537, p.597-605, 2001.

MAGLARA, A.A.; VASILAKI, A.; JACKSON, M.J.; McARDLE, A. Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective effect of heat shock proteins. **The Journal of Physiology**, v. 549, n. 3, p. 837-46. 2003.

MALLOUK, N.; JACQUEMOND, V.; ALLARD, B. Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} activated K^{+} channels. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 25 (Apr), n. 9, p. 4950-5, 2000.

MARQUES, M. J., FERRETI, R., VOMERO, V. U., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 35, p. 349-353, 2007a.

MARQUES, M.J.; MACHADO, R.V.; MINATEL, E.; SANTO-NETO, H. Dissodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. **Muscle Nerv.** v. 37, p. 61-67, 2008.

MARQUES MJ, PERTILLE A, CARVALHO CL, SANTO NETO H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. **Anat Rec (Hoboken)**. v. 290, p. 846-854, 2007b.

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

McGEACHIE, J.K.; GROUNDS, M.D.; PARTRIDGE, T.A.; MORGAN, J.E. Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. **J Neurol Sci.** v. 119 (Nov), n. 2, p. 169-79, 1993.

McKENNA, M.J.; MEDVED, I.; GOODMAN, C.A.; BROWN, M.J.; BJORKSTEN, A.R.; MURPHY, K.T.; PETERSEN, A.C.; SOSTARIC, S.; GONG, X. N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺, K⁺ -pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. **J Physiol.** v. 576, p. 279-288, 2006.

MESSINA, S.; BITTO, A.; AGUENNOUZ, M.; MINUTOLI, L.; MONICI, M.C.; ALTAVILLA, D.; SQUADRITO, F.; VITA, G. **Experimental Neurology**, v. 198, p. 234-241, 2006.

MINATEL, E.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 5, p. 561-569, 2003.

MURPHY, M.E.; KEHRER, J.P. Oxidative stress and muscular dystrophy. **Chem. Biol. Interact.** v. 69, p. 101-178, 1989.

NGUYEN, H.X.; TIDBALL, J.G. Null mutation of gp91phox reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. **J Physiol.** v. 15 (Dec), n. 553, p. 833-41, 2003.

NIGRIS, F.; LERMAN, A.; IGNARRO, L.J.; IGNARRO, S.W.; SICA, V.; BAKER, A.H.; LERMAN, L.O.; GENG, Y.J.; NAPOLI, C. Oxidative-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine.** v. 9, n. 8, p. 351-359, 2003.

PAYNE, E.T.; YASUDA, N.; BOURGEOIS, J.M.; DEVRIES, M.C.; RODRIGUEZ, M.C.; YOUSUF, J.; TARNOPOLSKY, M.A. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 33, p. 66–77, 2006.

PETERSON, J.M.; FEEBACK, K.D.; BAAS, J.H.; PIZZA, F.X. Tumor necrosis factor- α promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 101, p. 1394-1399, 2006.

PINTO, R.S.M.; FERRETTI, R.; MORAES, L.H.R.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J.; MINATEL, E. N-Acetylcysteine treatment reduces TNF- α levels and myonecrosis in diaphragm muscle of *mdx* mice. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 472-475, 2013.

PLOMGAARD, P.; FISCHER, C.P.; IBFELT, T.; PEDERDEN, B.K.; VAN HALL, G. Tumor necrosis factor-alpha modulates human in vivo lipolysis. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 93, n. 2, p. 543-9, 2008.

PORTER, J.D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H.J.; MERRIAN, A.P.; RICHMONDS, C.R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F.H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient *mdx* mice. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 3, p. 263-272, 2002.

PORTER, J.D.; MERRIAN, A.P.; LEAHY, P.; GONG, B.; KHANNA, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (*mdx*) mice. **Hum Mol Genetics**. v. 12, n. 15, p.1813-1821, 2003.

PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation. **Histol Histopathol**, v. 18, p. 1243-1256, 2003.

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

RAGUSA, R.J.; CHOW, C.K.; PORTER, J.D. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorder**, v. 7, p. 379-386, 1997.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Musc Nerv**. v. 24, p. 1575-1594, 2001.

RANDO, T.A.; DISATNIK, M.H.; YU, Y.; FRANCO, A. Muscle cells from *mdx* mice have an increased susceptibility to oxidative stress. **Neuromuscular Disorder**, v. 8, p. 14-21, 1998.

REID, M.B.; LI, Y-P. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. **Respir Res**. v. 2, n. 5, p. 269-272, 2001.

RITTER, C.; ANDRADES, M.E.; REINKE, A. et al., Treatment with n-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit Care Med**. v. 32, p. 342-349, 2004.

ROBERT, V.; MASSIMINO, M L.; TOSSELO, V.; MARSAULT, R.; CANTINI, M.; SORRENTINO, V. Alterations in calcium handling at the subsarcolemal level in *mdx* myotubes. **J Biol Chem**, v. 276, p. 4647-4651, 2001.

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

ROBINSON, K.M.; JANES, M.S.; PEHAR, M.; MONETTE, J.S.; ROSS, M.F.; HAGEN, T.M.; MURPHY, M.P.; BECKMAN J.S. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.103, p. 15038-15043, 2006.

RODRIGUEZ, M.C.; TARNOPOLSKY, M.A. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.** v. 34, p. 1217-1220, 2003.

SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; AL RIKABI, A.C. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. **Pharmacol Res.** v. 43, p. 211–218, 2001.

SANDSTROM, M.E.; ZHANG, S.J.; BRUTTON, J.; SILVA, J.P.; REID, M.B.; WESTERBLAD, H.; KATZ, A. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. **J Physiol**. v. 575, p. 251-262, 2006.

SECCO, M.; BUENO JR, C.; VIEIRA, N.M.; ALMEIDA, C.; PELATTI, M.; ZUCCONI, E.; BARTOLINI, P.; VAINZOF, M.; MIYABARA, E.H.; OKAMOTO, O.K.; ZATZ, M. Systemic delivery of human mesenchymal stromal cells combined with IGF-1 enhances muscle functional recovery in LAMA2^{dy/2j} dystrophic mice. **Stem Cell Rev and Rep**. DOI 10.1007/s12015-012-9380-9.

SENFTLEBEN, U.; KARIN, M. The IKK/NF-KappaB pathway. **Crit Care Med**. v. 30, p. S18-S26, 2002.

SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.; HOH, J.F.; ROSENTHAL, N.; GROUNDS, M.D.;

Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic *mdx* mice. **Mol. Ther.** v. 10, p. 829-843, 2004.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin. v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SILVEIRA, L.R.; PILEGAARD, H.; KUSUHARA, D.; CURI, R.; HELLSTEN, Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (ppar)-gamma coactivator 1 alpha (pgc-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (ucp3) and hexokinase ii (hkii) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Bioc. Biop. Acta. Mol. Cell. Res.** v.1763, p.969-976, 2006.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research.** v.531, p.231–251, 2003.

SMITH, M.A.; REID, M.M. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 151, p. 229-241, 2006.

SOUTO, E.X. Tratamento de suporte e quelação de ferro em pacientes com síndromes mielodisplásicas. **Rev bras hematol hemator.** v. 28, n. 3, p. 204-209, 2006.

SPRONG, R.C.; WINKELHUYZEN-JANSSEN, A.M.L.; AARSMAN, C.J.M.; OIRSCHOT, J.F.L.M.; BRUGGEN, T.; ASBECK, B.S. Low-dose N-Acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high dose increase mortality.

Am J Respir Crit Care Med. v. 157, p. 1283-1293. 1998.

STROBER, W. Trypan Blue exclusion test of cell biability. **Curr. Protocol. Immunol.** v.21, p.A.3B1-A.3B.2, 2001.

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

TEIXEIRA, K.C.; SOARES, F.S.; ROCHA, L.G.C.; SILVEIRA, P.C.L. et al., Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine. **Pulmonary Pharmacology Therapeutics**, v. 21, p. 309-316, 2008.

TERNEUS, M.V.; BROWN, J.M.; CARPENTER, A.B.; VALENTOVIC, M.A. Comparison of S-adenosyl-L-methionine (S-AMe) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. **Toxicology.** v. 244 (Feb 3), n. 1, p. 25-34, 2008.

TERRILL J.R.; BOYATZIS, A.; GROUNDS M.D.; ARTHUR P.G. Treatment with the cysteine precursor l-2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC) implicates taurine deficiency in severity of dystropathology in mdx mice. **Int. J. of Bioch. And cell biol.** v. 45, p. 2097-2108, 2013.

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

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 288, p. R345-353, 2005.

TONON, E.; FERRETTI, R.; SHIRATORI, J.H.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J.; MINATEL, E. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in *mdx* mice. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 686-690, 2012.

TORRES, L.F.; DUCHEN, L.W. The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**. v. 110, n. 2, p. 269-99, 1987.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.** v. 42, p. 318- 343, 2003.

VANDEBROUK, A.; MARTIN, D.; COLSON-VAN SCHOOR, M.; DEBAIX, H.; GAILLY, P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle fibers. **J Cell Biol.** v. 158, p. 1089-1096, 2002.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WEHLING-HENRICKS, M.; LEE, J.J.; TIDBALL, J.G. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 483-490, 2004.

WEHLING-HENRICKS, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mice. **Journal of Cell Biology**, v. 155, p. 123-131, 2001.

WEISBERG, S.P.; McCANN, D.; DESAI, M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.** v. 112, p. 1796-1808, 2003.

WHITEHEAD, N.; YEUNG, E.W.; ALLEN, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 657-662, 2006.

WHITEHEAD, N.P.; PHAM, C.; GERVASIO, O.L.; ALLEN, D.G. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in *mdx* mice. **J Physiol.** v. 586, n. 7, p. 2003-2014, 2008.

WILLIAMS, I.A.; ALLEN, D.G.; The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient *mdx* mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 293, n. 3, p. 1969-1977, 2007.

WILLIAMS, R.E.; ZWEIER, J.L.; FLAHERTY, J.T. Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts. **Circulation.** v. 83, p. 1006–1014, 1996.

WOOLF, P.J.; LU, S.; CORNFORD-NAIRN, R.; WATSON, M.; XIAO, X.H.; HOLROYD, S.M.; BROWN, L.; HOEY, A.J. Alterations in dihydropyridine receptors in dystrophin-deficient cardiac muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 6, p. 2439-45, 2006.

YOSHIDA, M.; YONETANI, A.; SHIRASAKI, T.; WADA, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 290, p. 449–455, 2006.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews** v. 74, p. 139-161, 1994.

ZAFARULLAH, M., W. Q. Li, *et al.* Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 1, p.6-20, jan. 2003.

ZHANG, H.J.; DOCTROW, S.R.; XU, L.; OBERLEY, L.W.; BEECHER, B.; MORRISON, J.; OBERLEY, T.D.; KREGEL, K.C. Redox modulation of the liver with chronic antioxidant enzyme mimetic treatment prevents age-related oxidative damage associated with environmental stress. **Faseb J.** v. 18 (Oct), n. 13, p. 1547-9, 2004.

ZWART, L.L.D.; MEERMAN, J.H.; *et al.* Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic. Biol. Med.** v.26, p.202-26,1999.

8.0 ANEXOS

Anexo 1 – Certificado Comitê de Ética



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2128-1, sobre "Tratamento *in vivo* e *in vitro* com a associação de N-acetilcisteína e deferoxamina em camundongos distróficos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Elaine Minatel / Luis Henrique Rapucci Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 05 de abril de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2128-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 5, 2010.

Campinas, 05 de abril de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>