



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**RAFAEL DE SENZI MORAES PINTO**

**“INFLUÊNCIA DO N-ACETILCISTEÍNA (NAC) NO PROCESSO DE DEGENERAÇÃO MUSCULAR EM CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Rafael de Senzi Moraes Pinto

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

**Orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel**

**Campinas, 2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>P658i</b>	<p>Pinto, Rafael de Senzi Moraes Influência do N-acetilcisteína (NAC) no processo de degeneração muscular em camundongos distróficos / Rafael de Senzi Moraes Pinto. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadora: Elaine Minatel. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Camundongo <i>mdx</i>. 2. Músculos - Degeneração. 3. N-acetilcisteína. I. Minatel, Elaine, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/lb)</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Influence of the N-acetylcysteine in the muscular degeneration process in dystrophic mice.

**Palavras-chave em inglês:** *Mdx* mice; N-acetylcysteine; Muscles - Degeneration.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Elaine Minatel, Jesus Carlos Andreo, Edison Duarte.

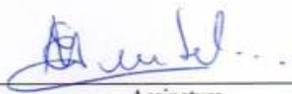
**Data da defesa:** 02/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 02 de fevereiro de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Elaine Minatel (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Edison Duarte



Assinatura

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo



Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

Assinatura

Prof. Dr. Jose Angelo Camilli

Assinatura

## DEDICATÓRIA

Dedico os frutos deste trabalho aos meus avós

Waldemar Antonio de Senzi e Lucy de Senzi

e aos meus pais,

João Moraes Pinto Junior e Ana Maria de Senzi Moraes Pinto.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos **Ana Rita, Pedro e João,**

**Carla** e família **Adabbo,**

Sra. **Liliam Alves Senne Panagio** pelo direcionamento e dedicação incondicional em todas as etapas da Pós-Graduação,

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural,

**CAPES/PROEX** pela concessão da bolsa de estudos,

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

Profª. Dra. **Elaine Minatel** pela confiança e orientação,

Profª. Dra. **Evanisi Teresa Palomari** pelas oportunidades de aprimoramento no ensino da Anatomia Humana,

Prof. Dr. **Roberto de Oliveira Levy** pelos ensinamentos durante o estágio de capacitação docente,

Prof. Dr. **Humberto Santo Neto** por me ensinar conceitos sólidos e diferenciados sobre Anatomia Humana,

Profª. Dra. **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** pelos valiosos ensinamentos de Anatomia Topográfica e Esplancnologia,

Prof. Dr. **Jose Angelo Camilli** por me orientar nos processos de preparação de peças anatômicas,

Prof. Dr. **Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira** pelas considerações no exame de proficiência em língua estrangeira,

Profª. Dra. **Maria Julia Marques** pela concessão do laboratório e material utilizados nos experimentos, pelos ensinamentos na disciplina de Neuroanatomia e pelas considerações no exame de qualificação de mestrado,

Profª. Dra. **Laurecir Gomes** pela gestão com excelência do programa de Pós-Graduação e pelas considerações no exame de qualificação de mestrado,

Prof. Dr. **Paulo Pinto Joazeiro** pelas considerações durante o exame de qualificação de mestrado,

Professores Dr. **Edison Duarte**, Dr. **Jesus Carlos Andreo** e Dra. **Rosana Macher Teodori** pelas contribuições durante a etapa de análise prévia do presente trabalho,

Prof. Dr. **José Meciano Filho** pela disponibilidade e atenção prestada durante toda a realização do Mestrado, pelos brilhantes ensinamentos e exemplos de conduta,

Prof. Dr. **Eduardo José Caldeira** pela concessão do microscópio da Faculdade de Medicina de Jundiaí,

Profa. Dra. **Ana Maria Aparecida Guaraldo** e Prof. Dr. **Luiz Augusto Corrêa Passos** pela amizade e ensinamentos durante a disciplina "Animais de Laboratório em Pesquisa Biomédica",

Mestrandos **Robson Aparecido dos Santos Boni** e **Luiz Gabriel Maturana** pelo companheirismo e ensinamentos durante todas as disciplinas de Anatomia Humana,

Ms. **Renato Ferretti** pela amizade e ensinamentos para a realização das técnicas utilizadas neste trabalho,

Aos amigos do programa de Pós-Graduação **Gustavo, Flávia, Ivan, Wilson, Roberta, Amanda, Rodrigo, Ana Paula, Cíntia, Eduardo e Wagner**,

Sr. **Toni Donizete dos Santos**, Sr. **Paulo Afonso Bernardes** e Sr. **Paulo Francisco dos Santos**, pela amizade e apoio durante as disciplinas de Anatomia Humana e estágio de capacitação docente,

Sr. **Norivaldo Celestino** e Sr. **Marco Aurélio Ribeiro de Paula**, pela amizade e manutenção dos laboratórios de pesquisa do Departamento de Anatomia,

Sra. **Marlene Lima** pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho,

Todos os **docentes, funcionários e colegas** que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para a minha formação em Anatomia Humana.

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Apresentação .....	2
1.2 Distrofia Muscular de Duchenne.....	3
1.3 Camundongo <i>mdx</i> .....	7
1.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	8
1.5 Espécies Reativas de Oxigênio e Músculo Destrófico .....	10
1.6 N-Acetilcisteína .....	12
2.0 OBJETIVOS.....	14
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
3.1 Animais.....	17
3.2 Protocolo Experimental.....	17
3.2.1 Camundongos <i>mdx</i> (n=30) .....	17
3.2.2 Camundongos C57BL/10 (n=10).....	18
3.3 Tratamento com NAC.....	18
3.4 Análise Histológica .....	18
3.5 Determinação da atividade de creatina-quinase (CK).....	20
3.6 Quantificação de TNF- $\alpha$ e 4-HNE.....	20
4.0 RESULTADOS.....	23
4.1 Análise qualitativa .....	24
4.2 Análise quantitativa .....	27
4.3 Níveis de creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo .....	30
4.4 Immunoblotting .....	30
4.4.1 – TNF- $\alpha$ .....	30
4.4.2 – 4-HNE .....	33
5.0 DISCUSSÃO.....	35
5.1 Degeneração e Regeneração Muscular.....	36
5.2 Níveis Plasmáticos de Creatina Quinase .....	38
5.3 TNF- $\alpha$ .....	40
5.4 4-HNE .....	42
6.0 CONCLUSÃO.....	44
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

**ABREVIATURAS**

**4-HNE** – 4-hidroxinonenal

**ADP** – difosfato de adenosina

**AE** – azul de Evans

**ATP** – trifosfato de adenosina

**CDG** – complexo distrofina-glicoproteínas

**CK** – enzima creatina-quinase

**CTRL** – controle

**DABCO** – 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano

**DIA** – músculo diafragma

**DMD** – distrofia muscular de Duchenne

**EROs** – espécies reativas de oxigênio

**GAPDH** – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**HE** – hematoxilina-eosina

**IL-1 $\beta$**  – interleucina 1 $\beta$

**Infl/Reg** – área de inflamação / regeneração

**MDA** – malondialdeído

***mdx*** – X chromosome-linked muscular dystrophy

***mdxN*** – camundongo *mdx* tratado com N-acetilcisteína

***mdxS*** – camundongo *mdx* tratado com salina

**NAC** – N-acetilcisteína

**NADPH** – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NC** – núcleo central

**NF- $\kappa$ B** – fator de transcrição nuclear

**nNOS** – óxido nítrico sintase neuronal

**NO** – óxido nítrico

**NP** – núcleo periférico

**OH $\cdot$**  – radical hidroxila

**Reg** – área de regeneração

**SAC** – canal de cálcio ativado por estiramento

**STN** – músculo esternomastóideo

**TA** – músculo tibial anterior

**TNF-  $\alpha$**  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

## RESUMO

Estudos recentes demonstram o envolvimento do estresse oxidativo nas distrofinopatias. Neste trabalho, verificamos se o uso do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) no período que antecede a mionecrose diminui a degeneração muscular em camundongos *mdx*, modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne. Quinze camundongos *mdx* com 14 dias de vida receberam por via intraperitoneal 150mg/kg de NAC diluído em salina por 14 dias. Quinze camundongos *mdx* receberam salina pela mesma via e período. Os músculos tibial anterior (TA), esternomastóide (STN) e diafragma (DIA) foram utilizados para quantificar (1) fibras em degeneração muscular (fibras positivas ao azul de Evans), (2) fibras regeneradas (fibras com núcleo central), (3) áreas de Inflamação/Regeneração e Regeneração, (4) conteúdo de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e do 4-hidroxinonenal (4-HNE), através da técnica de immunoblotting. Amostras de sangue foram utilizadas para quantificar o conteúdo da enzima creatina quinase (CK). NAC promoveu diminuição significativa na porcentagem de fibras em degeneração (marcadas pelo azul de Evans) em todos os músculos analisados, redução significativa de fibras com núcleo central no músculo TA e diminuição significativa na área de Inflamação/Regeneração nos músculos STN e DIA ( $p < 0,05$ ; Teste *t* de Student). Na análise por immunoblotting, observamos diminuição significativa do TNF- $\alpha$  no músculo DIA e do 4-HNE nos músculos STN e DIA dos camundongos *mdx* tratados com NAC ( $p < 0,05$ ; Teste *t* de Student). Diminuição significativa dos níveis de CK foi observada nos animais tratados com NAC ( $p < 0,05$ ; Teste *t* de Student). Em conjunto, estes resultados demonstram que o antioxidante NAC possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular.

## ABSTRACT

Recent studies strongly support the involvement of oxidative stress in dystrophinopathies. In the present study, we verified whether N-acetylcysteine (NAC) treatment before the cycles of muscle degeneration-regeneration decreases muscular degeneration in *mdx* mice. *Mdx* mice at 14 days of age received intraperitoneal injection of NAC (150mg/kg diluted with saline) daily, for 14 days. Control *mdx* mice received saline by the same via and for the same period of time. The tibialis anterior (TA), sternomastoid (STN) and diaphragm (DIA) muscles were used for the quantification of (1) necrotic fibers (labeled with Evans blue dye), (2) regenerated fibers with central nuclei, (3) inflammation/regeneration area, (4) tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels (immunoblotting analysis). The blood of these animals was drawn to evaluate serum CK activity by spectrophotometry. NAC-treated muscle showed a significant decrease in the percentage of Evans blue dye-positive fibers ( $p < 0,05$ ; Student's *t* Test). The number of fibers with central nuclei decreased in the TA muscle ( $p < 0,05$ ; Student's *t* Test). The area of inflammation-regeneration decreased in the STN and DIA muscles in the NAC treated group. Immunoblots showed a significant decrease in the levels of TNF- $\alpha$  levels in DIA muscle and of 4-HNE levels in STN e DIA muscles in NAC-treated mice ( $p < 0.05$ ; Student's *t*-test). NAC significantly decreased the blood levels of creatine kinase in NAC-treated mice ( $p < 0.05$ ; Student's *t*-test). These results suggest that antioxidants such as NAC could have therapeutic potential for dystrophinopathies.

## **1.0 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Apresentação

As distrofias musculares compreendem um grupo heterogêneo de patologias geneticamente determinadas, caracterizadas por alterações degenerativas progressivas das fibras musculares, cuja principal manifestação é a fraqueza muscular progressiva (SCHMALBRUCH, 1982). A disfunção genética mais comum é a distrofia muscular de Duchenne (DMD).

A DMD é uma doença autossômica recessiva ligada ao cromossomo X que acomete uma em cada 3.500 crianças do sexo masculino nascidas vivas (BIGGAR et al., 2002). Afeta primariamente a musculatura estriada esquelética e cardíaca. Os primeiros sinais do acometimento se tornam evidentes no início da infância e a doença evolui com perda progressiva da musculatura, substituição das fibras musculares por tecido fibroadiposo e aumento do tecido conjuntivo intersticial (SEIXAS et al., 1997). No início da segunda década de vida a maioria dos indivíduos perde a capacidade de deambular e fica dependente de cadeira de rodas (CHAKKALAKAL et al., 2005). Embora a utilização de recursos terapêuticos seja capaz de melhorar qualidade de vida dos portadores da DMD, na maioria dos casos o óbito ocorre ao fim da segunda década de vida por falência cardiorrespiratória (BOGDANOVICH et al., 2004).

A alteração genética ocorrida na DMD causa modificação do gene responsável pela codificação da proteína distrofina. A ausência desta proteína ainda é considerada como o principal fator responsável pela patofisiologia da doença. Entretanto, recentes estudos indicam que outros fatores também podem estar envolvidos na patogênese da DMD, como por exemplo, o estresse oxidativo.

Marcadores de estresse oxidativo foram identificados em músculos de pacientes distróficos e de camundongos *mdx*, modelo experimental da DMD (RAGUSA et al., 1997; RODRIGUEZ, TARNOPOLSKY, 2003). Outros trabalhos também indicam o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da DMD. Dentre estes podemos destacar os que enfocam que

as células musculares distróficas são mais susceptíveis a espécies reativas de oxigênio (EROs), (RANDO et al., 1998; DISATNIK et al., 1998); que os radicais livres contribuem para a perda da integridade da membrana nas distrofias musculares (MURPHY, KEHRER, 1989); redução da concentração de antioxidantes endógenos (glutathiona e vitamina E) e alterações na atividade de enzimas antioxidantes nas fibras musculares distróficas (RAGUSA et al., 1997; MURPHY, KEHRER, 1989).

Desta forma, tratamentos com antioxidantes que inibem a formação de EROs, como por exemplo o N-Acetilcisteína (NAC), podem ter um potencial efeito terapêutico sobre a DMD. Diminuição do nível de radicais livres foi observada no músculo cardíaco de camundongos *mdx* tratados com NAC (WILLIAMS, ALLEN, 2007). Recentemente, também foi observado que NAC previne o aumento da permeabilidade da membrana e reduz o déficit de força associado com dano muscular induzido por estiramento (WHITEHEAD, 2008).

## **1.2 Distrofia Muscular de Duchenne**

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é considerada a mais comum e devastadora das distrofias musculares humanas, afetando 1 a cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas (BIGGAR et al., 2002). A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, em que os pacientes sofrem uma degeneração muscular progressiva severa. Os primeiros sinais clínicos são detectados entre 2 e 5 anos de idade através da dificuldade de caminhar e erguer-se de superfícies. Com a progressão da doença, já na adolescência, o paciente fica confinado a cadeira de rodas, e a insuficiência cardiopulmonar é a causa de sua morte, frequentemente durante a segunda década de vida (ENGEL et al., 1994).

A anormalidade genética da DMD está presente no braço curto do cromossomo X (locus

Xp21.1) cujo produto normal é uma proteína denominada distrofina (HOFFMAN, 1996). 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 estriado esquelético (RANDO, 2001). A função desse complexo é estabilizar a membrana da célula muscular durante os ciclos de contração e relaxamento. Além disso, existem evidências do importante papel do CDG na regulação de canais de cálcio mecanossensíveis, especialmente no espaço subsarcolemal, influenciando na homeostase do cálcio e na sua sinalização (GAILLY, 2002).

Várias hipóteses procuram explicar os mecanismos que levam à degeneração nos músculos distróficos (para revisão ver DECONINCK, DAN, 2007). A hipótese mecânica sugere que a inexistência da ligação entre os meios intra e extracelular, decorrente da ausência da distrofina e das demais proteínas do CDG, torna o sarcolema mecanicamente instável (COHN, CAMPBELL, 2000; BATCHELOR, WINDER, 2006; DECONINCK, DAN, 2007; ERVASTI, 2007). A instabilidade mecânica faz com que os músculos se tornem susceptíveis à lesão durante os ciclos de contração e relaxamento (CHAKKALAKAL et al., 2005). Em virtude desta fragilidade, ocorrem áreas de descontinuidade do sarcolema permitindo a passagem de substâncias do meio extracelular para o meio intracelular, como o íon cálcio, e de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, como a enzima creatinoquinase (CK); (ENGEL, YAMAMOTO, FISCHKBECK, 1994). Na DMD, o aumento do nível plasmático da CK é característico da fase inicial da doença. Durante os três primeiros anos de vida, os níveis de CK aumentam até atingirem um pico que coincide com o início do aparecimento dos primeiros sinais clínicos da patologia (ENGEL, YAMAMOTO, FISCHKBECK, 1994). Nos camundongos *mdx*,

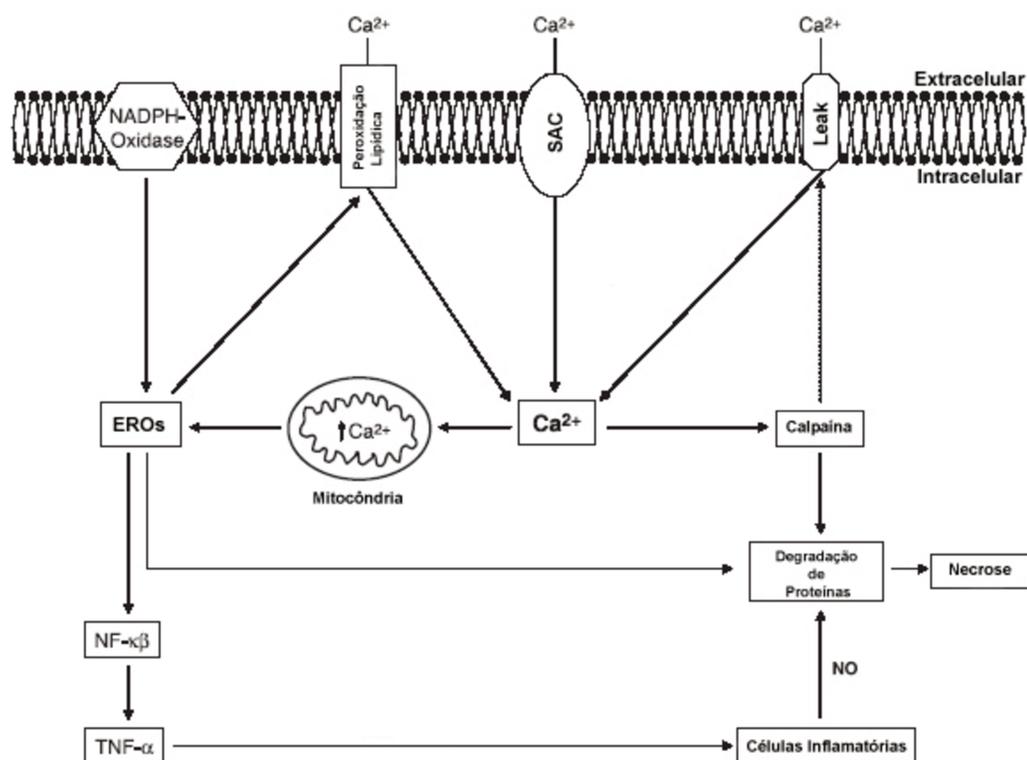
os níveis de CK são elevados durante grande parte da vida do animal (BULFIELD et al., 1984; ENGEL, YAMAMOTO, FISCHKHBECK, 1994; YOSHIDA et al., 2006).

A hipótese do cálcio sugere o envolvimento do CDG no funcionamento de canais iônicos da membrana e sua alteração provoca alteração no funcionamento destes canais. A passagem excessiva deste íon para o interior da fibra muscular provoca sobrecarga das mitocôndrias com conseqüente redução da síntese de ATP, ativação de proteases cálcio-dependentes e ativação de fosfolipases  $A_2$ , enzimas que digerem os fosfolipídeos da membrana, levando a um aumento das áreas de descontinuidade desta e permitindo a entrada de mais íons cálcio para o meio intracelular (para revisão ver GISSEL, 2005; WHITEHEAD, YEUNG, ALLEN, 2006). Devido a esta série de eventos, as fibras musculares distróficas sofrem degeneração e necrose (PETROF, 1998; ALDERTON, STEINHARDT, 2000; BATCHELOR, WINDER, 2006). Esta hipótese se confunde com a hipótese mecânica devido à interação existente entre os dois mecanismos.

Outra hipótese é a participação de fatores inflamatórios liberados por neutrófilos, macrófagos e citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; WHITEHEAD, 2006). Sugere-se que os músculos distróficos apresentam resposta inflamatória excessiva em conseqüência 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, SPENCER, TIDBALL, 2001; PORTER et al., 2002; HODGETTS et al., 2006).

Além dessas hipóteses, estudos suportam fortemente a importância do estresse oxidativo nas distrofinopatias (RANDO et al., 1998; NIEBROJ-DOBOSZ et al., 2002; RODRIGUEZ, TARNOPOLSKY, 2003; NAKAE et al., 2004). Há evidências de que o processo degenerativo nos músculos distróficos pode ser devido ao estresse oxidativo.

O acúmulo intracelular de íons cálcio conduz a uma captação anormal deste pela mitocôndria, resultando em uma produção elevada de EROs (BROOKES et al., 2004). Outra possibilidade de mecanismo de formação de EROs é através da NADPH-oxidase, a qual se tem conhecimento que produz rapidamente EROs durante o ciclo de relaxamento das células musculares lisas (GROTE et al., 2003). Recentemente, constatou-se a presença de subunidades de NADPH-oxidase no músculo estriado esquelético junto ao sarcolema (JAVESGHANI et al., 2002). Whitehead e colaboradores (2006) sugeriram que este complexo enzimático pode ser regulado pela distrofina ou por outras proteínas do CDG. Desta forma, sua função pode estar alterada nos músculos distróficos, levando a uma maior produção de EROs (Fig. 1).



**FIGURA 1:** Diagrama esquemático demonstrando as possíveis vias de degeneração na fibra muscular distrófica, pelo aumento de EROs e de cálcio intracelular; SAC (canal de cálcio ativado por estiramento); Leak (canal de cálcio do tipo L); NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear); TNF- $\alpha$ ; NO (óxido nítrico). Adaptado de Whitehead, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33, p.657-662, 2006.

### 1.3 Camundongo *mdx*

O camundongo *mdx* foi o primeiro modelo experimental da DMD e é o mais utilizado nos estudos relacionados a esta patologia (TANABE, ESAKI, NOMURA, 1986; HAMER et al., 2002; SASAOKA et al., 2003). Esta linhagem, denominada C57BL/10 *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) surgiu espontaneamente da linhagem C57BL/10 e foi descoberta ao acaso durante a realização de estudos sobre alterações nos glóbulos vermelhos (BULFIELD et al., 1984). Nestes animais, o nível plasmático da creatinoquinase (CK) mostrou-se elevado, sugerindo degeneração muscular (HOFFMAN, BROWN, KUNKEL, 1987). Posteriormente, foi confirmada a deficiência do gene responsável pela expressão da distrofina em virtude de alteração genética semelhante à ocorrida na DMD (SICINSKI et al., 1989). Nestes camundongos, a análise histológica de músculos estriados esqueléticos revelou a existência de degeneração e regeneração muscular, semelhante ao que ocorre em portadores da DMD (BULFIELD et al., 1984). No entanto, nos camundongos *mdx* os ciclos de regeneração muscular parecem compensar adequadamente a degeneração muscular. Estes animais apresentam menor acúmulo de tecido conjuntivo e menor perda funcional quando comparados à distrofínoptia desenvolvida em humanos (YABLONKA-REUVENI, ANDERSON, 2006).

Nos músculos de camundongos *mdx* os ciclos de degeneração/regeneração se iniciam efetivamente por volta dos 20 dias de idade. 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 et al., 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 et al., 1986). Com o passar do tempo, a capacidade de regeneração muscular diminui, provavelmente devido à exaustão das células satélites (LUZ, MARQUES, NETO, 2002), que são as células precursoras das células musculares e responsáveis pela regeneração muscular (para revisão ver DAWHAN, RANDO, 2005). Por volta dos 20 meses de idade estes animais apresentam substituição das fibras musculares degeneradas por tecido conjuntivo fibroso, as características histológicas de seus músculos tornam-se semelhantes às observadas em humanos e eles apresentam fraqueza muscular progressiva (LEFAUCHEUR, PASTORET, SEBILLE, 1995).

Outro ponto a ser destacado é que os músculos apresentam diferenças na evolução e na intensidade das lesões (PASTORET, SEBILLE, 1995; RADLEY, GROUNDS, 2006; MARQUES et al., 2008). Diferente da maioria dos músculos do animal distrófico, o diafragma apresenta uma patologia severa com degeneração progressiva, similar a progressão da DMD em humanos. Acredita-se que esta diferença é causada pelo trabalho contínuo do músculo para a respiração (STEDMAN et al., 1991) e pela diminuição da capacidade de regeneração após dano muscular (MATECKI et al., 2004).

#### **1.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)**

Atualmente, existe um crescente interesse no estudo do envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na patogênese das distrofinopatias.

A produção de EROs, entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas, tendo importante função biológica. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema antioxidante é composto por enzimas e substâncias protetoras não enzimáticas (ZWART et al., 1999). Alguns atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radicalares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os. Algumas 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 singlet e catalisando a dismutação do ânion radical superóxido, respectivamente (FRIDOVICH, 1998; FANG et al., 2002).

Os antioxidantes seqüestradores 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 seqüestrar radicais livres somente no meio aquoso, não podendo seqüestrar radicais lipofílicos localizados nas membranas celulares. Já o alfa-tocoferol é conhecido como um importante seqüestrador 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 et al., 2003).

Estes antioxidantes agem cooperativamente protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das EROs. No entanto, em condições de exaustão, é criado um estado de estresse oxidativo, levando a danos nestes sistemas. 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).

Em situação de estresse oxidativo, há um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e os pró-oxidantes, com a predominância destes últimos. Os mecanismos de defesa do organismo nesta situação podem não ser suficientes para conter tais espécies, havendo a necessidade de intervenção terapêutica a fim de se evitar a lesão oxidativa de moléculas biologicamente importantes (FANG et al., 2002; FREDSTROM, 2002). Dentre os efeitos deletérios atribuídos à formação de EROs podemos destacar: inativação de enzimas, peroxidação de lípidos da membrana celular, mutações no DNA mitocondrial e nuclear e modificação de proteínas (McCORD, 2000).

### **1.5 Espécies Reativas de Oxigênio e Músculo Distrófico**

Sabe-se também que as EROs possivelmente são mediadoras da lesão do músculo distrófico (WHITEHEAD, 2006). A hipótese de que as EROs estejam envolvidas na fisiopatologia das distrofias musculares foi inicialmente baseada nas similaridades entre as mudanças patológicas que ocorrem na DMD e mudanças que ocorrem no músculo sob diferentes condições de estresse oxidativo, como isquemia, exercício físico intenso e deficiência de vitamina E (MURPHY, KEHRER, 1989; IRINTCHEV, WERNIG, 1987; MENDELL et al.,

1971). Foram observadas alterações bioquímicas no músculo distrófico que são características de lesão oxidativa (RAGUSA et al., 1997; HAYCOCK et al., 1996; HAUSER et al., 1995; MURPHY, KEHRER, 1989). O aumento do estresse oxidativo na DMD é indicado: pelo aumento da excreção do 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine, indicativo de lesão oxidativa no DNA (RODRIGUEZ, TARNOPOLSKY, 2003); por alterações nas proteínas (NIEBROJ-DOBOSZ et al., 2002), indução de enzimas antioxidantes (MECHLER et al., 1984) e acúmulo de lipofuscina no músculo distrófico (NAKAE et al., 2004). Outro ponto a ser destacado é que as células distróficas são especificamente mais sensíveis à lesão por estresse oxidativo do que células musculares normais (RANDO et al., 1998). Além disso, evidências indicam uma associação entre o CDG e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (BRENMAN et al., 1996; CHANG et al., 1996; BRENMAN et al., 1995), enzima envolvida no metabolismo do radical livre NO·.

Além disso, outro fator importante é que se observou que o aumento da produção das EROs, no período que antecede a qualquer necrose no camundongo *mdx*, promove peroxidação lipídica da membrana (DISATNIK et al., 1998). Desta forma, sugere 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 (BORNMAN et al., 1998).

As EROs podem causar lesão muscular através de efeitos diretos nas proteínas e na membrana da fibra muscular (peroxidação lipídica), como através da ativação de moléculas pró-inflamatórias (WHITEHEAD et al., 2006). Tradicionalmente, considera-se que os oxidantes exerçam seu efeito via ação tóxica direta sobre as células alvo. Contudo, estudos recentes têm sugerido sua contribuição na indução de genes. As EROs têm sido relacionadas à ativação do

fator nuclear de transcrição NF-KB nos camundongos *mdx*, uma vez que a ativação deste fator pode ser prevenida pelo antioxidante N-acetilcisteína (KUMAR, BORIEK, 2003). Sustentando ainda a ativação do fator NF-KB por EROs, experimentos constataram o aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias reguladas por este fator de transcrição, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina IL-1 $\beta$ , nos músculos de camundongos *mdx* antes do período necrótico (KUMAR, BORIEK, 2003). Sugere-se que o aumento anormal de TNF- $\alpha$  promove fraqueza muscular também em outras doenças (ZHAO, ZENG, 1997; NAKASHIMA et al., 1998). Considera-se também que o TNF-  $\alpha$  é um dos mais importantes indutores de NF-KB, contribuindo para um feedback positivo (MESSINA et al., 2006).

As evidências sugerem que as EROs podem estar envolvidas no processo distrófico, acionando uma cascata inflamatória que conduz a ativação do fator NF-KB e subsequente liberação de mediadores inflamatórios. Segundo Messina e colaboradores (2006), a interrupção desta cascata pode ter um potencial efeito terapêutico.

## 1.6 N-Acetilcisteína

N-Acetilcisteína (NAC) é um tiol, composto precursor da L-cisteína e glutathiona reduzida nas células (ZAFARULLAH et al., 2003). É uma fonte de grupos sulfidril e removedores de substâncias reativas com o oxigênio (OH- e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), geradas pela reação dos peroxinitritos, como o NO e superóxidos (ARUOMA et al., 1989). NAC tem demonstrado efeito protetor na disfunção endotelial e inflamação, no tratamento pela desintoxicação ao paracetamol e na diminuição da lesão provocada pelo tempo de isquemia do enxerto e dos níveis de malondialdeído (MDA) em pacientes renais crônicos (ZAFARULLAH et al., 2003).

NAC tem sido empregado no estudo de lesão por contraste iodado, pelo uso de drogas nefrotóxicas e na insuficiência renal crônica (TEPEL, 2000; DRAGER et al., 2004; SHIMIZU et al., 2005) e como mucolítico no tratamento da bronquite crônica e outras patologias pulmonares (ZUIN et al., 2005).

Muitos estudos têm demonstrado sua função antioxidante, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias, por inibir o estresse oxidativo, a liberação de TNF- $\alpha$  e a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, entre outros efeitos (ZAFARULLAH et al., 2003).

Efeitos benéficos do NAC foram relatados nos músculos distróficos. A diminuição do nível de radicais livres foi observada no músculo cardíaco de camundongos *mdx*, tornando-o semelhante ao observado em animais controle (WILLIAMS, ALLEN, 2007). O uso de NAC também preveniu o aumento da permeabilidade da membrana e reduziu o déficit de força associado com dano muscular induzido por estiramento nos camundongos distróficos (WHITEHEAD, 2008).

## **2.0 OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Verificar se o tratamento com NAC, antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração, diminui a degeneração muscular em camundongos *mdx*.
- 2) Quantificar o conteúdo de TNF- $\alpha$  após tratamento com NAC.
- 3) Quantificar a peroxidação lipídica (4-Hydroxynonenal – 4-HNE) após tratamento com NAC.

### **3.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Animais

Utilizamos 40 camundongos das linhagens *mdx* e C57BL/10 (camundongos heterozigotos para o gene que desencadeia a distrofia muscular de Duchenne e que deram origem à linhagem *mdx*), de ambos os sexos, com 14 dias de vida pós-natal, obtidos de casais mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia. As matrizes são oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 25º dia de vida pós-natal sendo posteriormente separados. Durante todo o experimento, mantivemos os animais em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água *ad libitum*.

Desenvolvemos os protocolos experimentais 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 (CEEA-IB/UNICAMP).

### 3.2 Protocolo Experimental

#### 3.2.1 Camundongos *mdx* (n=30)

Dividimos os animais em dois grupos experimentais: *mdx* tratado com NAC (*mdxN*, n=15), e *mdx* tratado com solução salina (*mdxS*, n=15).

Realizamos a análise morfológica (coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e azul de Evans (AE)) nos músculos Esternomastóide (STN), Tibial Anterior (TA) e Diafragma (DIA) de 5 animais de cada grupo.

Realizamos a análise bioquímica e por western blotting em outros 10 animais de cada

grupo. Para tanto, retiramos amostras de sangue para avaliar a concentração de creatina quinase (CK) e utilizamos os músculos STN, TA e DIA para quantificar o conteúdo de TNF- $\alpha$  e 4-HNE.

### **3.2.2 Camundongos C57BL/10 (n=10)**

Utilizamos os animais deste grupo (CTRL) para as análises bioquímica e western blotting. Retiramos amostras de sangue para avaliar a concentração de creatina quinase (CK) e utilizamos os músculos STN, TA e DIA para quantificar o conteúdo de TNF- $\alpha$  e 4-HNE.

### **3.3 Tratamento com NAC**

A partir do 14<sup>o</sup> dia de vida pós-natal, pesamos os camundongos *mdx* diariamente e os animais do grupo *mdxN* receberam por injeção intraperitoneal doses diárias de 150mg/kg de NAC diluído em salina (WANG et al., 2006; LIU et al., 2007) até completarem 28 dias de idade. O grupo *mdxS* recebeu salina, pela mesma via e período.

### **3.4 Análise Histológica**

Doze horas antes do sacrifício, pesamos os animais e injetamos (por via intraperitoneal) 0,1 ml de uma solução a 1% de AE para cada 10g de camundongo, (solução em PBS: 14g de fosfato de sódio monofásico, 4,3 g de fosfato de potássio dibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em um litro de água destilada; ph 7,5; HAMER et al., 2002; MATSUDA et al., 1995). Após o tempo acima referido, anestesiemos os animais por via intra-peritoneal 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. Retiramos os músculos STN, DIA e TA, congelamos

em isopentano resfriado a  $-159^{\circ}\text{C}$  (nitrogênio líquido) e armazenamos em biofreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para obtenção dos cortes em criostato (Microm®-HS505E) os músculos foram mantidos a  $-23^{\circ}\text{C}$ , seccionados transversalmente na espessura de  $0,8\ \mu\text{m}$  e coletados em lâmina. Obtivemos 06 lâminas com 12 cortes dos músculos STN, DIA e TA dos referidos grupos experimentais. Dessas, 03 foram banhadas com acetona por 15 minutos e posteriormente montadas em meio de montagem DABCO (Sigma) para fluorescência para visualização das fibras coradas com AE. As restantes coramos com HE, e montamos em resina.

Para a verificação da penetração do AE nas fibras musculares, analisamos dois cortes de cada músculo em microscópio óptico de fluorescência (Nikon). Quantificamos o número de fibras coradas e expressamos em porcentagem em relação ao número total de fibras da mesma secção.

Observamos as lâminas coradas com HE em microscópio de luz. Avaliamos o número de fibras que apresentaram núcleo central (indicativo de fibras musculares regeneradas; TORRES, DUCHEN, 1987), de fibras com núcleo periférico (característica de fibras normais) e delimitamos as áreas de inflamação / regeneração (Infl/Reg) e as áreas de regeneração (Reg). A contagem da população de fibras foi obtida através de um retículo de cem pontos acoplado à ocular do microscópio em objetiva de 40X, com auxílio de um contador manual. Contamos todas as fibras dos cortes (fibras normais e regeneradas) 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. Para delimitarmos as áreas Infl/Reg e Reg, capturamos as imagens por uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio. Analisamos as imagens pelo programa Image-Pro Express. Obtivemos a área total da secção transversal de cada músculo por meio da soma das partes fotografadas. Submetemos os resultados obtidos ao Teste t de Student.

### 3.5 Determinação da atividade de creatina-quinase (CK)

Determinamos a atividade de CK no soro dos animais dos grupos CTRL, *mdxN* e *mdxS*. Após anestesia (protocolo descrito no item 3.4), coletamos amostras de sangue por punção cardíaca e centrifugamos (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18k) a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Utilizamos o soro obtido para determinar a atividade de CK através do kit CK Nac Cinético Crystal da Bioclin. Lemos as absorbâncias das amostras a 25°C utilizando 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. Expressamos os valores em U/L.

### 3.6 Quantificação de TNF- $\alpha$ e 4-HNE

Após retirada do sangue, perfundimos os animais com PBS, removemos e cortamos os músculos STN, DIA e TA em pequenos pedaços, que foram homogeneizados imediatamente em 2 ml de tampão para homogeneização (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. Centrifugamos os extratos a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e utilizamos o sobrenadante para análise do extrato total. Realizamos a determinação de proteína pelo método de BRADFORD e colaboradores (1976). Tratamos as amostras do extrato protéico com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotretiol 100mM, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, aplicamos 30  $\mu$ g de proteína em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Realizamos a eletrotransferência do

gel para a membrana de nitrocelulose em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. Incubamos as membranas com solução basal (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. Posteriormente, incubamos com 10µg de anticorpo primário (anti-TNF- $\alpha$  policlonal, Milipore, AB2148P ou 4-HNE, Santa Cruz Biotechnology: sc-130083) diluído em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, lavamos as membranas por 30 minutos com solução basal e incubamos em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG Peroxidase labeled para o TNF- $\alpha$  e rabbit anti-goat IgG Peroxidase labeled para o 4-HNE) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, lavamos as membranas novamente por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce) por 5 minutos, seguido de exposição a um filme Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, N.Y, USA). Escaneamos as densidades das bandas e das amostras sobre o filme e “salvamos” em discos de computador para quantificação da densitometria ótica, usando um scanner e o programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

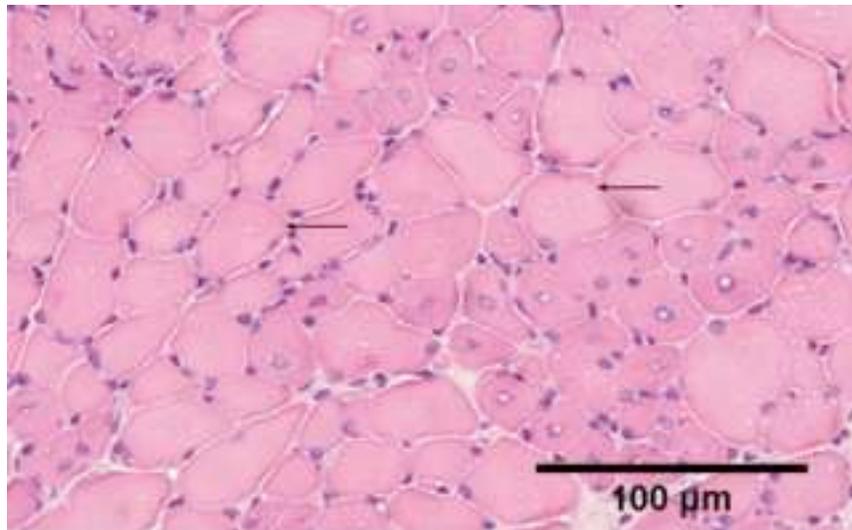
Para a normalização dos dados obtidos realizamos o controle interno através da incubação das amostras com o anticorpo primário GAPDH (FL-335, rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology). O protocolo consiste na reutilização das membranas utilizadas para detecção do TNF- $\alpha$  e 4-HNE. Para tanto, as referidas lavamos as membranas com TBS-T (solução basal) 3 vezes, por 10 minutos. Em seguida, incubamos com 10 mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7.5;  $\beta$ -Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1 hora, à 60°C. Após esse período, re-

equilibramos as membranas e lavamos com TBS-T. A seguir, incubamos com 10 $\mu$ g do anticorpo primário GAPDH e 2,5 $\mu$ g do anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG Peroxidase labeled), seguindo o protocolo descrito para detecção de TNF- $\alpha$  e 4-HNE.

## **4.0 RESULTADOS**

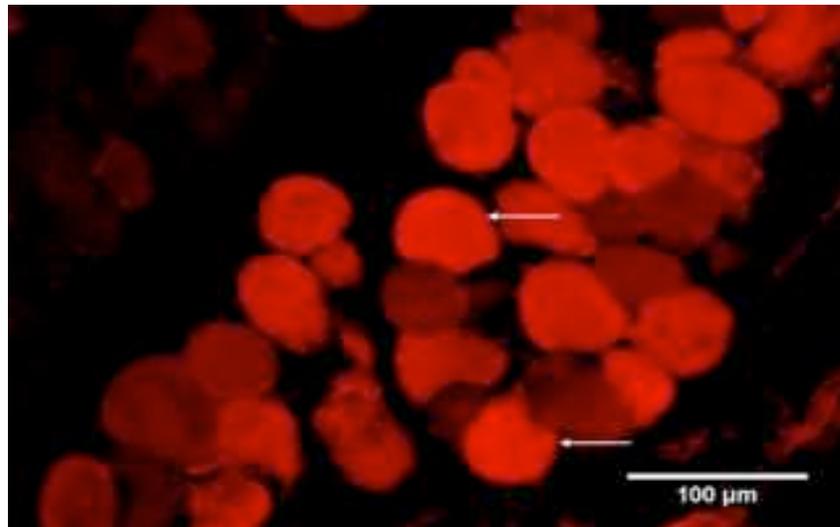
#### 4.1 Análise qualitativa

Os músculos STN, DIA e TA dos 2 grupos experimentais (*mdxN* e *mdxS*) demonstraram fibras musculares com diferentes características histológicas. Observamos áreas com fibras em degeneração, áreas com fibras em diferentes estágios de regeneração e áreas com fibras que ainda não haviam passado por nenhum destes processos (fibras com núcleo periférico). As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com as outras fibras de mesma característica (Fig. 2).



**FIGURA 2.** Secção transversal do músculo distrófico (TA) do grupo *mdxS* mostrando fibras com núcleo periférico (setas). Coloração HE.

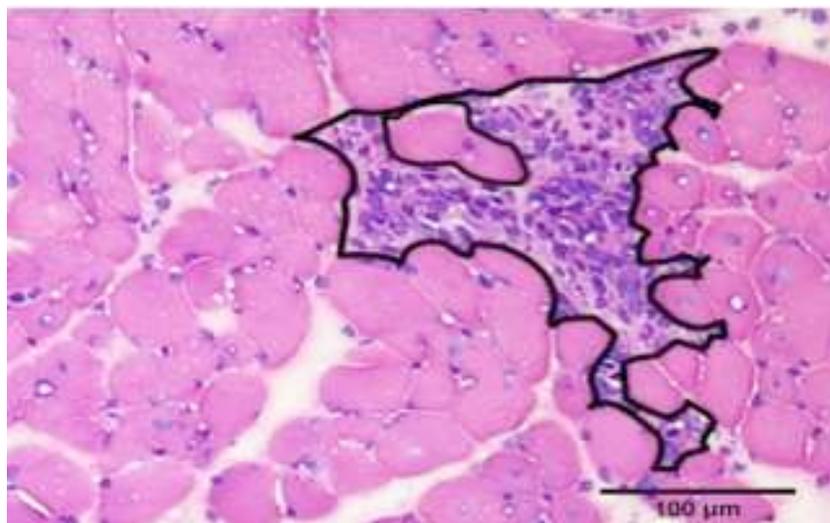
Evidenciamos as fibras com alteração da permeabilidade do sarcolema ou em degeneração pela presença de azul de Evans (AE) no seu interior (Fig. 3).



**FIGURA 3.** Secção transversal do músculo STN do grupo *mdxN* mostrando fibras necróticas marcadas pelo AE (setas).

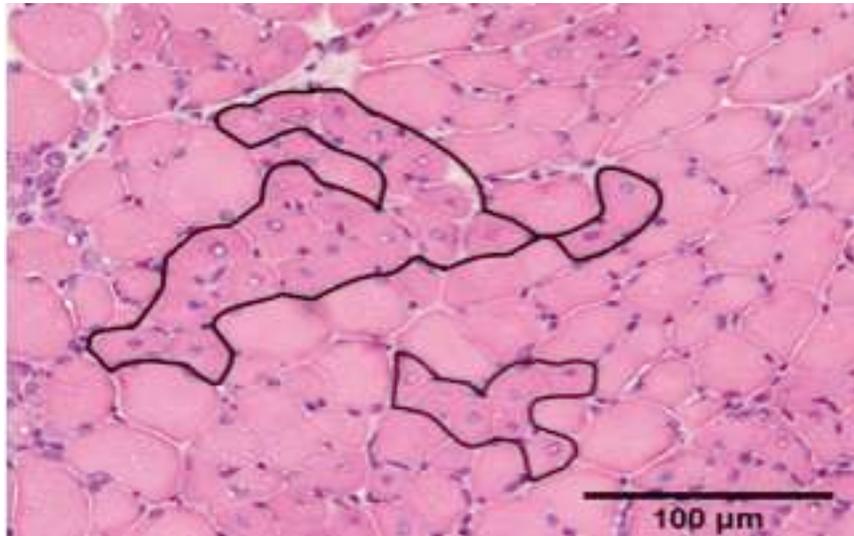
Classificamos as fibras musculares em regeneração em dois estágios, de acordo com as suas características morfológicas e a celularidade local:

1) Áreas de Inflamação / Regeneração (Infl/Reg), apresentando fibras no estágio inicial de regeneração, caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade (Fig. 4).



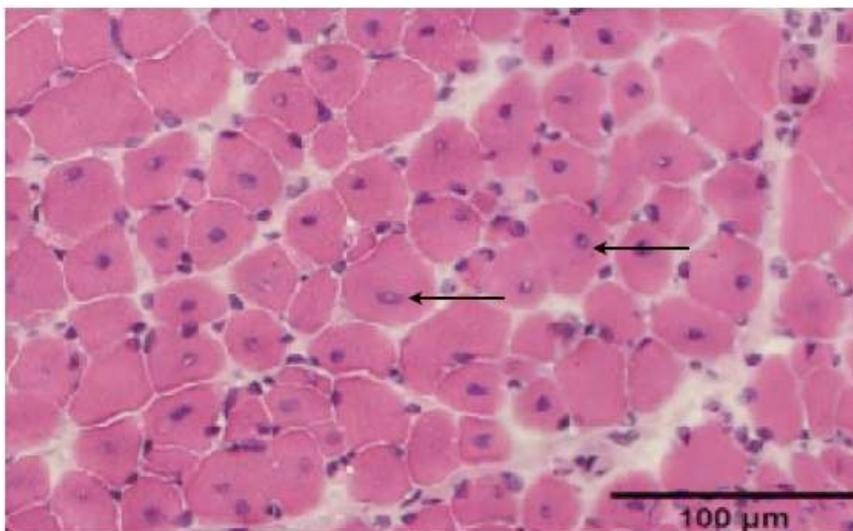
**FIGURA 4.** Secção transversal do músculo STN do grupo *mdxN* mostrando fibras no estágio inflamação / regeneração (em destaque). Coloração HE.

2) Áreas de Regeneração (Reg), que apresentam fibras em um estágio mais avançado de regeneração, caracterizadas por citoplasma levemente basófilo, núcleo central, maior proporção de citoplasma em relação ao volume nuclear e diminuição aparente do infiltrado inflamatório, em áreas de menor celularidade (Fig. 5).



**FIGURA 5.** Secção transversal do músculo TA do grupo *mdxN* mostrando fibras no estágio de regeneração (em destaque). Coloração HE.

Caracterizamos as fibras regeneradas pelo núcleo centralizado, condensado, citoplasma eosinófilo e diâmetro da fibra muscular próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico (Fig. 6).



**FIGURA 6.** Seção transversal do músculo TA do grupo *mdxN* mostrando fibras regeneradas com núcleo central (setas). Coloração HE.

#### 4.2 Análise quantitativa

Para análise quantitativa dos grupos experimentais, utilizamos as seguintes variáveis:

1) Porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans (%AE), porcentagem de fibras com núcleo central (%NC) e porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP), em relação ao número total de fibras dos músculos STN, DIA e TA (Tabela 1).

**Tabela 1. Comparação entre a porcentagem de fibras com núcleo central, fibras com núcleo periférico e fibras marcadas pelo azul de Evans dos músculos STN, DIA e TA entre os grupos *mdxS* e *mdxN*.**

	<i>mdx</i>	%NC	%NP	%AE
STN	NAC	11.48 ± 4.88	84.44 ± 4.35	4.08 ± 1.41*
	SAL	9.91 ± 4.20	82.61 ± 5.06	7.48 ± 1.61
DIA	NAC	3.71 ± 1.64*	95.78 ± 1.82	0.51 ± 0.34*
	SAL	1.60 ± 0.43	97.24 ± 0.94	1.16 ± 0.57
TA	NAC	1.33 ± 1.02*	97.00 ± 1.82*	1.67 ± 1.68*
	SAL	5.32 ± 3.14	90.03 ± 6.18	4.65 ± 3.31

%NC, porcentagem de fibras regeneradas com núcleo central; %NP, porcentagem de fibras com núcleo periférico; %AE, porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans. \*Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle,  $p < 0.05$ ; Teste T de Student.

Diferença significativa ( $p < 0.05^*$ ) da porcentagem de fibras positivas ao AE foi observada nos músculos STN, DIA e TA do grupo *mdxN* comparado com os animais do grupo *mdxS*. No STN do grupo tratado verificamos  $4.08 \pm 1.41\%$  de fibras positivas ao AE enquanto que no controle havia  $7.48 \pm 1.61\%$ . No DIA e no TA, os valores do grupo tratado foram  $0.51 \pm 0.34\%$  e  $1.67 \pm 1.68\%$  comparados a  $1.16 \pm 0.57\%$  e  $4.65 \pm 3.31\%$  do grupo controle, respectivamente. Em relação às fibras com NC, o grupo tratado apresentou  $11.48 \pm 4.88\%$ ,  $3.71 \pm 1.64\%$  e  $1.33 \pm 1.02\%$  destas fibras nos músculos STN, DIA e TA, comparadas a  $9.91 \pm 4.20\%$ ,  $1.60 \pm 0.43\%^*$  e  $5.32 \pm 3.14\%^*$  encontradas no grupo controle. Em relação as fibras com NP, observou-se diferença estatística significativa apenas no TA, sendo o valor  $97.00 \pm 1.82\%$  para o *mdxN*, e  $90.03 \pm 6.18\%$  para o *mdxS*.

2) Analisamos a porcentagem da área em inflamação / regeneração (%Infl/Reg) e porcentagem da área em regeneração (%Reg), em relação a área total de seção transversal do terço médio dos músculos STN, DIA e TA (Tabela 2).

**Tabela 2. Comparação entre a porcentagem da área de fibras em estágio inicial e avançado de regeneração entre os grupos *mdxN* e *mdxS*, dos músculos STN, DIA e TA.**

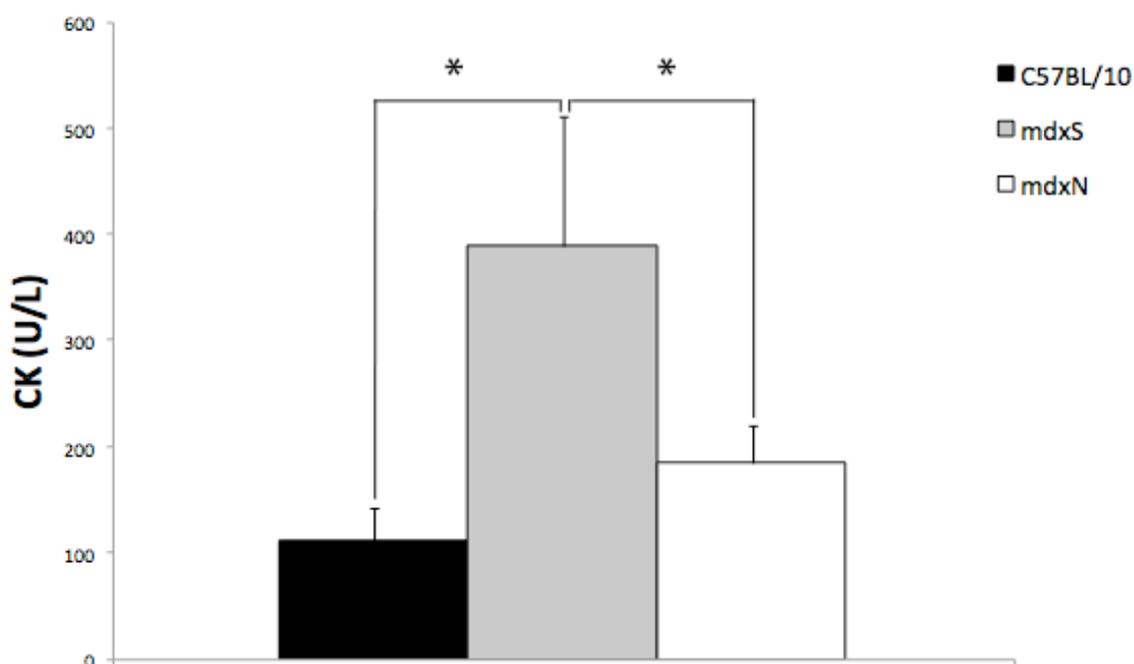
	<i>mdx</i>	%Infl/Reg	%Reg
STN	NAC	6.13 ± 3.07*	31.02 ± 10.46*
	SAL	14.68 ± 7.57	10.28 ± 4.76
DIA	NAC	11.30 ± 4.04*	2.37 ± 0.92*
	SAL	31.53 ± 5.28	0.86 ± 0.48
TA	NAC	14.14 ± 16.10	21.09 ± 17.82
	SAL	15.49 ± 8.21	19.39 ± 14.59

**%Infl/Reg**, porcentagem da área total que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; **%Reg**, porcentagem da área total em estágio avançado do processo de regeneração. \*Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle,  $p < 0.05$ ; Teste T de Student.

Diferença estatística significativa ( $p < 0.05^*$ ) da %Infl/Reg, e %Reg foi observada nos músculos STN e DIA, entre os grupos tratado e controle. No STN, verificamos  $6.13 \pm 3.07$  %Infl/Reg no grupo tratado comparado a  $14.68 \pm 7.57\%$  no grupo controle. O grupo tratado apresentou  $31.02 \pm 10.46$  em %Reg, em relação a  $10.28 \pm 4.76\%$  do grupo controle. No DIA, verificamos  $11.30 \pm 4.04$  %Infl/Reg no grupo tratado comparado a  $31.53 \pm 5.28\%$  do grupo controle. O grupo tratado apresentou  $2.37 \pm 0.92$  %Reg em relação a  $0.86 \pm 0.48\%$  do grupo controle. No TA, esta análise não demonstrou diferença estatística significativa.

### 4.3 Níveis de creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo

Os valores de CK total encontrados no plasma sanguíneo (Fig. 7), expressos em U/L, foram  $111.30 \pm 31.03$ ,  $389.10 \pm 121.57$  e  $184.84 \pm 35.15$  para os animais dos grupos C57BL/10, *mdxS* e *mdxN*, respectivamente. Observou-se diferença estatística significativa entre os grupos C57BL/10 e *mdxS*, e entre os grupos *mdxS* e *mdxN* ( $p < 0.05$ , teste T de Student).

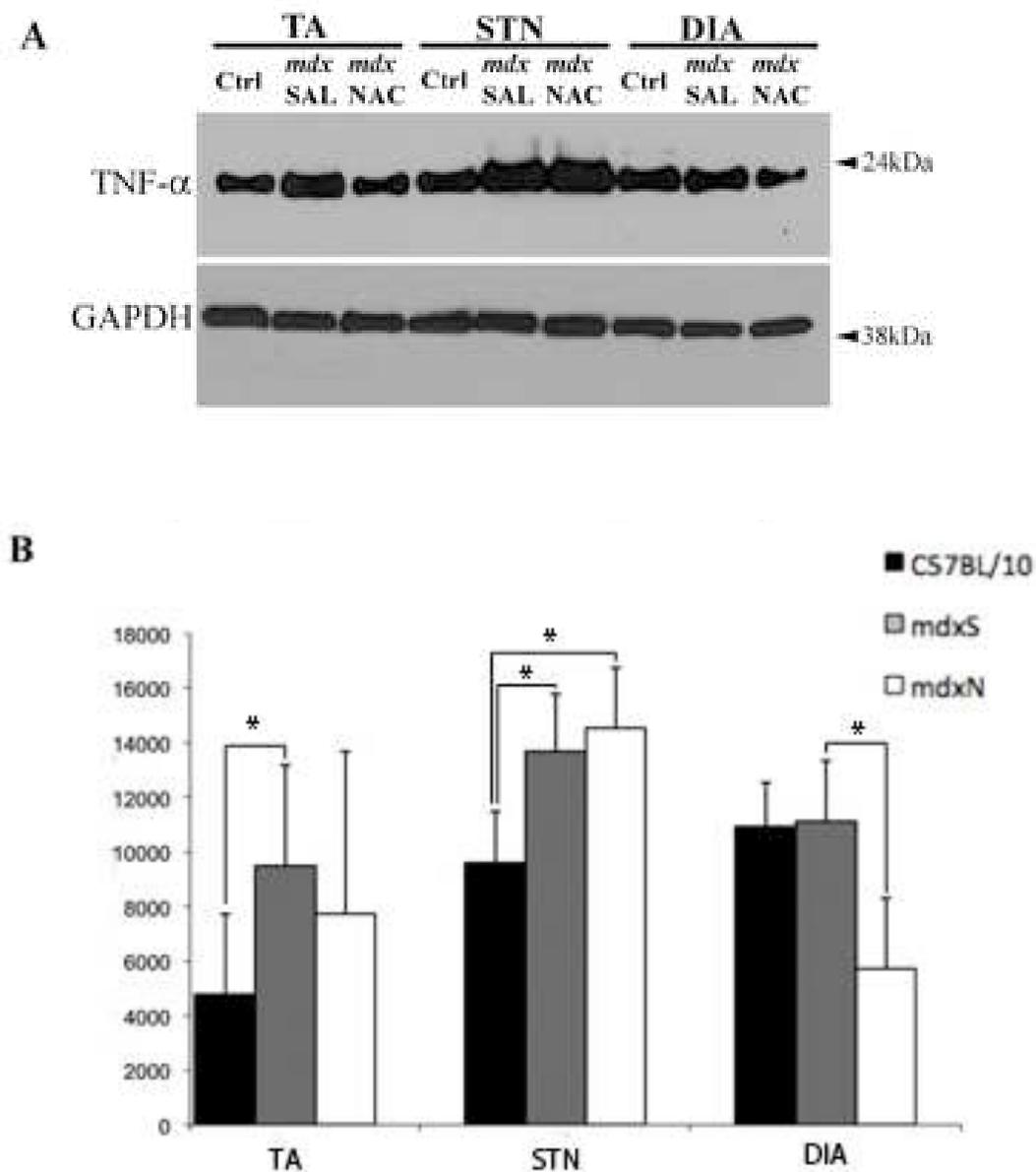


**FIGURA 7.** CK, creatina-quinase; C57BL/10, grupo de camundongos controle; *mdxS*, grupo de camundongos *mdx* injetados com salina; *mdxN*, grupo de camundongos *mdx* tratados com NAC. \* $p < 0.05$ ; Teste T de Student.

## 4.4 Immunoblotting

### 4.4.1 – TNF- $\alpha$

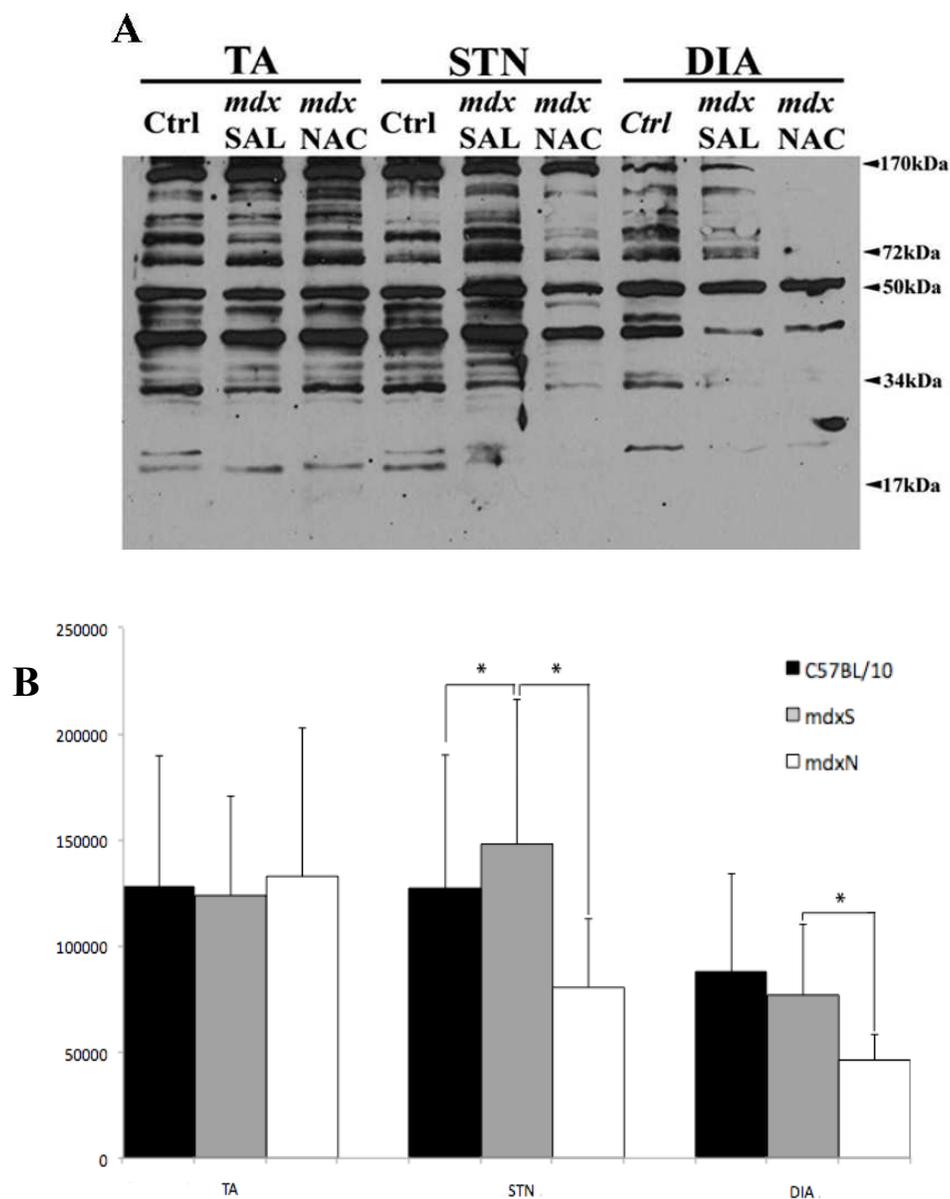
A análise do immunoblotting do TNF- $\alpha$  (Fig. 8A) demonstrou aumento desta proteína nos músculos TA, STN E DIA dos animais *mdxS* em relação aos animais C57BL/10 (controle). Nos músculos TA e STN, este aumento foi significativo. Comparando os grupos *mdxS* e *mdxN*, observamos diminuição do conteúdo de TNF- $\alpha$  nos músculos TA e DIA dos animais tratados com NAC, sendo esta diminuição significativa no músculo DIA (Fig. 8B). No músculo STN do grupo tratado com NAC, observamos aumento significativo do conteúdo de TNF- $\alpha$ , comparado ao grupo que recebeu salina.



**FIGURA 8.** (A) Western Blotting; observam-se as bandas imunoreativas para o TNF- $\alpha$ ; C57BL/10, grupo controle; *mdx*S, grupo *mdx* injetado com salina; *mdx*N, grupo *mdx* tratado com NAC; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma. (B) Intensidade de pixels do TNF-  $\alpha$ . \* $p < 0.05$ ; Teste T de Student.

#### 4.4.2 – 4-HNE

A análise do imunoblotting para o 4-HNE não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais no músculo TA. Nos músculos STN e DIA, observamos diminuição significativa no conteúdo de 4-HNE após o tratamento com NAC (Fig. 9).



**FIGURA 9:** (A) Western Blotting; observam-se as bandas imunoreativas para o 4-HNE; C57BL/10, grupo controle; *mdxS*, grupo *mdx* injetado com salina; *mdxN*, grupo *mdx* tratado com NAC; TA, músculo

tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma. (B) Intensidade de pixels do 4-HNE. \* $p < 0.05$ ; Teste T de Student.

## **5.0 DISCUSSÃO**

### 5.1 Degeneração e Regeneração Muscular

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. O corante 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 (MARQUES et al., 2008; MATSUDA et al., 1995).

Utilizando a marcação com AE, verificamos que os resultados obtidos referentes a mionecrose nos músculos STN, DIA e TA para os camundongos *mdx* estão de acordo com a literatura (PAGEL, PARTRIDGE, 1999; WEHLING-HENRICKS et al., 2004; MARQUES, 2008). Os músculos STN, DIA e TA dos grupos *mdxS* e *mdxN* apresentam, no período analisado, fibras positivas ao AE. Segundo Shavlakadze e colaboradores (2004), observa-se alto nível de necrose muscular no músculo tibial anterior de camundongos distróficos entre 21 e 28 dias de idade. A fase aguda de necrose neste período providencia um modelo excelente para o estudo de intervenções terapêuticas designadas para prevenir ou reduzir a necrose, uma vez que a redução será facilmente identificada (RADLEY, GROUNDS, 2006).

Experimentos com músculos isolados de camundongos *mdx* demonstraram que NAC previne o aumento da permeabilidade da membrana e reduz o déficit de força associado com dano muscular induzido por estiramento (WHITEHEAD, 2008). Em nossos experimentos verificamos diminuição significativa da mionecrose nos músculos STN, DIA e TA do grupo *mdxN* em relação ao grupo *mdxS*, evidenciado por menor porcentagem de fibras positivas ao AE.

Observamos que o músculo STN do grupo *mdxN* apresenta diminuição de mais de 50%, seguido pelos músculos DIA (43%) e TA (35,9%), quando comparados a porcentagem de fibras positivas ao AE dos músculos *mdxS*.

A presença de núcleo central nas fibras musculares é um indicador de regeneração após a degeneração (McGEACHIE et al., 1993). Após 2 semanas de tratamento, nossos resultados demonstraram redução na porcentagem de fibras com núcleo centralizado e concomitante diminuição de fibras com núcleo periférico no músculo TA dos animais tratados com NAC quando comparados ao grupo que recebeu salina. Camundongos *mdx* tratados com NAC por 6 semanas apresentaram uma redução significativa do número de fibras com núcleo central no músculo extensor longo dos dedos, demonstrando a diminuição da progressão da doença (WHITEHEAD et al., 2008).

Outro parâmetro utilizado para a observação da regeneração muscular foi a análise das áreas de Inflamação/Regeneração e Regeneração. Nos músculos STN e DIA do grupo *mdxN* houve redução significativa na porcentagem da área de Infl/Reg e aumento significativo na %Reg. Estes dados demonstram que o tratamento com NAC diminui a área de inflamação e ao mesmo tempo não prejudica o processo de regeneração muscular. Uma explicação para este resultado pode estar relacionada ao fator nuclear de transcrição NF-KB, cujo nível está elevado em músculos de pacientes distróficos (MONICI et al., 2003) e de camundongos *mdx* (MESSINA et al., 2006). Recentes trabalhos demonstram que a ativação do fator NF-KB bloqueia a capacidade de regeneração dos músculos e também promove a inflamação e necrose muscular por sinalizar a ativação de macrófagos (ACHARYYA, et al., 2007). Desta forma a inibição deste fator teria um efeito benéfico sobre as fibras musculares distróficas. A ativação deste fator é causada por uma variedade de estímulos celulares, incluindo as espécies reativas de oxigênio.

Sugerimos que o tratamento com o antioxidante NAC reduziu o nível de NF-KB em nossos experimentos. Reforçando nossa idéia, estudos demonstraram significativa redução da atividade de NF-KB em camundongos *mdx* ou normais tratados com antioxidantes, dentre os quais o NAC (FARID et al., 2005; MESSINA et al., 2006; HNIA et al., 2007, WHITEHEAD et al., 2008).

Uma observação interessante do presente trabalho diz respeito à diferença das respostas dos músculos estudados. 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 (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). Possivelmente, a diferença observada na degeneração e mionecrose nos músculos estudados é consequência dos diferentes momentos em que cada músculo apresenta os ciclos de degeneração/regeneração (PASTORET, SEBILLE, 1995; MARQUES et al., 2008) e das diferentes respostas dos músculos aos fármacos utilizados, assim como relatado em estudos anteriores (RADLEY, GROUNDS, 2006; MARQUES et al., 2008).

## **5.2 Níveis Plasmáticos de Creatina Quinase**

O cérebro, os músculos liso, cardíaco e esquelético são as principais fontes teciduais de creatina quinase (CK). A CK é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo fosfato entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP). Os produtos desta reação são a creatina, que

pode ser reaproveitada pela célula, e a adenosina trifosfato (ATP), que se encontra disponível para reações dependentes de energia na célula. Os valores de CK no soro se alteram em várias condições clínicas associadas à lesão muscular aguda ou ao esforço muscular intenso. Os níveis de CK encontram-se altos após a realização de atividade física, de cirurgias e crises convulsivas, bem como em indivíduos portadores de doenças neuromusculares, como miosite e distrofia muscular (KATIRJI, 2001).

Embora seja um dos parâmetros mais indicados para o diagnóstico de lesões musculares (GROUNDS et al., 2008), o nível sérico da CK pode apresentar considerável variação individual. Assim, os valores de CK devem servir apenas como uma análise complementar para o diagnóstico e acompanhamento da evolução das doenças neuromusculares.

Na DMD, a concentração de 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 (BULFIELD et al., 1984; YOSHIDA et al., 2006).

No presente trabalho, os camundongos *mdx* tratados com NAC apresentaram diminuição nos valores de CK quando comparados aos camundongos *mdx* que receberam apenas solução salina. Este dado é coerente com os resultados obtidos quanto à degeneração muscular, uma vez que observamos que o tratamento com NAC diminuiu a porcentagem de fibras positivas ao AE nos músculos STN, DIA e TA. Isto sugere que o estresse oxidativo é um fator importante na degeneração muscular do camundongo *mdx* e que o tratamento com NAC atenua a degeneração no músculo distrófico. Corroborando com este dado, foi demonstrado que o pré-tratamento com NAC diminuiu a atividade de CK em ratos com lesão do miocárdio induzida por isoproterenol (LIU et al., 2009).

### 5.3 TNF- $\alpha$

A resposta inflamatória crônica é um sinal típico da distrofia muscular e pode ser um mecanismo que contribui fortemente na progressão da patologia (PORTER et al., 2002). Secções de músculos de camundongos *mdx* coradas com HE revelaram áreas densamente agrupadas com intensas células marcadas, as quais possivelmente são células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos. Essas células são conhecidas por produzir concentrações substanciais de EROs através do complexo NADPH oxidase (NGUYEN, TIDBALL, 2003).

Entre as várias citocinas pró-inflamatórias, um papel importante e principal pode ser atribuído ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), envolvido em doenças que promovem fraqueza muscular (REID, LI, 2001; STEWART et al., 2004). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória expressa por células inflamatórias, mioblastos, miotubos e músculo esquelético lesado (COLLINS, GROUNDS, 2001; KURU et al., 2003). É também produzido por tecido adiposo (WEISBERG et al., 2003; FRUHBECK, 2004), o qual é frequentemente pronunciado na DMD. Em resposta a menor lesão muscular, o TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  e de neutrófilos, no início do dano sarcolemal conduz a necrose das fibras musculares distróficas. Reforçando esta hipótese, o bloqueio *in vivo* do TNF- $\alpha$  por cromoglicato de sódio, prevenindo a degranulação de mastócitos (que liberam altos níveis de TNF- $\alpha$ ; RADLEY, GROUNDS, 2006), depleção de neutrófilos hospedeiros, bloqueio da função do TNF-  $\alpha$  com Enbrel (HODGETTS et al., 2006) ou com Remicade (GROUNDS, TORRISI, 2004) protege os camundongos *mdx* da necrose muscular.

No presente projeto verificamos um aumento de TNF- $\alpha$  nos músculos dos camundongos do grupo *mdxS* comparados aos animais controle (C57/BL/10). Este nosso resultado está de acordo com outros trabalhos que constataram o aumento do TNF- $\alpha$  nos músculos de camundongos *mdx* (KUMAR, BORIEK, 2003; PIERNO et al., 2007). Também em músculos de pacientes distróficos foram encontradas fibras positivas ao TNF- $\alpha$  (KURU et al., 2003). Com relação ao tratamento com NAC, verificamos que os animais tratados com o referido antioxidante apresentam efeitos diferentes na concentração de TNF- $\alpha$  nos músculos analisados. Nos músculos TA e DIA houve redução do TNF- $\alpha$ , embora a diminuição significativa fosse observada somente no músculo DIA. Outros trabalhos também apresentaram diminuição do TNF- $\alpha$  após tratamento com NAC. Em animais com colite induzida, tratamento com NAC diminuiu significativamente o nível de EROS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (YOU et al., 2009). NAC exerceu efeito cardioprotetor no miocárdio de ratos lesados com isoproterenol, reduzindo o nível de expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (LIU et al., 2009). Também foi sugerido que NAC pode amenizar as lesões estruturais e funcionais provocadas no coração durante a morte cerebral, por inibir a expressão do fator NF-KB e diminuir a liberação de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  (ZHAI et al., 2009).

Outro ponto que deve ser destacado com relação ao TNF- $\alpha$  é a sua relação com o fator NF-KB. O NF-KB está envolvido na regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e interleucina IL-1 $\beta$ . Considera-se também que o TNF- $\alpha$  é um dos mais importantes indutores de NF-KB, contribuindo para um feedback positivo (MESSINA et al., 2006). Desta forma, a diminuição da expressão do TNF- $\alpha$ , após tratamento com NAC observada em nossos experimentos, reforça nossa hipótese de que também houve diminuição do fator NF-KB, como sugerido no item 5.1.

#### 5.4 4-HNE

Em experimentos com camundongos *mdx*, observou-se peroxidação lipídica da membrana causada pelo aumento da produção de EROs no período que antecede o início da degeneração das fibras musculares (DISATNIK et al., 1998). O processo de peroxidação lipídica causa a destruição de lipídeos presentes na membrana celular, resultando na formação de peróxidos lipídicos e aldeídos, como malondialdeído (MDA) e o 4-HNE (ESTERBAUER, CHEESEMAN, 1990). Muitos biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar o estresse oxidativo, dentre eles o MDA (ESTERBAUER, CHEESEMAN, 1990), dienos conjugados (DORMANDY, WICKENS, 1987), gases etano e pentano (FRANK et al., 1980), isoprostanos (MORROW et al., 1995), 4-HNE (ESTERBAUER et al., 1991), modificações de proteínas (LEVINE et al., 1994) e modificações no DNA (MARNETT, 1999). 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 et al., 1991). Em nossos experimentos, utilizamos a marcação com o 4-HNE para analisar a peroxidação lipídica decorrente da degeneração do músculo distrófico.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com NAC reduziu significativamente a expressão do 4-HNE nos músculos STN e DIA. Resultado semelhante foi observado em camundongos com lesão hepática provocada por overdose de acetaminofen (TERNEUS et al., 2008). O tratamento com NAC também diminuiu o nível de 4-HNE em células expostas ao NAF (Fluoreto de Sódio; ANURADHA, KANNO, HIRANO, 2001).

O processo oxidativo é determinado pelo desequilíbrio entre a geração de substâncias reativas oxidantes e a presença das substâncias antioxidantes que a estas se contrapõe. Os

antioxidantes podem ser intracelulares (glutathiona, superóxido dismutase, catalase, peroxidases), ou agirem na membrana celular como o betacaroteno, os flavonóides e as vitaminas C e E. A glutathiona é um dos mais abundantes e importantes antioxidantes dos músculos esqueléticos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; REID, DURHAM, 2002). No estresse oxidativo, ocorre redução da atividade do sistema de glutathiona / antioxidante (MIYATA et al., 2001; MAULIK, DAS, 2002). Desta forma, sugerimos que a diminuição na expressão de 4-HNE observada em nossos experimentos possa estar relacionada ao aumento do sistema glutathiona / antioxidante, uma vez que o NAC é um tiol, composto precursor da L-cisteína e glutathiona reduzida nas células.

Finalmente, sugerimos a realização de novos estudos envolvendo a análise de outros músculos dos camundongos *mdx*, favorecendo a compreensão das diferentes respostas apresentadas nos músculos estudados neste trabalho. Para isso, sugerimos o estudo do sistema antioxidante dos músculos extra-oculares e intrínsecos da laringe, protegidos da mionecrose no camundongo *mdx* (MARQUES et al., 2007b). Além disto, uma opção seria analisar os efeitos do NAC *in vitro*, permitindo uma visão alternativa do efeito dessa substância em relação ao modelo *in vivo*, utilizado neste trabalho.

## **6.0 CONCLUSÃO**

- O tratamento precoce com NAC diminuiu a degeneração muscular em camundongos *mdx*;
- Os músculos analisados neste trabalho (TA, STN e DIA) responderam de forma diferente ao tratamento com NAC;
- Em conjunto, os resultados demonstram que o NAC possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular.

## **7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acharyya, S., S. A. Villalta, *et al.* Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. J Clin Invest, v.117, n.4, Apr, p.889-901. 2007.
- Alderton, J. M. e R. A. Steinhardt. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. Trends Cardiovasc Med, v.10, n.6, Aug, p.268-72. 2000.
- Anuradha, C. D., S. Kanno, *et al.* Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. Free Radic Biol Med, v.31, n.3, Aug 1, p.367-73. 2001.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, *et al.* 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.593-7. 1989.
- Bani, C., J. Lagrota-Candido, *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.
- Batchelor, C. L. e S. J. Winder. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. Trends Cell Biol, v.16, n.4, Apr, p.198-205. 2006.
- Biggar, W. D., H. J. Klamut, *et al.* Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. Clin Orthop Relat Res, n.401, Aug, p.88-106. 2002.
- Bogdanovich, S., K. J. Perkins, *et al.* Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. J Mol Med, v.82, n.2, Feb, p.102-15. 2004.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brenman, J. E., D. S. Chao, *et al.* Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. Cell, v.84, n.5, Mar 8, p.757-67. 1996.

Brenman, J. E., *et al.* Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell, v.82, n.5, Sep 8, p.743-52. 1995.

Brookes, P. S., Y. Yoon, *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am J Physiol Cell Physiol, v.287, n.4, Oct, p.C817-33. 2004.

Buetler, T. M., M. Renard, *et al.* Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. Am J Clin Nutr, v.75, n.4, Apr, p.749-53. 2002.

Bulfield, G., W. G. Siller, *et al.* X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.4, Feb, p.1189-92. 1984.

Chakkalakal, J. V., J. Thompson, *et al.* Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. FASEB J, v.19, n.8, Jun, p.880-91. 2005.

Chang, W. J., S. T. Iannaccone, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.17, Aug 20, p.9142-7. 1996.

Cohn, R. D. e K. P. Campbell. Molecular basis of muscular dystrophies. Muscle Nerve, v.23,

n.10, Oct, p.1456-71. 2000.

Collins, R. A. e M. D. Grounds. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. J Histochem Cytochem, v.49, n.8, Aug, p.989-1001. 2001.

Deconinck, N. e B. Dan. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. Pediatr Neurol, v.36, n.1, Jan, p.1-7. 2007.

Dhawan, J. e T. A. Rando. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. Trends Cell Biol, v.15, n.12, Dec, p.666-73. 2005.

Disatnik, M. H., J. Dhawan, *et al.* Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. J Neurol Sci, v.161, n.1, Nov 26, p.77-84. 1998.

Dormandy, T. L. e D. G. Wickens. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. Chem Phys Lipids, v.45, n.2-4, Nov-Dec, p.353-64. 1987.

Drager, L. F., L. Andrade, *et al.* Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. Nephrol Dial Transplant, v.19, n.7, Jul, p.1803-7. 2004.

Engel, A. e C. Franzini-Armstrong. Myology : basic and clinical. New York: McGraw-Hill. 1994. 2 v. (xxi, 1937 p.) p.

Ervasti, J. M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular

dystrophy. Biochim Biophys Acta, v.1772, n.2, Feb, p.108-17. 2007.

Esterbauer, H. e K. H. Cheeseman. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol, v.186, p.407-21. 1990.

Esterbauer, H., R. J. Schaur, *et al.* Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med, v.11, n.1, p.81-128. 1991.

Fang, Y. Z., S. Yang, *et al.* Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition, v.18, n.10, Oct, p.872-9. 2002.

Farid, M., M. B. Reid, *et al.* Effects of dietary curcumin or N-acetylcysteine on NF-kappaB activity and contractile performance in ambulatory and unloaded murine soleus. Nutr Metab (Lond), v.2, Aug 26, p.20. 2005.

Frank, H., T. Hintze, *et al.* Monitoring lipid peroxidation by breath analysis: endogenous hydrocarbons and their metabolic elimination. Toxicol Appl Pharmacol, v.56, n.3, Dec, p.337-44. 1980.

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

Fridovich, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. J Exp Biol, v.201, n.Pt 8, Apr, p.1203-9. 1998.

Fruhbeck, G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, v.2, n.3, Jul, p.197-208. 2004.

Gailly, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. Biochim Biophys Acta, v.1600, n.1-2, Nov 4, p.38-44. 2002.

Gissel, H. The role of Ca<sup>2+</sup> in muscle cell damage. Ann N Y Acad Sci, v.1066, Dec, p.166-80. 2005.

Grote, K., I. Flach, *et al.* Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. Circ Res, v.92, n.11, Jun 13, p.e80-6. 2003.

Grounds, M. D. e J. Torrisi. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. FASEB J, v.18, n.6, Apr, p.676-82. 2004.

Grounds, M. D., H. G. Radley, *et al.* Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Neurobiol Dis, v.31, n.1, Jul, p.1-19. 2008.

Halliwell, B. e C. E. Cross. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect, v.102 Suppl 10, Dec, p.5-12. 1994.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. New York, Oxford University Press, 1999.

Hamer, P. W., J. M. Mcgeachie, *et al.* Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. J Anat, v.200, n.Pt 1, Jan, p.69-79. 2002.

Haslett, J. N., P. B. Kang, *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.

Hauser, E., H. Hoger, *et al.* Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. Neuropediatrics, v.26, n.5, Oct, p.260-2. 1995.

Haycock, J. W., S. Macneil, *et al.* Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. Neuroreport, v.8, n.1, Dec 20, p.357-61. 1996.

Hnia, K., G. Hugon, *et al.* Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophin-deficient Mdx mice. Am J Pathol, v.170, n.2, Feb, p.633-43. 2007.

Hodgetts, S., H. Radley, *et al.* Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. Neuromuscul Disord, v.16, n.9-10, Oct, p.591-602. 2006.

Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., *et al.* Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell, v.51, n.6, Dec 24, p.919-28. 1987.

Hoffman, E. P., E. Pegoraro, *et al.* Genetic counseling of isolated carriers of Duchenne muscular dystrophy. Am J Med Genet, v.63, n.4, Jun 28, p.573-80. 1996.

Irintchev, A. e A. Wernig. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. Cell Tissue Res, v.249, n.3, Sep, p.509-21. 1987.

Javesghani, D., S. A. Magder, *et al.* Molecular characterization of a superoxide-generating

NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. Am J Respir Crit Care Med, v.165, n.3, Feb 1, p.412-8. 2002.

Katirji, B. Cauda equina schwannoma misdiagnosed as focal motor neuron disease. J Clin Neuromuscul Dis, v.3, n.1, Sep, p.36-8. 2001.

Kumar, A. e A. M. Boriek. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. FASEB J, v.17, n.3, Mar, p.386-96. 2003.

Kuru, S., A. Inukai, *et al.* Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. Acta Neuropathol, v.105, n.3, Mar, p.217-24. 2003.

Lefaucheur, J. P., C. Pastoret, *et al.* Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. Anat Rec, v.242, n.1, May, p.70-6. 1995.

Levine, R. L., J. A. Williams, *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol, v.233, p.346-57. 1994.

Liu, B., W. Li, *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine in isoproterenol-induced myocardium injury in rats. Mol Biol Rep, v.36, n.4, Apr, p.761-5. 2009.

Liu, Y., H. Zhang, *et al.* Antioxidant N-acetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice. Eur J Pharmacol, v.575, n.1-3, Dec 1, p.142-8. 2007.

Luz, M. A., M. J. Marques, *et al.* Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is

caused by exhaustion of myogenic cells. Braz J Med Biol Res, v.35, n.6, Jun, p.691-5. 2002.

Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res, v.424, n.1-2, Mar 8, p.83-95. 1999.

Marques, M. J., R. Ferretti, *et al.* Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, v.35, n.3, Mar, p.349-53. 2007b.

Marques, M. J., A. Pertille, *et al.* Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. Anat Rec (Hoboken), v.290, n.7, Jul, p.846-54. 2007a.

Marques, M. J., R. Ventura Machado, *et al.* Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. Muscle Nerve, v.37, n.1, Jan, p.61-7. 2008.

Matecki, S., G. H. Guibinga, *et al.* Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.287, n.4, Oct, p.R961-8. 2004.

Matsuda, R., A. Nishikawa, *et al.* 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, n.5, Nov, p.959-64. 1995.

Maulik, N. e D. K. Das. Redox signaling in vascular angiogenesis. Free Radic Biol Med, v.33, n.8, Oct 15, p.1047-60. 2002.

Mccord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med, v.108, n.8, Jun 1,

p.652-9. 2000.

Mcgeachie, J. K., M. D. Grounds, *et al.* Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. J Neurol Sci, v.119, n.2, Nov, p.169-79. 1993.

Mechler, F., S. Imre, *et al.* Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. J Neurol Sci, v.63, n.3, Mar, p.279-83. 1984.

Mendell, J. R., W. K. Engel, *et al.* Duchenne muscular dystrophy: functional ischemia reproduces its characteristic lesions. Science, v.172, n.988, Jun 11, p.1143-5. 1971.

Messina, S., A. Bitto, *et al.* Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. Exp Neurol, v.198, n.1, Mar, p.234-41. 2006.

Minatel, E., H. S. Neto, *et al.* Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. Muscle Nerve, v.28, n.5, Nov, p.561-9. 2003.

Miyata, T., C. Van Ypersele De Strihou, *et al.* Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. Kidney Int, v.60, n.6, Dec, p.2351-9. 2001.

Monici, M. C., M. Aguenouz, *et al.* Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. Neurology, v.60, n.6, Mar 25, p.993-7. 2003.

Morrow, J. D., B. Frei, *et al.* Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. N Engl J Med, v.332, n.18,

May 4, p.1198-203. 1995.

Murphy, M. E. e J. P. Kehrer. Oxidative stress and muscular dystrophy. Chem Biol Interact, v.69, n.2-3, p.101-73. 1989.

Nakae, Y., P. J. Stoward, *et al.* Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. J Mol Histol, v.35, n.5, Jun, p.489-99. 2004.

Nakashima, J., M. Tachibana, *et al.* Association between tumor necrosis factor in serum and cachexia in patients with prostate cancer. Clin Cancer Res, v.4, n.7, Jul, p.1743-8. 1998.

Nguyen, H. X. e J. G. Tidball. Null mutation of gp91phox reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. J Physiol, v.553, n.Pt 3, Dec 15, p.833-41. 2003.

Niebroj-Dobosz, I., A. Fidzianska, *et al.* Is the normal content of sulfhydryl groups attributable to sparing from dystrophic pathology in dystrophin-deficient muscles? Folia Neuropathol, v.40, n.3, p.143-50. 2002.

Pagel, C. N. e T. A. Partridge. Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. J Neurol Sci, v.164, n.2, Apr 1, p.103-16. 1999.

Pastoret, C. e A. Sebillle. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. J Neurol Sci, v.129, n.2, Apr, p.97-105. 1995.

Peterson, J. M., K. D. Feedback, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. J Appl Physiol, v.101, n.5, Nov, p.1394-9. 2006.

Petrof, B. J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. Mol Cell Biochem, v.179, n.1-2, Feb, p.111-23. 1998.

Pierno, S., B. Nico, *et al.* Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. Neuropathol Appl Neurobiol, v.33, n.3, Jun, p.344-59. 2007.

Porter, J. D., S. Khanna, *et al.* A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. Hum Mol Genet, v.11, n.3, Feb 1, p.263-72. 2002.

Porter, J. D., A. P. Merriam, *et al.* Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. Hum Mol Genet, v.12, n.15, Aug 1, p.1813-21. 2003.

Radley, H. G. e M. D. Grounds. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. Neurobiol Dis, v.23, n.2, Aug, p.387-97. 2006.

Ragusa, R. J., C. K. Chow, *et al.* Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord, v.7, n.6-7, Sep, p.379-86. 1997.

Rando, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. Muscle Nerve, v.24, n.12, Dec, p.1575-94. 2001.

Rando, T. A., M. H. Disatnik, *et al.* Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility

to oxidative stress. Neuromuscul Disord, v.8, n.1, Feb, p.14-21. 1998.

Reid, M. B. e W. J. Durham. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. Ann N Y Acad Sci, v.959, Apr, p.108-16. 2002.

Reid, M. B. e Y. P. Li. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. Respir Res, v.2, n.5, p.269-72. 2001.

Rodriguez, M. C. e M. A. Tarnopolsky. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. Free Radic Biol Med, v.34, n.9, May 1, p.1217-20. 2003.

Sasaoka, T., M. Imamura, *et al.* Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. Neuromuscul Disord, v.13, n.3, Mar, p.193-206. 2003.

Schmalbruch, H. Skeletal muscle fibers of newborn rats are coupled by gap junctions. Dev Biol, v.91, n.2, Jun, p.485-90. 1982.

Seixas, S. L., J. Lagrota-Candido, *et al.* [The importance of mdx mouse in the physiopathology of Duchenne's muscular dystrophy]. Arq Neuropsiquiatr, v.55, n.3B, Sep, p.610-7. 1997.

Shavlakadze, T., J. White, *et al.* Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. Mol Ther, v.10, n.5, Nov, p.829-43. 2004.

Shimizu, M. H., T. M. Coimbra, *et al.* N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. Kidney Int, v.68, n.5, Nov, p.2208-17. 2005.

Sicinski, P., Y. Geng, *et al.* The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science, v.244, n.4912, Jun 30, p.1578-80. 1989.

Slupphaug, G., B. Kavli, *et al.* The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat Res, v.531, n.1-2, Oct 29, p.231-51. 2003.

Stedman, H. H., H. L. Sweeney, *et al.* The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. Nature, v.352, n.6335, Aug 8, p.536-9. 1991.

Stewart, C. E., P. V. Newcomb, *et al.* Multifaceted roles of TNF-alpha in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. J Cell Physiol, v.198, n.2, Feb, p.237-47. 2004.

Tanabe, Y., K. Esaki, *et al.* Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. Acta Neuropathol, v.69, n.1-2, p.91-5. 1986.

Tepel, M., M. Echelmeyer, *et al.* Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. Kidney Int, v.58, n.2, Aug, p.867-72. 2000.

Terneus, M. V., J. M. Brown, *et al.* Comparison of S-adenosyl-L-methionine (SAME) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. Toxicology, v.244, n.1, Feb 3, p.25-34. 2008.

Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.288, n.2, Feb, p.R345-53. 2005.

Torres, L. F. e L. W. Duchen. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. Brain, v.110 ( Pt 2), Apr, p.269-99. 1987.

Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. Prog Lipid Res, v.42, n.4, Jul, p.318-43. 2003.

Vasconcelos, S.M.L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quim. Nova, v.30, n.5, p.1323-1338. 2007.

Wang, A. L., J. P. Wang, *et al.* A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. Hepatol Res, v.34, n.3, Mar, p.199-206. 2006.

Wehling, M., M. J. Spencer, *et al.* A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. J Cell Biol, v.155, n.1, Oct 1, p.123-31. 2001.

Wehling-Henricks, M., J. J. Lee, *et al.* Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. Neuromuscul Disord, v.14, n.8-9, Sep, p.483-90. 2004.

Weisberg, S. P., D. Mccann, *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, v.112, n.12, Dec, p.1796-808. 2003.

Whitehead, N. P., C. Pham, *et al.* N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. J Physiol, v.586, n.7, Apr 1, p.2003-14. 2008.

Whitehead, N. P., E. W. Yeung, *et al.* Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.33, n.7, Jul, p.657-62. 2006.

Williams, I. A. e D. G. Allen. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-

deficient mdx mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.3, Sep, p.H1969-77. 2007.

Yablonka-Reuveni, Z. e J. E. Anderson. Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. Dev Dyn, v.235, n.1, Jan, p.203-12. 2006.

Yoshida, M., A. Yonetani, *et al.* Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.290, n.2, Feb, p.R449-55. 2006.

You, Y., J. J. Fu, *et al.* Effect of N-acetylcysteine on the murine model of colitis induced by dextran sodium sulfate through up-regulating PON1 activity. Dig Dis Sci, v.54, n.8, Aug, p.1643-50. 2009.

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

Zhai, W., R. Feng, *et al.* Mechanism of the protective effects of N-acetylcysteine on the heart of brain-dead Ba-Ma miniature pigs. J Heart Lung Transplant, v.28, n.9, Sep, p.944-9. 2009.

Zhao, S. P. e L. H. Zeng. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor in chronic heart failure with cachexia. Int J Cardiol, v.58, n.3, Feb, p.257-61. 1997.

Zuin, R., A. Palamidese, *et al.* High-dose N-acetylcysteine in patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Clin Drug Investig, v.25, n.6, p.401-8. 2005.

Zwart, L. L. D., J. H. Meerman, *et al.* Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med, v.26, n.1-2, Jan, p.202-26. 1999.

## DECLARAÇÃO

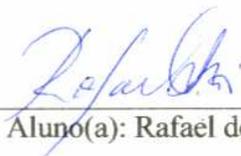
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada **“Influência do N-acetilcisteína (NAC) no processo de degeneração muscular em camundongos distróficos”**:

( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

( X ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1584-1).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).



Aluno(a): Rafael de Senzi Moraes Pinto



Orientador(a): Elaine Minatel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP