

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ÉRIKA TONON

**“INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO NO PROCESSO DE  
DEGENERAÇÃO MUSCULAR EM CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS”**

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Elaine Minatel".

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel

Campinas, 2009

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

**T616i**

Tonon, Érika

Influência do ácido ascórbico no processo de degeneração muscular em camundongos distróficos / Érika Tonon. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Elaine Minatel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido ascórbico. 2. Distrofia muscular. 3. Camundongo MDX. 4. Degeneração. I. Minatel, Elaine. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Influence of the ascorbic acid in the muscular degeneration process in dystrophic mice.

**Palavras-chave em inglês:** Ascorbic acid; Muscular dystrophy; MDX mice; Degeneration.

**Área de concentração:** Anatomia.

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

**Banca examinadora:** Elaine Minatel, Luciana Bolsoni Lourenço Morandini, Leonardo dos Reis Silveira.

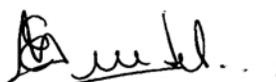
**Data da defesa:** 26/02/2009.

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

Campinas, 26 de fevereiro de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

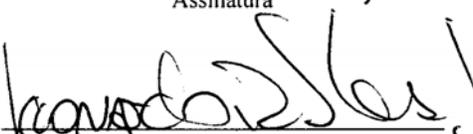
Profa. Dra. Elaine Minatel (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

  
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

  
Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

***Dedico...***

*Aos meus pais José e Emília, pelo apoio tranquilo e confortante. Ao Michael pelo amor, carinho e paciência.*

### ***Agradeço....***

A Deus pela presença em minha vida, dando-me força e consolo, guiando os meus passos nas incertezas e mostrando que sempre há um caminho a ser percorrido.

À Professora Dra. Elaine Minatel pela confiança, acolhimento e dedicação.

Aos Professores Dra. Maria Júlia Marques e Dr. Humberto Santo Neto pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Anatomia pela contribuição dada para a minha formação e pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

A Sra. Lillian Alves Senne Panagio e Ana Floriano pela atenção e auxílio durante o mestrado.

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

Aos Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula pelo auxílio nos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

Aos Srs. Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos e Toni Donizeti dos Santos, pelo auxílio durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela contribuição no desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos, Erenete, Enide, Elisiane e Edvaldo e aos meus sobrinhos Renata, Felipe e Matheus pelo carinho e apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos Cíntia, Renato, Adriana, Tereza, Ana Paula, Jean, Rafael e Leslie, pela importante contribuição para a realização deste trabalho e pela amizade e convívio nestes dois anos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho.

A você, por prestigiar este trabalho com o seu interesse e leitura.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

*“A Humildade é o primeiro degrau  
para a sabedoria”*

*(São Tomás de Aquino)*

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Apresentação .....	2
1.2. Patofisiologia da Distrofia Muscular de Duchenne.....	4
1.3. Camundongo <i>mdx</i> .....	9
1.4. Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	12
1.5. Ácido ascórbico (Vitamina C).....	15
<b>2. OBJETIVO</b> .....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
3.1. Animais.....	21
3.2. Grupos experimentais e tratamento com ácido ascórbico .....	21
3.3. Análise histológica .....	22
3.4. Determinação da creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo.....	24
3.5. Western Blotting.....	24
<b>4. RESULTADOS</b> .....	27
4.1. Análise qualitativa .....	28
4.2. Análise quantitativa .....	31
4.3. Análise comparativa entre os músculos TA, STN e DIA.....	36
4.4. Níveis de creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo.....	42
4.5. Análise do Western Blotting .....	43
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	46

5.1. Análise da mionecrose.....	47
5.2. Análise de regeneração.....	50
5.3. Análise da creatina-quinase.....	51
5.4. Análise de Western Blotting.....	52
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

**ABREVIATURAS**

AA	- Ácido ascórbico
AE	- Azul de Evans
AscH <sub>2</sub>	- Vitamina C
AscH <sup>-</sup>	- Ascorbato
Ca <sup>2+</sup>	- Íons cálcio
CDG	- Complexo distrofina-glicoproteínas
CK	- Creatina quinase
Cu(II)	- Cobre
DMD	- Distrofia muscular de Duchenne
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
HE	- Hematoxilina-Eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
HClO	- Ácido hipoclorito
HCOR	- Aldehydes
Inf/Reg	- Área de inflamação e regeneração
IL-1 $\beta$	- Interleucina
L <sup>·</sup>	- Radical lipídico
LOO <sup>·</sup>	- Radical peroxila
<i>Mdx</i>	- Murine dystrophin X-linked
<i>mdx</i> T7	- grupo <i>mdx</i> tratado de 7 dias
<i>mdx</i> T14	- grupo <i>mdx</i> tratado de 14 dias
<i>mdx</i> T14AA	- grupo <i>mdx</i> tratado de 14 dias com maior dosagem

<i>mdx</i> CTRL 7	- grupo <i>mdx</i> controle de 7 dias
<i>mdx</i> CTRL 14	- grupo <i>mdx</i> controle de 14 dias
NC	- Núcleo central
NF- $\kappa$ B	- Fator de transcrição nuclear
NP	- Núcleo periférico
NO	- Óxido nítrico
$n$ NOS	- Óxido nítrico sintase neural
$O_2^-$	- Ânion radical superóxido
$O_3$	- Ozônio
$\cdot$ OH	- Hidroxila
$\cdot$ OOH	- Peroxila
ONOO $\cdot$	- Peróxido nitrito
$^1O_2$	- Oxigênio singlet
PBS	- Tampão fosfato salina
Reg	- Área de regeneração
RO	- Alcoxil
ROOH	- Peróxido orgânico
ROS	- reactive oxygen species
SAC	- Canal ativado por alongamento
STN	- Esternomastóideo
TA	- Tibial anterior
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

A peroxidação lípidica causada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no período que antecede o início da degeneração muscular no camundongo *mdx*, sugere que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos primários da degeneração muscular distrófica, ao invés de ser um efeito secundário deste processo. No presente trabalho verificamos se o tratamento com ácido ascórbico antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração diminui a degeneração muscular em camundongos *mdx*. Camundongos *mdx* com 14 dias de vida pós-natal receberam por gavagem doses diárias de 0,1mg/kg de Ácido Ascórbico diluído em água por 7 (grupo *mdx* T7) e 14 dias (grupo *mdx* T14) e/ou dose de 200mg/kg por 14 dias (grupo *mdx* T14AA). Animais *mdx* controle receberam solução salina. Após este período, os músculos tibial anterior (TA), esternomastóide (STN) e diafragma (DIA) foram retirados. Na análise histológica, o ácido ascórbico diminuiu a degeneração muscular nos músculos TA do grupo *mdx* T7 e no DIA do grupo *mdx* T14AA ( $P < 0,05$ , Student's t Test) quando comparados ao controle. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de creatina quinase entre os grupos analisados ( $P > 0,05$ , Student's t Test). Aumento significativo no conteúdo de TNF- $\alpha$ , pela técnica de Western Blotting, foi observado nos músculos dos camundongos *mdx* tratados com ácido ascórbico. Os resultados indicam que o tratamento precoce de camundongos *mdx* com o ácido ascórbico diminuiu significativamente a mionecrose nos músculos tibial anterior e diafragma. O presente trabalho também sugere que o aumento do TNF- $\alpha$  não está necessariamente correlacionado ao aumento da mionecrose.

## ABSTRACT

Increased production of reactive oxygen species (ROS) can cause lipid peroxidation in the period preceding muscle necrosis in the *mdx* mice. This suggests that ROS may be involved as a primary, rather than secondary, cause of degeneration. In the present study, we verified whether ascorbic acid treatment before the cycles of muscle degeneration-regeneration decreases muscular degeneration in *mdx* mice. Mdx mice at 14 days of age received 0.1mg/kg of acid ascorbic daily in the water for 7 (group *mdx* T7) or 14 days (group *mdx* T14) and/or 200mg/kg for 14 days (group *mdx* T14AA). Control *mdx* mice received saline. After this period the tibialis anterior (TA), sternomastoid (STN) and diaphragm (DIA) muscles were removed. Histological analysis showed that ascorbic acid significantly decreased muscle degeneration in the TA of *mdx* T7 group and in the DIA of *mdx* T14AA group ( $P < 0,05$ , Student's t Test) compared to control. There were no changes in serum CK activity in the ascorbic acid-treated mice compared to control ( $P > 0,05$ , Student's t Test). Immunoblots showed a significant increase in the content of TNF- $\alpha$  in the muscles of the treated *mdx* mice. The present results indicate that ascorbic acid treatment before the cycles of muscle fiber degeneration-regeneration significantly decreases myonecrosis in TA and DIA dystrophic muscles. The present findings also suggest that increase TNF- $\alpha$  not necessarily correlates with increased myonecrosis.

## **1. 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 encontrada em crianças é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X (locus Xp21), que acomete uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas (BIGGAR et al, 2002). A doença afeta primariamente músculos esqueléticos e cardíacos e os primeiros sinais da doença aparecem em torno de 2 a 3 anos de idade, evoluindo com perda progressiva da musculatura, aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial e substituição das fibras musculares por tecido adiposo (SEIXAS et al, 1997). A maioria das crianças perde a capacidade de deambular no início da segunda década de vida, culminando com a insuficiência cárdio-respiratória entre 20 e 30 anos (BIGGAR et al, 2002).

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).

A falta da distrofina ainda é considerada como o principal fator responsável pela patofisiologia da doença. Além disso, estudos indicam que o estresse oxidativo também pode estar envolvido na fisiopatologia das distrofias musculares. Dentre estes podemos destacar os que enfocam que as células musculares distróficas são mais susceptíveis às espécies reativas de oxigênio (EROs) (RANDO et al, 1998; DISATNIK et al, 1998); os que relatam que os

radicais livres contribuem para a perda da integridade da membrana plasmática nas distrofias musculares (MURPHY e KEHRER, 1989) e os que identificaram marcadores de estresse oxidativo em músculos de pacientes com DMD e de camundongos *mdx* (RAGUSA et al, 1997; RODRIGUEZ e TARNOPOLSKY, 2003). Além disso, outros experimentos também mostraram a 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 e KEHRER, 1989).

As evidências sugerem que as EROs podem estar envolvidas no processo distrófico promovendo o aumento da peroxidação lipídica na membrana muscular e acionando uma cascata inflamatória que conduz à ativação do fator NF-kB e subsequente liberação de mediadores inflamatórios. Segundo Messina e colaboradores (2006), a interrupção desta cascata pode ter um efeito terapêutico potencial. Desta forma, levantamos a hipótese de que o tratamento dos animais *mdx* com ácido ascórbico (antioxidante) antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração poderia proteger os músculos distróficos da necrose por diminuir a produção das EROs e conseqüentemente a liberação de moléculas pró-inflamatórias (como por exemplo o TNF- $\alpha$ ).

O ácido ascórbico é um antioxidante não enzimático, e é conhecido por ser um potente inibidor da peroxidação lipídica (POWERS et al, 2004). De acordo com Yousef e colaboradores (2007) a suplementação oral com ácido ascórbico inativa radicais livres, protegendo os animais de danos celulares.

## 1.2. Patofisiologia da Distrofia Muscular de Duchenne

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 uma proteína encontrada na face citoplasmática do sarcolema, com massa molecular relativa de 427 KDa que possui 3685 aminoácidos, que mantém os filamentos de actina e miosina, participantes do processo de contração-relaxamento, ligadas a um complexo de glicoproteínas do sarcolema. Este complexo de proteínas, junto com a distrofina, forma o complexo distrofina-glicoproteína (CDG, Figura 1), expresso em alta concentração no músculo esquelético estriado (RANDO, 2001; SUNADA e CAMPBELL, 1995).

A distrofina encontra-se estruturalmente dividida em quatro domínios: o primeiro corresponde à extremidade amino-terminal da proteína e está relacionada à  $\alpha$ -actina; o segundo e maior domínio corresponde a um segmento em forma de bastão e encontra-se ligado a espectrina; o terceiro é um domínio rico em cisteína e está ligado a ancorina; e o quarto domínio corresponde à extremidade carboxi-terminal da distrofina. Este último encontra-se ligado a um complexo de proteínas extracelulares, tais como:  $\alpha$ 2-laminina e  $\alpha$ -dístroglicana (ENGEL et al, 1994; ERVASTI, 2007).

Outras proteínas, além da distrofina, fazem parte deste complexo:

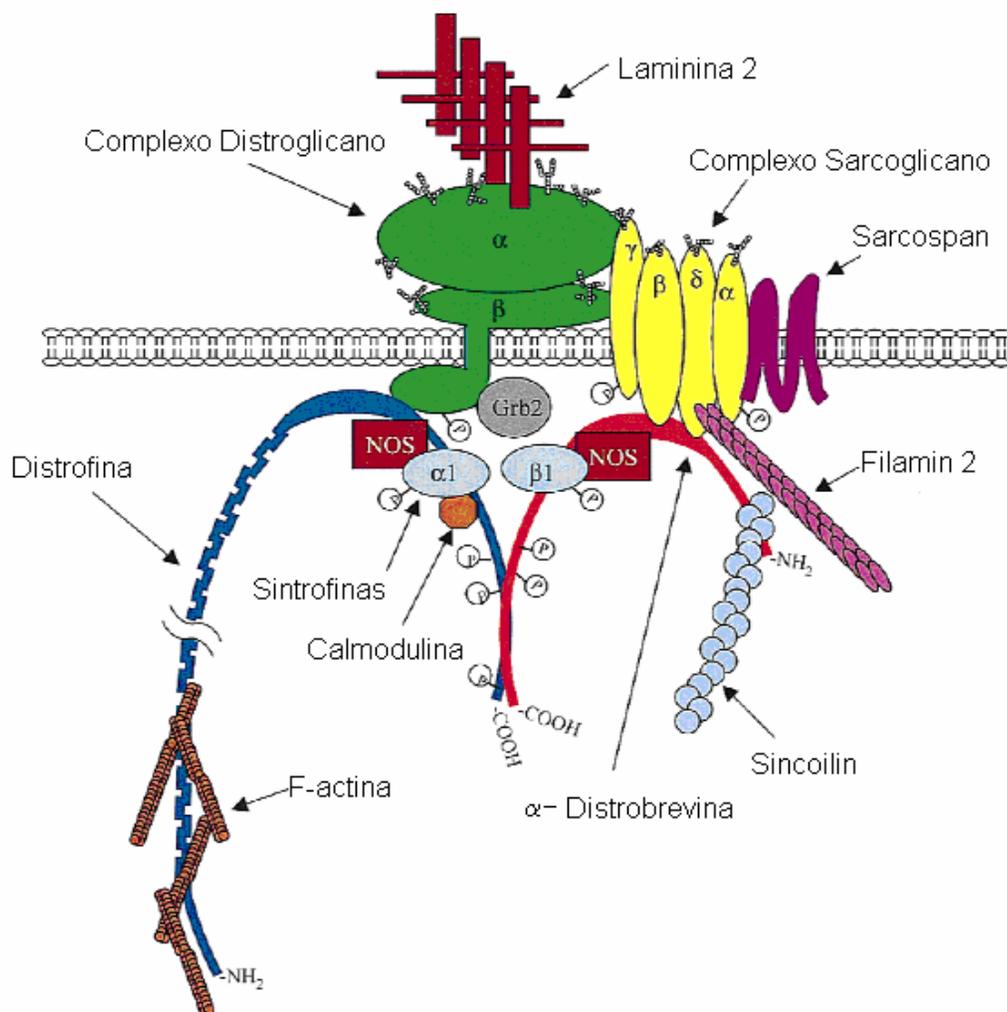
- dístroglicanas ( $\alpha$  e  $\beta$ ): a  $\alpha$ -dístroglicana encontra-se no espaço extracelular, onde se liga à laminina-2 da lâmina basal e à  $\beta$ -dístroglicana, que é uma proteína transmembrana. A  $\beta$ -dístroglicana serve de ligação entre a  $\alpha$ -dístroglicana e a distrofina (WATCHKO et al, 2002);

- sarcoglicanas: é composto por quatro subunidades de proteínas submembranas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), que se ligam entre si e funcionam como uma proteína única. As sarcoglicanas se ligam à  $\beta$ -dístroglicana (OZAWA et al, 2005);

- sarcospan: é uma proteína transmembrana;

- dístrobrevina ( $\alpha$ ): é uma proteína intracelular que se liga à dístrofina por meio do terminal C (DURBEEJ e CAMPBELL, 2002);

- sintrofinas: são proteínas intracelulares, que nas células musculares existem sob a forma das subunidades  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ . Ambas se ligam diretamente ao terminal C da dístrofina (STRAUB e CAMPBELL, 1997; JONES et al, 2003).



**Figura 1:** Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema, incluindo os componentes integrais do complexo (distrofina, complexo distroglicano, complexo sarcoglicano,  $\alpha$ -distrobrevina, sintrofinas e sarcospan), a ligação com a matriz extracelular (laminina 2), partes de ligação intracelular (F-actina, sincoilina e filamina 2) e moléculas de sinalização ligadas ao complexo (calmodulina, Grb2 e NOS). Adaptado de Rando, *Muscle & Nerve*, 24, p.1575-1594, 2001.

A falta de distrofina e de componentes do CDG interrompe a ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto da fibra muscular, 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

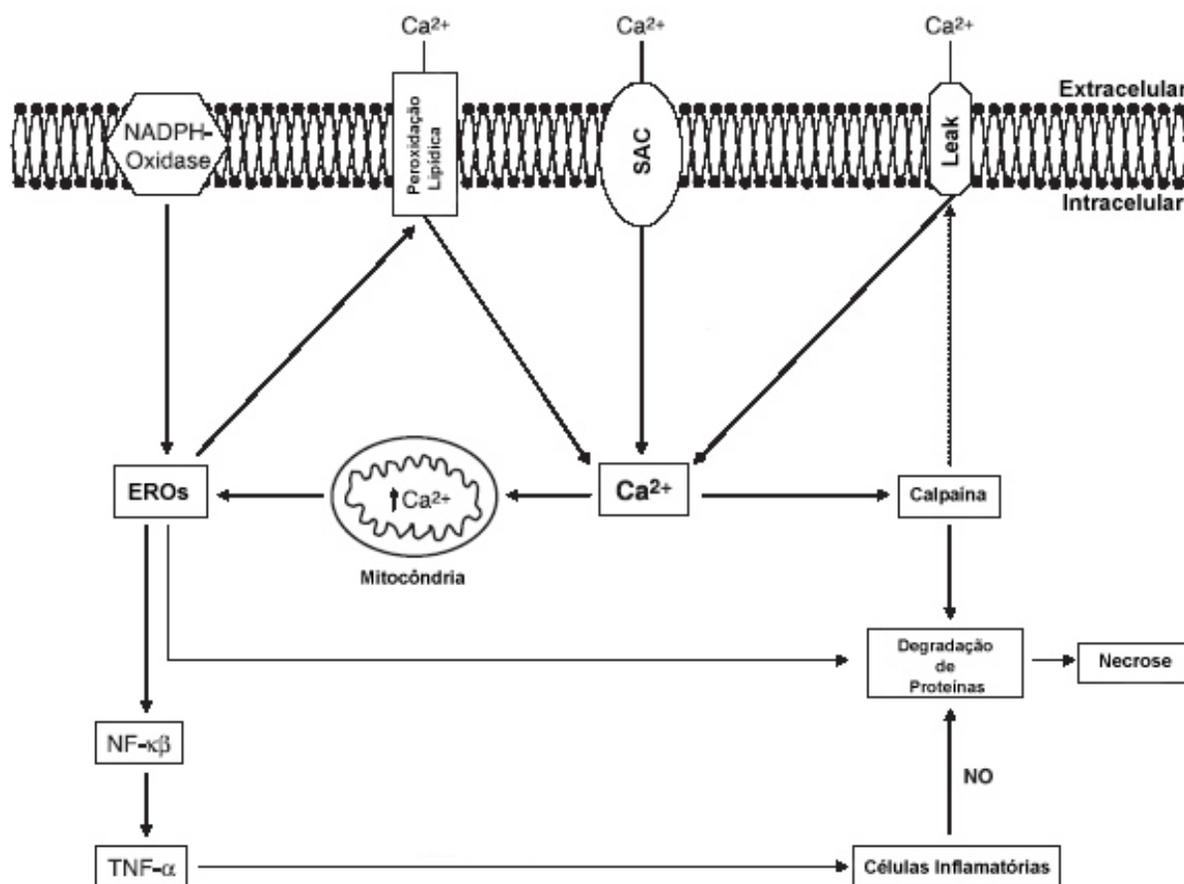
(BIGGAR et al, 2002; BOGDANOVICH et al, 2004). Inicia-se então um processo de regeneração muscular através da ativação de células satélites com posterior formação e amadurecimento dos miotubos em fibras musculares, porém este é prejudicado ou insuficiente na DMD. Gradualmente os músculos são substituídos por gordura e tecido fibroso, o que justifica a perda da função observada nesses pacientes (GROUNDS et al, 2005).

Outros mecanismos que poderiam contribuir para a mionecrose são: (1) o funcionamento dos canais de cálcio da fibra muscular distrófica. Foi sugerido que os mecanismos controladores da concentração de cálcio estariam prejudicados devido à ausência da distrofina, resultando no influxo e acúmulo intracelular de grandes quantidades de íons cálcio (VANDEBROUCK et al, 2005). Isso colaboraria para a ruptura do sarcolema, para a hipercontração da miofibrila e para a ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, resultando na necrose da fibra muscular (STRAUB et al, 1997). (2) Sinalização celular alterada (RANDO, 2001), e (3) participação de fatores inflamatórios liberados por neutrófilos, macrófagos e citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (para revisão ver WHITEHEAD, 2006).

Além desses mecanismos, estudos suportam fortemente a importância do estresse oxidativo nas distrofinopatias. 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 (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema mostrando as possíveis vias de degeneração na fibra muscular distrófica, pelo aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e de cálcio intracelular; SAC (canal de cálcio ativado por alongamento); Leak (canal de cálcio do tipo L); NF-κB (fator de transcrição nuclear); TNF-α (fator de necrose tumoral alfa); NO (óxido nítrico). Adaptado de Whitehead, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33, p.657-662, 2006.

### 1.3. Camundongo *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. O mutante *mdx* foi inicialmente identificado na colônia de camundongos C57BL10/ScSn, apresentando níveis elevados das enzimas musculares piruvatoquinase e creatinoquinase (LEFAUCHEUR et al, 1995). Tal como os humanos com DMD, os camundongos *mdx* apresentam deficiência na produção de distrofina nas suas fibras musculares, reproduzindo assim, as características das fibras musculares dos pacientes portadores de DMD (BULFIELD et al, 1984). Face a isto, os camundongos distróficos são extensivamente utilizados como modelo experimental para investigação de diversos aspectos da DMD. Assim sendo, muito do que se sabe hoje sobre a fisiopatologia da doença deve-se aos estudos realizados com esses animais (STENINA et al, 2004; DECONINCK e DAN, 2007).

Apesar da ausência da distrofina ser um achado comum tanto nos pacientes portadores de DMD quanto nos camundongos *mdx*, a evolução do quadro clínico não é exatamente a mesma para cada um deles. Ultraestruturalmente há algumas diferenças evidentes entre a patologia dos camundongos *mdx* e da DMD. Desta forma, apesar dos camundongos apresentarem intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, diferem 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 (CULLEN e JAROS, 1988).

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 e 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).

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 e KEHRER, 1989; IRINTCHEV e 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 e 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 e 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 (BORNHAM 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 de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B nos camundongos *mdx*, uma vez que a ativação deste fator pode ser prevenida pelo antioxidante N-acetilcisteína (KUMAR e BORIEK, 2003). Sustentando ainda a ativação do

fator NF- $\kappa$ B por EROs, experimentos constataram o aumento da expressão de citocinas pró-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 e BORIEK, 2003). Sugere-se que o aumento anormal de TNF- $\alpha$  promove fraqueza muscular também em outras doenças (ZHAO e ZENG, 1997; NAKASHIMA et al, 1998). Considera-se também que o TNF- $\alpha$  é um dos mais importantes indutores de NF- $\kappa$ B, 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- $\kappa$ B e subsequente liberação de mediadores inflamatórios. Segundo Messina e colaboradores (2006), a interrupção desta cascata pode ter um potencial efeito terapêutico.

#### **1.4. Espécies reativas de oxigênio (EROs)**

*In vivo*, o oxigênio é reduzido a água, via quatro elétrons, na cadeia respiratória. Porém, o oxigênio pode sofrer uma redução parcial com formação de produtos intermediários altamente reativos, sendo sua toxicidade decorrente da formação de seus derivados parcialmente reduzidos (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila), denominados espécies reativas de oxigênio (EROs; FRIDOVICH, 1998).

Na maioria das células que utilizam o oxigênio, este é reduzido pela citocromo C oxidase e oxidase que, em virtude de seus dois grupamentos heme e dois grupos prostéticos Cu(II), controla a redução do oxigênio à água, via quatro elétrons, evitando a formação de tais produtos intermediários. No entanto, existem nas células, outras enzimas capazes de reduzir o

oxigênio a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), assim como processos enzimáticos e espontâneos que produzem ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ; FRIDOVICH, 1998).

As EROs podem ser classificadas em dois grupos: radicais e não radicais. O grupo radical é caracterizado por conter um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, e este grupo contém os seguintes componentes: o óxido nítrico (NO), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ), peroxila ( $\cdot OOH$ ) e alkoxil (RO); o grupo não radical, embora sejam extremamente reativos, são estáveis, pois apresentam um número par de elétrons em sua última camada eletrônica, este grupo contém uma grande variedade de substâncias e alguns desses componentes são produzidos em altas concentrações nas células tais como o ácido hipoclorito (HClO), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peróxido orgânico (ROOH), aldehydes (HCOR), ozônio ( $O_3$ ), peróxido nitrito (ONOO $\cdot$ ) e oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) (KOHEN e NYSKA, 2002).

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 radiculares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os. Algumas enzimas, tais como a glutathiona 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).

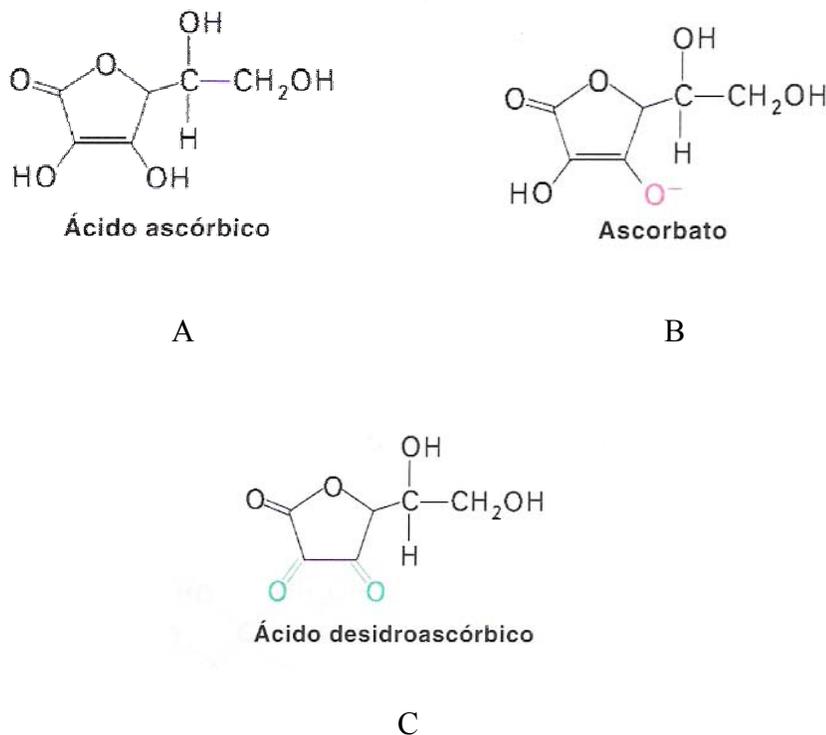
Em situação de estresse oxidativo, há um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e os pró-oxidantes, com a predominância destes últimos. Os mecanismos de defesa do organismo nesta situação podem não ser suficiente para conter tais espécies, havendo a

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. Ácido ascórbico (Vitamina C)**

O ácido ascórbico (AA, Figura 3A) é essencial ao homem, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor, como ocorre em plantas e na maioria dos animais. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C ( $\text{AsCH}_2$ ), encontra-se na forma de ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ) (Figura 3B), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um  $\text{H}^+$  ou  $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$  para um radical. Em ambiente biológico aquoso o ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ) forma o ânion radical desidroascórbico (Figura 3C), pouco reativo, atuando como antioxidante sobre a EROs, e eficientemente sobre o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o hipoclorito ( $\text{HClO}$ ) e os radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e peroxila ( $\cdot\text{OOH}$ ) (VASCONCELOS et al, 2007).



**Figura 3:** Fórmulas do ácido ascórbico (STRYER, 1996).

O ácido ascórbico é um antioxidante não enzimático, e é conhecido por ser um potente inibidor da peroxidação lipídica (POWERS et al, 2004). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro normalmente, é realizado pelo radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), com conseqüente formação do radical lipídico ( $\text{L}\cdot$ ). Na propagação, o  $\text{L}\cdot$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em radical peroxila ( $\text{LOO}\cdot$ ), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o  $\text{L}\cdot$ . O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}\cdot$  e  $\text{LOO}\cdot$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios, acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana celular

(FERREIRA e MATSUBARA, 1997). De acordo com Yousef e colaboradores (2007) a suplementação oral com ácido ascórbico inativa radicais livres, protegendo os animais de danos celulares. Além de sua função antioxidante, o ácido ascórbico também está envolvido na ativação de outros antioxidantes como a vitamina E (CARR e FREI, 1999) e no aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido desmutase (LU et al, 2007).

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi verificar se o tratamento precoce com o antioxidante ácido ascórbico, antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração, diminui a degeneração muscular em camundongos *mdx*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Animais

Foram utilizados 50 camundongos da 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, os animais foram mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água *ad libitum*.

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos 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. Grupos experimentais e tratamento com ácido ascórbico

Os animais do grupo *mdx* tratado (n=20) foram tratados a partir do 14º dia de vida pós-natal. Os animais receberam por gavagem doses diárias de 0,1mg/kg de Ácido Ascórbico (L-Ascorbic acid, Sigma-Aldrich) diluído em água (AHN et al, 2006) até completar 21 dias (n=10; *mdx* T7) e/ou até 28 dias de idade (n=10; *mdx* T14). Outro grupo (n=10; *mdx* T14AA), foi tratado por gavagem com dosagem diária maior de Ácido Ascórbico (200mg/kg) diluído em água até 28 dias de idade. O grupo *mdx* controle (n=20) recebeu água ao invés da droga, pela mesma via e período (*mdx* CTRL 7 e/ou *mdx* CTRL 14, n=10 cada). Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados via intra-peritonal 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 e os músculos tibial anterior (TA), esternomastóideo (STN) e diafragma (DIA) retirados para análise histológica (n=5 de cada grupo) e/ou para técnica de Western Blotting. Amostras de sangue foram coletadas para análise de creatino-quinase total (n=5 de cada grupo).

Os animais tratados com ácido ascórbico foram pesados diariamente em balança semi-analítica (Marte® AS2000C) para que a dose da droga fosse ajustada ao peso do animal.

### **3.3. Análise histológica**

Doze horas antes do sacrifício, 5 animais de cada grupo 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 monofásico, 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 et al (1995). O sucesso da injeção do AE foi identificado pela coloração azul das orelhas e patas dos animais. Após o tempo acima referido, os animais foram anestesiados e os músculos TA, STN e DIA retirados conforme o item 3.2., congelados em seguida em isopentano resfriado a – 159°C por nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer a – 70°C.

Para obtenção dos cortes em criostato (Micom-HS%)%E), os músculos foram mantidos a –23°C, seccionados transversalmente na espessura de 0,8 µm e coletados em lâmina. Foram obtidas 06 lâminas com cerca de 12 cortes dos músculos TA, STN e DIA dos referidos grupos experimentais, dessas 03 foram banhadas com acetona por 15 minutos e

posteriormente montadas em meio de montagem DABCO (Sigma) para visualização das fibras coradas com AE e 03 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). Foram 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.

Os cortes dos músculos TA, STN e DIA corados com HE foram observados em microscópio de luz. O parâmetro avaliado foi o número de fibras que apresentam núcleo central (indicativo de fibras musculares regeneradas - TORRES e 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 40X, com auxílio de um contador manual. Todas as fibras do corte (fibras normais e regeneradas) foram contadas para que fosse feita a estimativa da população total de fibras do músculo. Assim, foi possível obter a porcentagem de fibras normais e regeneradas dos animais empregados no experimento. Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste t de Student.

Imagens das áreas de inflamação/regeneração e regeneração foram capturadas por uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio e analisadas pelo programa Image-Pro Express. A área total da secção transversal do músculo foi obtida por meio da soma das partes fotografadas para que seja feita a estimativa da porcentagem das áreas de inflamação/regeneração e regeneração dos músculos distróficos.

### **3.4. Determinação da creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo**

Após anestesia (já descrita no item 3.2), amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18k) a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para determinar a atividade de CK.

Para quantificação da CK total foi utilizado o kit CK Nac Cinético Crystal da Bioclin®. As absorbâncias das amostras em relação a ondas U.V. com comprimento de onda de 340 nm foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation® Spectrophotometer Genesys 20) e cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

### **3.5. Western Blotting**

Após retirada do sangue, os animais foram perfundidos com PBS e os músculos TA, STN e DIA removidos, cortado em pequenos pedaços, congelados em isopentano resfriado a – 159°C por nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer a – 70 °C. Foram homogeneizados 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. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise por extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford e colaboradores (1976).

As amostras do extrato protéico foram tratadas 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 e aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 60 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 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, foram incubadas com 10µg de anticorpo primário (anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$ ) diluído em 10mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10mL de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG Peroxidase labeled) 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 Chemiluminescent, Pierce) por 5 minutos, seguido de exposição a um filme Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, N.Y, USA). As densidades das bandas e das amostras sobre filme foram escaneadas e os arquivos gerados foram gravados em discos de computador para quantificação da densitometria ótica (Image Processing and Analysis in Java).

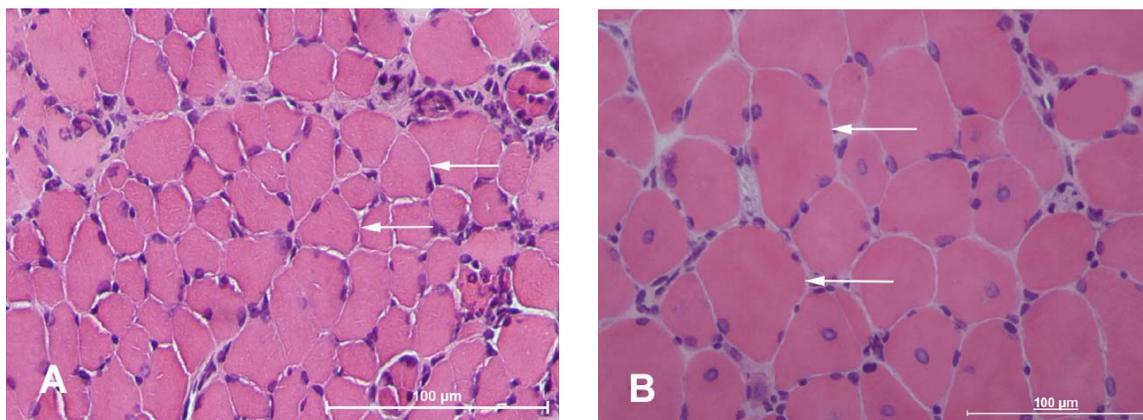
Para a normalização dos dados obtidos foi realizado o controle interno, através da incubação das amostras com o anticorpo GAPDH (FL-335, rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology). O protocolo consiste na reutilização das membranas utilizadas para detecção do TNF- $\alpha$ . Para tanto, as referidas membranas foram lavadas com TBS-T (solução basal) por 3X de 10 minutos. Em seguida, foram incubadas 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 foram re-equilibradas e lavadas com TBS-T. A seguir foram incubadas 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- $\alpha$ . Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste t de Student.

#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Análise qualitativa

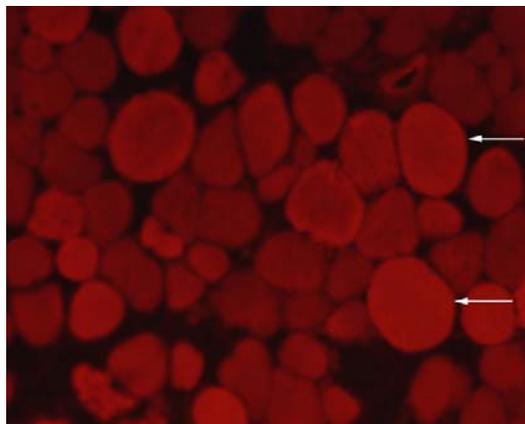
Os músculos TA, STN e DIA dos 5 grupos experimentais (*mdx* T7, *mdx* T14, *mdx* T14AA, *mdx* CTRL7 e *mdx* CTRL14) apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras com núcleo periférico, fibras em processo de degeneração, fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras completamente regeneradas.

As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com outras fibras de mesma característica (Figura 4 A e B).



**Figura 4.** Secção transversal dos músculos esqueléticos distróficos TA (A) e STN (B) mostrando fibras com núcleo periférico (setas). Coloração HE.

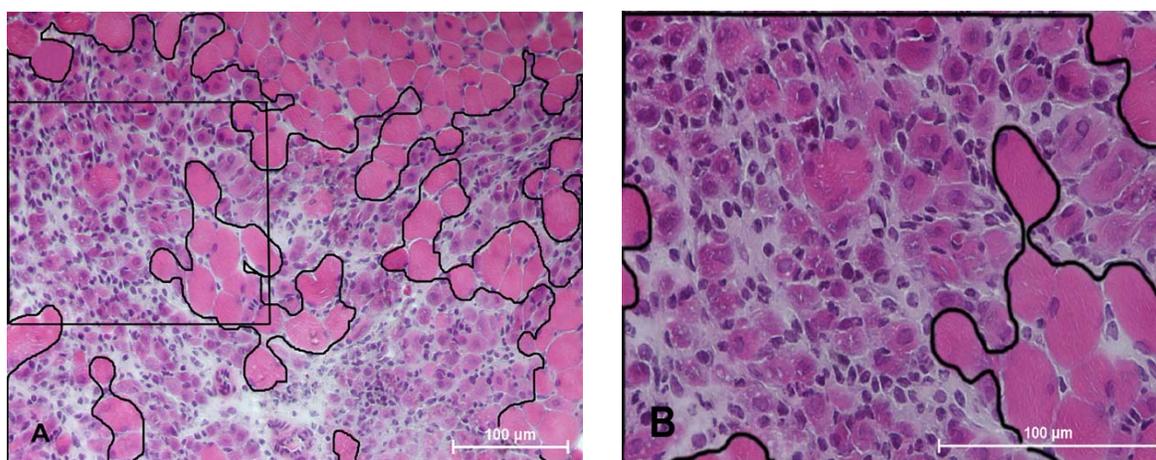
As fibras com alteração da permeabilidade do sarcolema ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Figura 5).



**Figura 5.** Secção transversal do músculo TA mostrando fibras necróticas marcadas pelo azul de Evans (setas). Aumento 200X.

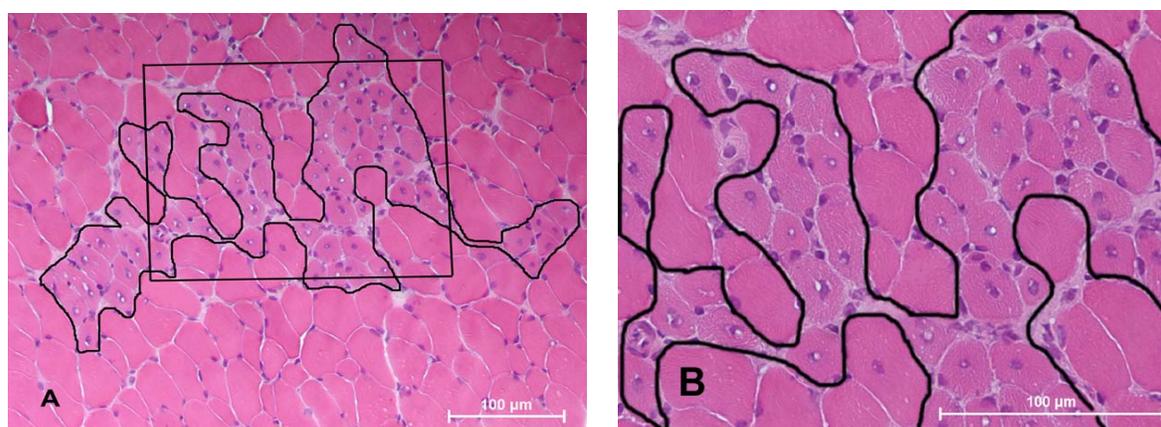
As fibras musculares em regeneração foram classificadas em dois estágios, de acordo com as suas características morfológicas e a celularidade local:

As áreas de Inflamação/ Regeneração que apresentam fibras no estágio inicial de regeneração, foram caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade (Figura 6 A e B).



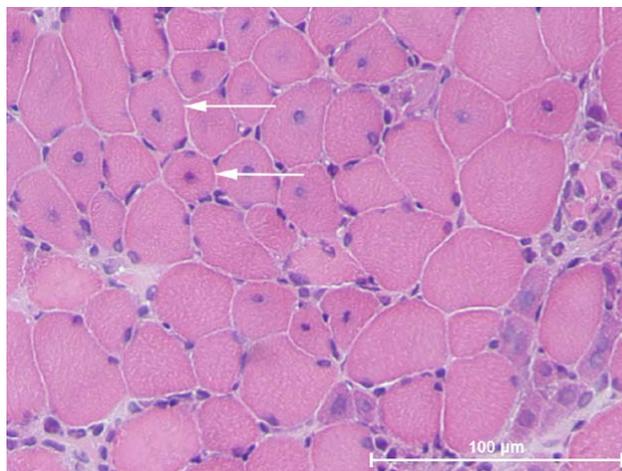
**Figura 6.** Secção transversal do músculo TA mostrando fibras no estágio inicial de regeneração (A). B representa o quadro em detalhe na figura A. Coloração HE.

Já as áreas de Regeneração apresentam fibras no estágio mais avançado de regeneração, caracterizadas por citoplasma levemente basófilo, núcleo central e maior proporção de citoplasma em relação ao volume nuclear. Apresentam uma diminuição aparente do infiltrado inflamatório, e menor celularidade em relação às áreas de Inflamação/Regeneração (Figura 7 A e B).



**Figura 7.** Secção transversal do músculo TA mostrando fibras no estágio avançado de regeneração (A). B representa o quadro em detalhe na figura A. Coloração HE.

Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, condensado, citoplasma eosinófilo e diâmetro da fibra muscular próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico (Figura 8).



**Figura 8.** Secção transversal do músculo TA mostrando fibras regeneradas com núcleo central (setas). Coloração HE.

#### 4.2. Análise quantitativa

Para análise dos grupos experimentais foram utilizadas as seguintes variáveis: porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans ou em degeneração (%AE), porcentagem de fibras com núcleo central (%NC) e porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP) em relação ao número total de fibras musculares.

Diferença significativa ( $p < 0,05^*$ ) da porcentagem de fibras com NP e positivas ao AE foi observada no músculo TA do grupo *mdx* T7 quando comparado ao seu respectivo controle (músculo TA do grupo *mdx* CTRL7). Verificamos  $99,01 \pm 0,82$  de fibras com NP no músculo TA do grupo *mdx* T7 e  $97,39 \pm 1,61$  no seu respectivo controle; e  $0,68 \pm 0,60$  de fibras em degeneração enquanto que no controle havia  $2,31 \pm 1,61$ , uma diminuição de cerca de 60% destas fibras. Os outros músculos (STN e DIA) relacionados a este grupo não apresentaram diferença significativa em relação às variáveis analisadas (ver Tabela 1).

Nos músculos TA, STN e DIA do grupo *mdx* T14 não observamos diferença significativa nestas variáveis quando comparados aos seus respectivos controles (ver Tabela 1).

No grupo *mdx* T14AA verificamos diferença significativa ( $p < 0,05^*$ ) da porcentagem de fibras com NP e positivas ao AE no músculo DIA. Verificamos  $98,66 \pm 1,05$  de fibras com NP no grupo *mdx* T14AA e  $95,25 \pm 1,79$  no seu respectivo controle (*mdx* CTRL 14); e  $0,49 \pm 0,91$  de fibras em degeneração enquanto que no controle havia  $3,19 \pm 1,48$ . Os outros músculos (TA e STN) relacionados a este grupo não apresentaram diferença significativa em relação às variáveis analisadas (ver 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 tibial anterior (TA), esternomastóideo (STN) e diafragma (DIA) dos grupos *mdx* CTRL 7 e T 7 e dos grupos *mdx* CTRL 14, T 14 e T14AA.

	<i>Mdx</i>	%NC	%NP	%AE
<b>TA</b>	CTRL7	0,30±0,20	97,39±1,61	2,31±1,61
	T7	0,32±0,32	99,01±0,82*	0,68±0,60*
	CTRL14	6,79±11,51	90,31±11,87	2,90±1,80
	T14	7,96±5,53	87,20±6,37	4,84±5,67
	T14AA	13,77±9,68	85,14±9,79	1,09±0,88
<b>STN</b>	CTRL7	5,60±1,23	92,51±2,10	1,89±1,51
	T7	8,52±4,27	89,26±3,60	2,22±3,47
	CTRL14	23,30±9,39	75,10±10,61	1,60±1,26
	T14	27,38±3,93	68,69±6,69	3,93±4,36
	T14AA	25,70±8,56	71,71±6,93	2,59±2,88
<b>DIA</b>	CTRL7	1,09±0,74	97,12±1,04	1,79±0,80
	T7	1,13±0,66	96,62±1,67	2,25±1,34
	CTRL14	1,56±0,51	95,25±1,79	3,19±1,48
	T14	1,51±0,43	94,99±1,59	3,49±1,70
	T14AA	0,85±0,44	98,66±1,05**	0,49±0,91**

%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 do músculo TA CTRL7. \*\* Diferença significativa do músculo DIA CTRL14. (P<0,05; Teste T de *student*).

Em relação à área total da secção transversal do terço médio do músculo, porcentagem da área de inflamação e regeneração (% Inf/Reg) e porcentagem da área de regeneração (%Reg) do músculo DIA dos grupos *mdx* CTRL 14 e T 14, verificamos diferença significativa ( $p < 0,05^*$ ) na porcentagem da área de Inf/Reg, tendo  $18,62 \pm 5,56$  de área de Inf/Reg no grupo *mdx* T14 e  $8,36 \pm 6,27$  no grupo *mdx* CTRL14. No músculo DIA do grupo *mdx* CTRL 7 e T 7 não verificamos diferença significativa nestas variáveis. Nos demais músculos (TA e STN), não houve diferença significativa em nenhum dos grupos *mdx* CTRL 7 e T 7 e *mdx* CTRL 14 e T 14. No grupo *mdx* T14AA também não houve diferença significativa ( $p < 0,05^*$ ) em nenhuma destas variáveis (ver Tabela 2).

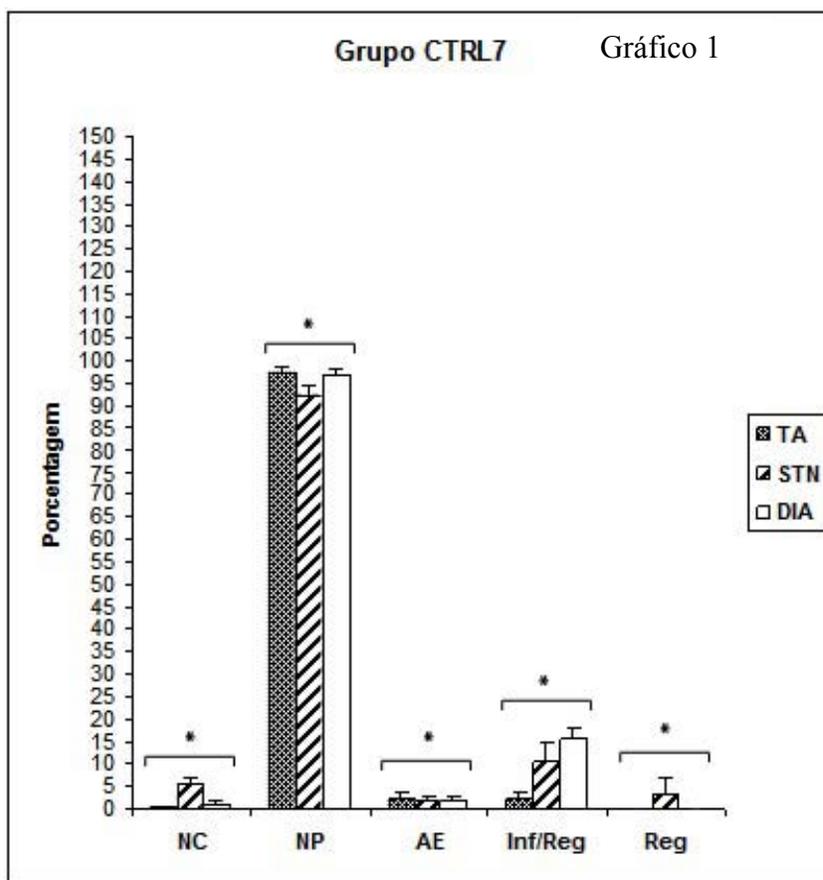
**Tabela 2.** Comparação entre a porcentagem da área de fibras em estágio inicial e avançado de regeneração, entre os grupos *mdx* CTRL7 e T7 e *mdx* CTRL14, T14 e T14AA, dos músculos tibial anterior (TA), esternomastóideo (STN) e diafragma (DIA).

	<i>Mdx</i>	% Área	
		Inf/Reg	Reg
<b>TA</b>	CTRL7	2,50±1,15	0,00±0,00
	T7	2,40±1,20	0,00±0,00
	CTRL14	7,98±6,27	5,97±5,00
	T14	26,98±27,74	6,75±7,93
	T14AA	13,10±4,55	5,17±5,48
<b>STN</b>	CTRL7	10,77±3,86	3,21±3,49
	T7	11,96±3,99	4,19±3,55
	CTRL14	8,68±4,62	6,23±5,87
	T14	12,02±9,47	7,12±7,47
	T14AA	15,04±13,42	3,99±3,23
<b>DIA</b>	CTRL7	15,54±2,48	0,02±0,04
	T7	18,09±16,31	0,03±0,05
	CTRL14	8,36±6,27	0,53±0,41
	T14	18,62±5,56*	3,52±3,94
	T14AA	13,43±6,48	1,04±1,78

**%Área Inf/Reg**, porcentagem da área total que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; **%Área Reg**, porcentagem da área total em estágio avançado do processo de regeneração. \* Diferença significativa do músculo DIA CTRL14. (P<0,05; Teste T de *student*).

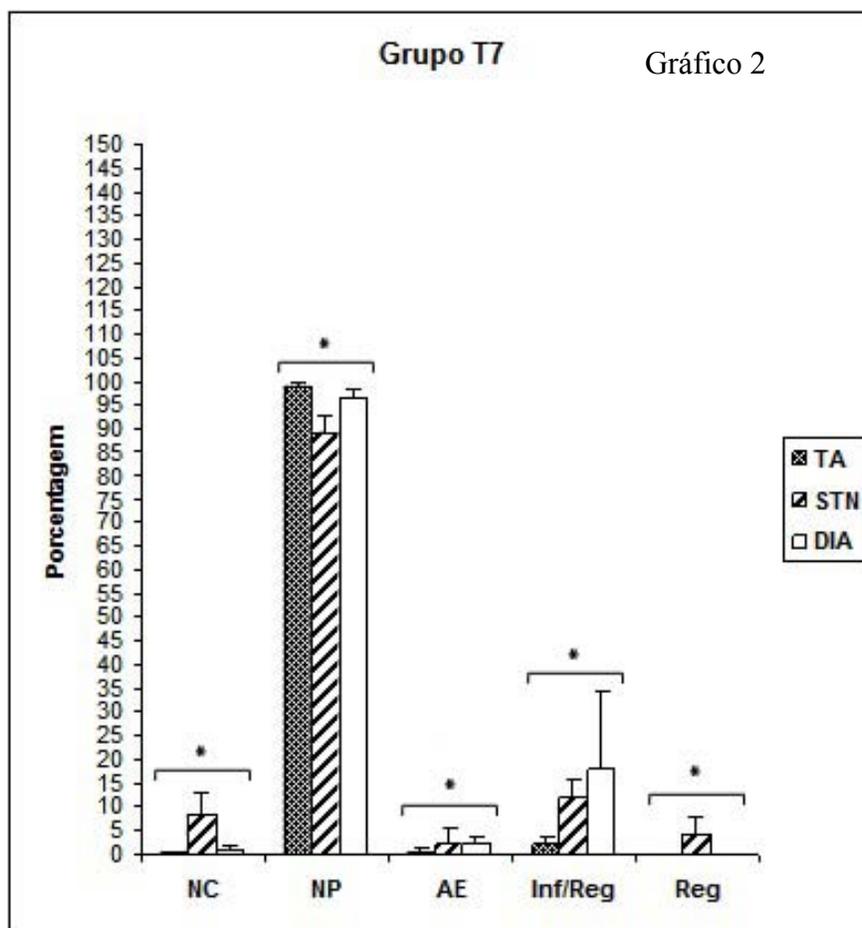
### 4.3. Análise comparativa entre os músculos TA, STN e DIA

Comparando-se os músculos TA, STN e DIA dos 5 grupos experimentais (*mdx* CTRL7, *mdx* T7, *mdx* CTRL14, *mdx* T14 e *mdx* T14AA) verificamos que estes respondem de forma diferente frente ao processo de degeneração ou ao tratamento com ácido ascórbico. No grupo *mdx* CTRL7 a porcentagem de fibras com NC nos músculos TA, STN e DIA foi de 0.30, 5.60 e 1.09; com NP foi de 97.39, 92.51 e 97.12; positivas ao AE foi de 2.31, 1.89 e 1.79 respectivamente, verificando diferença significativa em todas as variáveis (ANOVA  $p < 0,05^*$ ). Diferença significativa também foi observada nas áreas de Inf/Reg e Reg, cujos valores em porcentagem obtidos foram: 2.50 (TA), 10.77 (STN) e 15.54 (DIA) para as áreas de Inf/Reg; 0.00 (TA), 3.21 (STN) e 0.02 (DIA) para as áreas de regeneração (ver Gráfico 1).



**Gráfico 1:** CTRL7, grupo *mdx* controle de 7 dias; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma; NC, fibras regeneradas com núcleo central; NP, fibras com núcleo periférico; AE, fibras positivas ao azul de Evans; **Inf/Reg**, área que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; **Reg**, área em estágio avançado do processo de regeneração. \* Diferença significativa entre os músculos do mesmo grupo. ( $P < 0,05$ ; ANOVA).

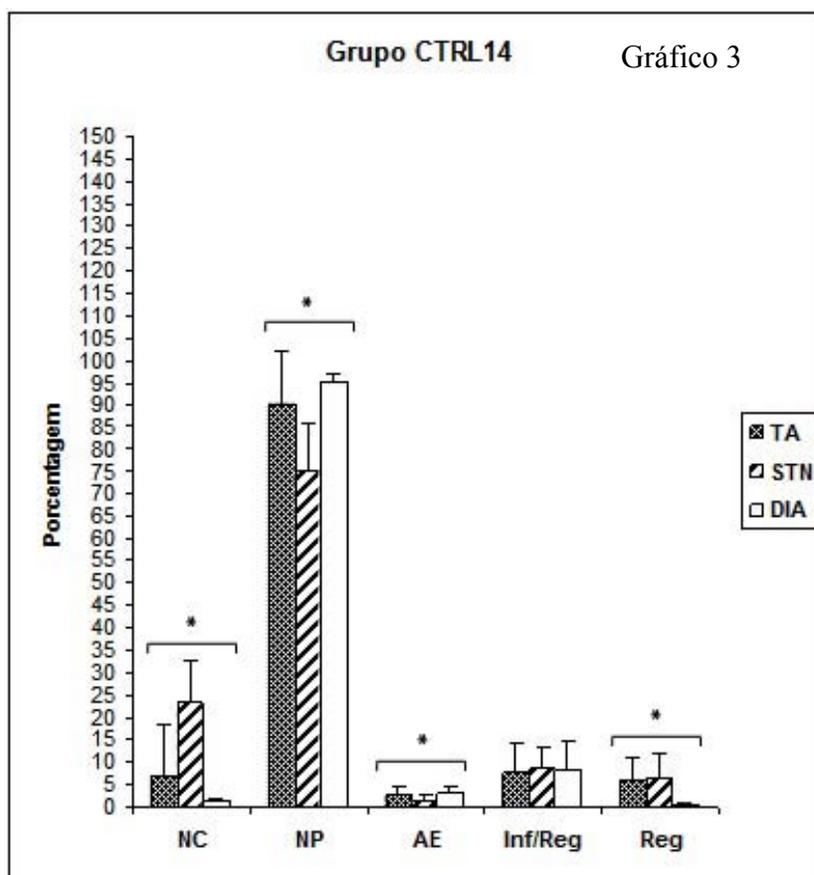
No grupo *mdx* T7 foi observada diferença significativa entre os músculos TA, STN e DIA. A porcentagem de fibras com NC foi de 0.32, 8.52 e 1.13; de NP foi de 99.01, 89.26 e 96.62; e de fibras positivas ao AE foi de 0.68, 2.22 e 2.25 respectivamente. Quanto à área de Inf/Reg a porcentagem foi de 2.40, 11.96 e 18.09; e quanto à área de Reg foi de 0.00, 4.19 e 0.03 para os músculos TA, STN e DIA respectivamente; tendo diferença significativa (ANOVA  $p < 0,05^*$ ) (ver Gráfico 2).



**Gráfico 2:** T7, grupo *mdx* tratado de 7 dias; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma; NC, fibras regeneradas com núcleo central; NP, fibras com núcleo periférico; AE, fibras positivas ao azul de Evans; **Inf/Reg**, área que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; **Reg**, área em estágio avançado do processo de regeneração. \* Diferença significativa entre os músculos do mesmo grupo. ( $P < 0,05$ ; ANOVA).

Nos músculos TA, STN e DIA do grupo *mdx* CTRL 14 houve diferença significativa em relação às fibras com NC (6.79, 23.30 e 1.56), NP (90.31, 75.10 e 95.25) e positivas ao AE (2.90, 1.60 e 3.19) respectivamente. Nas áreas de Inf/Reg neste grupo, não foi observada diferença significativa entre os músculos TA, STN e DIA, sendo os valores 7.98, 8.68 e 8.36 respectivamente. Para as áreas de Reg a porcentagem de cada músculo TA, STN e DIA foi de

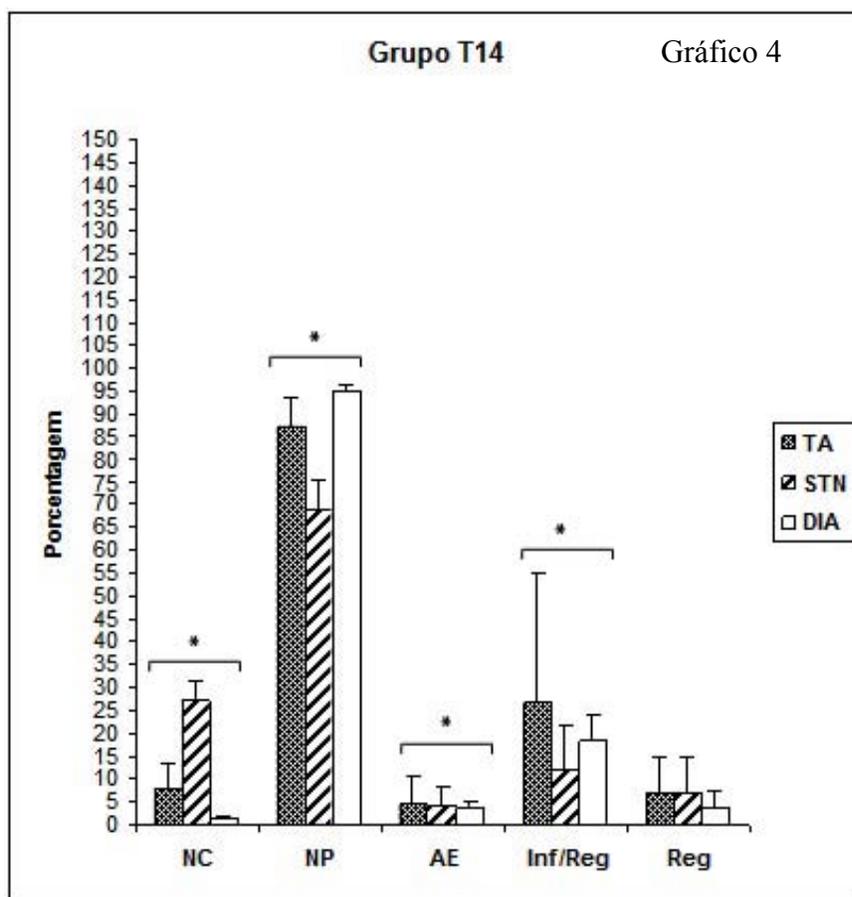
5.97, 6.23 e 0.53 respectivamente, tendo diferença significativa (ANOVA  $p < 0,05^*$ ) (ver Gráfico 3).



**Gráfico 3:** CTRL14, grupo *mdx* controle de 14 dias; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma; NC, fibras regeneradas com núcleo central; NP, fibras com núcleo periférico; AE, fibras positivas ao azul de Evans; Inf/Reg, área que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; Reg, área em estágio avançado do processo de regeneração. \* Diferença significativa entre os músculos do mesmo grupo. ( $P < 0,05$ ; ANOVA).

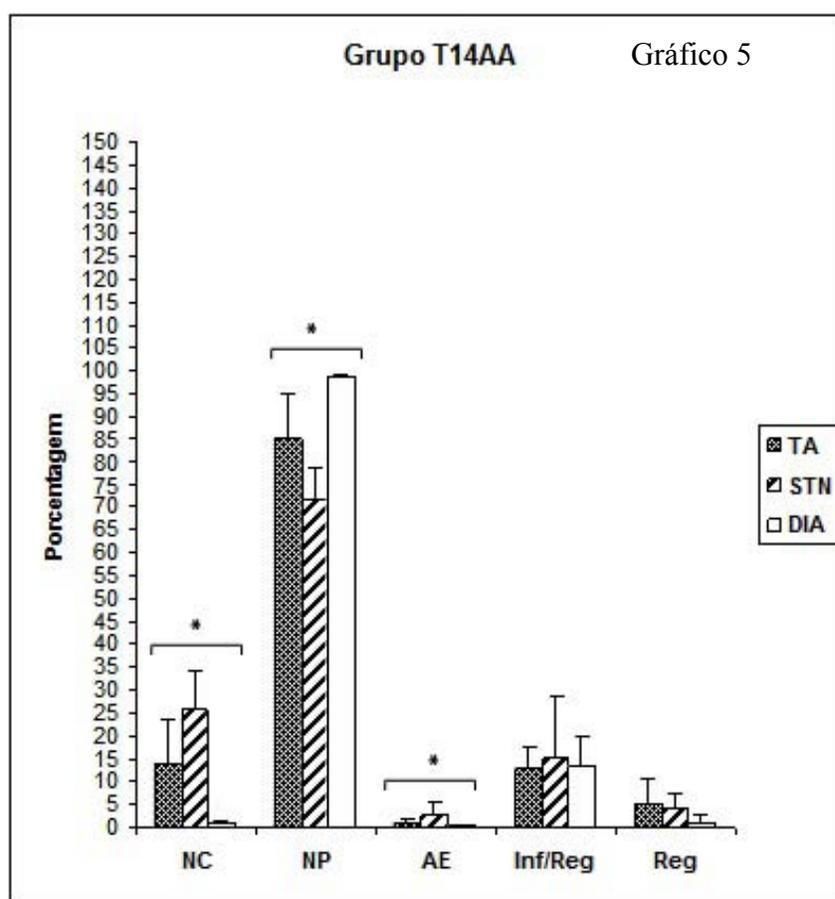
No grupo *mdx* T14 a porcentagem de fibras com NC nos músculos TA, STN e DIA foi de 7.96, 27.38 e 1.51; com NP foi de 87.20, 68.69 e 94.99; e positivas ao AE foi de 4.84, 3.93 e 3.49 respectivamente, verificando diferença significativa em todas as variáveis (ANOVA

$p < 0,05^*$ ). Diferença significativa também foi observada nas áreas de Inf/Reg entre os músculos TA, STN e DIA, cujo valores encontrados foram 26.98, 12.02 e 18.62 respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os músculos TA, STN e DIA, nas áreas de Reg, cujos valores foram 6.75, 7.12 e 3.52 respectivamente (ANOVA  $p < 0,05^*$ ) (ver Gráfico 4).



**Gráfico 4:** T14, grupo *mdx* tratado de 14 dias; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma; NC, fibras regeneradas com núcleo central; NP, fibras com núcleo periférico; AE, fibras positivas ao azul de Evans; **Inf/Reg**, área que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; **Reg**, área em estágio avançado do processo de regeneração. \* Diferença significativa entre os músculos do mesmo grupo. ( $P < 0,05$ ; ANOVA).

No grupo *mdx* T14AA houve diferença significativa entre os músculos TA, STN e DIA, em relação as seguintes variáveis: NC (13.77, 25.70 e 0.85); NP (85.14, 71.71 e 98.66) e AE (1.09, 2.59 e 0.49) respectivamente. Nas áreas de Inf/Reg e Reg não houve diferença significativa entre os músculos TA, STN e DIA deste grupo, cujos valores em porcentagem obtidos foram: TA (13.10), STN (15.04) e DIA (13.43) para as áreas de Inf/Reg; TA (5.17), STN (3.99) e DIA (1.04) para as áreas de regeneração (ANOVA  $p < 0,05^*$ ) (ver Gráfico 5).



**Gráfico 5:** T14AA, grupo *mdx* tratado de 14 dias com maior dosagem; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; DIA, músculo diafragma; NC, fibras regeneradas com núcleo central; NP, fibras com núcleo periférico; AE, fibras positivas ao azul de Evans; Inf/Reg, área que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; Reg, área em estágio avançado do processo de regeneração. \* Diferença significativa entre os músculos do mesmo grupo. ( $P < 0,05$ ; ANOVA).

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

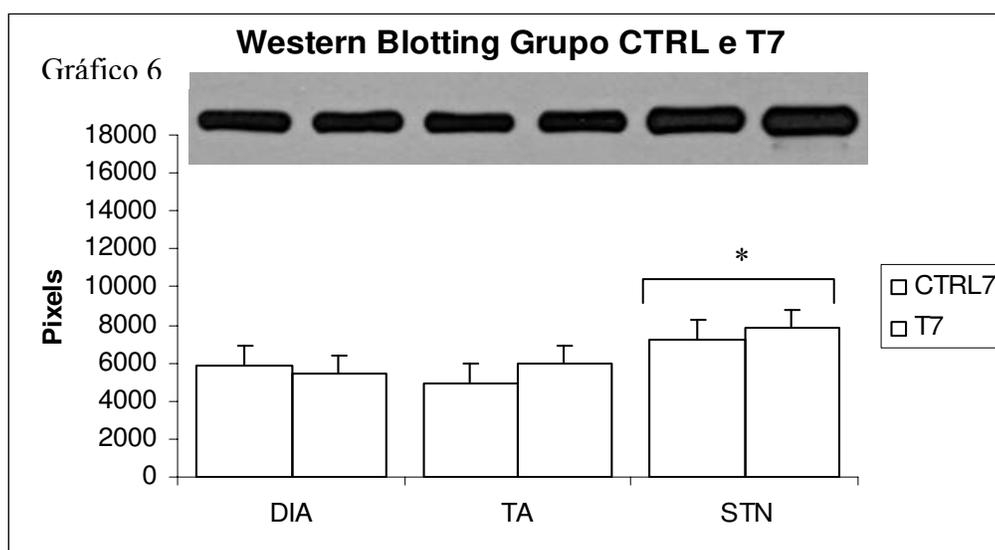
Os valores de CK total encontrados no plasma sanguíneo não mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ; teste t de *student*) entre os grupos estudados. As médias dos valores de CK, expressos em U/L, para os animais dos grupos *mdx* T7 e *mdx* CTRL7 foram  $1587,97 \pm 820,33$  e  $670,45 \pm 427,06$  respectivamente e para os animais dos grupos *mdx* T14 e *mdx* CTRL14 foram  $711,28 \pm 638,44$  e  $1655,16 \pm 806,82$  respectivamente (ver Tabela 3).

**Tabela 3.** Quantificação de CK (U/L) em camundongos *mdx* de 21 e 28 dias, gavagem com água (*mdx* CTRL7 e *mdx* CTRL14 respectivamente) e tratados por gavagem com ácido ascórbico (*mdx* T7 e *mdx* T14 respectivamente). Média  $\pm$  desvio padrão (dp).

	média $\pm$ dp
<i>mdx</i> CTRL7	$670,45 \pm 427,06$
<i>mdx</i> T7	$1587,97 \pm 820,33$
<i>mdx</i> CTRL14	$1655,16 \pm 806,82$
<i>mdx</i> T14	$711,28 \pm 638,44$

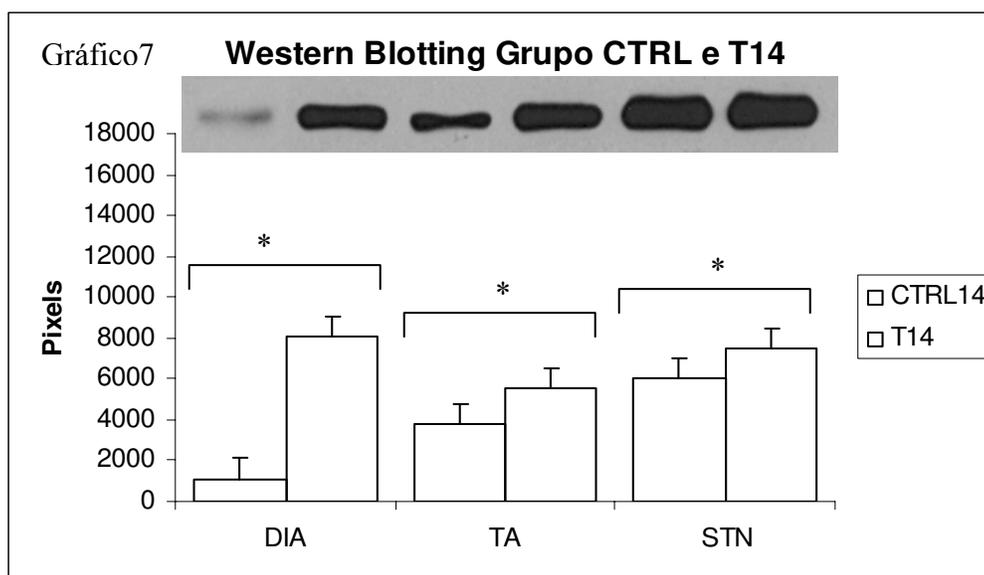
#### 4.5. Análise do Western Blotting

Comparando a quantificação do TNF- $\alpha$  entre o grupo *mdx* CTRL7 e T7 verificamos diferença significativa ( $p < 0,05^*$ ) no músculo STN com 7252.00 pixels no grupo *mdx* CTRL7 e 7829.00 pixels no grupo *mdx* T7. Nos demais músculos (TA e DIA) deste grupo não houve diferença significativa (ver Gráfico 6).



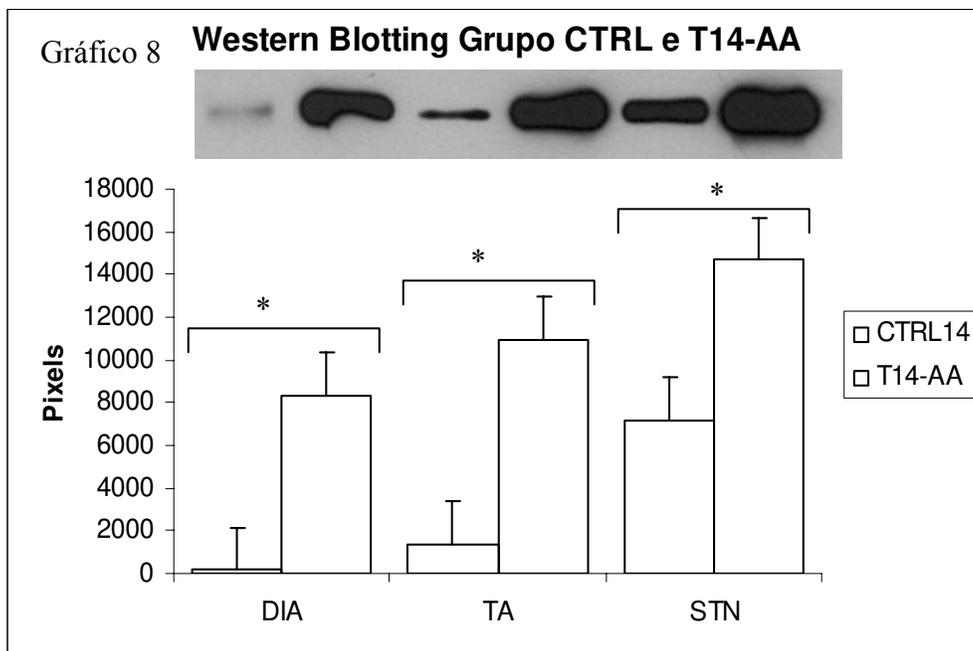
**Gráfico 6:** Western Blotting, quantificação do TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; CTRL7, grupo *mdx* controle de 7 dias; T7, grupo *mdx* tratado de 7 dias; DIA, músculo diafragma; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; \* Em relação ao seu respectivo controle ( $P < 0,05$ ; Teste T de *student*).

No grupo *mdx* CTRL14 e T14 verificamos diferença significativa em todos os músculos estudados DIA, TA e STN. A mensuração do TNF no músculo DIA foi de 1114.67 pixels encontrado no grupo *mdx* CTRL14 e de 8052.33 no grupo *mdx* T14; no TA foi de 3763.00 e 5503.40 e no STN de 6049.33 e 7450.67 respectivamente (ver Gráfico 7).



**Gráfico 7:** Western Blotting, quantificação do TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; CTRL14, grupo *mdx* controle de 14 dias; T14, grupo *mdx* tratado de 14 dias; DIA, músculo diafragma; TA, músculo tibial anterior; STN, músculo esternomastóideo; \* Em relação ao seu respectivo controle ( $P < 0,05$ ; Teste T de *student*).

No grupo *mdx* T14AA também verificamos diferença significativa nos músculos DIA, TA e STN em relação ao grupo *mdx* CTRL14. A mensuração do TNF no músculo DIA foi de 171.33 pixels encontrado no grupo *mdx* CTRL14 e de 8330.67 no grupo *mdx* T14-AA; no TA foi de 1350.67 e 10948.00 e no STN de 7167.67 e 14691.67 respectivamente (ver Gráfico 8).



**Gráfico 8:** Western Blotting, quantificação do **TNF- $\alpha$** , fator de necrose tumoral; **CTRL14**, grupo *mdx* controle de 14 dias; **T14-AA**, grupo *mdx* tratado de 14 dias com maior dosagem; **DIA**, músculo diafragma; **TA**, músculo tibial anterior; **STN**, músculo esternomastóideo; \* Em relação ao seu respectivo controle ( $P < 0,05$ ; Teste T de student).

## **5. DISCUSSÃO**

## 5.1. Análise da mionecrose

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 e análise da integridade do sarcolema, nos fornecem dados que, em conjunto, descrevem o processo de degeneração e regeneração ocorridos ao longo do tempo nos músculos esqueléticos (GASCHEN e BURGUNDER, 2001).

No presente trabalho, verificamos que os resultados obtidos referentes a mionecrose para o grupo *mdx* CTRL estão de acordo com a literatura (PAGEL e PARTRIDGE, 1999; HENRICKS-WEHLING et al, 2004). Comparando-se os músculos TA, STN e DIA, 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 em regeneração e de fibras regeneradas (núcleo central) e de fibras positivas ao AE. O AE 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, 2007c; MATSUDA et al, 1995).

Possivelmente, as diferenças observadas na mionecrose nos músculos do grupo *mdx* CTRL são conseqüências dos diferentes tempos em que cada músculo apresenta os ciclos de degeneração/regeneração (PASTORET e SEBILLE, 1995; MARQUES et al, 2008). 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 e TORRISI, 2004).

Na análise do grupo *mdx* tratado verificamos diminuição significativa da mionecrose nos músculos TA do grupo *mdx* T7 e DIA do grupo *mdx* T14AA em relação ao grupo controle, evidenciada pelo maior número de fibras com núcleo periférico e por menor porcentagem de fibras positivas ao AE.

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 e 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, 2005; BANI et al, 2008). Estes dados, associados aos dados obtidos no presente trabalho sugerem que os músculos distróficos podem apresentar comportamentos diferentes frente às estratégias farmacológicas. De acordo com Gosselin e colaboradores (2007) os músculos distróficos (diafragma, gastrocnêmio e genioglossa) apresentaram resultados diferentes após tratamento com pirfenidona.

Outro ponto a ser destacado é que o tratamento com ácido ascórbico teve efeito no músculo que apresentou maior degeneração (fibras positivas ao AE) naquele período. Observamos que com 21 dias de vida, o músculo TA passa por um pico de degeneração, com aumento significativo da porcentagem de fibras marcadas com AE comparada aos músculos

STN e DIA ( $p < 0,05$ ). Já com 28 dias de vida, o músculo mais atingido é o DIA. Isto pode explicar a ação protetora do ácido ascórbico somente na degeneração dos referidos músculos no período em questão.

No grupo *mdx* T7 a dosagem de ácido ascórbico foi suficiente para proteger o músculo TA, mas no grupo *mdx* T14 houve a necessidade de uma dosagem maior para se obter resultado com o músculo DIA. De acordo com a literatura é necessária alta concentração de ácido ascórbico para que este possa atuar como um pró-oxidante bem como um antioxidante (PODMORE et al, 1998). Sendo assim, sugerimos que é necessária dosagem maior de ácido ascórbico para prevenir a mionecrose nos animais *mdx* com mais de 21 dias de idade, visto que, neste período, observa-se extensa área de necrose nos músculos destes animais (SHAVLAKADZE et al, 2004). Reforçando nossa hipótese, estudos com coelhos demonstraram que alta dosagem de ácido ascórbico é mais eficaz contra os danos oxidativos induzidos por cloreto estanoso do que doses mais baixas (YOUSEF et al, 2007).

Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos que sugerem que o estresse oxidativo influencia no processo degenerativo que ocorre no *mdx* (WILLIANS e ALLEN, 2007; DORCHIES et al, 2006). Segundo Willians e Allen, (2007) o estresse oxidativo pode ser um dos fatores responsáveis pela patogênese observada no músculo cardíaco dos camundongos distrófico. Colaborando ainda com nossos resultados, os dados obtidos com o músculo cardíaco após tratamento com antioxidante demonstraram que o período do início do tratamento, bem como a duração e concentração do fármaco são fatores importantes que interferem no efeito da terapia farmacológica. O trabalho em questão sugere que os antioxidantes podem prevenir o início do desenvolvimento do processo degenerativo no camundongo *mdx*, porém não são capazes de reverter à patologia já existente.

Embora o presente trabalho não permita elucidar os mecanismos pelos quais o ácido ascórbico protegeu a fibra distrófica, sugerimos que o antioxidante possa ter atuado diretamente no sarcolema, inibindo a peroxidação lipídica. Diversos trabalhos sugerem que os radicais livres contribuem na perda da integridade da membrana nas distrofias musculares (DISATNIK et al, 1998; MURPHY e KEHRER, 1989). As EROs oxidam componentes celulares, particularmente lipídios e proteínas, ocasionando lesões na membrana plasmática. Desta forma, a membrana apresenta maior permeabilidade ao cálcio extracelular. O aumento do cálcio intracelular provoca hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (RANDO, 2002).

## **5.2. Análise de regeneração**

No presente trabalho, dividimos a área total do músculo distrófico em 2 regiões: a área de inflamação-regeneração, que representa o estágio inicial do processo regenerativo, com abundante infiltrado inflamatório, bem como mioblastos e miotubos. A área de regeneração, que representa um estágio mais avançado de regeneração, visto que contém mioblastos e pobre infiltrado inflamatório.

Verificamos que o tratamento com ácido ascórbico aumentou de forma significativa a porcentagem da área de inflamação-regeneração do músculo DIA no grupo *mdx* T14. Como já discutido no item anterior, a dose de ácido ascórbico utilizada no grupo *mdx* T14 não foi suficiente para impedir o processo de degeneração no músculo distrófico, fato este que poderia explicar o aumento significativo da área de inflamação-regeneração no músculo DIA. Outro fator que pode estar envolvido é o aumento significativo do TNF- $\alpha$ , que será discutido no item 5.4.

### 5.3. Análise da creatina-quinase

Outra análise realizada em nossos experimentos foi a determinação da creatina-quinase (CK) total no plasma sanguíneo. A enzima CK catalisa a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP), com a formação de creatina-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).

No presente trabalho, não houve diferença significativa entre os níveis de CK dos grupos experimentais analisados. Este dado não é coerente com os dados histológicos dos músculos TA do grupo *mdx* T7 e do DIA do grupo *mdx* T14AA, em que o tratamento com ácido ascórbico diminuiu as fibras positivas ao AE e aumentou o número de fibras com núcleo periférico, quando comparados ao grupo *mdx* CTRL. Concluímos que a quantificação de CK não acompanha as alterações histológicas de cada músculo, pois os valores obtidos da CK são valores séricos totais, ou seja, expressam a necrose do músculo cardíaco e de todos os músculos esqueléticos.

Também devemos considerar que, embora a análise de CK seja amplamente utilizada para diagnósticos, os valores obtidos podem apresentar considerável variação individual. Segundo Warren e colaboradores (2006) vários fatores podem influenciar a variação nos níveis plasmáticos desta enzima. Assim, os valores de CK devem servir apenas como análise

complementar para o diagnóstico e acompanhamento da evolução das doenças neuromusculares.

#### **5.4. Análise de Western Blotting**

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). 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 e LI, 2001; STEWART et al, 2004). Aumento significativo de fibras positivas ao TNF- $\alpha$  foi observado nos músculos de camundongos *mdx* (KUMAR e BORIEK, 2003; PIERNO et al, 2007) e em músculos de pacientes distróficos (KURU et al, 2003). De acordo com Tartaglia e Goeddel (1992), a resposta das células musculares ao TNF- $\alpha$  é mediada por duas populações de receptores de membrana, TNFR1 (55kDa) e TNFR2 (75kDa).

O efeito antiinflamatório do ácido ascórbico tem sido sugerido. O ácido ascórbico exerce este efeito por diminuir a concentração de EROs que é produzida por macrófagos e modular a ativação de macrófagos e neutrófilos na progressão da inflamação (BULGER et al, 2002). Atua também inibindo a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual tem um papel importante na produção de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (HORTON et al, 2001; CARCAMO et al, 2002). No presente trabalho, os músculos TA, STN e DIA dos animais tratados com ácido ascórbico apresentaram aumento significativo de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo controle. O que nos permite sugerir que o aumento do TNF- $\alpha$  não está necessariamente correlacionado ao aumento da mionecrose.

Aumento significativo de TNF- $\alpha$  também foi observado em camundongos Balb/c tratados com vitamina C durante ativação de células T (NOH et al, 2004). Cabe ressaltar que o aumento da concentração de TNF- $\alpha$  foi observado somente quando as células T foram ativadas. A discrepância de nossos resultados e do trabalho citado anteriormente com outros trabalhos que verificaram diminuição do TNF- $\alpha$  em animais tratados com antioxidantes, pode ser devida a concentração do fármaco, via de administração, espécie animal utilizada ou a presença de células T estimuladas.

Segundo a literatura, as células do sistema imune, particularmente as células T, podem ter um papel na patologia das distrofias musculares, constituindo um componente autoimune da doença, nas quais as células T são ativadas por um antígeno comum (SPENCER e TIDBALL, 2001). Sendo assim, levantamos a hipótese de que as células T possam estar ativadas nos animais distróficos, explicando o aumento significativo de TNF- $\alpha$  observado em nossos experimentos. Entretanto, o mecanismo pelo qual as células T ativadas influem na concentração de TNF- $\alpha$ , em animais suplementados com ácido ascórbico ainda não está estabelecido. Não se sabe se o efeito ocorre devido ao acúmulo intracelular de ácido ascórbico, ou se há uma ligação deste a um determinado receptor de membrana ainda não identificado (NOH et al, 2004).

## **6. CONCLUSÕES**

- 1) O tratamento precoce de camundongos *mdx* com o antioxidante ácido ascórbico diminuiu significativamente a mionecrose nos músculos tibial anterior e diafragma.
- 2) A terapia antioxidante teve efeito nos músculos que apresentaram pico de degeneração no período analisado.
- 3) Os músculos dos camundongos *mdx* tratados com ácido ascórbico apresentaram aumento significativo no conteúdo de TNF- $\alpha$ . Sugerimos que este aumento não está necessariamente correlacionado ao aumento da mionecrose.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHN, T.; YUN, C.H.; OH, D.B. Tissue-specific of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicology Letter* 166: 27-36, 2006.

BANI, C. et al. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of *mdx* mice. *Muscle Nerve*, v. 37, n. 5, p. 583-592, 2008.

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*. 401: 88-106, 2002.

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*. 82 (2): 102-115, 2004.

BORNAMAM, 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* 56: 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*. 72: 248-254, 1976.

BRENMAN, J.E.; CHAO, D.S.; GREE, S.H.; et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$  1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*; 84: 757-67, 1996.

BRENMAN, J.E.; CHAO, D.S.; XIA, H.; ALDAPE, K.; BREDT, D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*; 82: 743-52, 1995.

BRIGUET, A., COURDIER-FRUH, I., FOSTER, M., MEIER, T., MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscular Disorders*. v.14, p.675-682, 2004.

BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C817-33, 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.* 75: 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.* 81: 1189-1192, 1984.

BULGER, E.M.; GARCIA, I.; MAIER, R.V. Intracellular antioxidant activity is necessary to modulate the macrophage response to endotoxin. *Shock.* 18: 58-63, 2002.

CARCAMO, J.M.; PEDRAZA, A.; BORQUEZ-OJEDA, O.; GOLDE, D.W. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting IKappa B alpha phosphorylation. *Biochemistry.* 41: 12995-3002, 2002.

CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and effects in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (6), 1086-1107, 1999.

CHANG, W.J.; IANNACCONE, S.T.; LAU, K.S. et al. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 9142-7, 1996.

COHN, R.D.E; CAMPBELL, K.P. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, v. 23, p. 1456-1471, 2000.

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* 77: 69-81, 1988.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric Neurology* 36:1-7, 2007.

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.* 161: 77-84, 1998.

DORCHIES, O.M.; WAGNER, S.; VUADENS, O.; WALDHAUSER, K.; BUETLER, T.M.; KUCERA, P.; RUEGG, U.T. Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C616-C625, 2006.

DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. Muscular dystrophies involving the dystrophin- glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, v. 12, p. 349-361, 2002.

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

ERVASTI, J. M. Dystrophin, its interaction with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1772, p. 108-117, 2007.

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

FREDSTROM, S. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. *Nutrition*. V. 18, p. 537-539, 2002.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ass. Med. Brasil*, 43 (1): 61-8, 1997.

GASCHEN, F., BURGUNDER, J.M. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. *Acta Neuropathologica*. v.101, p.591-600, 2001.

GOSSELIN, L. E.; WILLIAMS, J.E.; PERSONIUS, K.; FARKAS, G. A. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (mdx) mice: impact of pirfenidone. *Muscle Nerve* 35: 208-216, 2007.

GROTE, K.; FLACH, I.; LUCHTEFELD, M.; 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.* 92: E80-6, 2003.

GROUND, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, v. 15, p. 381-391, 2005.

GROUND, M.D., TORRISI, J. Anti-TNF $\alpha$  (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB Journal*. v.18, p.676-682, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, v. 3444, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. New York, *Oxford University Press*, 1999.

- HAMER, P.W.; McGEACHIE, J.M.; DAVIES, M.J.; GROUNDS, M.D. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J. Anat.* 200: 69-79, 2002.
- HASLETT, J. N. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. *Mamm. Genome*, v. 16, n. 10, p. 739-748, 2005.
- HAUSER, E.; HOGER, H.; BITTNER, R.; WIDHALM, K.; HERKNER, K.; LUBEC, G. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. *Neuroped.* 26: 260-2, 1995.
- HAYCOCK, J. W.; MACNEIL, S.; JONES, P.; HARRIS, J. B.; MANTLE, D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport.* 8: 357-61, 1996.
- HENRICKS-WEHLING, 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.
- HOFFMAN, E.P. Clinical and histopathological features of abnormalities of dystrophin-based membrane cytoskeleton. *Brain Pathol.* 6: 49-61, 1996.
- HORTON, J.W.; WHITE, D. J.; MAASS, D.L.; HYBKI, D. P.; HAUDEK, S.; GIROIR, B. Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma-mediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion. *J. Traumatol*, 50: 397-408, 2001.
- IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: Strain and muscle differences. *Cell Tissue Res*; 249: 509-21, 1987.
- JAVESGHANI, D.; MAGDER, S.A.; BARREIRO, E.; QUINN, M. T.; HUSSAIN, S. N. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 412-18, 2002.

JI, L.L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol.* 258: 918-23, 1990.

JONES, K. J. et al. Deficiency of the syntrophins and  $\alpha$ -dystrobrevin in patients with inherited myopathy. *Neuromuscul. Disord.*, v. 13, p. 456-467, 2003.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, vol 30, n° 6, pp620-650, 2002.

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.* 17: 386-396, 2003.

KURU, S.; INUKAI, A.; KATO, T.; LIANG, Y.; KIMURA, S.; SOBUE, G. Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 105: 217-224, 2003.

LEFAUCHEUR, J.P.; PASTORET, C.; SEBILLE, A. A phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.* 242: 70-76, 1995.

LU, X.; SONG, Y.; FU, Y.; SI, J.; QIAN, K. Ascorbic acid alleviates pancreatic damage induced by dibutyltin dichloride (DBTC) in rats. *Yonsei Med J* 48 (6): 1028-1034, 2007.

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. 548, n. 3, p. 837-846, 2003.

MARQUES, M.J., MACHADO, R.V., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in *mdx* sternomastoid, diaaphragm and tibialis anterior. *Muscle & Nerve* 37 (1): 61-67, 2008.

MARQUES, M. J., PERTILLE, A., CARVALHO, V. C., CARVALHO, C. L. T., SANTO NETO, H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *Anat Rec. Part A.* v.290, p.846-854, 2007a.

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, 2007b.

MARQUES, M.J.; MATSUMURA, C.Y.; SANTO NETO, H. Alteration in the permeability of dystrophic fibers during neuromuscular junction development. *Acta Biol Hung.* 58: 1-9, 2007c.

MATHEW, D.; NAIR, C.K.K.; JACOB, J.A.; BISWAS, N.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S.; KAGIYA, T.V. Ascorbic acid monoglucoside as antioxidant and radioprotector. *J. Radiat. Res.* 48: 369-376, 2007.

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.* 118: 959-964, 1995.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108: 652-659, 2000.

MECHLER, F.; IMRE, S.; DIOSZEGHY, P. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 63: 279-83, 1984.

MENDELL J.R.; ENGEL W.K.; DERRER, E.C. Duchenne muscular dystrophy: Functional ischemia reproduces its characteristic lesions. *Science*; 172: 1143-5, 1971.

MESSINA, S.; BITTO, A.; AGUENNOUZ, M.; MINUTOLI, L.; MONICI, M.C.; ALTAVILLA, D.; SQUADRITO, F.; VITA, G. *Experimental Neurology* 198: 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. *Musc-Nerv.* 28 (5): 561-569, 2003.

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

NAKAE, Y.; STOWARD, P.J.; KASHIYAMA, T.; SHONO, M.; AKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; NONAKA, I. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J Mol Histol.* 35: 489-499, 2004.

NAKASHIMA, J.; TACHIBANA, M.; UENO, M.; MIYAJIMA, A.; BABA, S.; MURAI, M. Association between tumor necrosis factor in serum and cachexia in patients with prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 4:1743-1748, 1998.

NIEBRÓJ-DOBOSZ, I.; FIDZIANSKA, A.; HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, I. oxidative damage to muscle proteins in dystrophinopathies. *Acta Myol.* V. 21, p. 12-17, 2002.

NOH, K.; LIM, H.; MOON, S.K.; KANG, J.S.; LEE, W.J.; LEE, D.; HWANG, Y.I. Mega-dose vitamin C modulates T cell functions in Balb/c mice only when administered during T cell activation. *Immunology Letters.* 98: 63-72, 2004.

OZAWA, E. et al. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve*, v. 2, n. 5, p. 563-576, 2005.

PAGEL, C. N.; PARTRIDGE, T. A. Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. *Journal of Neurological Science*, v. 164, p. 103-116, 1999.

PASTORET, C., SEBILLE, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci.* v.129, p.97-105, 1995.

PIERNO, S.; NICO, B.; BURDI, R.; LIANTONIO, A.; DIDONNA, M.P.; CIPPONE, V.; FRAYSSE, B.; ROLLAND, J.F.; MANGIERI, D.; ANDRETTA, F.; FERRO, P.; CAMERINO, C.; ZALLONE, A.; CONFALONIERI, P.; DE LUCA, A. 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. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33: 344-359, 2007.

PODMORE, I.D.; GRIFFITHS, H. R.; HEBERT, K. E.; MISTRY, N.; MISTRY, P.; LUNEC, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 392: 559, 1998.

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*. 12 (15): 1813-1821, 2003.

PORTER, J.D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H.J.; RAO, J.S.; 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.

POWERS, S.K.; DeRUISSEAU, K.C.; QUINDRY, J.; HAMILTON, K.L. Dietary antioxidants and exercise. *J. Sports Sci.* 22: 81-94, 2004.

RADLEY, H.; GROUNDS, M. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiology of Disease* 23: 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. *Neuromuscul. Disord.* 7: 379-386, 1997.

RANDO, T. A. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. *Am J Phys Med Rehabil*;81; 175-186, 2002.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Musc-Nerv*, 24: 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. *Neuromuscul. Disord.* 8: 14-21, 1998.

REID, M. B.; LI, Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* 2: 269-272, 2001.

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

SCHMALBRUCH, H. The muscular dystrophies. In: Mastaglia, F. L and Walton, J. (Eds.), *Skeletal muscle pathology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, p.235, 1982.

SEIXAS, S.L.; CÂNDIDO, J.L.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(3-B), p.610-617, 1997.

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.* 10:829-843, 2004.

SLUPPHANG, 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.

SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul Disord.* 11: 556-64, 2001.

STENINA, M.A.; SAVCHUK, V.I.; SITNIKOV, V.F.; KRIVOV, L.I.; KUZNETSOV, A.B.; VOEVODIN, D.A.; YARYGIN, V.N.; SUKHIKH, G.T. Hereditary muscular dystrophy in

mdx mice as a homologous model for introduction of cell technologies in the treatment of progressive muscular dystrophies in humans. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 10:425-428, 2004.

STEWART, C. E.; NEWCOMB, P. V.; HOLLY, J. M. Multifaceted roles of TNF-alpha in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. *J Cell Physiol.* 198: 237-247, 2004.

STRAUB, V.; CAMPBELL, K. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr. Opin. Neurol.*, v. 10, n. 6, p. 168-175, 1997.

STRAUB, V.; RAFAEL, J.A.; CHAMBERLAIN, J.S.; CAMPBELL, K.B.; Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. *Journam of Cell Biology*, v. 139, n. 2, p. 375-385, 1997.

STRYER, L. metabolismo: conceitos e planos básicos. In: \_\_\_\_\_. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 430, cap. 17.

SUNADA, Y.; CAMPBELL, K. Distrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr. Opin. Neurol.*, v. 8, p. 379-385, 1995.

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

TARTAGLIA, L. A.; GOEDEL, D. V.; Two TNF receptores. *Immunol Today*. 13: 151-153, 1992.

TORRES, L. F.; DUCHEN, L. W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphologicas studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 110: 269-299, 1987.

VANDEBROUCK, A; DUCRET, T.; BASSET, O.; SEBILLE, S.; RAYMOND, G.; RUEGG, U.; GAILLY, P.; COGNARD, C.; CONSTANTIN, B. Regulation of store-operated

calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes.

*The FASEB Journal*, doi:10.1096/fj.04-3633fje, 2005.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.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.

*Quim. Nova*, vol. 30, nº. 5, 1323-1338, 2007.

ZHAO, S.P.; ZENG, L.H. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor in chronic heart failure with cachexia. *Int. J. Cardiol.* 58:257-261, 1997.

ZWART, L.L. et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine.* V. 26,n.1/2,p.202-226, 1999.

WARREN, G.L.; O'FARRELL, L.; ROGERS, K.R.; BILLINGS, K. M.; SAYERS, S.P.;

CLARKSON, P.M. CK-MM autoantibodies: Prevalence, immune complexes, and effect on CK clearance. *Muscle & Nerve*, v. 34 (3), p. 335-346, 2006.

WATCHKO, J. F.; O'DAY, T. L.; HOFFMAN, E. P. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J. Appl. Physiol.*, v. 93, p. 407-417, 2002.

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* 33: 657-662, 2006.

WILLIAMS, L.A.; ALLEN, D.G. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H846-H855, 2007.

WILSON, R. L. Free radical repair mechanisms and the interation of glutathion and vitamin C and E. In: Radioprotectors and anticarcinogens, eds. Nyga, O. F. And Simic, M.G., pp 1-23, *Academic press*, New York, 1983.

YOSEF, M.I.; AWAD, T.I.; ELHAG, F.A.; KHALED, F.A. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. *Toxicology* 235: 194-202, 2007.

YOSHIDA, M.; YONETANI, A.; SHIRASAKI, T.; WADA, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Phifiology-Regulatory Integrative and Comparative Phisiology*, v.290, n.2, p. R449-R455,2006.



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

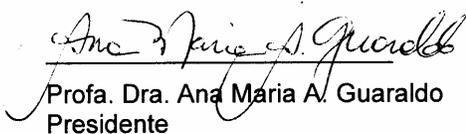
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1217-1, sobre "Influência do ácido ascórbico no processo de degeneração muscular em camundongos distróficos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Elaine Minatel / Erika Tonon, 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 na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de março de 2007.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1217-1, 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 March 28, 2007.

Campinas, 28 de março de 2007.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada “Influência do Ácido Ascórbico 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.

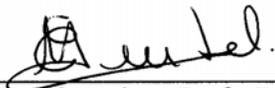
( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

( X ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1217-1). *Aprov. 28/03/07*

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



\_\_\_\_\_  
Aluna: Érika Tonon



\_\_\_\_\_  
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

*Ana Maria Aparecida Guaraldo*  
Nome: \_\_\_\_\_  
Função: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP