



# STRESS OXIDATIVO E PROTEÇÃO A MIONECROSE NA DISTRÓFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: ESTUDO EM CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS DA LINHAGEM *MDX*

Maurício, A.F.; Minatel, E.; Marques, M.J.\*;

\*marques@unicamp.br

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, UNICAMP

Apoio financeiro: CNPq e FAPESP

**Palavras-chave:** distrofia muscular; lipofuscina; *mdx*; stress oxidativo

## INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária caracterizada por fraqueza e perda muscular progressiva que afeta um em cada 3.500 meninos nascidos vivos. O comprometimento muscular é causado pela falta da distrofina, proteína estrutural do sarcolema que promove a sua estabilização. Em ausência de distrofina, ocorre aumento da permeabilidade ao cálcio e conseqüente mionecrose. Recentemente, considera-se que o stress oxidativo também esteja relacionado a fisiopatologia da DMD. A lipofuscina resulta da degradação oxidativa de macromoléculas e sua presença indica se os músculos são mais ou menos suscetíveis a oxidação celular. No camundongo *mdx*, modelo experimental da distrofia muscular, os músculos estriados esqueléticos são afetados em diferentes intensidades. Músculos da pata, diafragma e esternomastóide sofrem ciclos de mionecrose e regeneração muscular. Os músculos extra-oculares (EOMs), por outro lado, não apresentam degeneração, sendo protegidos da falta da distrofina.

## OBJETIVO

Verificar se os músculos extra-oculares de camundongos distróficos da linhagem *mdx* possuem acúmulo de lipofuscina comparável ao observado em músculos da pata do mesmo animal e de animais controle.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: camundongos com 2 meses de idade e idosos (entre 9 a 26 meses), de ambos os sexos, da linhagem *mdx* (n=6) e da linhagem controle C57BL/10 (n=6).

Anestesia: hidrato de cloral 10% ip. Músculos estudados: tibial anterior e Extra-Ocular (EOM).

Técnica: congelamento e corte no criostato. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência para verificar a presença dos grânulos de lipofuscina, que são auto-fluorescentes.

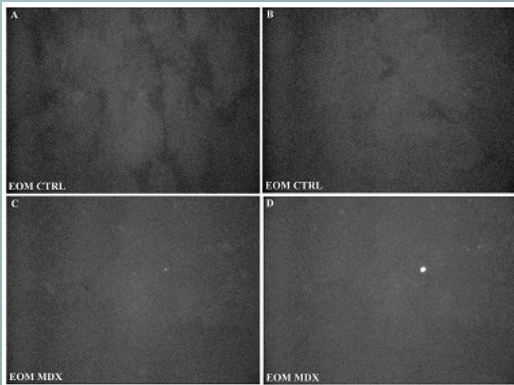
Os grânulos foram contados com auxílio de um contador manual. Para a análise estatística utilizou-se o teste t de Student.

Os EOMs distróficos são protegidos da mionecrose



Cortes transversais dos músculos corados por HE. Notar a ausência de núcleos centrais no músculo protegido A, EOM reto. Notar a presença de núcleos centrais nos músculos afetados B e C, EOM retrator do bulbo e tibial anterior (TA), respectivamente.

Em jovens, o músculo EOM reto *mdx* não possui lipofuscina



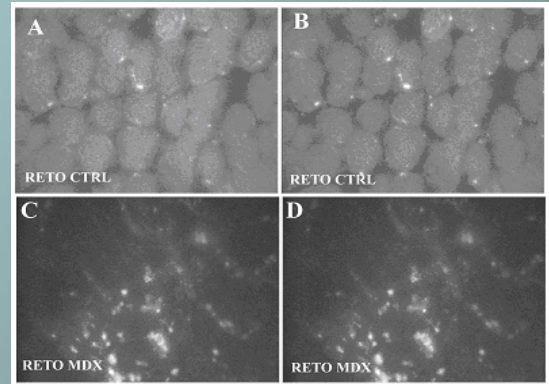
Músculo extra-ocular/retos de animais jovens. Grânulos de lipofuscina ao microscópio de fluorescência. A, B, músculo controle extra-ocular/reto. Notar ausência de grânulos fluorescentes, nos dois canais (verde e azul). Em C, D, músculo extra-ocular distrófico. Notar a presença de um grânulo brilhante, notadamente no canal da fluoresceína (azul, D) e menos brilhante no canal da rodamina (verde, C).

## RESULTADOS/DISCUSSÃO

A quantidade de grânulos de lipofuscina no músculo EOM/reto distrófico foi semelhante àquela observada no músculo EOM/reto controle, em animais jovens. O músculo EOM/retrator distrófico, tal como o TA distrófico, apresentou aumento significativo do número de grânulos quando comparado ao seu controle e ao EOM/reto distrófico.

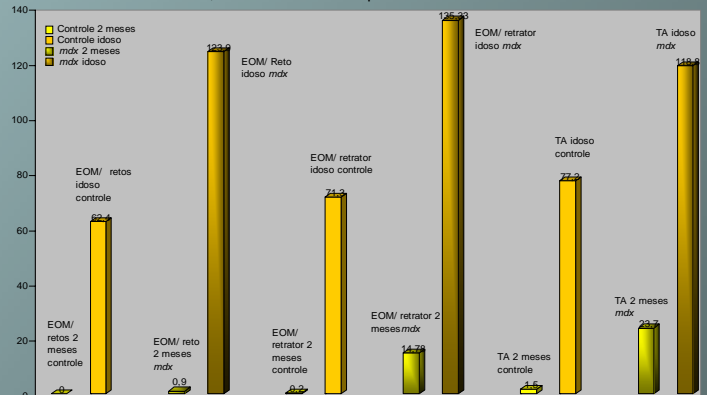
Com o envelhecimento, houve aumento de lipofuscina em todos os músculos estudados. Porém, os animais *mdx* idosos ainda apresentaram um acúmulo maior destes grânulos do que os controles.

Em idosos, o músculo EOM reto *mdx* possui lipofuscina



Músculo extra-ocular/reto de animais idosos. Grânulos de lipofuscina ao microscópio de fluorescência. Em músculo controle (A, B), notar a presença de grânulos fluorescentes, nos dois canais (verde e azul). Em C, D, músculo distrófico, notar a presença abundante de grânulos brilhantes, observados concomitantemente nos dois canais (verde, C, azul, D).

Com o envelhecimento, houve aumento de lipofuscina em todos os músculos estudados.



Quantidade de grânulos de lipofuscina (média) presente em cada músculo, em animais controles e *mdx* de 2 meses de idade e idosos.

## CONCLUSÃO

Concluímos que os mecanismos de proteção dos músculos extra-oculares distróficos parecem envolver uma diminuição do stress oxidativo. O músculo retrator do bulbo, por outro lado, apresenta comportamento igual aos músculos da pata no que se refere a deposição de lipofuscina, sugerindo que eles sofrem stress oxidativo que pode colaborar na patogênese da distrofia. O envelhecimento aumentou a deposição de lipofuscina, inclusive afetando os músculos distróficos protegidos e controles. Isto sugere que os mecanismos envolvidos no envelhecimento possam levar a uma possível perda do tamponamento do stress oxidativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Marques M.J.; Pertille A.; Carvalho C. L. T.; Santo Neto H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *The Anatomical Record*, 2007a. *in press*.
- Nakae Y.; Stoward P.J.; Shono M.; Matsuzake T. Most apoptotic cells in *mdx* diaphragm muscle contain accumulated lipofuscin. *Histochem Cell Biol*. 205 – 214, 2001.
- Nakae Y.; Stoward P.J.; Kashiyama T.; Shono M.; Akagi A.; Matsuzake 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.