

Análise morfológica dos músculos Tibial Anterior, Esternomastóide e Diafragma de camundongos *mdx* tratados com ácido ascórbico: comparação entre as vias de administração oral, intraperitoneal e intramuscular

Shiratori, J.H.; Minatel, E.

Departamento Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia; IB-UNICAMP

Palavras-Chave: Camundongos *mdx*, Regeneração muscular, Antioxidante

INTRODUÇÃO

A peroxidação lipídica causada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no período que antecede o início da degeneração muscular no camundongo *mdx* (modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne), sugere que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos primários da degeneração muscular distrófica, ao invés de ser um efeito secundário deste processo.

OBJETIVO

No presente trabalho verificamos se o tratamento com ácido ascórbico (AA) antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração, diminui a mionecrose em camundongos *mdx* e qual via de administração oral (O), intramuscular (IM) ou intraperitoneal (IP) é mais indicada para o tratamento



METODOLOGIA

Camundongos *mdx*, com 14 dias de vida receberam por gavagem; injeção IM e/ou injeção IP doses diárias de 200 mg/kg de AA diluído em água por 14 dias. Animais *mdx* controle receberam solução salina pelas mesmas vias e período. Cortes congelados dos músculos Tibial Anterior (TA), Esternomastóide (STN) e Diafragma (DIA) foram utilizados para: (1) quantificar fibras em necrose (evidenciadas pelo marcador azul de Evans) e fibras regeneradas (indicadas pela presença de núcleo central), (2) delimitar áreas de Inflamação/regeneração (Inf/Reg) e regeneração (Reg).

RESULTADOS

Análise Qualitativa

As fibras com alteração de permeabilidade ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Fig. 1A). As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com outras fibras de mesma característica (Fig. 1B). Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, citoplasma eosinófilo e diâmetro próximo ao de uma fibra com núcleo periférico (Fig. 1B).

As fibras musculares em regeneração foram classificadas em dois estágios: 1) Fibras no estágio inicial de regeneração, caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeados por infiltrado inflamatório exuberante (Áreas de Inf/Reg; Fig. 1C); 2) Fibras no estágio mais avançado de regeneração, caracterizadas por citoplasma levemente basófilo, núcleo central, maior proporção de citoplasma em relação ao volume nuclear e diminuição aparente do infiltrado inflamatório (Áreas de Reg; Fig. 1D).

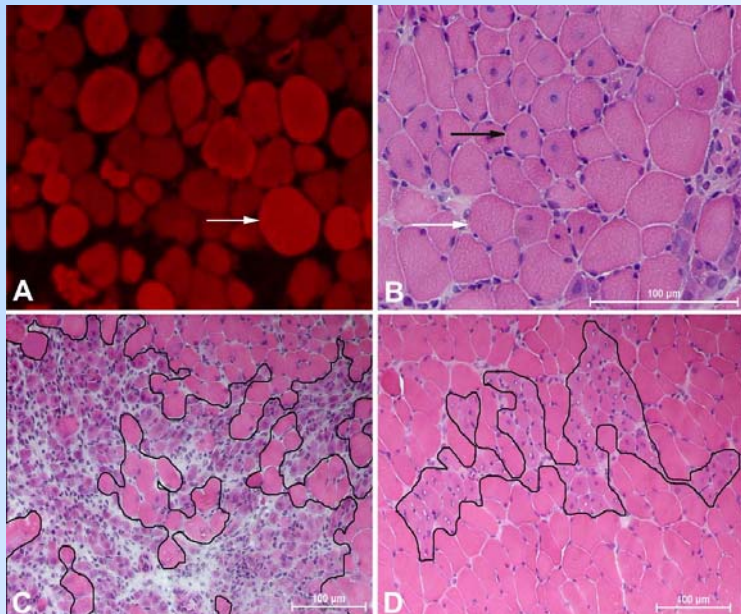


Figura 1: Secções transversais de músculos DIA (A), STN (B) e TA (C e D) de camundongos *mdx* tratados com ácido ascórbico. Em A, fibras em degeneração, positivas ao AE (seta) em microscopia de fluorescência (200X). Em B, fibras musculares com núcleo periférico de formato poligonal (seta branca) e fibras musculares regeneradas com núcleo centralizado (seta preta). Em C, área de inflamação/regeneração com exuberante infiltrado inflamatório e fibras musculares em estágio inicial de regeneração. Em D, área de regeneração com fibras no estágio mais avançado de regeneração. Coloração HE (B, C e D).

Análise Quantitativa

Observou-se diminuição significativa na porcentagem de fibras positivas ao AE no músculo DIA do grupo *mdx* tratado com AA via oral (tratado: $0,49 \pm 0,91\%$, controle: $3,19 \pm 1,48\%$; $p < 0,05$) e aumento na porcentagem de fibras com núcleo periférico (tratado: $98,66 \pm 1,05\%$, controle: $95,25 \pm 1,79\%$; $p < 0,05$) quando comparadas a seu respectivo controle. No grupo *mdx* tratado com AA via intramuscular observou-se uma diminuição na porcentagem de área de Inf/Reg (tratado: $4,86 \pm 0,73\%$, controle: $7,87 \pm 2,01$; $p < 0,05$). Na via intraperitoneal não foram observadas diferenças significativas nas variáveis analisadas.

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), Esternomastóide (STN) e Diafragma (DIA) dos grupos oral (O), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM).

	Músc	%NC	%NP	%AE	
O	TA	CTRL	6,79±1,51	90,31±1,37	2,90±1,30
		T	7,96±5,33	87,20±6,37	4,84±5,67
	DIA	CTRL	1,56±0,51	95,25±1,79	3,19±1,48
		T	1,51±0,43	98,66±1,05*	0,49±0,91*
	STN	CTRL	23,36±9,39	75,10±10,61	1,60±1,26
		T	27,38±3,93	68,69±6,69	3,93±4,36
IP	TA	CTRL	8,34±3,39	91,43±5,43	0,27±0,28
		T	6,02±3,98	92,73±5,43	1,25±1,88
	DIA	CTRL	2,64±0,99	97,03±1,32	0,33±0,41
		T	1,98±0,75	96,52±2,47	1,51±1,93
	STN	CTRL	15,75±4,67	80,13±4,91	4,13±4,23
		T	15,97±11,13	78,73±12,54	5,30±11,04
IM	TA	CTRL	4,08±2,31	94,64±2,49	1,20±0,88
		T	9,99±5,74	89,51±5,37	0,68±1,32
	DIA	CTRL	3,36±1,12	96,64±1,12	0,00±0,00
		T	3,04±1,10	96,83±1,06	0,10±0,23
	STN	CTRL	17,70±7,03	80,53±5,31	1,70±1,95
		T	16,66±4,47	78,51±8,33	4,86±4,52

%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 DIA CTRL ORAL. ($P < 0,05$; Teste T de student)

Tabela 2. Comparação entre a porcentagem da área de fibras em estágio inicial e avançado de regeneração, entre os grupos O, IP e IM, dos músculos Tibial Anterior (TA), Diafragma (DIA) e Esternomastóide (STN).

	Músc	% Área Inf/Reg	% Área Reg	
O	TA	CTRL	7,98±6,27	5,97±5,00
		T	13,10±4,55	5,17±5,48
	DIA	CTRL	8,36±6,27	0,53±0,41
		T	13,43±6,48	1,04±1,78
	STN	CTRL	8,68±4,62	6,23±5,87
		T	15,04±13,42	3,99±3,23
IP	TA	CTRL	10,10±9,77	5,69±3,98
		T	2,95±1,20	16,33±14,43
	DIA	CTRL	6,34±2,32	0,89±0,45
		T	6,45±2,35	3,70±3,73
	STN	CTRL	11,81±5,69	3,72±0,88
		T	7,65±5,98	5,29±1,94
IM	TA	CTRL	5,56±2,68	4,57±3,63
		T	6,45±4,46	2,96±2,55
	DIA	CTRL	7,87±2,01	1,35±0,87
		T	4,86±0,73*	0,91±0,61
	STN	CTRL	5,80±1,76	3,85±2,52
		T	6,76±3,22	4,46±1,00

%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 CTRL IM. ($P < 0,05$; Teste T de student)

CONCLUSÕES

O tratamento com o antioxidante ácido ascórbico:

- 1) Por via oral, diminuiu significativamente a mionecrose no músculo diafragma nos camundongos *mdx*.
- 2) Por via intramuscular, diminuiu significativamente a área de inflamação/regeneração no músculo diafragma nos camundongos *mdx*.