

Zanqueta, M.M.; Franzatto, A. C.; Binotto, A.; Pertille, A.; Minatel, E.
Departamento Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia; IB-UNICAMP

INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética que apresenta evolução clínica com piora progressiva ao longo do tempo. Várias estratégias farmacológicas estão sendo testadas no camundongo *mdx*, modelo experimental da DMD, no intuito de minimizar a evolução da doença. Atualmente, o efeito dos antioxidantes tem recebido atenção especial. Estudos *in vivo*, demonstraram redução da degeneração muscular em *mdx* tratados com antioxidante derivado do chá verde ou submetidos a uma dieta pobre em ferro, a qual reduz a produção de radicais hidroxila.

OBJETIVO

Verificar se o tratamento com o antioxidante ácido ascórbico diminui a degeneração muscular em camundongos *mdx* submetidos ao exercício. O ácido ascórbico é um antioxidante não enzimático, hidrossolúvel e é conhecido por ser um potente inibidor da peroxidação lipídica.



MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos *mdx* adultos foram divididos em 4 grupos experimentais: *mdx* sedentário (S), *mdx* sedentário + ácido ascórbico (SAA), *mdx* exercício (E), e *mdx* exercício + ácido ascórbico (EAA). Os animais dos grupos 3 e 4 foram submetidos a períodos de 4 semanas de exercício de corrida contínua, praticada 2 vezes por semana, sob uma esteira motorizada horizontal com uma velocidade de 10 cm/seg. Os animais dos grupos 2 e 4 receberam por gavagem doses diárias de 200 mg/kg de ácido ascórbico diluído em água por 5 semanas. Os animais dos grupos 1 e 3 receberam solução salina, pela mesma via e período. Todos os animais foram submetidos à análise de medida de força. Cortes congelados do músculo Tibial Anterior (TA) foram utilizados para análise morfológica (número de fibras positivas ao azul de Evans; número de fibras regeneradas, áreas de inflamação/regeneração e regeneração) e/ou para quantificação do 4-HNE (Western Blotting).

RESULTADOS

Análise Qualitativa

As fibras com alteração de permeabilidade do sarcolema ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Fig. 1A). As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal (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: 1º Fibras no estágio inicial de regeneração, caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeados por infiltrado inflamatório exuberante (Áreas de Inflamação/Regeneração; Fig. 1C); 2º 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 Regeneração; Fig. 1D).

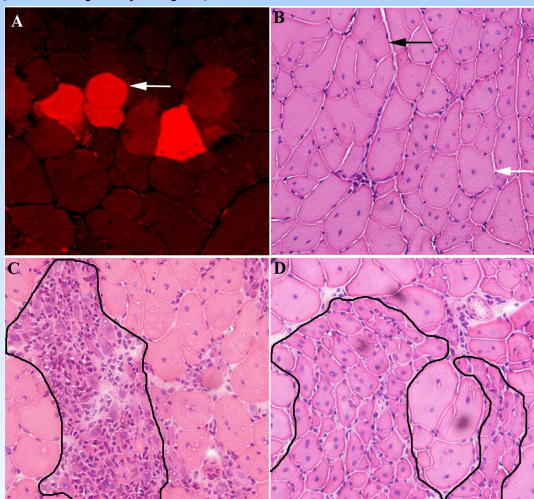


Figura 1. Seções transversais do músculo TA de camundongos *mdx* (grupo S). Em A, fibras em degeneração, positivas ao Azul de Evans (seta) em microscopia de fluorescência. Em B, fibras musculares com núcleo periférico de formato poligonal (seta preta) e fibras musculares regeneradas com núcleo centralizado (seta branca). 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). Aumento 200X.

Análise Quantitativa

O tratamento com AA diminuiu a % de fibras com núcleo central (*mdx* EAA 4,77±2,68%; *mdx* E 13,64±1,14%) no grupo *mdx* E+AA em relação ao grupo *mdx* E. Os demais dados analisados não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 1. Comparação entre a porcentagem de fibras com núcleo central, fibras com núcleo periférico e fibras marcadas pelo azul de Evans no músculo TA dos grupos *mdx* CTRL 7 e T 7 e dos grupos *mdx* S, SAA, E e EAA.

	MDX	%NC	%NP	%AE
TA	S	9,48±3,41	90,52±3,41	0,33±0,54
	SAA	13,23±3,38	86,77±3,39	0,01±0,02
	E	13,64±1,14	93,18±0,55	0,24±0,14
	EAA	4,77±2,68 *	95,23±2,68	0,45±0,58

%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 grupo *mdx* E; p<0,05; Teste T de student.

Tabela 2. Comparação entre a porcentagem da área de fibras em estágio inicial e avançado de regeneração, no músculo TA dos grupos *mdx* CTRL 7 e T 7 e dos grupos *mdx* S, SAA, E e EAA.

	MDX	% Infl/Reg	% Reg
TA	S	1,72±0,388	4,76±1,97
	SAA	9,45±5,28	11,29±7,88
	E	4,97±1,37	5,44±3,31
	EAA	4,48±6,20	11,63±21,42

%Área Infl/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.

Com relação ao teste de força (gr/gr do peso corporal), este foi realizado antes de iniciar o experimento e no dia do sacrifício. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados (p<0,05; teste t de Student).



mdx	Teste de Força
S	0,03 ± 0,01
SAA	0,03 ± 0,01
E	0,03 ± 0,00
EAA	0,03 ± 0,00

Quantificação do 4-HNE (marcador de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs)

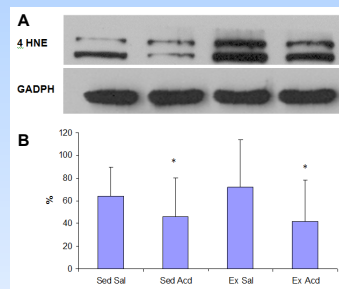


Gráfico 1. Análise dos níveis de 4-HNE no músculo TA dos grupos *mdx* S, SAA, E e EAA. A. Western Blot. B. Quantificação da intensidade das bandas do 4-HNE. GAPDH foi usado como controle interno dos experimentos. *Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle; p<0,05; Teste T de student.

CONCLUSÃO

- 1) O tratamento com o antioxidante ácido ascórbico diminuiu a degeneração muscular (por diminuir o número de fibras com núcleo central) em camundongos *mdx* submetidos ao exercício.
- 2) Não houve diferença significativa na força muscular entre os animais dos grupos experimentais.
- 3) O tratamento com o antioxidante ácido ascórbico diminuiu a concentração de EROs em camundongos *mdx* sedentários e submetidos ao exercício.

Apoio financeiro:



PIBIQ

PROCESSO 07/0189-1