INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA EM TECIDOS
BIOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS Dmd^{mdx}/J POR AAN**

SABRINA METAIRON

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:
Profa. Dra. Cibeles Bugno Zamboni**

**SÃO PAULO
2012**

“Senhor, dá-me a serenidade de aceitar as coisas que eu não posso mudar, coragem para mudar aquelas que eu posso, e sabedoria para distinguir umas das outras.”

Reinhold Niebuhr

**Dedicado aos meus amores
Max, Stephanie, Natasha, Hans e Sophie**

**Ao meu pai Richard Marcel Metairon
(1940 – 2006)**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha orientadora Dra. Cibele Bugno Zamboni pela inestimável dedicação, orientação, incentivo e apoio, que me foi dado em todo o decorrer desta jornada. Paralelamente me orientou de maneira excepcional, demonstrando um admirável profissionalismo nas continuas e valiosas discussões, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Obrigada por ousar e permitir que eu participasse no desenvolvimento científico desta tese.

AGRADECIMENTOS

A colega pesquisadora do Centro de Biotecnologia do IPEN/CNEN-SP, Dra. Miriam Fussae Suzuki pela amizade e colaboração nas diversas conversas realizadas no decorrer desta jornada.

Aos pesquisadores do Centro de Estudos do Genoma Humano do IB-USP, Profa. Dra. Mayana Zatz e Dr. Carlos Roberto Bueno Júnior, no auxílio desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna do Instituto Butantan pela sua inestimável e valiosa colaboração no desenvolver deste trabalho.

Aos profissionais da Proteção Radiológica e reator IEA-R1 pelo auxílio e dedicação aos atendimentos as irradiações realizadas.

Aos integrantes da Divisão de Informação, Documentação e Apoio ao Usuário, em especial à bibliotecária Maria Teresa Zavitoski, pela dedicação na obtenção de referências bibliográficas.

Às amigas Msc. Luciana Kovacs dos Santos e Dra. Laura Cristina Oliveira, pela amizade, incentivo e apoio nas diversas fases deste trabalho.

Aos integrantes do Grupo de Espectrometria e Espectroscopia Gama, Dr. José Agostinho Medeiros, Msc. Ilca Medeiros e Msc. Wagner Fonseca Batista pelos momentos de colaboração e descontração.

Aos meus familiares e amigos, Richard Metairon Junior, Marcos Dehn, Caroline Meneghello, Dra. Fernanda Salzano, Dra. Marcia Mielle Cavalcante, Dr. Carlos Emiliano, Dr. Frederico Genezini e Msc. Claudio Nikan, por toda a amizade, apoio e carinho.

Ao meu pai Richard Marcel Metairon (1940 – 2006) e avó Gloria Metairon (1913 – 2010), que sempre me incentivaram na luta de meus ideais, com muita dedicação, respeito, profissionalismo, e principalmente amor a todo e qualquer trabalho realizado.

E um agradecimento muito especial para as luzes de minha vida, Max, Uça, Nana, Hans e Sissi, pela incessante demonstração de amor, carinho, paciência e compreensão, recebida no decorrer desta jornada. Sem eles nada disso aconteceria!

Obrigada a todos vocês.

DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS Dmd^{mdx}/J POR AAN

Sabrina Metairon

RESUMO

Neste trabalho a determinação de elementos químicos em tecidos biológicos (sangue total, ossos e órgãos) de camundongos distróficos, usados como modelo animal da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), foi realizada utilizando técnica analítica nuclear.

O objetivo do presente trabalho foi a determinação dos valores de referência para elementos de relevância em bioquímica clínica (Ca, Cl, K, Mg e Na) e nutricional (Br e S) em sangue total, tíbia, quadríceps anterior e coração de camundongos da linhagem distrófica Dmd^{mdx}/J (10 machos e 10 fêmeas) e grupo controle C57BL/6J (10 machos), utilizando a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons – AAN. Para obter mais detalhes das alterações que esta disfunção pode causar nesses tecidos biológicos, foram calculadas matrizes de correlação entre as espécies Dmd^{mdx}/J e comparadas ao grupo controle C57BL/6J.

Para a realização deste estudo 119 amostras de tecidos biológicos foram irradiadas no reator nuclear IEA-R1 no IPEN (São Paulo, Brasil). Os resultados de análise, por AAN, constituem as primeiras estimativas para os valores de referência nesses tecidos biológicos dos camundongos Dmd^{mdx}/J e C57BL/6J. Além disso, as alterações em alguns dos coeficientes de correlações entre os animais saudáveis e com disfunção indicam uma conexão entre esses elementos no sangue, tíbia, quadríceps e coração.

Esses dados poderão auxiliar pesquisadores avaliar e comparar as vantagens e desvantagens dos diferentes tratamentos, realizados na distrofia muscular, quando estes modelos animais forem empregados, auxiliando os pesquisadores a avaliar a eficácia de novos procedimentos terapêuticos antes de serem empregados em paciente com DMD.

ELEMENTS DETERMINATION OF CLINICAL RELEVANCE IN BIOLOGICAL TISSUES OF Dmd^{mdx}/J DYSTROPHIC MICE STRAINS INVESTIGATED BY NAA

Sabrina Metairon

ABSTRACT

In this work the determination of chemistry elements in biological tissues (whole blood, bones and organs) of dystrophic mice, used as animal model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), was performed using analytical nuclear technique.

The aim of this work was to determine reference values of elements of clinical (Ca, Cl, K, Mg, Na) and nutritional (Br and S) relevance in whole blood, tibia, quadriceps and hearts from Dmd^{mdx}/J (10 males and 10 females) dystrophic mice and C57BL/6J (10 males) control group mice, using Neutron Activation Analysis technique (NAA). To show in more details the alterations that this disease may cause in these biological tissues, correlations matrixes of the DMD^{mdx}/J mouse strain were generated and compared with C57BL/6J control group.

For this study 119 samples of biological tissue were irradiated in the IEA-R1 nuclear reactor at IPEN (São Paulo, Brazil). The concentrations of these elements in biological tissues of Dmd^{mdx}/J and C57B/6J mice are the first indicative interval for reference values. Moreover, the alteration in some correlation coefficients data among the elements in the health status and in the diseased status indicates a connection between these elements in whole blood, tibia, quadriceps and heart.

These results may help the researchers to evaluate the efficiency of new treatments and to compare the advantages of different treatment approaches before performing tests in patients with muscular dystrophy.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
MOTIVAÇÃO	2
OBJETIVO	3
CAPÍTULO 1 - DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA	4
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	4
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 Reator Nuclear IEA-R1.....	11
2.2 Análise por Ativação com Nêutrons.....	11
2.2.1 Método Instrumental.....	12
2.2.2 Método Semi-Paramétrico.....	14
2.3 Instrumentação Nuclear.....	16
2.4 Calibração em Energia do Espectrômetro- γ	17
2.5 Modelos Animais.....	18
2.6 Coleta e Preparo das Amostras Biológicas.....	20
2.7 Procedimento Experimental.....	23
2.7.1 Método Instrumental (INAA)	23
2.7.2 Método Semi-Paramétrico.....	26
2.8 Análise Estatística.....	27
2.9 Materiais de Referência.....	27
2.10 Análise do "branco"	29
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS	30
3.1 Concentrações dos elementos.....	30
3.2 Correlação de Pearson.....	49
3.2.1 Método de Youden – Elipse de Confiança.....	49
CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO	62
4.1 Estudo do comportamento das concentrações dos elementos.....	62
4.2 Análise dos coeficientes de correlação.....	64
4.3 Razão entre tecidos biológicos.....	65
4.4 Comparação entre as diferentes linhagens distróficas.....	72
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	74
5.1 Perspectiva.....	75

<i>ANEXO 1</i>	76
<i>ANEXO 2</i>	78
<i>ANEXO 3</i>	79
<i>ANEXO 4</i>	82
<i>ANEXO 5</i>	84
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	86

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: A importância clínica dos elementos investigados.....	2
Tabela 2: Condições experimentais para a realização das medidas de (INAA): descrição do material biológico; massa (média, mínimo e máximo); elemento medido e as condições estabelecidas para T_i ; T_d e T_c	24
Tabela 3: Concentrações dos elementos obtidos (presente estudo) comparados aos valores certificados.....	28
Tabela 4: Concentrações de Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tíbia dos camundongos C57BL/6J e $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$	31
Tabela 5: Concentrações de Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gL^{-1}) em sangue total dos camundongos C57BL/6J e $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$	32
Tabela 6: Concentrações de Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S em músculo dos camundongos C57BL/6J e $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$	33
Tabela 7: Concentrações de Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S em coração dos camundongos C57BL/6J e $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$	34
Tabela 8: Matriz de correlação em tíbia da linhagem C57BL/6J (controle).....	50
Tabela 9: Matriz de correlação em sangue total da linhagem C57BL/6J (controle).....	51
Tabela 10: Matriz de correlação em músculo da linhagem C57BL/6J (controle).....	52
Tabela 11: Matriz de correlação em coração da linhagem C57BL/6J (controle).....	53
Tabela 12: Matriz de correlação em tíbia da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ macho.....	54
Tabela 13: Matriz de correlação em sangue total da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ macho.....	55
Tabela 14: Matriz de correlação em músculo da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ macho.....	56
Tabela 15: Matriz de correlação em coração da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ macho.....	57
Tabela 16: Matriz de correlação em tíbia da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ fêmea.....	58
Tabela 17: Matriz de correlação em sangue total da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ fêmea.....	59
Tabela 18: Matriz de correlação em músculo da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ fêmea.....	60
Tabela 19: Matriz de correlação em coração da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ fêmea.....	61
Tabela 20: Razão entre a média da concentração, medidas em tíbia e músculo, do grupo controle e distrófico (macho), em função da média da concentração em sangue.....	67
Tabela 21: Razão entre a média da concentração, medida no coração, do grupo controle e distrófico (macho), em função da média da concentração em sangue.....	68

Tabela 22: Razão entre a média da concentração, medidas em tibia e músculo, entre gênero (da linhagem distrófica), em função da média da concentração em sangue.....69

Tabela 23: Razão entre a média da concentração, medida no coração, entre gênero (da linhagem distrófica), em função da média da concentração em sangue.....70

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1: Diagrama dos 79 exons do gene da proteína distrofina.....	5
Figura 2: Diagrama de exclusão do exon 50.....	6
Figura 3: Representação da célula muscular envolta pela membrana plasmática “sarcolema”	6
Figura 4: Representação da fibra muscular.....	7
Figura 5: Heredograma.....	8
Figura 6: Principais sintomas DMD: comprometimento dos músculos dos membros inferiores.....	9
Figura 7: Escoliosis.....	9
Figura 8: A: Músculo Normal; B: Biópsia Muscular de um paciente com DMD.....	10
Figura 9: Ilustração da técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN).....	11
Figura 10: Vista frontal (10a) e lateral (10b) do arranjo experimental com detector HPGe no LEER.....	16
Figura 11: Sistema de aquisição de dados do LEER.....	17
Figura 12: Ajuste da curva de eficiência do espectrômetro- γ do LEER.....	18
Figura 13: Camundongo distrófico da linhagem Dmd^{mdx}/J	19
Figura 14: Camundongo da linhagem C57BL/6J (grupo controle).....	19
Figura 15: Camundongos das linhagens: C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J	20
Figura 16: Condição padrão de alojamento dos animais.....	21
Figura 17: Amostras de sangue total em papel de filtro (17a); acondicionamento em recipiente apropriado (17b); armazenamento em compartimento apropriado (17c).....	22
Figura 18: Remoção dos órgãos (18a), amostras de osso, coração e músculo (18b) e frasco de polietileno (18c).....	22
Figura 19: Invólucros de polietileno utilizados na irradiação: dispositivo de irradiação denominado coelho (19a), cápsula para armazenamento de pó e cilindro (Eppendorf) para armazenamento dos órgãos (19b).....	23
Figura 20a: Espectro- γ (parcial) do músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J macho irradiado por 4 minutos (fluxo de $\sim 5.10^{12} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), onde os picos não identificados em termos de energia correspondem ao Bg (radiação de fundo).....	25

Figura 20b: Espectro- γ (parcial) do músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J macho irradiado por 4 minutos (fluxo de $\sim 5.10^{12} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).....	26
Figura 21: Valores de Z – score considerando o intervalo de confiança de 68% (1DP) e 95% (2DP).....	29
Figura 22: Comparação entre as concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tíbia das linhagens Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) e C57BL/6J (macho).....	35
Figura 23: Comparação entre as concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gL^{-1}) em sangue total das linhagens Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) e C57BL/6J (macho).....	35
Figura 24: Comparação entre as concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em músculo das linhagens Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) e C57BL/6J (macho).....	36
Figura 25: Comparação entre as concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em coração das linhagens Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) e C57BL/6J (macho).....	36
Figura 26: Concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tíbia da linhagem C57BL/6J.....	37
Figura 27: Concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tíbia da linhagem Dmd^{mdx}/J macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	38
Figura 28: Concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tíbia da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	39
Figura 29: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gL^{-1}) em sangue total da linhagem C57BL/6J.....	40
Figura 30: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gL^{-1}) em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	41
Figura 31: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gL^{-1}) em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	42
Figura 32: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em músculo da linhagem C57BL/6J.....	43

Figura 33: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em músculo da linhagem Dmd^{mdx} /J macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	44
Figura 34: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em músculo da linhagem Dmd^{mdx} /J fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	45
Figura 35: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em coração da linhagem C57BL/6J.....	46
Figura 36: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em coração da linhagem Dmd^{mdx} /J macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	47
Figura 37: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em coração da linhagem Dmd^{mdx} /J fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle.....	48
Figura 38: Elipses de confiança em tibia da linhagem C57BL/6J (controle).....	50
Figura 39: Elipses de confiança em sangue total da linhagem C57BL/6J (controle).....	51
Figura 40: Elipses de confiança em músculo da linhagem C57BL/6J (controle).....	52
Figura 41: Elipses de confiança em coração da linhagem C57BL/6J (controle).....	53
Figura 42: Elipses de confiança dos elementos Ca, Cl, Mg e Na em tibia da linhagem Dmd^{mdx} /J macho.....	54
Figura 43: Elipses de confiança em sangue total da linhagem Dmd^{mdx} /J macho.....	55
Figura 44: Elipses de confiança em músculo da linhagem Dmd^{mdx} /J macho.....	56
Figura 45: Elipses de confiança em coração da linhagem Dmd^{mdx} /J macho.....	57
Figura 46: Elipses de confiança em tibia da linhagem Dmd^{mdx} /J fêmea.....	58
Figura 47: Elipses de confiança em sangue total da linhagem Dmd^{mdx} /J fêmea.....	59
Figura 48: Elipses de confiança em músculo da linhagem Dmd^{mdx} /J fêmea.....	60
Figura 49: Elipses de confiança em coração da linhagem Dmd^{mdx} /J fêmea.....	61
Figura 50: Avaliação da distribuição t-student ($p < 0,05$) entre o grupo controle e Dmd^{mdx} /J para os tecidos biológicos investigados (sangue em gL^{-1} , órgãos e ossos em gkg^{-1}).....	62
Figura 51: Avaliação da distribuição t-student ($p < 0,05$) para a linhagem distrófica, em função do gênero, para os tecidos biológicos investigados (sangue em gL^{-1} , órgãos e ossos em gkg^{-1}).....	63

Figura 52: Razão entre as médias das concentrações dos elementos investigados nos tecidos biológicos do grupo controle (C57BL/6J) e distrófico (Dmd^{mdx}/J - macho) e entre gênero da linhagem Dmd^{mdx}/J71

Figura 53: Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg e Na (gL^{-1}) em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J macho comparada com outras linhagens distróficas A/J e SJL/J como também aos valores do grupo C57BL/6J (controle).....73

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em pesquisas na área médica, biológica, da saúde pública, nutrição, genética, imunologia e áreas correlatas, animais são usados para investigações diversas, tais como: testes de novos medicamentos, vacinas, anticorpos, bem como, na produção de soro para venenos, etc. Usualmente, nestas investigações, os animais devem ser constantemente submetidos a testes laboratoriais e clínicos para avaliação de seu estado de saúde. A análise do sangue é uma das avaliações prioritárias, uma vez que este fluído corpóreo representa o mais importante referencial biológico do sistema circulatório. Análises bioquímicas, tais como: Calcemia, Calemia, Cloremia e Natremia, dentre outras, são comumente realizadas para esta finalidade. Entretanto, estas análises são realizadas em soro e, quando o material biológico é escasso ou de difícil obtenção, caso dos experimentos que envolvem animais de pequeno porte, este procedimento pode requerer o sacrifício dos mesmos durante o experimento.

Nos últimos anos, o Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER) do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq/IPEN), tem-se dedicado a realizar pesquisas aplicadas em Física Nuclear junto à área Médica, visando tanto à obtenção de dados sobre tecidos patológicos com vistas a um maior conhecimento sobre os processos de desenvolvimento dessas patologias. Nestes estudos, a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN) vem sendo aplicada, com sucesso, na investigação de alguns elementos em tecidos biológicos (TAB. 1), em animais de pequeno, médio e grande porte (camundongos, ratos, coelhos e cavalos), bem como em seres humanos [1-10]. A principal vantagem do uso da técnica de AAN esta relacionada com a possibilidade do uso de pequena quantidade de sangue total (100 a 500 μ L) quando comparado com a análise convencional, realizada em soro (2 a 5 mL de soro/análise, em média [11]), bem como a possibilidade do seu emprego da técnica na análise de órgãos e ossos.

INTRODUÇÃO

TABELA 1 – A importância clínica dos elementos investigados

Elementos Selecionados	Função [12]
Ca, Cl, K e Na	Balanço eletrolítico Equilíbrio ácido-base
Ca, K, Na e Mg	Transmissão de impulsos nervosos
Ca, Na	Auxilia na coagulação sanguínea
Cl	Equilíbrio osmótico
Ca	Formação de ossos e dentes Contração muscular (age como estimulador)
Mg	Necessário para a estrutura dos ossos e dentes Contração muscular (age como relaxante)
K	Associado ao sódio, regularizando as batidas do coração e o sistema muscular Contribui para a formação das células Contração muscular (age como relaxante)
S [*]	Encontrado em ossos e cartilagens
Br ^{**}	Desconhecida

* Relevância nutricional: os alimentos que compõem a dieta do brasileiro são ricos em enxofre (principalmente leite, queijos, ovos, carne, cebola, alho, arroz, cereais, frutas secas) e podem apresentar níveis sanguíneos elevados [2]

** Embora sua avaliação clínica não seja usual (esta relacionada a intoxicação por medicamentos), sua investigação (no presente estudo) é importante por estar presente em medicamentos (analgésicos, anti – inflamatórios, antibióticos) usados por pacientes distróficos. Com relação ao aspecto nutricional, a ingestão de frutos do mar, pela população brasileira, pode apresentar níveis sanguíneos elevados [2,3]

MOTIVAÇÃO

No presente estudo, a técnica de AAN [13] foi aplicada na investigação dos tecidos biológicos de camundongos portadores de distrofia muscular progressiva. Este estudo foi proposto com base no projeto “Avaliação bioquímica do tecido sanguíneo de camundongos distróficos utilizando a técnica de análise por ativação com nêutrons: Novo enfoque para o acompanhamento clínico”, em andamento no IPEN desde 2009 e com apoio financeiro do CNPq, em colaboração com o Centro de Biociências e com o Laboratório de Fluorescência

INTRODUÇÃO

de Raios-X, ambos do IPEN; com Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan – SP e com Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências – USP, SP. Dentre as realizações deste projeto, até o presente, o sangue de duas espécies de camundongos já foram investigados usando a técnica de AAN [6,7,9,10]: as linhagens distróficas A/J e SJL/J, indicando diferenças fisiológicas para alguns elementos e, da mesma forma, quando comparadas com sangue total de seres humanos [2-4], sugerindo que medidas específicas devam ser realizadas para cada espécie. Dando continuidade, no presente estudo, foi investigada a linhagem de camundongos Dmd^{mdx}/J. Trata-se de uma linhagem amplamente utilizada como modelo animal na investigação de distrofias musculares progressivas na qual não há caracterização de tecidos biológicos (tais como: sangue total, osso, músculo e coração).

A abordagem do trabalho é feita em 5 capítulos. No capítulo 1 é descrita a Distrofia Muscular de Duchenne. No capítulo 2 é feita a descrição da metodologia nuclear aplicada e a descrição do experimento: população de estudo, coleta e preparo das amostras, descrição e desempenho do arranjo experimental bem como a validação do método de AAN utilizando materiais de referência (padrões biológicos de sangue, osso e músculo). No capítulo 3 são apresentados os resultados e no capítulo 4 é feita a discussão. No capítulo 5 são apresentadas as conclusões e na sequência os anexos e referências.

OBJETIVO

Medir a ocorrência de metais e íons em sangue total, tíbia (osso), quadríceps anterior direito (músculo) e coração utilizando a técnica de AAN, em camundongos distróficos da linhagem Dmd^{mdx}/J e camundongos da linhagem C57BL/6J (grupo controle), na tentativa de identificar elementos que possam atuar como marcadores, gerando maior entendimento desta disfunção.

CAPÍTULO 1 – DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

As distrofias musculares progressivas (DMP) são caracterizadas por apresentarem uma degeneração progressiva irreversível da musculatura esquelética. Mais de trinta formas diferentes de distrofias musculares já foram identificadas, com diferentes níveis de complexidade, todas atacam a musculatura. Entretanto, os músculos atingidos podem ser diferentes de acordo com o tipo de DMP [14].

A incidência mundial de *doenças genéticas* entre os recém-nascidos de pais normais é de 3%. No Brasil, de acordo com o último censo realizado pelo IBGE em 2010 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), isso significa mais de 5 milhões de pessoas, sendo que só o estado de São Paulo abriga da ordem de 1 milhão de casos.[15]

De acordo com várias fontes de informação (IBMEC, DATASUS, IBGE, ANÁLISE BOOZ, ALLEN) [15] o potencial de pessoas portadoras de algum tipo de *distrofia*, tem a estimativa de 250 nascimentos por ano no Estado de São Paulo, sendo que 170 estão concentrados na região metropolitana da capital.

A distrofia muscular é uma das alterações genéticas mais comuns em todo o mundo. De cada 3.000 nascidos vivos, um é portador de algum tipo de distrofia muscular. Essa incidência supera a de doenças como o câncer infantil, que é de aproximadamente um para 4.500 nascidos, de acordo com o Inca – Instituto Nacional de Câncer. [15]

Há vários tipos de distrofias musculares, que diferem quanto a severidade, início e causas genéticas e neste estudo foi investigada a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) o tipo mais agressivo e de maior incidência.

1.1 – Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

“Eu pensei que a humanidade já estava infringida de suficientes males... e não parabenizo o Senhor pelo novo presente que a humanidade ganhou” [16,17]. Este

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

pronunciamento dramático foi feito por Guillaume Duchenne, neurologista francês que primeiro escreveu sobre a doença em 1868. Referia-se a descrição histórica de uma doença neuromuscular progressiva e destrutiva que afeta principalmente meninos. Por um século a doença seria conhecida como uma distrofia. Depois da observação de Duchenne, essa condição seria conhecida e comumente chamada como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

Em 1987, dois grupos de pesquisas, um nos Estados Unidos e outro no Canadá, identificaram e isolaram o gene da DMD [15,18]. Com isso foi possível identificar o produto que este gene codifica: a proteína distrofina [19]. O gene que codifica esta proteína é o maior gene do genoma humano [20] com 79 exons (segmento do DNA) que são unidos como as peças de um quebra-cabeça (FIG. 1).

FIGURA 1 - Diagrama dos 79 exons do gene da proteína distrofina [20].

A DMD é caracterizada pela falta de um ou mais exons do gene que codifica a proteína distrofina. Esta exclusão interfere no sequenciamento, e a mudança de apenas um aminoácido pode causar alterações funcionais graves. A mutação do gene pode resultar numa proteína completamente não-funcional. Na FIG.2 observa-se a exclusão do exon 50, o que impede que o exon 49 se junte ao exon 51, devido a sua forma, resultado em uma alteração do RNA mensageiro e codificação de uma proteína irregular [20].

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

FIGURA 2 – Diagrama de exclusão do exon 50 [20].

A distrofia muscular é uma doença de caráter hereditário. Sua principal característica é a degeneração da membrana que envolve diferentes células musculares. Todas as formas de distrofia muscular são de caráter genético e não podem ser revertidas. A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum delas [14,15]. A redução ou falta da produção da proteína distrofina na superfície da membrana da célula muscular, também chamada de sarcolema (FIG. 3), ocasiona uma “ruptura” da membrana e através dessa “abertura” há maior influxo de íons Ca na fibra muscular (FIG.4) [21-23]. O excesso de Ca penetra no sarcolema causando subsequente necrose da fibra muscular dos músculos lisos, esqueléticos e cardíacos e em alguns neurônios cerebrais [24,25].

FIGURA 3 – Representação da célula muscular envolta pela membrana plasmática “sarcolema” [26]

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

FIGURA 4 – Representação da fibra muscular [26]

A DMD é o tipo mais agressivo de distrofia. Geralmente o sexo masculino é mais afetado. Esta alta incidência no sexo masculino está relacionada ao cromossomo X (FIG. 5): como nas mulheres existem dois cromossomos X, caso um deles possua o gene defeituoso, o outro cromossomo X garantirá o bom funcionamento dos músculos, ou seja, a mulher será portadora do gene da DMD mas poderá ou não desenvolver esta doença. Entretanto, isto não ocorre com o sexo masculino que só apresenta um cromossomo X. Portanto, se o homem receber o cromossomo X materno defeituoso ele não terá o X normal para contrabalançar e garantir o bom funcionamento do músculo. É desta forma que a doença se manifesta. Por isso, a distrofia muscular atinge principalmente meninos numa incidência de 1 menino a cada 3000 - 3500 recém nascidos [15,27,28].

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

FIGURA 5 – Heredograma[29]

É importante ressaltar que 2/3 de todos os casos de mutação é transmitida pela mãe, e 1/3 (restante dos casos) ocorre por um erro genético, uma “mutação nova” sem que o gene tenha sido herdado [14, 20, 30].

Os primeiros sintomas se desenvolvem por volta dos 2 a 6 anos de idade, com manifestações de: quedas frequentes, dificuldades para subir escadas, correr, levantar-se do chão e alterações da coluna e dos tendões (FIG. 6 e 7). Com isso, nota-se um atraso de desenvolvimento com relação às outras crianças da mesma idade [31]. Com o progredir da doença ocorre também o comprometimento dos músculos dos membros superiores e, em geral, ao redor da adolescência tem-se o comprometimento do músculo cardíaco, dos músculos respiratórios, sistema gastrointestinal, coluna, olhos, cérebro e outros órgãos, levando a óbito a maioria dos indivíduos afetados antes mesmo de completarem vinte e cinco anos de idade.

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

FIGURA 6 – Principais sintomas DMD: comprometimento dos músculos dos membros inferiores [29]

FIGURA 7 – Escoliosis[29]

Nos últimos anos, a expectativa de vida desses pacientes em países desenvolvidos passou de 20 a 25 anos para mais de 35 anos. No Brasil, só a concessão dos BiPAPs – aparelhos não-invasivos de respiração artificial – aumentou a expectativa de vida dos afetados pela Distrofia de Duchenne entre 12 a 15 anos [15]. Já os afetados pelas formas mais brandas de distrofia podem ter uma vida praticamente normal se diagnosticados precocemente e tratados adequadamente.

Na prática clínica a DMD pode ser diagnosticada pela determinação de altas concentrações da enzima creatina quinase (CK) no sangue [32]; e também por exames complementares, como a biópsia muscular [15,27], onde um pequeno fragmento do músculo afetado é removido (por incisão direta no músculo) e posteriormente submetido ao exame microscópico [29].

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA

Na FIG. 8 um corte longitudinal do músculo (em presença de DMD, FIG. 8B) mostra uma extensiva substituição de fibras musculares por células adiposas. Note que o tamanho e forma e das fibras no músculo normal FIG. 8A apresenta fronteiras nas membranas sendo usado como controle muscular e na FIG. 8B, onde o paciente possui DMD, a completa falta de distrofina.

FIGURA 8 – A: Músculo Normal; B: Biópsia Muscular de um paciente com DMD [33].

Existem técnicas mais modernas para o diagnóstico desse tipo de doença, como por exemplo: a biópsia embrionária, realizada nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário [32].

Com o conhecimento da avaliação da distrofina e uso de tratamentos precoces como: sessões de fisioterapia, uso de corticóides, aparelhos de respiração assistida e cirurgias [31,34-36], é possível amenizar o quadro clínico do paciente com distrofia muscular de Duchenne permitindo que a evolução da doença ocorra de forma mais lenta.

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reator Nuclear IEA-R1

As irradiações com nêutrons foram realizadas no reator nuclear IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). Este reator é do tipo piscina. Tem como combustível nuclear urânio enriquecido a 20% no isótopo U^{235} e como moderador / refrigerador água leve [37]. Na realização deste trabalho o reator operou a uma potência de 3,0 a 4,5MW, para um intervalo de fluxo térmico de $4,32 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $7,16 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.2 Análise por Ativação com Nêutrons

A técnica analítica nuclear empregada denomina-se Análise por Ativação com Nêutrons (AAN) [13]. Em síntese, quando um feixe de nêutrons, produzido a partir de um reator nuclear ou fonte de nêutrons, atinge o material em estudo ocorre a indução de reações nucleares nos núcleos dos elementos constituintes deste material. Cada elemento (constituente do material) ao tornar-se radiativo emite uma radiação gama (γ) característica FIG. 9, processo denominado de desexcitação nuclear. A identificação e a quantificação dessas radiações, utilizando suas propriedades nucleares, permite análise qualitativa e quantitativa dos materiais ativados [13,38].

FIGURA 9 – Ilustração da técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN)

MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos denominados como Instrumental (INAA) e Semi-Paramétrico (NAA), descritos nos itens 2.2.1 e 2.2.2 respectivamente, foram utilizados na determinação da composição elementar das amostras biológicas estudadas.

2.2.1 Método Instrumental

Constitui-se na irradiação simultaneamente do material biológico (amostra em questão) e padrão (material de referência, usualmente uma mesma matriz, com valores de concentrações elementares certificados) garantindo as mesmas condições experimentais. A equação geral que fornece a atividade induzida por um fluxo de nêutrons é bem estabelecida na literatura [13] e é expressa por:

$$A = \frac{N_A \cdot \sigma \cdot \phi \cdot m \cdot f \cdot F}{M} \cdot \left(1 - e^{-\lambda T_i}\right) \quad (1)$$

onde:

- N_A número de Avogrado (tabelado);
- ϕ fluxo de nêutrons;
- σ secção de choque de ativação (tabelado) [39];
- m massa da amostra;
- f fração do isótopo que irá sofrer ativação;
- F fração do elemento ativado;
- T_i tempo de irradiação (estabelecido);
- M massa atômica do elemento;
- λ constante de desintegração (tabelado) [38].

Desta forma, a razão entre as atividades (amostra e padrão) reduz-se a:

MATERIAIS E MÉTODOS

$$\frac{A_{am}}{A_{pd}} = \frac{m_{am}}{m_{pd}} \quad (2)$$

onde:

A_{am} atividade da amostra;

A_{pd} atividade do padrão (conhecida);

m_{am} massa da amostra (estabelecida);

m_{pd} massa do padrão (estabelecido);

Conhecida a atividade da amostra é possível calcularmos a concentração do elemento através da equação (3), inserindo um fator de correção devido à diferença de tempo entre a medida do padrão e da amostra.

$$C_{am} = C_{pd} \cdot \frac{A_{am}}{A_{pd}} \cdot e^{\lambda t} \quad (3)$$

onde:

C_{am} concentração do elemento na amostra;

C_{pd} concentração do elemento no padrão (conhecido);

A_{am} área da transição gama referente a amostra (calculada pelo programa IDF [40]);

A_{pd} área da transição gama referente ao padrão (calculada pelo programa IDF [40]);

t intervalo de tempo entre o término da contagem de tempo do padrão e início da contagem de tempo da amostra (calculado);

λ constante de desintegração (tabelado) [38].

2.2.2 Método Semi-Paramétrico

Neste método, um procedimento denominado de razão de Cádmio [13,41,42] é empregada para a determinação do fluxo de nêutrons térmicos (ϕ_n) utilizando detectores de ativação, por exemplo folhas de Au, que é expresso pela equação (4):

$$\phi_n = \frac{A^{au} \cdot M}{m \cdot N_A \cdot \sigma \cdot K_t} \cdot \left(1 - \frac{F_{cd}}{R_{cd}} \right) \quad (4)$$

onde:

ϕ_n fluxo de nêutrons;

A^{au} atividade de saturação do detector de ativação (folha de Au);

M peso atômico do ouro (Au);

N_A número de Avogadro (tabelado);

m massa da amostra de Au;

F_{cd} fator de Cádmio (tabelado) [43];

R_{cd} razão obtida experimentalmente pela irradiação das folhas de Au (nua e coberta com Cd);

σ secção de choque de ativação (tabelado) [39];

k_t fator de perturbação do fluxo (tabelado) [44].

A medida da atividade pode ser obtida por um sistema de contagem conhecendo-se a eficiência de detecção da transição γ de interesse usando a expressão:

$$A = \frac{C_\gamma \cdot \lambda}{\varepsilon_\gamma \cdot I_\gamma \cdot (1 - e^{-\lambda T_i}) \cdot e^{-\lambda T_e}} \quad (5)$$

MATERIAIS E MÉTODOS

onde:

- A** atividade do isótopo radioativo;
- C_γ** área da transição γ discriminada, obtida pelo programa IDF [40];
- λ** constante de desintegração (tabelado) [38];
- ε_γ** eficiência de detecção na energia da transição γ discriminada (determinada);
- I_γ** intensidade da transição γ discriminada (tabelada) [45];
- T_i** tempo de irradiação (estabelecido);
- T_e** tempo de espera (intervalo de tempo que decorre entre o final da irradiação e o início da contagem da amostra);

Desta forma, a fração de cada elemento ativado (F) pelo fluxo de nêutrons térmicos, na amostra biológica em questão, pode ser expressa através da equação (6).

$$F = \frac{\lambda.M.C_{\gamma}.e^{-\lambda T_e}}{m.N_A.\varepsilon_{\gamma}.\sigma.\phi.I_{\gamma}.f(1 - e^{-\lambda T_i}).(1 - e^{-\lambda T_e})} \quad (6)$$

onde:

- f** fração do isótopo que irá sofrer ativação;
- C_γ** área da transição γ discriminada, obtida pelo programa IDF [40];
- M** massa atômica do elemento;
- φ** fluxo de nêutrons, calculado pela equação (4);
- λ** constante de desintegração (tabelado) [38];
- σ** secção de choque de ativação (tabelado) [39];
- ε_γ** eficiência de detecção na energia da transição γ discriminada; (obtida experimentalmente);
- I_γ** intensidade da transição γ discriminada (tabelada) [45];
- T_i** tempo de irradiação (estabelecido);
- T_e** tempo de espera (intervalo de tempo que decorre entre o final da irradiação e o início da contagem da amostra);
- T_c** tempo de contagem (estabelecido);
- m** massa da amostra;
- N_A** número de Avogadro (tabelado).

2.3 Instrumentação Nuclear

A instrumentação nuclear utilizada na aquisição dos espectros em energia da radiação γ é constituída por um espectrômetro-gama, sistema eletrônico e sistema de aquisição de dados, instalados no LEER, descritos a seguir.

O espectrômetro-gama na FIG. 10a é constituído por um detector semicondutor de HPGe de 198cm^3 (FWHM = 1,87 keV) Modelo ORTEC – GEM – 60195, montado no interior de uma blindagem de chumbo. Este tipo de blindagem minimiza a radiação de fundo do laboratório. Um suporte circular de lucite centralizado sobre a face do detector na FIG. 10b, sustenta a fonte a uma distância de 12,5 cm, que atenua efeitos secundários de detecção como soma e empilhamento, causados pelas transições gama mais intensas. Entre a fonte e o detector não há nenhum tipo de absorvedor, o que minimiza os efeitos de absorção e espalhamento.

(10a)

(10b)

FIGURA 10 – Vista frontal (10a) e lateral (10b) do arranjo experimental com detector HPGe do espectrômetro-gama no LEER.

MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema de aquisição de dados da FIG. 11 constitui-se de um amplificador (ORTEC 671), operando em modo de rejeição (pile up) e um analisador multicanal ADCAM (ORTEC 919E) ambos conectados a um microcomputador da linha PC-486.

FIGURA 11 – Sistema de aquisição de dados do LEER.

2.4 Calibração em Energia do Espectrômetro- γ

A partir da instrumentação descrita no item 2.3, é possível através do gerenciado do programa GAMMA VISION a aquisição de dados dos espectros de raios gama. Utilizando-se fontes padrão [45] de $^{56,60}\text{Co}$, ^{137}Cs e ^{152}Eu , que possuem valores de intensidade de suas transições gamas (I_γ) bem determinadas, é possível obter a curva de eficiência do detector e energia do espectrômetro- γ [46].

A equação 7 representa a função de ajuste da curva de eficiência FIG. 12.

$$\varepsilon(E) = a.e^{b.E} + c.e^{d.E} \quad (7)$$

FIGURA 12 – Ajuste da curva de eficiência do espectrômetro- γ do LEER

MATERIAIS E MÉTODOS

2.5 Modelos Animais

Geralmente a escolha de um modelo animal vai depender do experimento, custos, tempo de duração bem como a necessidade de se ter ou não uniformidade genética nas pesquisas a serem desenvolvidas [47].

Neste estudo foram selecionados os camundongos com deficiência de distrofina, da linhagem Dmd^{mdx}/J (FIG. 13), que apresentam degeneração muscular progressiva associada com necrose, fibrose e inflamação como ocorre em humanos.

FIGURA 13 – Camundongo distrófico da linhagem Dmd^{mdx}/J

Como grupo controle foi selecionada a linhagem C57BL/6J da FIG. 14, que deu origem a mutação no Dmd^{mdx}/J da DMD. Os camundongos C57BL/6J são modelos animais que servem de comparativo aos demais grupos distróficos, por não apresentar ciclos de degeneração da fibra muscular.

FIGURA 14 – Camundongo da linhagem C57BL/6J (grupo controle)

MATERIAIS E MÉTODOS

Como as fibras musculares começam a degenerar com três semanas de idade, as linhagens distróficas ao atingirem a fase adulta (4 meses de idade) já apresentam degeneração moderada. Na FIG. 15 é possível notar a diferença física entre as linhagens C57BL/6J (esquerda) e Dmd^{mdx}/J (direita).

FIGURA 15 – Camundongos das linhagens: C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J

2.6 Coleta e Preparo das Amostras Biológicas

Foram utilizados 20 camundongos distróficos da linhagem Dmd^{mdx}/J (sendo 10 machos e 10 fêmeas), e 10 camundongos machos da linhagem C57BL/6J que compõem o grupo controle, todos em fase adulta (4 meses de idade) obtidos a partir do acasalamento de animais mantidos no Centro de Biotecnologia do IPEN – CNEN/SP e Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências – USP, SP. As matrizes foram oriundas do Jackson Laboratory (Maine, USA) com aprovação do comitê de ética: 087/99 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 21º dia de vida pós-natal.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em caixas plásticas padrão (FIG. 16), em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro e temperatura ambiental de 18⁰ C), com ração e água *ad libitum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

FIGURA 16 – Condição padrão de alojamento dos animais

A coleta de sangue foi feita pela abertura frontal do abdômen, realizada logo após o deslocamento cervical (método de eutanásia recomendado e aceito sob restrição para várias espécies animais, de acordo com a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV - Conselho [48]). Imediatamente após a coleta, antes da coagulação, alíquotas pré-estabelecidas de 100 μ L (em duplicata) foram pipetadas em papel de filtro Whatman nº 41 (área de deposição $\sim 2,5 \text{ cm}^2$), (FIG. 17a), utilizando-se micropipeta calibrada; nenhum anticoagulante foi utilizado. Cada amostra foi submetida à secagem, utilizando luz infravermelha, e transferida para recipiente apropriado (tubo a vácuo sem anticoagulante), sem a necessidade de refrigeração (FIG. 17b), e armazenada até sua utilização (FIG. 17c).

MATERIAIS E MÉTODOS

FIGURA 17 – Amostras de sangue total em papel de filtro (17a); acondicionamento em recipiente apropriado (17b); armazenamento em compartimento apropriado (17c).

Os ossos (tíbias) e órgãos (corações e músculos dos quadríceps anterior direito) foram removidos, pesados, colocados em frascos de polietileno (eppendorf) e imediatamente congelados até serem utilizados (FIG. 18).

FIGURA 18 – Remoção dos órgãos (18a), amostras de osso, coração e músculo (18b) e frascos de polietileno (18c).

Amostras de sangue animal (IAEA-A13), fígado bovino em pó (NIST 1557b) e osso (NIST 1486) foram pesadas (valores pré-estabelecidos) e acondicionadas em cápsulas de polietileno com dimensões 0,05 cc e 0,2 cc respectivamente (FIG. 19), para controle de qualidade das medidas e utilização como padrão.

MATERIAIS E MÉTODOS

FIGURA 19 – Invólucros de polietileno utilizados na irradiação: dispositivo de irradiação denominado coelho (19a), cápsula para armazenamento de pó e cilindro (Eppendorf) para armazenamento dos órgãos (19b)

2.7 Procedimento Experimental

Os métodos de análise instrumental e semi-paramétrico, conforme itens 2.7.1 e 2.7.2. respectivamente, foram aplicados permitindo quantificar os núclídeos: ^{79}Br ($T_{1/2} = 17,6$ min, $E_{\gamma} = 616$ keV), ^{26}Mg ($T_{1/2} = 9,5$ min, $E_{\gamma} = 844$ keV), ^{24}Na ($T_{1/2} = 15$ h, $E_{\gamma} = 1369$ keV), ^{41}K ($T_{1/2} = 12,4$ h, $E_{\gamma} = 1524$ keV), ^{37}Cl ($T_{1/2} = 37,2$ min, $E_{\gamma} = 1643$ keV), ^{48}Ca ($T_{1/2} = 8,7$ min, $E_{\gamma} = 3085$ keV) e ^{36}S ($T_{1/2} = 5,1$ min, $E_{\gamma} = 3104$ keV). Durante todo o experimento, o fluxo de nêutrons térmicos utilizado variou em um intervalo de $4,32 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $7,16 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.7.1 Método Instrumental (INAA)

Cada amostra foi acondicionada em frascos de eppendorf e colocada no interior do invólucro padrão de irradiação, com dimensões de 2,5 cm diâmetro interno; 3,0 cm diâmetro externo e 7,0 cm de comprimento (FIG. 19a), juntamente com a amostra padrão (FIG. 19b) e posteriormente irradiadas no reator nuclear IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na TAB. 2 são apresentadas as condições experimentais estabelecidas utilizando o método Instrumental para: massa; Tempo de irradiação (T_i); Tempo de decaimento (T_d) e Tempo de contagem (T_c).

TABELA 2 – Condições experimentais para a realização das medidas por INAA: descrição do material biológico; massa (média, mínimo e máximo); elemento medido e as condições estabelecidas para T_i; T_d e T_c

Material Biológico	Massa VM (± 0,1%)	Massa (mínimo)	Massa (máximo)	Elemento/ Ti: Td: Tc
Tíbia, g	0,0644 ^{GC}	0,0571 ^{GC}	0,0734 ^{GC}	Ca/ 30s: 60s: 120s Cl, Mg, Na 30s: 60s: 900s
	0,0749 ^m	0,0601 ^m	0,0930 ^m	
	0,0585 ^f	0,0464 ^f	0,0762 ^f	
Músculo, g	0,2118 ^{GC}	0,1552 ^{GC}	0,2546 ^{GC}	Ca/ 240s: 60s: 120s Br, Cl, K, Mg, Na, S/ 240s:60s:900s
	0,3592 ^m	0,3321 ^m	0,4309 ^m	
	0,2572 ^f	0,2014 ^f	0,2923 ^f	
Coração, g	0,1004 ^{GC}	0,0893 ^{GC}	0,1135 ^{GC}	Br, Ca, Cl, K, Mg, Na, S/ 240s:60s:900s
	0,1393 ^m	0,1217 ^m	0,1691 ^m	
	0,0989 ^f	0,0780 ^f	0,1201 ^f	
Sangue, µL	100			Br, Ca, Cl, K, Mg, Na, S/ 240s:60s:120 - 300s

VM – Valor Médio (média aritmética - massa úmida em g)
 massa (mínimo): menor massa medida (massa úmida em g)
 massa (máximo): maior massa medida (massa úmida em g)

Ti: tempo de irradiação

Td: tempo de decaimento

Tc: tempo de contagem

GC: Grupo Controle (C57BL/6J - machos)

m: machos (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

f: fêmeas (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

Concluída a irradiação, amostra e padrão (material de referência certificado) foram levados para contagem no espectrômetro γ. Órgãos e ossos foram transferidos para frascos

MATERIAIS E MÉTODOS

de eppendorf (não irradiados) antes do início das contagens. Cada amostra foi irradiada por duas vezes.

A análise de cada espectro foi realizada utilizando o programa IDEFIX [40] (ANEXOS 1) e a concentração dos elementos foi obtida através do software INAA (ANEXO 2).

Para ilustrar, nas FIG. 20a e 20b são apresentados os espectros- γ do músculo ativado da linhagem Dmd^{mdx}/J macho.

FIGURA 20a – Espectro- γ (parcial) do músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J macho irradiado por 4 minutos (fluxo de $\sim 5.10^{12} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), os picos não identificados correspondem ao Bg (radiação de fundo)

FIGURA 20b – Espectro- γ (parcial) do músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J macho irradiado por 4 minutos (fluxo de $\sim 5 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

2.7.2 Método Semi-Paramétrico

Nesta etapa, cada amostra biológica foi acondicionada em frascos de polietileno (eppendorf), junto com os detectores de ativação (duas folhas metálicas de Au de $\leq 1\text{mg}$ nua e coberta com Cd) usados para medida do fluxo de nêutrons [45] e irradiados no reator IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP, permitindo a ativação simultânea desses materiais. Usando este procedimento, a atividade dos raios gama induzida, na amostra biológica e nos detectores de nêutrons (folhas de Au), são obtidas sob as mesmas condições de irradiação.

Após a irradiação (tempo de decaimento de 1 minuto) as amostras foram contadas por 15 minutos, em intervalo de 60s para executar a soma parcial dos arquivos, o que permitiu o cálculo da concentração de todos os elementos em uma única irradiação. Na

MATERIAIS E MÉTODOS

sequência, as intensidades de γ das amostras de Au (nu) e de Au coberto com Cd foram medidas no espectrômetro gama por 3 minutos, permitindo a identificação e cálculo da área da transição gama de 411 keV do ^{197}Au para determinação da Razão de Cádmio e posteriormente foi calculado o fluxo de nêutrons (ANEXO 3).

O cálculo da área foi realizado utilizando o software IDEFIX [40] (ANEXO 1) e a concentração dos elementos foi obtida através do software ATIVAÇÃO [49] (ANEXO 3).

2.8 Análise Estatística

Os seguintes tratamentos estatísticos foram aplicados:

1. Incerteza de medição (NBR-17025, 2005)
2. Limite de Detecção (LD)
3. Distribuição t de Student
4. Coeficientes de Correlação de Pearson (ANEXO 4)
5. Método de Youden – Elipse de Confiança (ANEXO 5)

2.9 Materiais de Referência

O desempenho do arranjo experimental bem como o controle de qualidade das medidas foi verificado utilizando materiais de referência certificados e aplicando o teste estatístico Z-score [50] para avaliação da exatidão e precisão do procedimento analítico. Na TAB. 3 são apresentados os valores certificados e os resultados das concentrações dos elementos obtidos nas análises dos padrões para o sangue de animal IAEA A-13, fígado bovino (NIST 1577b) e osso (NIST 1486). Esses materiais foram escolhidos por apresentarem valores certificados para todos os elementos medidos nas diferentes amostras biológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

TABELA 3 - Concentrações dos elementos obtidos (presente estudo) comparados aos valores certificados

Elementos	Presente Estudo Média $\pm 1\sigma$	Valores Certificados	DPR, %	ER , %	Valores de Z Score
Br, gkg⁻¹	0,0211 $\pm$ 0,0025	0,0220 $\pm$ 0,0024 ⁽¹⁾	11,85	4,09	0,37
Ca, mgkg⁻¹	269 $\pm$ 11	265,8 $\pm$ 2,4 ⁽²⁾	4,09	1,20	1,33
	0,123 $\pm$ 0,014	0,116 $\pm$ 0,004 ⁽³⁾	11,38	6,03	1,75
	263 $\pm$ 44	286 $\pm$ 54 ⁽¹⁾	16,73	8,04	0,43
Cl, gkg⁻¹	2,76 $\pm$ 0,19	2,78 $\pm$ 0,06 ⁽³⁾	6,88	0,72	0,33
Mg, mgkg⁻¹	4,51 $\pm$ 0,31	4,66 $\pm$ 0,17 ⁽²⁾	6,87	3,22	0,88
	0,610 $\pm$ 0,054	0,601 $\pm$ 0,028 ⁽³⁾	8,85	1,50	0,32
	102 $\pm$ 33	99 $\pm$ 28 ⁽¹⁾	32,35	3,97	0,11
Na, gkg⁻¹	2,5 $\pm$ 0,15	2,42 $\pm$ 0,06 ⁽³⁾	6,00	3,31	1,33
	13,1 $\pm$ 0,31	12,6 $\pm$ 1,01 ⁽¹⁾	2,37	9,23	0,50
S, gkg⁻¹	7,92 $\pm$ 0,47	7,85 $\pm$ 0,06 ⁽³⁾	5,93	0,89	1,17
	7,1 $\pm$ 0,64	6,5 $\pm$ 0,52 ⁽¹⁾	9,01	3,03	1,15
K, gkg⁻¹	2,03 $\pm$ 0,43	2,50 $\pm$ 0,35 ⁽¹⁾	21,18	18,80	1,34

DPR: Desvio Padrão Relativo

ER: Erro Relativo

⁽¹⁾ IAEA A-13⁽²⁾ NIST 1486⁽³⁾ NIST 1577b

Os valores de Z-score obtidos (TAB.3 e FIG. 21) indicam que os resultados são satisfatórios, considerando o intervalo de confiança de 95% ($|z| \leq 2$) [51] adotado na prática clínica, para os padrões analisados.

FIGURA 21 – Valores de Z – score considerando o intervalo de confiança de 68% (1DP) e 95% (2DP).

2.10 Análise do “branco”

Ca, Cl, Mg e Na foram identificadas no branco (papel de filtro – Whatman) utilizado na coleta de sangue: $0,025\text{gL}^{-1}$ para Ca, $0,077\text{ gL}^{-1}$ para Cl, $0,0085\text{ gL}^{-1}$ para Mg e $0,038\text{gL}^{-1}$ para Na. Correções foram realizadas nas medidas do Ca e Mg em sangue, os demais elementos não foram detectados.

RESULTADOS

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS

3.1 Concentrações dos elementos

As concentrações dos elementos em tíbia, sangue total, músculo e coração da linhagem Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) são apresentadas nas TAB. 4, 5, 6 e 7, respectivamente constando o valor médio (VM), desvio-padrão (DP), valores mínimos e máximos, intervalo de normalidade (com confiança de 95% adotada na prática clínica), mediana e limite de detecção (LD). Os dados do grupo controle (linhagem C57BL/6J) também foram incluídos para comparação. Para a visualização destas comparações (controle & distróficos) foram elaboradas as FIG. 22, 23, 24 e 25.

RESULTADOS

TABELA 4 - Concentrações de Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tibia dos camundongos C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J

Elementos	VM $\pm$ 1DP	Valor Mínimo	Valor Máximo	Intervalo de Normalidade (95%)	Mediana	LD
Ca	129,72 $\pm$ 6,28 ^{GC}	114,15	135,72	117,15 – 142,29	131,00	0,95
	126,41 $\pm$ 9,58 ^m	107,33	141,03	107,25 – 145,58	130,13	
	121,80 $\pm$ 15,01 ^f	102,44	144,46	91,78 – 151,82	121,36	
Cl	1,20 $\pm$ 0,13 ^{GC}	0,94	1,37	0,94 – 1,47	1,20	0,37
	1,11 $\pm$ 0,10 ^m	0,97	1,32	0,91 – 1,31	1,09	
	1,43 $\pm$ 0,16 ^f	1,22	1,70	1,11 – 1,74	1,43	
Mg	2,11 $\pm$ 0,28 ^{GC}	1,79	2,54	1,56 – 2,67	2,11	0,44
	2,46 $\pm$ 0,37 ^m	2,06	3,13	1,72 – 3,20	2,35	
	2,12 $\pm$ 0,38 ^f	1,61	2,70	1,36 – 2,87	2,09	
Na	3,50 $\pm$ 0,47 ^{GC}	2,87	4,44	2,56 – 4,45	3,42	0,17
	3,78 $\pm$ 0,33 ^m	3,25	4,24	3,12 – 4,45	3,89	
	3,73 $\pm$ 0,55 ^f	2,63	4,66	2,63 - 4,83	3,64	

GC: Grupo Controle C57BL/6J (machos)

m: machos (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

f: fêmeas (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

LD: Limite de Detecção

RESULTADOS

TABELA 5 - Concentrações de Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g^L⁻¹) em sangue total dos camundongos C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J

Elementos	VM ± 1 DP	Valor Mínimo	Valor Máximo	Intervalo de Normalidade (95%)	Mediana	LD
Br	0,0056 ± 0,0006 ^{GC}	0,0043	0,0061	0,0044 – 0,0067	0,0058	0,0009
	0,0037 ± 0,0002 ^m	0,0034	0,0040	0,0032 – 0,0042	0,0036	
	0,0038 ± 0,0003 ^f	0,0035	0,0044	0,0032 – 0,0044	0,0038	
Ca	0,289 ± 0,066 ^{GC}	0,191	0,383	0,158 – 0,421	0,314	0,014
	0,244 ± 0,085 ^m	0,097	0,347	0,074 – 0,414	0,222	
	0,156 ± 0,034 ^f	0,111	0,203	0,087 – 0,224	0,160	
Cl	3,13 ± 0,26 ^{GC}	2,64	3,42	2,62 – 3,65	3,22	0,01
	2,71 ± 0,18 ^m	2,47	3,04	2,35 – 3,08	2,70	
	2,99 ± 0,28 ^f	2,67	3,50	2,43 – 3,54	2,91	
K	2,45 ± 0,48 ^{GC}	2,04	3,69	1,49 – 3,41	2,37	0,27
	2,39 ± 0,32 ^m	1,85	2,82	1,75 – 3,03	2,29	
	2,14 ± 0,43 ^f	1,40	2,60	1,28 – 2,99	2,40	
Mg	0,027 ± 0,009 ^{GC}	0,013	0,038	0,010 – 0,044	0,027	0,001
	0,017 ± 0,002 ^m	0,014	0,020	0,014 – 0,020	0,017	
	0,010 ± 0,003 ^f	0,007	0,015	0,004 – 0,016	0,009	
Na	2,37 ± 0,25 ^{GC}	2,04	2,80	1,86 – 2,88	2,30	0,01
	2,38 ± 0,20 ^m	2,11	2,72	1,98 – 2,78	2,39	
	2,46 ± 0,32 ^f	2,04	3,00	1,82 – 3,10	2,43	
S	1,17 ± 0,22 ^{GC}	0,92	1,52	0,73 – 1,61	1,18	0,53
	1,02 ± 0,17 ^m	0,74	1,27	0,68 – 1,35	1,00	
	0,92 ± 0,16 ^f	0,73	1,17	0,61 – 1,23	0,91	

GC: Grupo Controle C57BL/6J (machos)

m: machos (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)f: fêmeas (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

LD: Limite de Detecção

RESULTADOS

TABELA 6 - Concentrações de Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S em músculo dos camundongos C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J

Elementos	VM ± 1DP	Valor Mínimo	Valor Máximo	Intervalo de Normalidade (95%)	Mediana	LD
Br, mgkg⁻¹	0,32 ± 0,09 ^{GC}	0,18	0,45	0,14 – 0,50	0,35	0,03
	0,49 ± 0,08 ^m	0,38	0,48	0,33 – 0,64	0,48	
	0,46 ± 0,11 ^f	0,31	0,66	0,24 – 0,68	0,48	
Ca, gkg⁻¹	0,061 ± 0,016 ^{GC}	0,040	0,084	0,030 – 0,093	0,061	0,009
	0,070 ± 0,026 ^m	0,034	0,110	0,018 – 0,123	0,075	
	0,060 ± 0,022 ^f	0,031	0,095	0,017 – 0,103	0,059	
Cl, gkg⁻¹	0,54 ± 0,05 ^{GC}	0,46	0,60	0,43 – 0,64	0,54	0,006
	0,59 ± 0,09 ^m	0,48	0,79	0,41 – 0,77	0,58	
	0,67 ± 0,07 ^f	0,57	0,79	0,53 – 0,81	0,69	
K, gkg⁻¹	5,13 ± 0,48 ^{GC}	4,51	5,96	4,16 – 6,09	5,21	0,26
	4,90 ± 0,51 ^m	4,22	5,94	3,89 – 5,92	4,92	
	4,82 ± 0,51 ^f	4,11	5,90	3,80 – 5,85	4,80	
Mg, gkg⁻¹	0,274 ± 0,022 ^{GC}	0,247	0,323	0,230 – 0,319	0,274	0,038
	0,222 ± 0,019 ^m	0,201	0,248	0,185 – 0,260	0,223	
	0,226 ± 0,019 ^f	0,200	0,251	0,188 – 0,263	0,222	
Na, gkg⁻¹	0,59 ± 0,06 ^{GC}	0,49	0,67	0,47 – 0,71	0,60	0,01
	0,60 ± 0,08 ^m	0,50	0,74	0,44 – 0,76	0,59	
	0,66 ± 0,08 ^f	0,55	0,81	0,50 – 0,81	0,65	
S, gkg⁻¹	2,44 ± 0,46 ^{GC}	1,82	3,43	1,53 – 3,36	2,28	0,33
	2,17 ± 0,54 ^m	1,57	3,90	1,10 – 3,24	2,07	
	2,06 ± 0,44 ^f	1,20	2,56	1,19 – 2,94	2,23	

GC: Grupo Controle C57BL/6J (machos)

m: machos (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)f: fêmeas (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

LD: Limite de Detecção

RESULTADOS

TABELA 7 - Concentrações de Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S em coração dos camundongos C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J

Elementos	VM ± 1DP	Valor Mínimo	Valor Máximo	Intervalo de Normalidade (95%)	Mediana	LD
Br, mgkg⁻¹	1,31 ± 0,19 ^{GC}	0,94	1,59	0,93 – 1,69	1,30	0,33
	1,33 ± 0,27 ^m	0,98	1,79	0,80 – 1,86	1,32	
	1,04 ± 0,25 ^f	0,65	1,31	0,53 – 1,55	1,10	
Ca, gkg⁻¹	0,035 ± 0,015 ^{GC}	0,017	0,061	0,005 – 0,066	0,032	0,013
	0,028 ± 0,011 ^m	0,014	0,052	0,006 – 0,049	0,026	
	0,019 ± 0,009 ^f	0,010	0,038	0,001 – 0,037	0,015	
Cl, gkg⁻¹	1,33 ± 0,38 ^{GC}	1,01	2,28	0,57 – 2,08	1,25	0,014
	1,62 ± 0,23 ^m	1,33	2,06	1,17 – 2,07	1,60	
	1,24 ± 0,20 ^f	1,07	1,63	0,84 – 1,64	1,17	
K, gkg⁻¹	2,82 ± 0,54 ^{GC}	1,98	3,77	1,75 – 3,89	2,82	0,32
	2,54 ± 0,38 ^m	1,73	2,91	1,79 – 3,29	2,69	
	2,94 ± 0,31 ^f	2,47	3,38	2,32 – 3,56	2,90	
Mg, gkg⁻¹	0,163 ± 0,025 ^{GC}	0,132	0,214	0,113 – 0,214	0,160	0,069
	0,156 ± 0,022 ^m	0,108	0,194	0,112 – 0,199	0,153	
	0,152 ± 0,028 ^f	0,114	0,189	0,096 – 0,208	0,148	
Na, gkg⁻¹	1,06 ± 0,28 ^{GC}	0,79	1,75	0,50 – 1,61	0,96	0,011
	1,11 ± 0,14 ^m	0,91	1,41	0,82 – 1,40	1,07	
	1,06 ± 0,16 ^f	0,84	1,36	0,74 – 1,38	1,03	
S, gkg⁻¹	3,02 ± 0,42 ^{GC}	2,35	3,61	2,19 – 3,86	3,01	0,50
	2,25 ± 0,47 ^m	1,61	2,83	1,31 – 3,19	2,39	
	2,27 ± 0,67 ^f	0,96	3,36	0,94 – 3,60	2,22	

GC: Grupo Controle C57BL/6J (machos)

m: machos (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

f: fêmeas (Distróficos - Dmd^{mdx}/J)

LD: Limite de Detecção

RESULTADOS

FIGURA 22 - Comparação entre as concentrações dos elementos *Ca*, *Cl*, *Mg* e *Na* (gkg^{-1}) em tibia das linhagens *Dmd^{mdx}/J* (macho e fêmea) e *C57BL/6J* (macho)

FIGURA 23 - Comparação entre as concentrações dos elementos *Br*, *Ca*, *Cl*, *K*, *Mg*, *Na* e *S* (gL^{-1}) em sangue total das linhagens *Dmd^{mdx}/J* (macho e fêmea) e *C57BL/6J* (macho)

RESULTADOS

FIGURA 24 - Comparação entre as concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em músculo das linhagens Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) e C57BL/6J (macho)

FIGURA 25 - Comparação entre as concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em coração das linhagens Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea) e C57BL/6J (macho)

RESULTADOS

As FIG. 26 a 37 foram elaboradas para visualizar o comportamento das concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S nos diferentes tecidos biológicos das linhagens C57BL/6J (controle) e Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea). O intervalo de confiabilidade para ± 1 e ± 2 DP, nessas figuras, correspondem ao grupo controle.

FIGURA 26 - Concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (gkg⁻¹) em tibia da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

FIGURA 27 - Concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (g kg^{-1}) em tibia da linhagem *Dmd^{mdx}/J* macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 28 - Concentrações dos elementos Ca, Cl, Mg e Na (gkg^{-1}) em tibia da linhagem *Dmd^{mdx}/J* fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 29 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g L^{-1}) em sangue total da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

FIGURA 30 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g L^{-1}) em sangue total da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 31 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g L^{-1}) em sangue total da linhagem $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 32 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g kg^{-1}) em músculo da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

FIGURA 33 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g kg^{-1}) em músculo da linhagem *Dmd^{mdx}/J* macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 34 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g kg^{-1}) em músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 35 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g kg^{-1}) em coração da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

FIGURA 36 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (g kg^{-1}) em coração da linhagem *Dmd^{mdx}/J* macho. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

FIGURA 37 - Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S (gkg^{-1}) em coração da linhagem *Dmd^{mdx}/J* fêmea. O intervalo de confiabilidade (para ± 1 e ± 2 DP) corresponde ao grupo controle

RESULTADOS

3.2 Correlação de Pearson

Estabelecida as concentrações dos elementos nas amostras biológicas é possível a elaboração da matriz de correlação de Pearson [52,53], que fornece parâmetros (coeficientes de correlação descritos no ANEXO 4) para melhor entendimento comportamental desta doença.

Nas TAB. 8 a 19 são apresentadas as matrizes de correlação dos elementos investigados em tibia, sangue total, músculo e coração das linhagens C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea), respectivamente.

3.3 Método de Youden – Elipse de Confiança

Com a determinação das matrizes de correlação é possível, através do Método de Youden [53-56] (descrito no ANEXO 5), interpretar o comportamento da correlação de Pearson.

Nas FIG. 38 a 49 são apresentadas as elipses de confiança dos elementos determinados em tibia, sangue total, músculo e coração das linhagens C57BL/6J e Dmd^{mdx}/J (macho e fêmea), respectivamente.

RESULTADOS

TABELA 8 – Matriz de correlação em tíbia da linhagem C57BL/6J (controle)

C57BL/6J	Ca	Cl	Mg	Na
Ca	1	0,32	-0,13	0,57
Cl		1	0,15	0,26
Mg			1	0,31
Na				1

FIGURA 38 - Elipses de confiança em tíbia da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

TABELA 9 – Matriz de correlação em sangue total da linhagem C57BL/6J (controle)

C57BL/6J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	-0,32	0,45	-0,09	0,16	0,53	0,34
Ca		1	-0,18	0,17	0,20	-0,30	-0,04
Cl			1	-0,01	0,03	0,35	-0,18
K				1	0,20	-0,21	0,55
Mg					1	-0,01	0,05
Na						1	0,01
S							1

FIGURA 39- Elipses de confiança em sangue total da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

TABELA 10 – Matriz de correlação em músculo da linhagem C57BL/6J (controle)

C57BL/6J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	0,08	0,86	0,56	-0,09	0,90	-0,13
Ca		1	0,10	0,28	-0,33	0,15	0,51
Cl			1	0,59	-0,12	0,88	-0,07
K				1	-0,46	0,57	0,65
Mg					1	-0,05	-0,46
Na						1	-0,14
S							1

FIGURA 40 - Elipses de confiança em músculo da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

TABELA 11 – Matriz de correlação em coração da linhagem e C57BL/6J (controle)

C57BL/6J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	0,38	-0,18	0,03	-0,41	-0,01	0,09
Ca		1	0,18	0,00	-0,48	0,16	0,56
Cl			1	0,28	-0,25	0,92	0,44
K				1	0,13	0,56	-0,15
Mg					1	-0,31	-0,52
Na						1	0,34
S							1

FIGURA 41 - Elipses de confiança em coração da linhagem C57BL/6J (controle)

RESULTADOS

TABELA 12 – Matriz de correlação em tíbia da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

Dmd^{mdx}/J	Ca	Cl	Mg	Na
Ca	1	0,06	-0,03	0,64
Cl		1	-0,11	0,14
Mg			1	0,16
Na				1

FIGURA 42 - Elipses de confiança em tíbia da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

RESULTADOS

TABELA 13 – Matriz de correlação em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

Dmd^{mdx}/J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	0,05	0,44	-0,05	-0,42	0,31	0,03
Ca		1	0,53	0,65	0,26	0,16	0,14
Cl			1	0,78	-0,02	0,77	0,39
K				1	0,19	0,36	0,25
Mg					1	-0,19	0,16
Na						1	0,53
S							1

FIGURA 43 - Elipses de confiança em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

RESULTADOS

TABELA 14 – Matriz de correlação em músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

Dmd ^{mdx} /J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	-0,48	-0,46	-0,05	0,80	-0,39	0,57
Ca		1	0,42	0,32	-0,13	0,50	-0,09
Cl			1	0,21	-0,48	0,40	-0,07
K				1	-0,17	0,34	0,54
Mg					1	-0,03	0,20
Na						1	-0,23
S							1

FIGURA 44 - Elipses de confiança em músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

RESULTADOS

TABELA 15 – Matriz de correlação em coração da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

Dmd^{mdx}/J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	0,69	0,41	0,36	-0,23	0,23	-0,25
Ca		1	-0,16	0,19	-0,42	0,18	-0,17
Cl			1	-0,17	0,01	-0,01	0,06
K				1	0,03	0,34	0,24
Mg					1	-0,34	0,41
Na						1	0,17
S							1

FIGURA 45 - Elipses de confiança em coração da linhagem Dmd^{mdx}/J macho

RESULTADOS

TABELA 16 – Matriz de correlação em tíbia da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

Dmd^{mdx}/J	Ca	Cl	Mg	Na
Ca	1	0,00	0,66	0,84
Cl		1	0,11	0,32
Mg			1	0,41
Na				1

FIGURA 46 - Elipses de confiança em tíbia da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

RESULTADOS

TABELA 17 – Matriz de correlação em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

Dmd ^{mdx} /J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	0,23	0,57	0,09	0,42	0,50	-0,21
Ca		1	0,22	0,01	0,02	0,43	-0,43
Cl			1	-0,30	0,71	0,96	-0,05
K				1	-0,17	-0,38	-0,40
Mg					1	0,60	-0,14
Na						1	-0,14
S							1

FIGURA 47 - Elipses de confiança em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

RESULTADOS

TABELA 18 – Matriz de correlação em músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

Dmd^{mdx}/J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	-0,01	0,07	0,08	0,42	0,06	-0,40
Ca		1	-0,03	0,03	-0,18	-0,12	-0,15
Cl			1	0,57	-0,11	0,95	0,54
K				1	0,00	0,63	0,59
Mg					1	-0,08	-0,55
Na						1	0,58
S							1

FIGURA 48 - Elipses de confiança em músculo da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

RESULTADOS

TABELA 19 – Matriz de correlação em coração da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

Dmd^{mdx}/J	Br	Ca	Cl	K	Mg	Na	S
Br	1	0,54	0,49	-0,26	-0,31	0,55	0,08
Ca		1	-0,21	-0,35	-0,26	-0,27	-0,45
Cl			1	-0,12	-0,12	0,94	0,61
K				1	-0,05	-0,03	0,16
Mg					1	-0,27	-0,23
Na						1	0,59
S							1

FIGURA 49 - Elipses de confiança em coração da linhagem Dmd^{mdx}/J fêmea

DISCUSSÃO

CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO

4.1 Estudo do comportamento das concentrações dos elementos

Para discutir os resultados das concentrações nos tecidos biológicos investigados foram elaboradas as FIG. 50 e 51 nas quais são apresentadas as avaliações obtidas para a distribuição *t-student* entre o C57BL/6J (grupo controle constituído por machos) e Dmd^{mdx}/J (grupo distrófico constituído por machos) e entre gênero para a linhagem distrófica (Dmd^{mdx}/J macho e Dmd^{mdx}/J fêmea), respectivamente.

FIGURA 50 – Avaliação da distribuição *t-student* ($p < 0,05$) entre o grupo controle e Dmd^{mdx}/J (macho) para os tecidos biológicos investigados (sangue em $g L^{-1}$, órgãos e ossos em $g kg^{-1}$)

DISCUSSÃO

FIGURA 51 – Avaliação da distribuição *t*-student ($p < 0,05$) para a linhagem distrófica, em função do gênero, para os tecidos biológicos investigados (sangue em g L^{-1} , órgãos e ossos em g kg^{-1})

Os resultados (VM) em sangue total (TAB. 5) dos elementos Br, Cl e Mg, para machos do grupo $\text{Dmd}^{\text{mdx}}/\text{J}$ encontram-se próximos ao limite inferior quando comparado ao GC. Com relação a gênero, enquanto para o Ca, K e Mg observa-se uma diminuição nas concentrações para as fêmeas em relação aos machos, tem-se aumento nos níveis de Na e Cl, mas os resultados encontram-se no intervalo de 2σ de desvio padrão (usualmente adotado na prática clínica). Embora não seja possível uma comparação das fêmeas com o grupo controle (constituído só por machos) essas variações sugerem que o sangue pode ser um bom indicador para o monitoramento e avaliação da progressão DMD. As FIG. 50 e 51 enfatizam essas alterações no sangue para os elementos Br e Cl ($p < 0,05$) entre o controle e distrófico macho e também para Ca e Cl ($p < 0,05$) entre gênero. Com relação à alteração nos níveis sanguíneos de Br, os resultados sugerem uma dependência que pode estar diretamente relacionada a ração, pois os camundongos da linhagem C57BL/6J foram gerados no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências – USP

DISCUSSÃO

enquanto que os distróficos no Centro de Biotecnologia do IPEN, ou seja, submetidos a ração diferenciada.

Com relação as concentrações na Tíbia (TAB. 4), para o Cl e Na, dentro do desvio 1σ , entre machos distróficos e GC, mas para Ca e Mg o que se observa é uma diminuição nos níveis de Ca ($p<0,05$) e um aumento na concentração de Mg ($p<0,05$). Com relação a gênero observa-se concordância para todos os elementos medidos, somente o limite inferior do Mg ($1,36 \text{ gkg}^{-1}$) das fêmeas distróficas, quando comparado aos dos machos ($1,72 \text{ gkg}^{-1}$), encontra-se abaixo do desvio 2σ , o que também é enfatizado pela na FIG. 51 (Mg, $p<0,05$).

No músculo (TAB. 6) os resultados das concentrações dos elementos Ca, Cl, K, Na e S encontram-se no intervalo de desvio 2σ , estabelecido pelo grupo controle, mas para o Mg o limite inferior em machos ($0,185 \text{ gkg}^{-1}$) encontra-se abaixo do desvio 2σ quando comparado com o grupo controle ($0,230 \text{ gkg}^{-1}$). Para Br é observado um aumento na concentração dos machos distróficos. Com relação a gênero observa – se similaridades no comportamento de todos os elementos; somente para o Cl tem-se um aumento nas fêmeas Cl ($0,67 \text{ gkg}^{-1}$) quando comparado aos dos machos ($0,59 \text{ gkg}^{-1}$). As FIG. 50 e 51 enfatizam essas alterações no músculo para Br e Mg ($p<0,05$) entre o controle e distrófico macho e também para Cl ($p<0,05$) entre gênero.

Quanto à análise realizada no coração (TAB. 7) as concentrações obtidas para todos os elementos, entre gênero, encontram-se muito alteradas. Entretanto a falta de valores de referência para fêmeas do grupo C57BL/6J (controle), não fornece subsídios que possam relacionar essas alterações ao comprometimento do músculo cardíaco devido a manifestação da distrofia muscular de Duchenne [29]. Entre os grupos (FIG. 51), controle e distrófico (macho), tem - se diminuição nos níveis de Cl e S ($p<0,05$).

4.2 Análise dos coeficientes de correlação

A correlação predominante na tíbia é dada por Ca:Na (TAB. 8, 12 e 16) mas as correlações obtidas para os distróficos encontram-se alteradas: enquanto o Ca na tíbia

DISCUSSÃO

saudável possui correlação positiva com Cl (0,32) essas correlações diferem para grupo distrófico macho (0,06) sendo praticamente inexistente nas fêmeas. Entre gênero observa-se, também, uma significativa diferença entre a correlação Ca:Mg nos machos (-0,03) e nas fêmeas (0,66).

Com relação ao sangue total as correlações entre grupos (saudável e distrófico) e entre gêneros também diferem. Nas fêmeas tem-se forte correlação do Cl com Mg (0,71), mas tanto no grupo saudável como nos machos distróficos esta intercorrelação não existe. Da mesma forma, enquanto Cl e K estão fortemente correlacionados no sangue dos animais distróficos machos (0,78), essa correlação não existe no sangue dos animais saudáveis e nas fêmeas apresentam comportamento invertido (-0,30). Ainda com relação a gênero tem-se uma forte correlação positiva do Mg com Na nas fêmeas (0,60), mas este comportamento é invertido e pouco relevante nos machos distróficos (-0,19) e inexistente no grupo saudável. A forte correlação Cl:Na só entre gêneros sugere relação com a disfunção.

As correlações predominantes no músculo do grupo controle são expressas por Br:Na (0,90), Cl:Na (0,88) e Br:Cl (0,86) (TAB. 10). Essas correlações são significativamente alteradas para o grupo DMD (macho): Br:Na (-0,39), Cl:Na (0,40) e Br:Cl (-0,46); bem como a forte dependência observada entre Br e Mg (0,80). Nas fêmeas (TAB. 18) a única correlação predominante é entre Cl e Na (0,95).

Com relação ao coração é observada uma forte correlação entre Cl e Na (0,92) no grupo saudável. Essa correlação é praticamente inexistente para o grupo DMD (macho): Cl:Na (-0,01) (TAB. 15) mas é predominante em fêmeas Cl:Na (0,92) (TAB. 19).

4.3 Razão entre tecidos biológicos

O sangue é responsável pelo transporte, regulação e proteção do organismo. Em decorrência, as funções realizadas pela circulação do sangue nos tecidos biológicos (tanto de órgãos como de ossos) são indispensáveis para o bom funcionamento do organismo bem como para atuar como indicador no caso de disfunções. Para verificar a existência ou

DISCUSSÃO

não de possíveis correlações entre órgãos e ossos com o sangue foi realizada uma comparação expressa pela razão entre as médias das concentrações em órgãos e ossos, entre grupos (saudável e distróficos macho) e entre gênero (da espécie distrófica), ambas em função das médias das concentrações em sangue. Essas comparações podem ser visualizadas na FIG. 52. As razões entre grupos são apresentadas nas TAB. 20 e 21 e entre gênero nas TAB. 22 e 23. Nestas tabelas foram incluídas as estimativas percentuais (da variação entre as médias) entre os grupos investigados (saudável e distrófico macho) e entre gênero (da espécie distrófica), para cada elemento.

Os resultados entre grupos e entre gênero para as razões C_T/C_S (C_T : média da concentração na tíbia; C_S : média da concentração no sangue) evidenciam um aumento significativo das razões de Ca e Mg entre grupos (15% e 46%, respectivamente) e gênero (52% e 32%, respectivamente).

As razões C_M/C_S (C_M : média da concentração no músculo; C_S : média da concentração no sangue) evidenciam um aumento tanto para os grupos como entre gênero. Este aumento é significativo para o Br entre grupos (da ordem de 116% nos machos distróficos); entre gênero tem-se variação significativa do Ca e Mg (aumento de 31% e 77% respectivamente) nas fêmeas.

Com relação as razões de C_C/C_S (C_C : média da concentração no coração; C_S : média da concentração no sangue) tem-se um aumento significativo para o Br (56%), Cl (43%) e Mg (50%) bem como uma diminuição, também significativa, do Na (34%) no grupo distrófico. Já para gênero, as razões para Ca e Na são praticamente constante enquanto que para Br e Cl elas são significativamente reduzidas nas fêmeas (25% para Br e 30 % para Cl). Para K e Mg o que se observa é um aumento nas razões de 30% e 67%, respectivamente.

DISCUSSÃO

TABELA 20 - Razão entre média da concentração, medidas em tíbia e músculo, do grupo controle e distrófico (macho), em função da média da concentração em sangue

Elementos	Tíbia/Sangue	% ^(*)
	C _T /C _S	
Ca	450 ^{GC}	>15
	516 ^m	
Cl	0,38 ^{GC}	>8
	0,41 ^m	
Mg	78 ^{GC}	>46
	145 ^m	
Na	1,48 ^{GC}	>7
	1,59 ^m	
Músculo/Sangue		% ^(*)
	C _M /C _S	
Br	0,06 ^{GC}	>116
	0,13 ^m	
Ca	0,21 ^{GC}	>38
	0,29 ^m	
Cl	0,17 ^{GC}	>29
	0,22 ^m	
K	2,09 ^{GC}	<2
	2,05 ^m	
Mg	10 ^{GC}	>30
	13 ^m	
Na	0,249 ^{GC}	>1,2
	0,252 ^m	
S	2,09 ^{GC}	>2
	2,13 ^m	

C_T : média da concentração na tíbia

C_M : média da concentração no músculo

C_S : média da concentração no sangue

(*) C_T / C_S e C_M / C_S para o GC foi assumido como 100%

>: expressa aumento

<: expressa diminuição

DISCUSSÃO

TABELA 21 - Razão entre a média da concentração no coração, do grupo controle e distrófico (macho), em função da média da concentração em sangue

Elementos	Coração/Sangue C_C/C_S	% ^(*)
Br	0,23 ^{GC}	>56
	0,36 ^m	
Ca	0,12 ^{GC}	
	0,12 ^m	
Cl	0,42 ^{GC}	>43
	0,60 ^m	
K	1,15 ^{GC}	<8
	1,06 ^m	
Mg	6 ^{GC}	>50
	9 ^m	
Na	0,68 ^{GC}	<34
	0,45 ^m	
S	2,58 ^{GC}	<14
	2,21 ^m	

C_C : média da concentração no coração

C_S : média da concentração no sangue

^(*) C_C/C_S para o GC foi assumido como 100%

>: expressa aumento

<: expressa diminuição

DISCUSSÃO

TABELA 22 - Razão entre a média da concentração, medidas em tíbia e músculo, entre gênero (da linhagem distrófica), em função da média da concentração em sangue.

Elementos	Tíbia/Sangue C_T / C_S	% ^(*)
Ca	516 ^m	>52
	782 ^f	
Cl	0,41 ^m	>17
	0,48 ^f	
Mg	145 ^m	>32
	212 ^f	
Na	1,59 ^m	<4
	1,52 ^f	
	Músculo/Sangue C_M / C_S	% ^(*)
Br	0,13 ^m	>8
	0,12 ^f	
Ca	0,29 ^m	>31
	0,38 ^f	
Cl	0,22 ^m	>10
	0,22 ^f	
K	2,05 ^{GC}	>77
	2,25 ^m	
Mg	13 ^m	>6,5
	23 ^f	
Na	0,252 ^m	>5
	0,268 ^f	
S	2,13 ^m	>5
	2,24 ^f	

C_T : média da concentração na tíbia

C_M : média da concentração no músculo

C_S : média da concentração no sangue

^(*) C_T / C_S e C_M / C_S para o distrófico macho foi assumido como 100%

>: expressa aumento

<: expressa diminuição

DISCUSSÃO

TABELA 23 - Razão entre a média da concentração no coração, entre gênero (da linhagem distrófica), em função da média da concentração em sangue

Elementos	Coração/Sangue C_C/C_S	% ^(*)
Br	0,36 ^m	<25
	0,27 ^f	
Ca	0,12 ^m	
	0,12 ^f	
Cl	0,60 ^m	<30
	0,42 ^f	
K	1,06 ^{GC}	>30
	1,37 ^m	
Mg	9 ^m	>67
	15 ^f	
Na	0,45 ^m	<4,5
	0,43 ^f	
S	2,2 ^m	>14
	2,5 ^f	

C_C : média da concentração no coração

C_S : média da concentração no sangue

^(*) C_C/C_S para o distrófico macho foi assumido como 100%

>: expressa aumento

<: expressa diminuição

DISCUSSÃO

FIGURA 52 – Razão entre as médias das concentrações dos elementos investigados nos tecidos biológicos do grupo controle (C57BL/6J) e distrófico (Dmd^{mdx}/J - macho) e entre gênero da linhagem Dmd^{mdx}/J

DISCUSSÃO

4.4 Comparação entre as diferentes linhagens distróficas

Os camundongos com deficiência de distrofina, da linhagem Dmd^{mdx}/J (FIG. 14), apresentam degeneração muscular progressiva associada com necrose, fibrose e inflamação, como ocorre em humanos com DMD. Já, as linhagens A/J e SJL/J apresentam deficiência da proteína disferlina [57-59]. Na linhagem A/J a degeneração muscular se desenvolve em diferentes regiões do organismo enquanto na linhagem SJL/J a distrofia muscular ocorre nos membros inferiores, também conhecida como limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) [59].

Os resultados obtidos em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J foram comparados com dados das linhagens distróficas A/J e SJL/J [2,4] e C57BL/6J. Essas comparações são apresentadas na FIG. 53 e dão indícios de que os níveis de Mg em sangue total encontram-se elevados nas linhagens distróficas A/J e SJL/J, comparativamente ao grupo Dmd^{mdx}/J e C57BL/6J (controle), sugerindo que esse elemento seja constantemente monitorado nesses modelos durante investigação bioquímica para diagnósticos e procedimentos terapêuticos de distrofia muscular. Particularmente o Ca, Na e Cl na linhagem A/J e Ca na linhagem SJL/J encontram-se próximos ao limite inferior do valor estabelecido para o controle enfatizando a mesma exigência de monitoração. Com relação ao Br a concentração na linhagem Dmd^{mdx}/J encontra-se próxima ao limite inferior do controle, além disso, para as linhagens A/J e SJL/J os níveis de Br encontram-se bastante alterados (como mencionado em 4.1 esta variação por estar relacionado a ração administrada).

DISCUSSÃO

FIGURA 53 – Concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg e Na (gL⁻¹) em sangue total da linhagem Dmd^{mdx}/J macho comparada com as linhagens A/J e SJL/J (distróficas) e C57BL/6J (controle)

CONCLUSÕES

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

A técnica de Análise por Ativação com Nêutrons foi utilizada para a obtenção dos valores de referência dos tecidos biológicos das linhagens distróficas Dmd^{mdx}/J e C57BL/6J (controle). Esses dados compõem as primeiras estimativas para os elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na e S em sangue total, quadríceps anterior, coração e para os elementos Ca, Cl, Mg e Na em tíbia, nessas espécies. Estes resultados fornecem subsídios bioquímicos para avaliar e comparar vantagens dos diferentes tipos de tratamentos, programados em distrofias musculares com este modelo animal (Dmd^{mdx}/J), antes de serem realizados testes em humanos (pacientes com DMD).

As comparações das concentrações e correlações nos tecidos investigados das linhagens C57BL/6J (controle) e Dmd^{mdx}/J (distrófico), ambos constituídos por machos, mostrou a necessidade da avaliação de Ca e Mg no sangue e da monitoração constante do coração. Além disso a análise comparativa em sangue, entre as linhagens C57BL/6J, Dmd^{mdx}/J , A/J e SJL/J, mostram diminuição nos níveis sanguíneos de Ca enfatizando a necessidade desta avaliação em organismos com disfunção muscular.

A variação da concentração Br em sangue entre as linhagens, que pode estar diretamente relacionada a administração de ração diferenciada, enfatiza a necessidade da análise na dieta desses animais (que também pode ser realizado por AAN) gerando subsídios para análise comparativa (entre concentrações) e adequado acompanhamento nutricional desses animais. Esse resultado sugere que uma dieta não balanceada pode interferir nos níveis sanguíneos de pacientes com DMD. O estudo realizado por Santos [60] também enfatiza que o controle nutricional desses pacientes, com distrofia muscular branda, é fundamental para manutenção da qualidade de vida.

As comparações das concentrações e das razões (C_T/C_S , C_M/C_S e C_C/C_S) entre gênero, para a linhagem distrófica Dmd^{mdx}/J , evidenciou diferenças significativas em todos os tecidos biológicos investigados, enfatizando a necessidade de se estabelecer índices de referência específicos para fêmeas do grupo C57BL/6J (controle). Esses índices são

CONCLUSÕES

fundamentais para esclarecer as alterações nas concentrações, entre gênero, nos tecidos investigados, principalmente no coração.

Com relação aos resultados obtidos em sangue para as linhagens distróficas Dmd^{mdx}/J , A/J e SJL/J , para os eletrólitos de relevância em bioquímica clínica, os limites estabelecidos podem auxiliar os profissionais da saúde e áreas correlatas a avaliar o status clínico deste modelo animal durante testes de novos tratamentos em distrofias musculares progressivas.

5.1 PERSPECTIVAS

Obter estas avaliações em outros modelos animais utilizados na investigação de DMD. Atualmente encontra-se em andamento a análise de sangue total do Golden Retriever, uma parceria com o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências – USP.

Submeter as amostras (utilizadas no presente estudo) a outros procedimentos analíticos. Atualmente encontra-se em andamento a análise de amostras de sangue total por fluorescência de raios X, uma parceria com o Laboratório de Fluorescência de Raios-X do IPEN.

ANEXOS

ANEXO 1

Programa IDF [40]: cálculo da área

Resultado de ajuste da área calculado pelo IDF

ANEXOS

ANEXO 2

Software INAA

Parâmetros: Cloro							Resultados		Lambda
C(p)	Erro	A(am)	Erro	A(p)	Erro	Tempo	C(am)	Erro	3,10E-04
1,88	0,15	17095	187	3829	88	60	1,23	0,10	

onde:

C_{am} concentração do elemento na amostra;

C_{pd} concentração do elemento no padrão (conhecido);

A_{am} área da transição gama referente à amostra (calculada pelo programa IDF [40]);

A_{pd} área da transição gama referente ao padrão (calculada pelo programa IDF [40]);

t intervalo de tempo entre o término da contagem do padrão e início da contagem de tempo da amostra (calculado);

λ constante de decaimento (tabelado) [38],

ANEXOS

ANEXO 3

PROGRAMA ATIVAÇÃO: Tela principal

Ativação

Fluxo

Concentração

²³ Na γ - 1368 keV	²⁶ Mg γ - 843 keV	²⁶ Mg γ - 1014 keV	²⁷ Al γ - 1778 keV	³⁷ Cl γ - 1642 keV
⁴¹ K γ - 1524 keV	⁴⁸ Ca γ - 3084 keV	⁵⁵ Mn γ - 846 keV	⁵⁵ Mn γ - 1810 keV	⁵⁸ Fe γ - 1099 keV
⁶⁸ Zn γ - 438 keV	⁷⁰ Zn γ - 620 keV	⁷⁵ As γ - 559 keV	⁷⁵ As γ - 657 keV	⁷⁹ Br γ - 616 keV
⁸¹ Br γ - 554 keV	⁸⁶ Sr γ - 388 keV	¹²⁷ I γ - 442 keV	¹⁹⁷ Au γ - 411 keV	¹⁹⁸ Pt γ - 542 keV

Outro Elemento

Sair

PROGRAMA ATIVAÇÃO: cálculo do Fluxo de nêutrons

Atividade Saturada

Arquivo Calcular Gerar Relatório Imprimir Relatório Sair Sobre

PARÂMETROS

Ouro

Área (Contagens) 25555 +/- 161

Eficiência 0.006304 +/- 0.000138

Tempo de Irradiação (s) 120 +/- 5

Tempo de Espera (s) 232620 +/- 10

Tempo de Contagem (s) 15 +/- 1

Massa do ouro (g) 0.87e-3 +/- 0.01e-3

Razão de Cádmi

Ouro + cádmio

Área (Contagens) 2402 +/- 49

Tempo de Espera (s) 232680 +/- 10

Fluxo térmico ($n/cm^2 s$)

5.04E+12 +/- 0.02E+12

Calcular Gravar Gerar Relatório Imprimir Relatório Sair

PROGRAMA ATIVAÇÃO: cálculo da concentração dos elementos

Arquivo Calcular Gerar Relatório Imprimir Relatório Sair Sobre			
Nome do Elemento		PARÂMETROS	
Sódio
Área (contagens)	40411 +/- 208
Fluxo de neutrons ($n/cm^2 s$)	5.97e12 +/- 7.55e10		
Massa da amostra (g)	0.1 +/- 0.0001		
Eficiência	2.9331e-3 +/- 5.0012e-5		
Tempo de Irradiação (s)	120		
Tempo de Espera (s)	3960	Fração de Massa 1.892012E-03 +/- 4.505854E-05	
Tempo de Contagem (s)	600	Massa (gramas) 1.892012E-04 +/- 4.509825E-06	
		Concentração Final (g/kg) 1.892012 +/- 4.513791E-02	
<input type="button" value="Calcular"/> <input type="button" value="Gravar"/> <input type="button" value="Gerar Relatório"/> <input type="button" value="Imprimir Relatório"/> <input type="button" value="Sair"/>			

ANEXO 4**Coefficiente de Correlação Linear de Pearson**

Estabelecida as concentrações dos elementos nas amostras biológicas é possível a elaboração da matriz de correlação de Pearson, expressa pelos coeficientes de correlação interelementos.

Cada correlação fornece uma relação linear entre duas variáveis quantitativas aleatórias expressas pela relação:

$$r_{(x,y)} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

onde:

σ_{XY} é a covariância de (X, Y)

σ_X σ_Y são os desvios padrões das variáveis X e Y

Para obtenção dos coeficientes considera-se o valor de cada variável X_{ji} ($j = 1, \dots, m$ elementos), em cada amostra analisada ($i = 1, \dots, N$ amostras), sendo a correlação entre os elementos medidos, por exemplo X_1 e X_2 , expressa por [52,53]:

$$\rho_{12} = \frac{\text{cov}(X_1 \cdot X_2)}{\sigma_{X1} \cdot \sigma_{X2}}$$

ANEXOS

onde:

$$\text{cov}(X_1 X_2) = \frac{\sum (X_{11} - X_1^m)(X_{12} - X_2^m)}{N - 1}$$

para:

X_j^m valor médio da variável j nas N amostras medidas

σ_{xj} é o desvio padrão da variável X_j

O valor do índice de correlação varia no intervalo $[-1, +1]$, de modo que:

- a. se $r = 1$ existe uma correlação positiva perfeita. O índice +1 indica uma dependência total entre as duas variáveis (relação direta), isto é, quando um aumenta, o mesmo acontece com a outra na mesma proporção;
- b. se $0 < r < 1$ há uma correlação positiva: quando um aumenta, o mesmo acontece com a outra e vice-versa, não necessariamente na mesma proporção;
- c. se $r = 0$, não existe uma relação linear, mas isso não implica necessariamente que as variáveis são independentes;
- d. se $r = -1$, existe uma correlação perfeita negativa. O índice -1 indica uma dependência total entre as duas variáveis (relação inversa): quando uma aumenta a outra diminui na mesma proporção;
- e. se $-1 < r < 0$, há uma correlação negativa; quando uma aumenta a outra diminui, não necessariamente na mesma proporção.

ANEXO 5

Método de Youden – Elipse de Confiança

Determinados os coeficientes de correlação entre duas variáveis quantitativas aleatórias é possível, através do método de Youden, interpretar esses resultados permitindo uma visualização simples e rápida, baseada na elaboração de um diagrama de dispersão dos resultados associados a uma região de confiança (elipse).

A elipse de confiança é traçada de modo que qualquer ponto tenha a mesma probabilidade “P” de se situar dentro da elipse e, em geral, é estabelecido o grau de 95% de confiança seguindo o método de Youden [53-56]. Geralmente, os pontos se situam dentro de uma elipse, cujo eixo maior faz um ângulo de aproximadamente 45^0 com o eixo da horizontal. Portanto a inclinação maior da elipse está próxima de +1 e a do eixo menor, de -1.

O planejamento experimental para a construção da elipse de confiança prevê a distribuição de um par de amostras semelhantes, não necessariamente de concentrações iguais, porém de concentrações próximas. As retas que passam pelas médias experimentais, em x (resultados relativos à uma das amostras analisadas) e em y (resultados relativos a outra amostra analisada), dividem o diagrama em quadrantes[53].

Matematicamente, a descrição da elipse de confiança [54] é expressa por:

$$T_{\varepsilon} = \frac{\left(x_i - \bar{x}\right)^2 \sigma_y^2 - 2\left(x_i - \bar{x}\right)\left(y_i - \bar{y}\right)\sigma_{xy} + \left(y_i - \bar{y}\right)^2 \sigma_x^2}{\sigma_x^2 \sigma_y^2 - \sigma_{xy}^2}$$

ANEXOS

onde:

ε nível de significância; T e ε estão relacionados pela expressão

$$\varepsilon = 1 - \varepsilon^{\left(-T\varepsilon/2\right)};$$

$\bar{x}$ média dos resultados para a amostra A;

$\bar{y}$ média dos resultados para a amostra B;

σ_x^2 variância dos resultados da amostra A;

σ_y^2 variância dos resultados da amostra B;

σ_{xy} covariância dos resultados das amostras A e B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B.; GENEZINI, F.A.; FIGUEIREDO, A.M.G.; ZAHN, G.S. Use of thermal neutrons to perform clinical analyses in blood and urine samples. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 263, p. 783–786, 2005.
- [2] OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B.; PESSOAL, E.A.; BORGES, F.T. Characterization of ions in urine of animal model with acute renal failure using NAA. *AIP Conference Proceedings*, v. 1351, p. 353–357, 2011.
- [3] ZAMBONI, C.B.; OLIVEIRA, L.C.; METAIRON S. Reference values in blood from inhabitants of Brazil: Br, Cl, K and Na determination using NAA *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 282, p. 95–97, 2009.
- [4] OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B.; MESA, J. Quantitative estimation of Br, Cl, K and Na in sample blood by NAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 269, p. 541–545, 2006.
- [5] ZAMBONI, C.B.; METAIRON, S.; GENEZINI, F.A. Analysis of major trace elements in albino rabbits by neutron activation analysis: reference data, April 13–18, 2008, Cancun. *In: Proceedings of 2nd INCC*, p. 97.
- [6] ZAMBONI, C.B.; ZAHN, G.S.; SANT'ANNA, O.A. Trace elements at whole blood of distinct mouse lines by NAA. In: VI LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON NUCLEAR PHYSICS AND APPLICATIONS, A J Kreiner et al., *AIP Conference Proceedings*, v. 884, p. 507 – 509, 2007.
- [7] ZAMBONI, C.B.; SUZUKI, M. F.; SANT'ANNA, O. A. Simultaneous determination of five elements in whole blood of dystrophin deficient mdx mouse by NAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 278, p. 585 – 589, 2008.
- [8] AGUIAR, R.; ZAMBONI, C. B.; GENEZINI, F. A. Analysis in blood of golden hamster by NAA for clinical practice. In: XXXI WORKSHOP ON NUCLEAR PHYSICS IN BRASIL, V Guimarães et al., *AIP Conference Proceedings*, v. 1139, p. 204, 2009.
- [9] ZAMBONI, C. B.; SUZUKI, M. F.; METAIRON, S.; CARVALHO, M. D. F.; SANT'ANNA, O. A. Investigation of whole blood of SJL/J mice using neutron activation analysis *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 281, p. 97–99, 2009.
- [10] ZAMBONI, C. B.; METAIRON, S.; SUZUKI, M. F.; FURTADO, M. F.; SANT'ANNA, O. A.; TAMBOURGI, D. V. Quantitative evaluation of blood elements by neutron activation analysis in mice immunized with Bothrops snake venoms *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 282, p. 37– 39, 2009.
- [11] FRÉJAVILLE, J.P.; KAMOUN, P. *Guide des examens de laboratoire*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [12] MAHAN, L. K. *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 9^o ed. Roca, São Paulo, 1998.
- [13] ZAMBONI, C. B. (Org.). *Fundamentos da Física de Nêutrons*. 1^o ed. Livraria da Física, São Paulo, 2007.
- [14] ZATZ, M. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. *Ciências & Saúde coletiva*, v. 7, n. 1, p. 85-89, 2002.
- [15] Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM) (2010). <http://www.abdim.org.br/> Accessed 22 Nov 2010.
- [16] IVORY, P. (2011). <http://www.mdausa.org/> Accessed 26 May 2011.
- [17] THOMPSON & THOMPSON, *Genética Médica*, 5^a ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p. 126, 1993.
- [18] KOENIG, M.; HOFFMAN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MONACO, A.P.; FEENER, C. KUNKEL, L.M. Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, v. 50 (3), p. 509-517, 1987.
- [19] HOFFMAN, E. P. *et al.* Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, v. 318, n. 2, p. 1363-1368, 1988.
- [20] <http://www.muscular-dystrophy.org/> Acesso em: 05 Jun 2009.
- [21] BODENSTEINER, J. B.; ENGEL, A. G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567.000 muscle fiber in 114 biopsies. *Neurology* v. 28 (5), p. 439 – 446, 1978.
- [22] MAUNDER-SEWRY, C.A.; GORODETSKY, R.; YAROM, R.; DUBOWITZ, V. Element analysis of skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophin using x-ray fluorescence spectrometry. *Muscle & nerve*, v. 3, p. 502-508, 1980.
- [23] GUIMARÃES, A. O. *Distribuição do CGRP na junção neuromuscular de camundongos distróficos da linhagem MDX*. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- [24] WORTON, R. G.; MOLNAR, M. J.; BRAIS, B.; KARPATI, G. The muscular dystrophies. In: SCRIVER, C.R. et. al. (Eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8 ed., New York, US: McGraw-Hill, p. 5493-5524, 2001.
- [25] BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease *Physiol. Rev.* v. 80 (3), p. 1215–1265, 2000.
- [26] <http://www.biocel.icb.usp.br/fabio.html> Acesso em: 05 Jun 2009.
- [27] BUSHBY, K. (2010). <http://www.treat-nmd.eu/> Accessed 10 Aug 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [28] LEIDEN UNIVERSITY MEDICAL CENTER (2007). Disponível em: <http://www.dmd.nl/> Acesso em: 05 Fev 2011.
- [29] OGIELA, D; ZIEVE, D. (2011) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/> Acesso em: 22 Nov 2011.
- [30] CAROMANO, F.A. Características do portador de Distrofia muscular de Duchenne (DMD). *Arq. Ciências Saúde UNIPAR*, v. 3(3), p. 211 – 218, 1999.
- [31] LEITÃO, A. *et al.*, Distrofia muscular. In.: LIANZA, S. *Medicina de reabilitação*. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 383-394, 1995.
- [32] MARQUES, J. D.; COSTA, S. K. S.; DA CRUZ, M. C., Distrofia Muscular de Duchenne: Um Enfoque Cinesioterapêutico, *Lato & Sensu*, Belém, v. 4, n. 1, p. 3-5, 2003.
- [33] JAY, V.; VAJSAR, J. The dystrophy of Duchenne. *The Lancet* v. 357, p. 550-552, 2001.
- [34] MEOLA, G.; SANSONE, V.; MARINOU, K.; SALVUCCI, J. Quantitative myotonia assessment: an experimental protocol *Neurol. Sci.* v. 21 (5), S971-974, 2000.
- [35] MUNTONI, F.; WELLS, D. Genetic treatments in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* v. 20, p. 590-594, 2007.
- [36] BUSHBY, K. et al., Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management *Neurol. Disorders* v. 14, p. 526-534, 2004.
- [37] CLIFFORD, K.B. *Nuclear reactors for research*. Princeton, N.Y.: D.Van Nostrand, 1957.
- [38] FIRESTONE, R.B. *Table of Isotopes*. 8 Ed. New York, N.Y.: Wiley, 1996.
- [39] MUGHABGHAB, S.F. Atlas of Neutron Resonances: Resonance Parameters and Thermal Cross Sections Z=1-100. *Elsevier BV*, London, 2006.
- [40] GOUFFON, P. *Manual do Programa Idefix*. Universidade de São Paulo, Instituto de Física, Laboratório do Acelerador Linear, São Paulo, 1987.
- [41] KNOLL, G.F. *Radiation detection and measurements*. New York, N.Y.: Wiley, 1979.
- [42] YORIYAZ, H.; FANARO, L.C.C.B.; DINIZ, R.; JEREZ, R. Methodology for evaluation and experimental measurements of parameters of the core of research reactor IEA-R1 using the Monte Carlo method. *IAEA Report*, Progress Report 2, 2000.
- [43] MUECK, K.; BENSCH, F. Cadmium correction factors of several thermal neutron foil detectors. *J. Nucl. Engl. Áustria*, v. 27, p. 677-688, 1973.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [44] MESTNIK FILHO, J. *A distribuição especial de fluxo de nêutrons no núcleo do reator IEA-R1, obtida por meio da ativação de folhas*. São Paulo, 1978. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologias Nucleares) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- [45] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *X-Ray and Gamma-Ray Standards for detector calibration*. (IAEA – TECDOC – 619), Viena, 1991.
- [46] OLIVEIRA, L.C. *Estudo da distribuição de íons e metais em sangue via metodologia nuclear*. 2008. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- [47] ANTENOR, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 19-24, 2002.
- [48] CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de Laboratório: Camundongos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- [49] MEDEIROS, J. A. G., ZAMBONI, C. B., ZAHN, G. S., OLIVEIRA, L. C., DALAQUA, L. Jr. Software para realização de análises hematológicas utilizando processo radioanalítico. **39º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial**, São Paulo – SP, Brasil, 2005.
- [50] Royal Society of Chemistry/Analytical Methods Committee; *Analyst*, Ch. 12, p. 180-188, 2005.
- [51] COSTA, J. G.; ROCHA, G. M. Organização e avaliação de comparações interlaboratoriais. ENQUALAB-2005 – Encontro para a Qualidade de Laboratórios Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP 07 a 09 de junho de 2005, São Paulo, Brasil.
- [52] GHILANI, C. D.; WOLF, P. R., **Adjustment Computations Spatial Data Analysis**, 5TH Ed. John Wiley and Sons, New York, USA (2010).
- [53] HANG CHUI, Q. S.; BISPO, J. M. A; IAMASHITA, C. O., “O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos,” *Quim Nova*, v. 27(6), p. 993-1003, 2004.
- [54] YODEN, W.J.; Graphical Diagnosis of Interlaboratory Test Results *Industrial Quality Control*, v. 15, p. 11, 1959.
- [55] OLIVIERI, J. C. *Programa Interlaboratorial: Proposta de Modelo para Interpretação de Resultados de Análises Químicas*. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- [56] NIMEROFF, I. Comparison of Uncertainty Ellipses Calculated from Two Spectrophotometric Colorimetry Methods by an Automatic-Computer Program *J. Opt. Soc. Am. B* 1966, 56 (2), 230-236.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [57] MATSUO, M. Duchenne muscular dystrophy *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.26, p. 166 - 171, 1995.
- [58] BLAKE, D.J.; WEIR, A.; NEWY, S.E.; DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* v. 82 (2), p. 291–329, 2002.
- [59] <http://www.jax.org/index.html>_Acesso em: 12 Abril 2009.
- [60] DOS SANTOS, L. F. *Avaliação do consumo alimentar em pacientes que frequentam a associação sul catarinense de amigos e familiares e portadores de distrofias musculares progressivas (ASCADIM), da região de criciúma – SC*. Criciúma, 2009. Monografia (Bacharel no Curso de Nutrição com Linha de Pesquisa em clínica) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Santa Catarina.