



**EFFECTO DE UNA DIETA CON N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PARÁMETROS
DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA PROGRESIÓN DE DISFERLINOPATÍA EN
MODELO ANIMAL**

**MAGÍSTER EN CIENCIAS
MENCIÓN EN RADICALES LIBRES Y BIOMEDICINA**

Autor: PAZ GARCÍA CAMPOS
Director de Tesis: Ana María Cárdenas, PhD
Co-Director: Marilyn Paz Araos, MSc.

Valparaíso – Chile

2019



Magister en Ciencias
Mención en Radicales Libres
y Biomedicina



**EFFECTO DE UNA DIETA CON N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PARÁMETROS
DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA PROGRESIÓN DE DISFERLINOPATÍA EN
MODELO ANIMAL**

**MAGÍSTER EN CIENCIAS
MENCIÓN EN RADICALES LIBRES Y BIOMEDICINA**

Autor: PAZ GARCÍA CAMPOS
Director de Tesis: Ana María Cárdenas, PhD
Co-Director: Marilyn Paz Araos, MSc.

Valparaíso – Chile

2019

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de manera especial a las cuatro mujeres importantes en mi vida – Marcela Campos, Elsa Fernández, Carmen Garcés y Gabriela Garcés – por su amor, apoyo incondicional, paciencia y aliento constante en la lucha por cumplir mis sueños.

A los que no están entre nosotros, que contribuyeron en la motivación e inspiración para conseguir mi objetivo y llegar a la meta. Un ejemplo de perseverancia y lucha.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, al concluir esta etapa, le agradezco mi familia, amigos y compañeros, por su apoyo incondicional, comprensión y amor brindado durante todo el proceso que ha hecho posible el término de esta investigación.

Un especial agradecimiento al Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, por la ayuda, apoyo y disposición mostrada en el desarrollo de mi investigación. Del mismo modo, agradecer a todos sus integrantes, en especial a Ximena Báez por su asesoría, conocimientos, apoyo y paciencia durante el proceso de aprendizaje y desarrollo de esta investigación.

Finalmente, pero no menos importantes, a mis queridos profesores Ana María Cárdenas, Marilyn Paz, Carlos Jara y Juan Cristián Rojas, por el apoyo brindado durante este proceso, asesorías y paciencia durante la creación de mi seminario de título; por entregarme sus conocimientos y por cada momento vivido durante el desarrollo de esta investigación. Ya que no solo me fortaleció como profesional sino también como persona.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	ix
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	ix
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I	1
1. Planteamiento del problema	1
2. Hipótesis de trabajo.....	4
3. Objetivos	4
3.1 General	4
3.2 Específicos.....	5
4. Justificación del estudio	6
CAPÍTULO II	7
1. Antecedentes: Breve reseña de información de trabajos previos	7
2. Marco Teórico.....	11
2.1 Estado REDOX.....	11
2.2 Músculo Esquelético.....	22

2.3	Distrofia Muscular	34
2.4	N-acetilcisteína precursores de la cisteína	43
CAPÍTULO III		46
1.	Tipo de investigación.....	46
2.	Diseño de la investigación	46
3.	Definición de variables e indicadores (Tabla 1)	48
4.	Población y muestra.....	49
4.1	Población	49
4.2	Muestra	50
5.	Método de trabajo	50
5.1	Test Pantalla Invertida.....	51
5.2	Extracción muestra de sangre y de tejidos.....	53
5.3	Preparación de las muestras	54
5.4	Determinación de Creatina Quinasa.....	55
5.5	Determinación de parámetros REDOX.....	55
6.	Técnicas de análisis de datos	60
7.	Instrumentos de colección de datos	61
8.	Limitaciones.....	61
CAPÍTULO IV.....		62
1.	Seguimiento durante estudio	62
2.	Prueba Funcional	63
3.	Creatina Quinasa.....	65
4.	Parámetros de Daño Oxidativo.....	66

4.1	Ensayo TBARS.....	66
4.2	Ensayo Carbonilo	69
5.	Parámetros de Defensa Antioxidante Enzimático.....	72
5.1	Actividad de SOD	72
5.2	Actividad de CAT	75
5.3	GSH/GSSG.....	78
6.	Parámetros de Defensa Antioxidante No Enzimático	81
6.1	TRAP.....	81
7.	Discusión	84
8.	Conclusiones	94
9.	Referencias.....	95
10.	ANEXOS.....	105
	106

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de Tablas

Tabla 1: Variables de estudio.....	48
Tabla 2: Protocolos de administración de NAC (Terrill et al. (2012).	51

Índice de Figuras

Figura 1: Especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas a partir de la reducción del oxígeno triplete (Apel y Hirt, 2004).	13
Figura 2: Estructura del músculo esquelético (Modificado de Huard et al., 2002).	22
Figura 3: Esquema de la estructura de los sarcómeros (traducido al español desde Saladin, 2007).....	24
Figura 4: Acoplamiento excitación-contracción y la utilización de ATP en la célula (modificado de Song et al., 2011).	26
Figura 5: Modelo de reparación de membrana (traducido al español desde McNeil 2009).	28
Figura 6: Modelo que representa los efectos bifásicos del estado REDOX sobre la fuerza muscular. (traducido al español desde Reid, 2001).....	32
Figura 7: Los grupos tioles de las proteínas miofibrilares (modificado de Ferreira y Reid, 2008).....	33
Figura 8: Patrones de distribución de la debilidad (traducido al español desde Mercuri y Muntoni, 2013).....	35

Figura 9: Representación esquemática del complejo de proteínas asociadas a la distrofina y otras proteínas sarcolemales relacionadas con distrofias musculares. Modificado Bonneman y Finkel (2002).	38
Figura 10: Diseño experimental	47
Figura 11: Bandas detectadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en los animales.....	49
Figura 12: Test pantalla invertida con roedor al centro de la pantalla cuadrada	52
Figura 13: Test pantalla invertida con roedor en suspensión de la malla de la pantalla.....	53
Figura 14: Control de peso durante el estudio de los grupos	63
Figura 15: Test pantalla invertida realizado en los grupos G1 y G2	64
Figura 16: Test pantalla invertida realizado en los grupos G3 y G4.	65
Figura 17: Actividad enzimática de CK (U/L) plasmática de los G1, G2, G3 y G4	66
Figura 18: Lipoperoxidación (nM MDA/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1, G2, G3 y G4	67
Figura 19: Lipoperoxidación (nM MDA/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1, G2, G3 y G4.....	68
Figura 20: Lipoperoxidación (nM MDA/mg proteínas) músculo tibial anterior de los G1, G2, G3 y G4	69
Figura 21: Daño a proteínas (nM carbonilo/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1, G2, G3 y G4.....	70
Figura 22: Daño a proteínas (nM carbonilo/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1, G2, G3 y G4	71

Figura 23: Daño a proteínas (nM carbonilo/mg proteínas) músculo tibial anterior de los G1, G2, G3 y G4	72
Figura 24: Actividad enzimática de SOD (U enzima/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1, G2, G3 y G4	73
Figura 25: Actividad enzimática de SOD (U enzima/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1, G2, G3 y G4	74
Figura 26: Actividad enzimática de SOD (U enzima/mg proteína) músculo tibial anterior de los G1, G2, G3 y G4	75
Figura 27: Actividad enzimática de CAT (U enzima/mg proteína) músculo cuádriceps de los G1, G2, G3 y G4.	76
Figura 28: Actividad enzimática de CAT (U enzima/mg proteína) músculo gastrocnemio de los G1, G2, G3 y G4	77
Figura 29: Actividad enzimática de CAT (U enzima/mg proteína) músculo tibial anterior de los G1, G2, G3 y G4	78
Figura 30: Relación complejo glutatión (GSH/GSSG) músculo cuádriceps de los G1, G2, G3 y G4	79
Figura 31: Relación complejo glutatión (GSH/GSSG) músculo gastrocnemio de los G1, G2, G3 y G4	80
Figura 32: Relación complejo glutatión (GSH/GSSG) músculo tibial anterior de los G1, G2, G3 y G4	81
Figura 33: Capacidad antioxidante total (TEAC μ M) músculo cuádriceps de los G1, G2, G3 y G4	82
Figura 34: Capacidad antioxidante total (TEAC μ M) músculo gastrocnemio de los G1, G2, G3 y G4	83
Figura 35: Capacidad antioxidante total (TEAC μ M) músculo tibial anterior de los G1, G2, G3 y G4	84

ABREVIATURAS

ACo: Acetilcolina

AO: Antioxidante(s)

APTA: *American Physical Therapy Association*

ARE: Elementos de respuesta antioxidante

ATP: Adenosin trifosfato

ATPasa: enzima adenosin tifosfato

AVV: Adenovirus asociado

Ca²⁺: Calcio

CAT: Catalasa

CK: Creatina quinasa

CO₂: Dióxido de Carbono

Cul3: cullin E3

Dysf: Disferlina

ECC: Excitación-contracción

EO: Estrés Oxidativo

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

Fe²⁺:IÓN Ferroso

FEH: Distrofia muscular facioescapulohumeral

FDL: Flexor largo de los dedos

Fig.: Figura

GPx: Glutación Peroxidasa.

GR: Glóbulos Rojos

GSH: Glutación Reducido

GSSG: Glutación Oxidado

H: Henrio

HO•: Radical Hidroxilo

HOCl: Ácido hipocloroso

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

JNK: c-Jun N-terminal

K⁺: Potasio

Keap1: Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch

LGMD 2B: Distrofia muscular de cinturas tipo 2B

LO•: Radical Alcoxilo

LOO•: Radical Peroxilo

LOOH: Hidroperóxidos Lipídicos

MDA: Malondialdehído

MM: Miopatía de Miyoshi

Na⁺: Sodio

NAC: N-acetilcisteína

NADH deshidrogenasa: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas

Nfr2: Factor 2 relacionado con NF-E2

NO: Óxido Nítrico

NO₂: Dióxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

¹O₂: Oxígeno Singlete

O₂⁻: Anión Superóxido

O₃: Ozono

ON: Óxido Nítrico

ONOO⁻: Peroxinitrito

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

REDOX: Reacción Oxido-Reducción

RL: Radical Libre

RLO: Radicales Libres de Oxígeno

ROOH: Radical Hidroperoxilo

RyR: Ryanodina

SIRT1: Sirtulina 1

SOD: Superóxido Dismutasa

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

TCA: Ácido Tricloroacético

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRAP: *Total Radical Peroxyl Trapping*

WT: *wild type*

RESUMEN

El estrés oxidativo (EO) se debe a un desequilibrio entre las producciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes. Este desequilibrio provoca una lipoperoxidación y oxidación de proteínas, con la consiguiente disfunción celular. Por consiguiente, el EO contribuye a patologías de diferentes afecciones, incluidas las distrofias musculares, entre ellas la disferlinopatía.

Las disferlinopatías son un grupo de distrofias musculares autosómicas recesivas causadas por mutaciones en la disferlina, proteína del músculo esquelético altamente expresada y crítica para la reparación del sarcolema. Esta enfermedad comienza entre la segunda y tercera décadas de la vida, afectando primero las funciones de las extremidades inferiores, luego los músculos proximales y paravertebrales y, finalmente, los músculos flexores del antebrazo. Los dos fenotipos de disferlinopatía más comunes son la miopatía de Miyoshi y la distrofia muscular tipo 2B. Las biopsias musculares de pacientes con disferlinopatía muestran signos de EO, con un aumento de la oxidación de proteínas y lipoperoxidación. También se han observado signos de EO en modelos animales de disferlinopatía, como aumento del contenido de lipofuscina, oxidación de la proteína tiol y carbonilación de proteínas y altos niveles de ROS en miofibras aisladas sometidas a estiramiento agudo.

Considerando que el EO podría exacerbar varias patologías humanas, una terapia antioxidante podría contrarrestar el progreso de las disferelopatías. La administración conjunta de dos antioxidantes, resveratrol y coenzima Q10, redujo las características morfológicas degenerativas del tejido muscular esquelético de ratones deficientes en disferlina. Sin embargo, tales hallazgos no fueron cuantitativos.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la N-acetilcisteína (NAC), un precursor de glutatión y agente antioxidante, en ratones deficientes en disferlina B6.A/J *Dysf^{prmd}* y ratones silvestres C57 BL/6. En estos modelos, cuantificamos el efecto del NAC en los niveles de lipoperoxidación, grupos carbonilo en las proteínas y antioxidantes endógenos y exógenos en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibial anterior. También se evaluaron funcionalidad.

Los resultados muestran que la NAC redujo significativamente la peroxidación de lípidos y los carbonilos de proteínas en el cuádriceps y gastrocnemios, y mejoró la resistencia, según lo medido por la prueba de detección invertida de Kondziela.

Palabras Claves: disferlinopatía, disferlina, distrofia muscular, estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno y N-acetilcisteína.

ABSTRACT

Oxidative stress (EO) results from an imbalance between the productions of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses. This imbalance causes lipoperoxidation and protein oxidation, with the consequent cell dysfunction. Therefore, the EO constitutes a mechanism that contributes to the pathology of different conditions, including muscular dystrophies such as dysferlinopathy.

Dysferlinopathies are group of autosomal recessive muscular dystrophies caused by mutations in dysferlin, a skeletal muscle protein highly expressed and critical for sarcolemma repair. This disease begins between the second and third decades of life, impairing first lower limb functions, then paravertebral and proximal upper girdle muscles, and finally forearm flexor muscles. The two most common dysferlinopathy phenotypes are Miyoshi's myopathy and limb girdle muscular dystrophy type 2B. Muscle biopsies from patients with dysferlinopathy show signs of EO, with an increase in protein oxidation and lipid peroxidation. Signs of EO have also been observed in animal models of dysferlinopathy, such as increased lipofuscin content, oxidation of thiol protein and protein carbonylation and high levels of ROS in isolated myofibers submitted to acute stretching.

Considering that EO could exacerbate several human pathologies, an antioxidant therapy could counteract the progress of dysferlinopathies. The co-administration of two antioxidants, resveratrol and coenzyme Q10, reduced the degenerative morphological characteristics of skeletal muscle tissue of a dysferlin-deficient mice. However, such findings were not quantitative.

In the present work, we evaluated the effect of N-acetylcysteine (NAC), a glutathione, precursor and antioxidant agent, in dysferlin-deficient B6.A / J *Dysfprmd* mice, and wild mice C57 BL/6. In these model, we quantified the effect of NAC on the levels of lipoperoxidation, carbonyls proteins and endogenous and exogenous antioxidants in the quadriceps, gastrocnemius and anterior tibial. Functionality was also evaluated.

The analyses show NAC significantly reduced lipid peroxidation and protein carbonyls in quadriceps and gastrocnemius, and it improved strength, as measured by Kondziela's inverted screen test.

Key Words: dysferlinopathy, dysferlin, muscular dystrophy, oxidative stress, reactive oxygen species and N-acetylcysteine.

CAPÍTULO I

1. Planteamiento del problema

Las distrofias musculares (DM) comprenden una gran familia que incluye más de 30 trastornos clínicos genéticos que se caracterizan por debilidad y degeneración progresiva del músculo esquelético usado durante movimientos voluntarios (Munzur y Muntoni, 2009). Gran parte de estos trastornos determinados genéticamente por más de 350 mutaciones diferentes en genes distintos, que están en constante estudio para determinar nuevas mutaciones o genes causantes de dicha enfermedad (Kaplan y Hamroun, 2014).

Entre las DM, se estima que su distribución mundial e incidencia es de 1/2000 nacidos vivos. Según datos publicados el año 2015 extrapolados de cifras prevalentes de estudios internacionales a la población chilena del año 2013, se estiman que existirían 1860 pacientes portadores de distrofias musculares en Chile (Castiglioni C., Bevilacqua J., y Hervias K. C., 2015).

Los institutos Teletón, a lo largo del país atienden el 85% de la población portadora de una discapacidad motora. Según el informe del año 2012, las enfermedades neurodegenerativas tienen una prevalencia del 12% y una incidencia del 13% en los institutos Teletón (Paolineli C. y González M., 2014). Sin embargo, en Chile no hay datos epidemiológicos exactos relacionados con estas enfermedades.

A partir del descubrimiento del gen de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), en los últimos años se ha desencadenado una línea de investigación que abarca la estructura y función del sarcolema, membrana vital para la integridad y supervivencia de la fibra muscular (Bonilla *et al.*, 1988; Campbell, 1995 y Emery, 2002); dichos estudios se han basado en las mutaciones de una amplia variedad de proteínas, incluyendo aquellas de la matriz extracelular del sarcolema, del citoesqueleto, citosólicas y de la membrana nuclear, cuyo déficit han demostrado producir diferentes formas de distrofias musculares (Cohn y Campbell, 2000). Dentro de estos estudios aparece una proteína transmembranal, disferlina (Dysf), cuya reducción o ausencia producto de mutaciones del gen que la codifica desencadena la patología autosómica recesiva, Disferlinopatía (Aoki *et al.*, 2001).

La incidencia y prevalencia exacta de disferlinopatías se desconoce en todo el mundo, pero se ha estimado que representa hasta el 30% de las distrofias musculares progresivas recesivas en el Medio Oriente y la India (Urtizberea *et al.*, 2008).

Aunque la base genética de muchos de estos trastornos se ha identificado, el mecanismo de la patogénesis exacto no está claro; actualmente la evidencia experimental sugiere que la interacción entre el defecto genético primario y niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuyen a la patología de varias distrofias musculares (Tidball y Wehling-Henricks, 2007) y se sitúa en el ámbito de la atención terciaria, terapéuticamente.

El problema es que la disferlinopatía es una enfermedad de la cual su conocimiento es relativamente reciente, antes sólo se clasificaba como una distrofia muscular inespecífica, por otra parte, actualmente no existe evidencia que demuestre una cura para este tipo de DM (Urtizberea *et al.*, 2008), ni tampoco una alternativa terapéutica específica para los pacientes portadores de disferlinopatía, siendo los tratamientos paliativos la única.

2. Hipótesis de trabajo

N-acetilcisteína normaliza los parámetros REDOX tisulares, y retrasa la aparición de cambios funcionales asociados a la disferlinopatía en un modelo animal.

3. Objetivos

3.1 General

Determinar el efecto de una dieta con N-acetilcisteína sobre parámetro de estrés oxidativo tisulares, y cambios funcionales asociados a la disferlinopatía en modelo animal.

3.2 Específicos

- Determinar el efecto de la N-acetilcisteína sobre la funcionalidad de los ratones con disferlinopatía y controles.
- Determinar el efecto a nivel sistémico, de la N-acetilcisteína sobre los niveles de creatina quinasa en ratones con disferlinopatía y controles.
- Determinar el efecto a nivel muscular, de la N-acetilcisteína sobre los niveles de daño oxidativo (lipoperoxidación y oxidación de proteínas) en ratones con disferlinopatía y controles.
- Determinar el efecto a nivel muscular de la N-acetilcisteína sobre las defensas antioxidante (enzimáticas, SOD, CAT, GSH/GSSG; y no enzimáticas, TRAP) en ratones con disferlinopatía y controles.

4. Justificación del estudio

Para poder establecer de forma objetiva la utilidad de un tratamiento en una enfermedad neuromuscular, es necesario disponer previamente de parámetros conocidos cuyos cambios nos indique que el tratamiento ensayado está siendo efectivo o no. Para determinar estos indicadores es preciso conocer la historia de la enfermedad, es decir, con que clínica se manifiesta y cómo evoluciona a lo largo del tiempo. Existen estudios evolutivos bien diseñados de la enfermedad DMD en los que posteriormente se han basado varios ensayos clínicos, pero estudios de este tipo no se han realizado en pacientes con una disferlinopatía.

Con este trabajo, en una primera instancia pretendemos conocer parámetros de daño oxidativo y defensas antioxidantes, a nivel muscular, estos parámetros son imprescindibles para establecer de forma objetiva la utilidad real de un tratamiento; para posteriormente observar cómo varían frente a un tratamiento antioxidante junto a una evaluación funcional en un modelo con disferlinopatía. Con el propósito de dar evidencia del rol de las ERO en la progresión de esta patología, este estudio medirá distintos marcadores tanto de daño oxidativo como de defensa antioxidante en disferlinopatías en un modelo de ratón deficiente de Dysf.

CAPÍTULO II

1. Antecedentes: Breve reseña de información de trabajos previos

Se ha informado previamente que el estrés oxidativo está implicado principalmente en el deterioro patogénico del músculo en el modelo de ratón mdx para MD deficiente en distrofina (Disatnik *et al.*, 1998). La lipoperoxidación es un índice común de lesión mediada por radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1989). Mediciones anteriores en músculos deficientes en distrofina han indicado niveles elevados de la peroxidación lipídica tanto en humanos como en ratones (Kar y Pearson, 1979; Jackson *et al.*, 1984, Mechler *et al.*, 1984, Ragusa *et al.*, 1997). Varios estudios informaron de la reducción del estrés oxidativo por diversas intervenciones, como la suplementación con antioxidantes, que condujeron a una reducción de los eventos adversos en diferentes patologías (Buck y Chojkier, 1996; Aragno *et al.*, 2002; Buetler *et al.*, 2002; Grounds y Torrisi, 2004; Kaczor *et al.*, 2007).

Frente a lo descrito anteriormente, Potgieter y colaboradores (2011) estudiaron las modificaciones celulares, mediante histología, frente a la suplementación de coenzima Q10 y resveratrol en ratones SJL / J. Si bien, es poco probable que la suplementación de un antioxidante en un modelo distrófico revertirá la remodelación patológica, el presente estudio demostró por histopatología, que en cuádriceps de animales afectados tratados con altas dosis de CoQ10 y una combinación de resveratrol / CoQ10 disminuye la

incidencia necrótica de la fibra muscular y disminuye la cantidad de focos inflamatorios; de este modo ayudando a la regeneración muscular eficiente en el músculo con deficiencia de Dysf.

En pacientes con DM, se han demostrado actividades alteradas de las enzimas antioxidantes (Burr, Asayama y Fenichel, 1987), disminución de la actividad de los complejos mitocondriales y la activación de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (NF- κ β). Se han descrito daños oxidativos sistémicos y musculares específicos y función antioxidante alterada en los músculos de los pacientes con DMD (Jongpiputvanich, Sueblinvong y Norapucsunton, 2005). Sin embargo, estos estudios en los modelos disferlinopatía son escasos; pero Renjini y colaboradores (2011) analizaron marcadores de estrés oxidativo y función antioxidante en biopsias musculares de pacientes con 3 tipos de distrofias musculares (DMD, sarcogliconopatía y disferlinopatía) con el fin de comparar la contribución de estos marcadores en dichas patologías musculares; además de evaluarlo en modelos animales de DM y mioblastos. Renjini demostró altos niveles de oxidación de proteínas en los tres tipos de DM, pero no encontraron diferencias significativas en enzimas antioxidantes. Para explicar el daño oxidativo en DM evaluaron si el complejo glutatión (GSH) se alteraba, evidenciando una alteración en los distintos componentes del complejo. El daño oxidativo en disferlinopatía fue demostrado por una reducción de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx), lo que estaría directamente relacionado con la degeneración muscular. A pesar de que los niveles de GSH

se mantuvieron inalterados en la disferlinopatía, la reducción de las actividades de glutatión-s-transferasa (GST) y GPx podría contribuir al daño oxidativo y a la patología muscular. Además, la peroxidación lipídica en disferlinopatía podría atribuirse a la pérdida de actividad de GST.

De Luna y colaboradores (2012) evaluaron la regulación de la expresión de Dysf en células HL60 por de vitamina D₃ usando distintas dosis (10, 25, 50 y 100 nmol/l) y tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas). Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demostraron que vitamina D, de una manera dosis dependiente aumenta la expresión de Dysf, alcanzado la mayor expresión a las 48 hrs en cultivos con 50 y 100 nmol/l. También se estudió la expresión de Dysf por Western blot (WB) donde se observa la expresión máxima de Dysf después de 72 horas de incubación con 100 nmol/l de vitamina D₃. Por otra parte, se ha informado que los portadores de una mutación en el gen DYSF tienen disminución de la expresión de Dysf en su músculo esquelético y monocitos (Illa *et al.*, 2007 y Parada *et al.*, 2009); por lo cual, De luna y colaboradores estimularon la expresión de Dysf en monocitos de sangre periférica (PBM) sanos y portadores de la mutación del gen DYSF con 100nmol/l de vitamina D₃ durante 72 horas, dando como resultado un aumento en la expresión de la proteína Dysf en ambos PBM. Por lo tanto, se puede concluir que la suplementación con vitamina D es una terapia potencial para el tratamiento de disferlinopatías.

Las ERO provocan un daño celular mediante la alteración directa e irreversiblemente de macromoléculas tales como proteínas, lípidos de membrana y el ADN (Halliwell y Gutteridge, 2007), pero otra consecuencia de la exposición celular a ERO es la modificación reversible de cadenas laterales tioles de proteínas; los tioles biológicos incluyen tioles libres de bajo peso molecular y tioles de proteínas, el grupo funcional del aminoácido cisteína. Estas modificaciones en los grupos tioles son reversibles a través de la acción de enzimas antioxidantes (tioredoxina, peroxirredoxina, así como cisteína libre y glutatión (Biswas, Chida y Rahman, 2006; Ferreira y Reid, 2008).

Además de los antecedentes descritos anteriormente, Terrill y colaboradores (2012) presentaron nuevos datos en una gama de músculos de ratones deficientes en Dysf a A/J ($A/J^{dysf/-}$) sobre la oxidación de tioles de proteínas, y la contribución del estrés oxidativo a la gravedad de la histopatología, en comparación con los ratones controles A/J de diversas edades. Los ratones $A/J^{dysf/-}$ muestran cambios distróficos, incluyendo necrosis e inflamación, que son histológicamente evidente a los 12 meses de edad en los músculos proximales, mientras que los músculos distales parecen relativamente poco afectados incluso en etapas tardías de la enfermedad. Además, a los 19 meses se observó un aumento significativo de carbonilos en el músculo cuádriceps de ratones $A/J^{dysf/-}$ en comparación a controles jóvenes.

Finalmente se evidenció un aumento en la oxidación de tioles en los músculos psoas y cuádriceps a los 8, 12 y 19 meses, siendo este último el que demuestra un aumento mayor. Este patrón de oxidación se correlacionaría con la manifestación y progresión de la enfermedad con la edad.

2. Marco Teórico

2.1 Estado REDOX

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción al proceso en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Estas reacciones de óxido-reducción (REDOX) son fundamentales, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas (Venereo, 2002; Lin y Beal, 2006).

Sin embargo, estas reacciones, esenciales para la vida, pueden ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, por lo tanto, alteran los procesos celulares como funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc. (Elejalde, 2001).

2.1.1 Estrés Oxidativo y Radicales Libres

El estrés oxidativo (EO) se define como una serie de alteraciones que se producen debido a un desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL), o agentes prooxidantes, y los mecanismos de acción antioxidante (AO) que posee un organismo (sistema de defensa enzimático y no enzimático, y mecanismos de reparación o eliminación de moléculas). A consecuencia de este desequilibrio se produce el daño de los componentes celulares y tisulares, lo cual propicia la aparición de procesos patológicos (Storey, 1996; Valavanidis *et al.*, 2006).

Los RL son moléculas que tienen un electrón desapareado en el último orbital, lo que hace que sean altamente inestables, muy reactivos y de vida media muy corta. Se producen a través de diferentes mecanismos biológicos, como en la cadena respiratoria mitocondrial, cadena transportadora de electrones a nivel microsomal y cloroplastos, y en las reacciones de oxidación. El daño celular provocado por los RL tiene origen en la interacción de éstos con las principales biomoléculas del organismo, las cuales corresponden a los carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez, Menéndez y Trujillo, 2001; Venereo, 2002).

2.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son generadas a partir de la reducción del oxígeno triplete o dióxígeno (Fig. 1), el que reacciona con moléculas biológicas para contribuir en procesos relacionados con la

señalización celular o en la generación de patologías bajo condiciones metabólicas anormales (Apel y Hirt, 2004; Zelickson *et al.*, 2013).

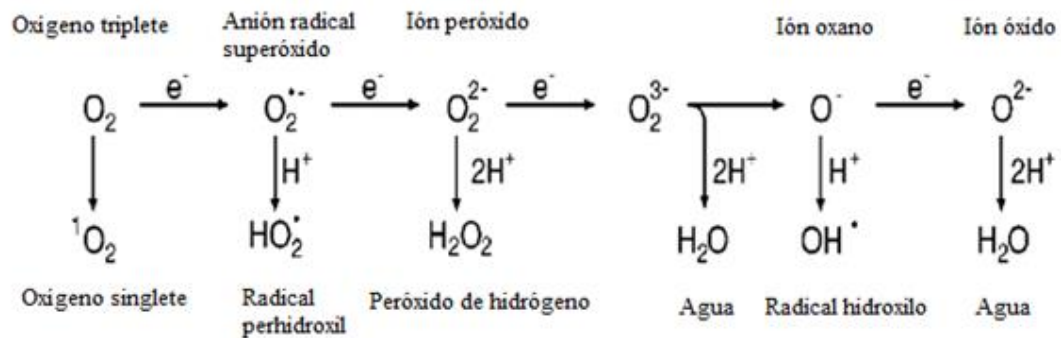


Figura 1: Especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas a partir de la reducción del oxígeno triplete (Apel y Hirt, 2004).

Dentro de las principales ERO se encuentra el oxígeno singlete, el anión radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Zelickson *et al.*, 2013).

El oxígeno singlete (1O_2) es una molécula no radicalaria, ya que no tiene un electrón desapareado, pero es una forma del oxígeno altamente reactiva. Esta molécula tiene una vida media de alrededor de 3,7 μs en medio acuoso (Gutteridge, 1994; Lesser, 2006).

El anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es una especie radicalaria que tiene propiedades oxidativas y reductoras dentro de los sistemas biológicos, según el tipo de solución en el cual se encuentre. Al encontrarse en solución acuosa, el $O_2^{\bullet-}$ actúa como un agente oxidante. No obstante, este radical se comporta

como un agente reductor, pudiendo reducir complejos férricos como el citocromo C. Este radical es estable en el interior de las membranas biológicas (tilacoides y mitocondrias). Por otra parte, el $O_2^{\bullet-}$ participa en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la reacción de dismutación. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, llegando a tener este último una vida media de alrededor de 50 μs (Lesser, 2006; Gutteridge y Halliwell, 2010).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), no es un radical libre, es una molécula que es biosintetizada en diversas vías metabólicas oxidativas (incluyendo la reacción de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$) y posee una estructura covalente sin carga. Es relativamente estable en ausencia de iones de metales de transición y es capaz de difundir rápidamente a través de las membranas celulares, pudiendo causar un daño directo sobre componentes celulares (Gutteridge, 1994; Lesser, 2006). Asimismo, es considerada por participar en vías metabólicas en condiciones normales al actuar como un segundo mensajero (Bienert, Schjoerring y Jahn, 2006).

El H_2O_2 también puede comportarse como una especie prooxidante generando un RL altamente reactivo, el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el cual es producido en presencia de iones de metales de transición a través de la reacción de Fenton y Haber-Weiss (Kehrer, 2000).

El radical hidroxilo (HO^\bullet) es la especie de oxígeno más reactiva, teniendo una vida media de 10^{-7} segundos y llegando a causar gran daño oxidativo al reaccionar con biomoléculas. En los sistemas biológicos, este radical puede activar cadenas de reacciones provocando daño en membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos, producto del proceso oxidativo. La producción de HO^\bullet está regulada por la disponibilidad de ión ferroso (Fe^{2+}), el cual participa en la reacción de Fenton, y por el $\text{O}_2^{\bullet-}$, como agente reductor en la reacción de Haber-Weiss (Gutteridge, 1994).

Existen otras especies químicas llamadas especies reactivas de nitrógeno (ERN), al igual que las ERO, participan en procesos biológicos de señalización celular y en la generación de patologías; las ERN derivan del óxido nítrico (NO^\bullet). Éste es producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), y en conjunto con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es capaz de generar el anión peroxinitrito (ONOO^-), el cual es un potente agente oxidante. El ONOO^- puede reaccionar con dióxido de carbono (CO_2) para formar nitrosoperoxicarbonato ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$), que al someterse a una fisión homolítica produce el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y el radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), cuya reactividad puede causar daño en las moléculas biológicas (Radi *et al.*, 2001; Zelikson *et al.*, 2013). Además, el ONOO^- puede ser protonado para formar ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual se descompone por homólisis para producir NO_2^\bullet y HO^\bullet (Radi *et al.*, 2001).

Las ERO y ERN interactúan con los lípidos que componen las membranas celulares a través de la lipoperoxidación, afectando directamente en la pérdida de la integridad de la membrana, lo que altera ciertas funciones relacionadas con la señalización y la permeabilidad, provocando incluso la muerte celular (Girotti, 1998; Grune, Catalgol y Jung, 2013). En este proceso, los ácidos grasos poliinsaturados son oxidados por especies reactivas formando radical peroxilo (LOO^\bullet). Éstos últimos son reducidos para formar hidroperóxidos lipídicos (LOOH), los cuales pierden su estabilidad relativa al reaccionar con metales iónicos, generando radicales alcoxilo (LO^\bullet). Los hidroperóxidos lipídicos se comportan como intermediarios para producir epóxidos, compuestos carbonilos tales como el hexanal y 4-hidroxi-2-nonenal, cetonas, isoprostanos y aldehídos, como el malondialdehído (MDA). Muchos de estos productos pueden reaccionar con proteínas y formar aductos de ADN, teniendo un efecto tóxico y mutagénico (Marnett, 1999).

2.1.3 Efectos de las Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno

La oxidación de proteínas es una de las consecuencias importantes del EO, ya que el daño generado puede provocar la pérdida de la funcionalidad catalítica de proteínas específicas e inducir a la pérdida de una función bioquímica particular (Sohal, 2002).

Además de las ERO y ERN, existen otros compuestos producto de reacciones secundarias generadas por EO que pueden oxidar proteínas, tales como

carbohidratos y lípidos modificados por daño oxidativo, en donde se incluyen productos de la lipoperoxidación (Grune, Catalgo y Jung, 2013).

Dentro de las modificaciones proteicas que son inducidas por las ERO se encuentran la formación de carbonilos, la pérdida de grupos sulfhidrilo, la formación de entrecruzamientos disulfuro, entrecruzamientos ditirosina, nitrotirosina, glioxidación y aductos de la peroxidación lipídica (Sohal, 2002).

El daño al ADN corresponde a otra de las consecuencias de importancia debido al EO, ya que genera una serie de procesos tales como alteraciones en la replicación, transcripción, y alteraciones mutagénicas, producto de la ruptura de las hebras, fragmentación de azúcares y supresión de bases nitrogenadas (Imlay y Linn, 1988; Cadet *et al.*, 1997; Marnett, 2002; El-Khamisy y Cadelcott, 2006; Rowe, Degtyareva y Doetsch, 2008).

Por otra parte, el malondialdehído (MDA), secundario a reacciones iniciadas por ERO y ERN puede producir deterioro en el ADN (Marnett, 2002).

2.1.4 Fuentes de Producción de Especies Reactivas

Las ERO son producidas por fuentes endógenas y exógenas. Uno de los principales sitios de producción endógena de ERO corresponde a la mitocondria, durante el proceso de la cadena transportadora de electrones, en donde el anión radical superóxido es producido en la membrana mitocondrial interna a través de la enzima NADH deshidrogenasa en el complejo I, y en la

interface entre la ubiquinona y el complejo III. Mediante la reacción de dismutación, el $O_2^{\bullet-}$ que se genera en este proceso es transformado en H_2O_2 . La difusión de protones a través de la membrana interna de la mitocondria disminuye la producción de ERO (Brookes, 2005).

Asimismo, las células inmunes son una fuente importante en la producción de ERO, ya que las células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos pueden secretar ERO, tales como $O_2^{\bullet-}$ y ácido hipocloroso (HOCl) para promover la fagocitosis (Schraufstätter *et al.* 1990; Halliwell 1991; Tidball 2005). Las ERO se producen en las células inmunes por diversas enzimas, incluidas las NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa. La NADPH oxidasa es una enzima unida a la membrana, por ejemplo, de bacterias, que cataliza la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Babior 2000). La mieloperoxidasa es una enzima Hem que se expresa de forma abundante en leucocitos que convierte el H_2O_2 y cloruro en HOCl (Harrison *et al.* 1976; Babior 1999; Hart *et al.* 1988). El HOCl es una ERO altamente reactiva que causa daño a lípidos, ADN y proteínas, además de reaccionar con los tioles proteicos (Prütz 1996).

También citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF), modulan la producción de ERO. El TNF es secretado por una amplia gama de células inflamatorias y de otro tipo (músculo esquelético), y es una quimiocina potente que atrae más células inflamatorias (Collins *et al.* 2001). A su vez, aumenta el EO tanto en sus células dianas como en las células circundantes (Halliwell *et al.* 2007), tanto en la catálisis de NADPH oxidasa como de las

mitocondrias (Hughes *et al.* 2005). Además, el TNF estimula la activación de NF- κ B, complejo proteico que juega un rol crítico en muchos procesos biológicos, incluido la expresión de citocinas (Hayden *et al.* 2004).

Por otra parte, en las fuentes exógenas de producción de ERO encontramos diversos desencadenantes, tales como radiaciones ionizantes y no ionizantes (radiación ultravioleta, radiación visible, exposición a contaminantes (O₃) (Spikes, 1989; Gutteridge, 1994).

Además, existen diversos elementos y condiciones que pueden alterar la producción de ERO, entre ellos los hábitos de vida, tales como, horas de sueño, dieta, enfermedades concomitantes, actividad física, entre otros (Haliwell y Gutteridge, 1989; Kahleova *et al.*, 2011; Mathangi, Shyamala y Subhashini, 2012; Kim, Cho y Park, 2012).

2.1.5 Sistemas de Defensa Antioxidante

Los mecanismos de defensa AO tienen el objetivo de mitigar los efectos nocivos producidos por las ERO y ERN a través del estrés oxidativo. Estas defensas pueden actuar previniendo la formación de agentes oxidantes o bien neutralizarlos una vez que se han formado (Wolf, Barrer y Dean, 1986; Sies, 1993).

Los sistemas AO han sido clasificados en enzimáticos, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); y

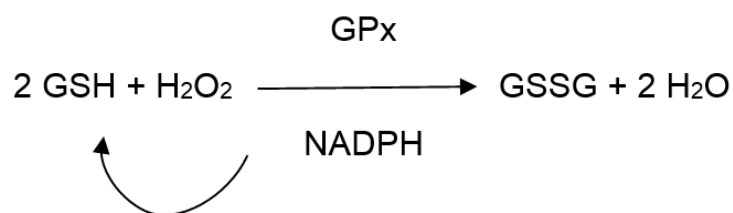
no enzimáticos, como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (vitamina A), el glutatión (GSH) y compuestos polifenólicos, entre otros (Halliwell y Gutteride, 1984).

La enzima SOD ha sido encontrada en diversas partes de células eucariontes, cuya función de la SOD es catalizar la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ para la producción de H_2O_2 y O_2 (Fridovich, 2013).

La enzima CAT se encuentra en los peroxisomas, donde cataliza la conversión de H_2O_2 a agua y oxígeno molecular, previniendo la formación del radical hidroxilo. La catalasa es altamente efectiva al actuar sobre altas concentraciones de H_2O_2 (Di Giulio *et al.*, 1989; Kirkman *et al.*, 1999; Lesser, 2006; Monaghan, Metcalfe y Torres, 2009).

Finalmente, dentro de las defensas AO enzimáticas se encuentra el sistema glutatión reductasa/peroxidasa, cuya función es catalizar la conversión de H_2O_2 a H_2O (ecuación 1) (Di Giulio *et al.*, 1989).

(1)



Por otra parte, los AO no enzimáticos cumplen una función importante en la defensa contra el daño producido por estrés oxidativo. En este tipo de defensas es posible encontrar compuestos que son sintetizados por vía endógena y compuestos que son incorporados en un organismo, por ejemplo, a través de la dieta, principalmente frutas y verduras (Monaghan, Metcalfe y Torres, 2009). Los compuestos antioxidantes no enzimáticos actúan interceptando a las especies reactivas una vez que se han formado, con el fin de transformarlas en compuestos no radicalarios y romper con las reacciones en cadena iniciadas por las especies reactivas (Sies, 1993).

Este grupo de AO se puede clasificar en: hidrofílicos y lipofílicos. Los AO hidrofílicos, moléculas reductoras pequeñas, son vitamina C, glutatión reducido, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, fenoles, entre otros. Mientras que los AO lipofílicos son vitamina E, carotenoides, ubiquinona, entre otros (Montero, 1996; Cabrera y Serrano, 2014).

Las ERO y el desbalance REDOX tienen un papel fundamental en la fisiología de muchos tejidos y diversas patologías. Un tejido que es susceptible de modificaciones oxidativas es el músculo esquelético, ya que las ERO se generan constantemente en el músculo esquelético durante condiciones basales y, en circunstancias tales como el ejercicio, el envejecimiento y la inflamación. El estrés oxidativo está asociado con muchas condiciones de atrofia muscular, como el VIH / SIDA, la diabetes, la sepsis y las distrofias musculares (Moylan y Reid, 2007). En consecuencia, la estructura y la función

del músculo esquelético hacen que sea más susceptible a la generación de ERO, desencadenando una disfunción celular como consecuencia de la generación de ERO, por lo tanto, a continuación, se describirá la estructura, fisiología y la participación de las ERO en el músculo esquelético.

2.2 Músculo Esquelético

El músculo esquelético, es el tejido más abundante en el cuerpo humano, constituye aproximadamente el 40% de la masa corporal. Este es un tejido contráctil especializado que tiene como función desplazar el cuerpo humano; además de participar en la respiración, regulador de metabolismo y una fuente generadora de calor. El músculo esquelético se compone de dos tipos celulares: músculo esquelético y tejido conectivo (Fig.2) (Huard et al., 2002).

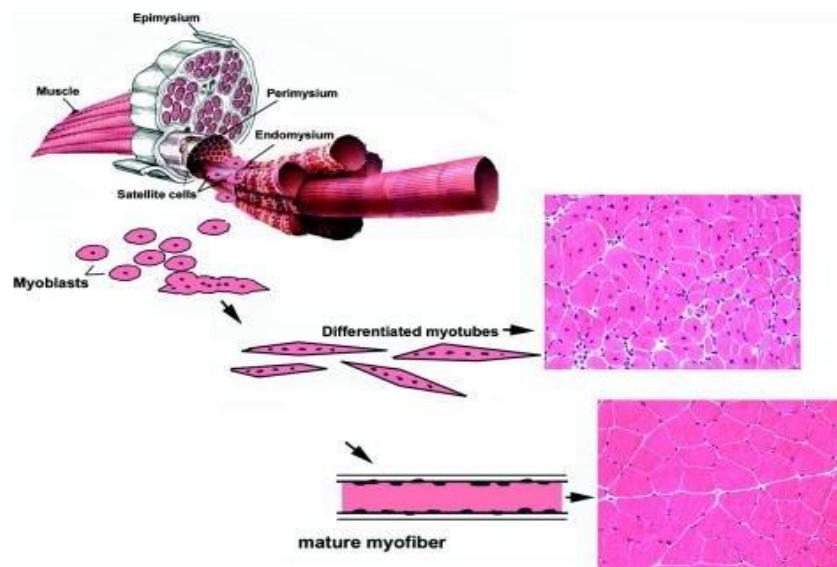


Figura 2: Estructura del músculo esquelético. El endomisio es una capa de tejido conectivo que rodea las miofibras individuales. El perimisio rodea fascículos o haces de fibras musculares, y la capa que rodea el músculo en sí es el epimisio. Cuando un músculo se lesiona, o durante el desarrollo, las células satélite se activan y se convierten en mioblastos. Estos se diferencian y se fusionan para formar miotubos que maduran en miofibras (Modificado de Huard et al., 2002).

La célula de músculo esquelético maduro se llama miocito o fibra muscular, que poseen una longitud variable que puede llegar a los 140 cm o más en los seres humanos. Son células multinucleadas cilíndricas con un diámetro de 10 a 100 μm . Las miofibras derivan de la fusión de múltiples mioblastos (células precursoras miogénica) (Fig. 2), donde los mioblastos contienen un solo núcleo y se fusionan para formar miotubos multinucleados que exhiben la nucleación central (Huard et al., 2002). A medida que los miotubos se convierten completamente inervados y maduros en una fibra muscular, estos mionúcleos finalmente migran a una posición periférica debajo de la membrana celular (denominada el sarcolema en el músculo). La aparición de núcleos centrales en el músculo adulto normal es un indicio de un proceso de regeneración del músculo o de una denervación muscular. Como se muestra en la Figura 2, cada fibra muscular está rodeada de una capa de tejido conectivo llamado endomisio, haces de fibras musculares están a su vez rodeados por otra capa de tejido conjuntivo llamada perimisio, y todo el músculo está rodeado por el epimisio, una capa de tejido conectivo que se continúa con el tendón, un tejido conectivo denso que ancla el músculo al hueso (McArdle et al., 2009).

2.2.1 Contracción del Músculo Esquelético

Dispuestos a lo largo de la longitud de las miofibras en el citoplasma (sarcoplasma) se encuentran las unidades funcionales más pequeñas llamadas miofibrillas. Estas miofibrillas están formadas por subunidades aún más pequeñas llamadas miofilamentos, compuestos por proteínas del

citoesqueleto (actina y la miosina) (Fig. 3 a y b). Los filamentos de miosina (filamentos gruesos) están conformados por paquetes de polipéptidos formados por dos cadenas pesadas y dos ligeras; los extremos globulares de las cadenas pesadas forman las cabezas con actividad ATPasa. Los filamentos de actina (filamentos finos) están conformados de moléculas pequeñas dispuestas en 2 cadenas helicoidales, unidos a otras dos proteínas, troponina y tropomiosina. La organización de superposición de filamentos de actina y miosina forman la unidad funcional de la miofibra-sarcómero (Fig. 3c) (McArdle, Katch F y Katch V, 2009). Existen otras proteínas que también contribuyen a la estructura de los sarcómeros y a la contracción muscular; que frente a mutaciones en alguna de ellas conllevan a enfermedades musculares (Bönnemann y Laing, 2004).

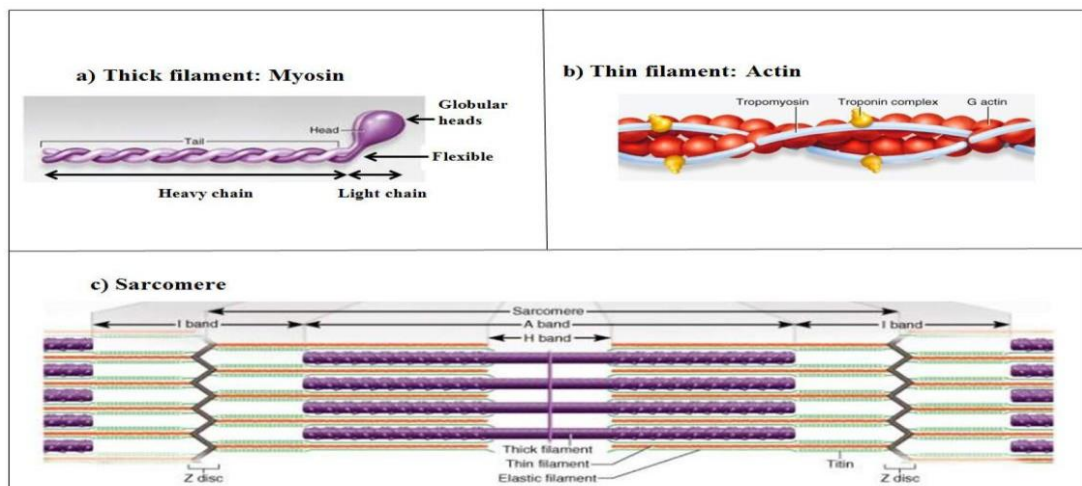


Figura 3: Esquema de la estructura de los sarcómeros. **a)** Filamentos gruesos, se compone de moléculas de miosina con dos cabezas globulares en sus extremos que tienen actividad ATPasa. **b)** Filamento delgado, se compone de dos cadenas helicoidales de moléculas de actina, con las proteínas de regulación: troponina y tropomiosina. **c)** Diagrama esquemático de un sarcómero dentro de una fibra muscular. La disposición estructural entre los filamentos gruesos y delgados permite que los puentes cruzados de ciclo se produzcan durante la contracción (traducido al español desde Saladin, 2007).

Los sarcómeros están organizados en serie a lo largo de una miofibrilla, y ocurre un proceso que permite el acortamiento sucesivo de los sarcómeros, causando que la miofibrilla se acorte en secuencia, lo que lleva a la contracción de toda la miofibrilla. Este proceso comienza con la estimulación eléctrica que viaja por el nervio motor, que permite la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular y que activa receptores nicotínicos en la superficie de la miofibrilla (sarcolema), produciendo el acoplamiento excitación-contracción (ECC). Esto implica que el potencial de acción desencadenado por la motoneurona alfa se propague a lo largo del sarcolema y baje por los túbulos T (extensiones del sarcolema que entran en el sarcoplasma y se extienden sobre el retículo sarcoplásmico). Este rápido cambio en el potencial eléctrico activa los receptores de dihidropiridina en la membrana de los túbulos T, que interactúan mecánicamente con los canales de liberación de calcio (Ca^{2+}), los receptores de Ryanodina (RyR), activándolos y haciendo que el retículo sarcoplásmico libere el Ca^{2+} en el sarcoplasma (Fig. 4). El Ca^{2+} se une al complejo troponina-tropomiosina, revirtiendo la inhibición de la miosina de la unión con la actina. La cabeza de la miosina se une a la actina, y también se combina con una enzima llamada miosina ATPasa, que rompe la unión de ADP a la miosina, conllevando a la liberación de energía en forma de ATP. Esta energía permite el movimiento de los puentes cruzados. EL ATP se une a la miosina de los puentes cruzados, lo que permite una "golpe de fuerza"-movimiento de la cabeza de miosina que causa el deslizamiento de los filamentos gruesos y finos, y que conduce a un acortamiento del músculo (Fig. 4) (McArdle et al., 2009; MacIntosh et al., 2012).

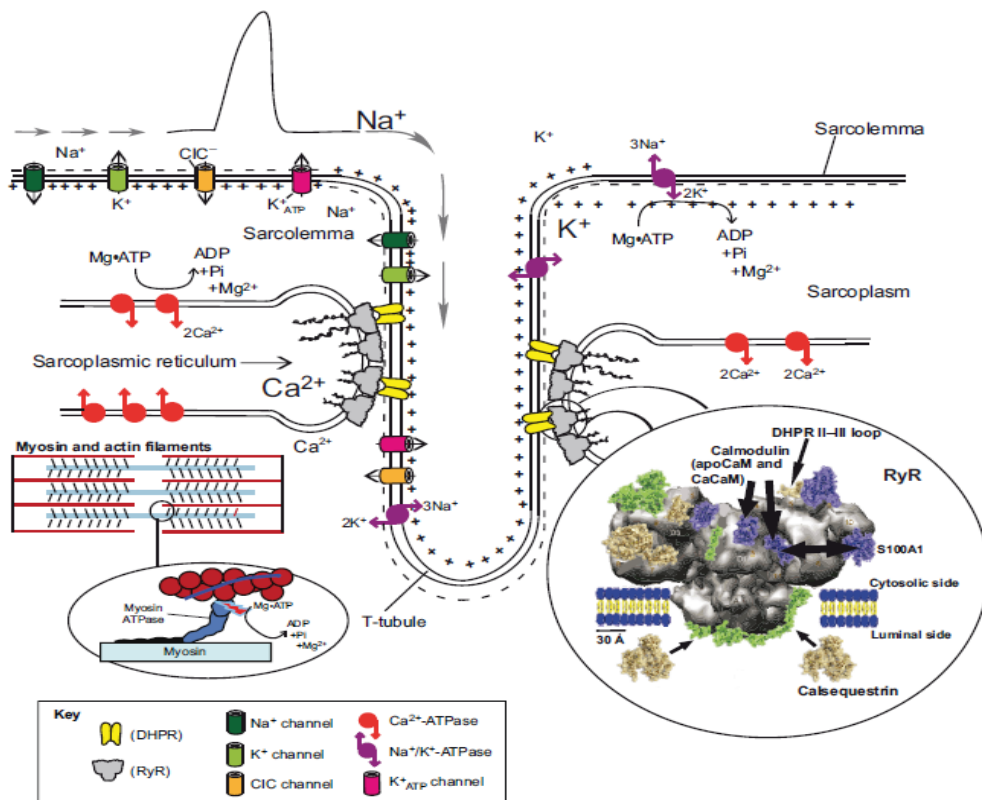


Figura 4: Acoplamiento excitación-contracción y la utilización de ATP en la célula. (modificado de Song et al., 2011).

2.2.2 Reparación del Músculo Esquelético

El músculo esquelético posee la capacidad de cambiar el tamaño y tipo de fibra muscular. Dentro de los factores que inducen a estos cambios se encuentran la nutrición, el ejercicio y la actividad, los que pueden conducir a un aumento (hipertrofia) o disminución (atrofia) de la masa muscular (Brunelli *et al.*2008).

Las miofibras del músculo esquelético que se contraen normalmente sufren con frecuencia alteraciones de la membrana plasmática, especialmente en contracciones excéntricas generadoras de alta fuerza (Clarke *et al.* 1993). Es

importante destacar que el desgaste muscular ocurre cuando las miofibras, debido a un defecto genético, son incapaces de reparar la membrana (Bansal *et al.* 2003).

Una ruptura física en la integridad del sarcolema desencadena una entrada de Ca^{2+} y un cambio en el balance redox (Fig. 5a), lo cual puede dar la señal para comenzar el proceso de reparación o en exceso causará la muerte rápida de la célula dañada (Steinhardt *et al.* 1994; Verkhratsky 2007). La entrada de Ca^{2+} provoca la activación de proteínas como la anexina I y II, disferlina y calpaína (Bansal y Campbell 2004; McNeil *et al.* 2006), las que poseen por función participar del proceso de reparación del sarcolema dañado. (Basal *et al.* 2003; Glover y Brown 2007; Kerr *et al.* 2014). Por otra parte, el aumento de los ROS promueve el reclutamiento de MG53 (Cai *et al.* 2009) proteína que también cumple un rol fundamental en el proceso de reparación del sarcolema dañado (Fig. 5).

La activación de disferlina, anexinas y proteínas MG53, permite el reclutamiento, agregación y fusión de vesículas y otros organelos membranosos son reclutados cerca del sitio de la lesión formando una gran vesícula rica en disferlina, mediada por anexina, calpaína y la proteína MG53 que actuarán como parche membranoso que restaurara el sarcolema dañado (Fig. 5) (Bansal y Campbell 2004; McNeil *et al.* 2006; Mellgren *et al.* 2007; McDade *et al.* 2014).

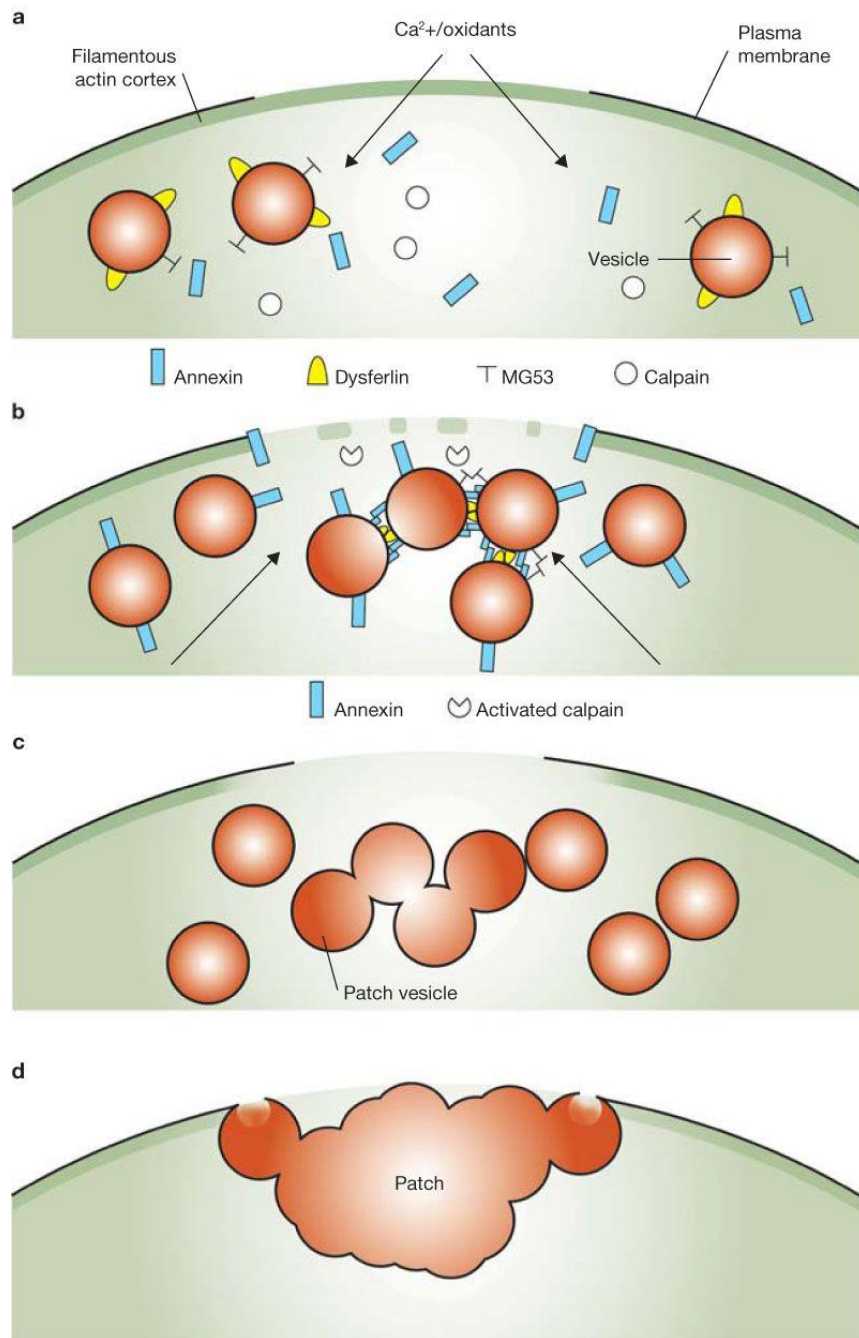


Figura 5: Modelo de reparación de membrana. (a) Entrada de calcio extracelular y oxidantes extracelulares desencadenan respuesta local. (b) Vesículas transportadas hacia sitio de lesión por la proteína kinesina motora de microtúbulos, entregando materiales para construcción requeridos, como membrana intracelular. Citoesqueleto cortical de actina se desmonta después de la activación de la proteasa calpaína por calcio, eliminando barrera física para eventos de fusión. (c) Vesículas se unen y fusionan entre sí, formando “un parche membranoso”. El reclutamiento de vesículas esta mediado por MG53 oxidado. La fusión esta mediada por anexina y disferlina activada por Ca²⁺ y por SNARE. (d) El parche membranoso se fusiona con membrana plasmática, completando la reparación. MG53, anexina y disferlina también participan en este evento de fusión (traducido al español desde McNeil 2009).

En el caso de una lesión aguda de la fibra muscular, se estimula la inflamación y la miogénesis para reparar la fibra dañada; mientras que en el caso de la necrosis crónica o repetitiva (como en estados de enfermedad), aumenta progresivamente la fibrosis y se deteriora la miogénesis para dar lugar a la sustitución de tejido muscular por tejido graso conectivo fibroso. Esta pérdida progresiva del tejido muscular ocurre en la mayoría de las distrofias musculares (Brunelli y Rovere-Querini, 2008).

La necrosis de miofibras normalmente inicia una secuencia rápida de eventos regenerativos y miogénesis. El proceso de necrosis implica ruptura irreversible del sarcolema, ya sea a través de toda su longitud o parte de la fibra muscular. Esto se refleja en el aumento de los niveles de creatina quinasa (CK), proteína citosólica del miocito que es liberada en la sangre. Los niveles plasmáticos de esta proteína constituyen una herramienta de diagnóstico para distrofias musculares (Charge y Rudnicki, 2004). El daño al sarcolema también da lugar a un aumento de Ca^{2+} intracelular, que puede aumentar la necrosis por la estimulación de la proteólisis, impulsado por calpaínas, que son proteasas dependientes Ca^{2+} (Grounds, 1991; Charge y Rudnicki 2004). Al ocurrir una lesión, pocas horas después, la propagación de la necrosis se detiene para localizar el sitio de la lesión, desencadenando una condensación de miofilamentos (hipercontraídos) para generar un resellado como barrera protectora (Papadimitriou *et al.*, 1990; Järvinen *et al.*, 2005). Posterior a la lesión se produce una invasión de células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos (Tidball 2005), cuya función es secretar citoquinas como TNF y

fagocitar el tejido dañado (Grounds, 1991; Tidball 1995). Sin embargo, el proceso de regeneración puede ser inhibido por la presencia persistente del tejido necrótico (Grounds et al., 2002).

Si bien, las células inflamatorias son esenciales para este proceso, una invasión excesiva de estas células puede exacerbar el daño muscular a causa de la secreción de ERO proveniente de los neutrófilos (Tidball, 2005).

2.2.3 Estrés Oxidativo y Músculo Esquelético

El músculo esquelético durante su estado de reposo y contracción genera ERO, ya que se requieren niveles óptimos de ERO para la regulación de la fisiología del músculo esquelético es su estado normal. Las ERO y las especies reactivas de nitrógeno se generan a partir de diferentes fuentes en el músculo esquelético, incluyendo las mitocondrias, NADPH oxidasas y NOS desde el sarcolema. Las principales especies producidas son superóxido y óxido nítrico (NO) y estas moléculas conducen a la formación de varias ERO secundarias y ERN (Jackson, 2011). La contracción del músculo esquelético provoca un aumento significativo de la generación de ERO y ERN; además, la inflamación (que se produce en diferentes situaciones, incluyendo daño en el músculo) también puede aumentar ERO y ERN en el tejido muscular.

Las ERO que están involucrados en los procesos fisiológicos normal del músculo, no sólo participan en modificaciones de proteínas de recambio u oxidación de tioles de las proteínas contráctiles del músculo esquelético, que

van a dar lugar a la disfunción contráctil y la fatiga, sino también participan a través de la modulación de vías de señalización relacionadas con la síntesis de proteínas y su degradación (Arthur, Grounds y Shavlakadze, 2008).

La literatura indica que las ERO participan de estos procesos activando o regulando complejas vías de señalización intracelular y frente a un exceso son capaces de provocar una reducción en la síntesis de proteínas o descomposición de éstas llevando a una atrofia muscular (Bonetto *et al.*, 2009); la cual explicaría varios procesos de distrofia musculares, pero sus mecanismos todavía no son claros (Arthur, Grounds y Shavlakadze, 2008). También se cree que la activación de NFkB por medio de ERO generado durante la contracción muscular, es un factor importante para la adaptación del músculo (Powers, Talbert y Adihetty, 2011).

A pesar de esto, la producción de ERO cumplen un rol esencial en el músculo esquelético, principalmente en la producción de la fuerza, gracias a su efecto bifásico (Fig. 6). Es así como el músculo requiere de un nivel óptimo de ERO para aumentar la fuerza mientras que concentraciones extremas, muy bajas o altas de ERO deprimen la fuerza (Reid 2001); estas condiciones se pueden producir durante esfuerzos mecánicos extenuantes, enfermedades inflamatorias y musculares (Smith y Reid, 2006; Dutka *et al.*, 2012).

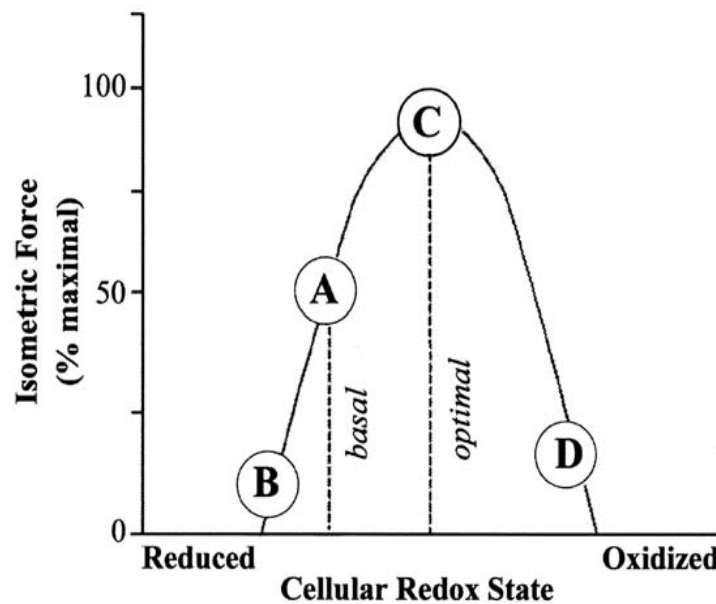


Figura 6: Modelo que representa los efectos bifásicos del estado REDOX sobre la fuerza muscular. **A**: estado basal del músculo fatigable. **B**: músculo fatigable expuesto al agente antioxidante o reductor. **C**: músculo fatigable expuesto a niveles bajos de ERO. **D**: músculo afectado por el exceso de ERO. Las líneas verticales discontinuas indican el estado redox basal (músculo en reposo sin estímulo REDOX exógeno) y el estado redox óptimo (estado en que la fuerza es máxima) (traducido al español desde Reid, 2001).

La literatura describe uno de los mecanismos posibles que podría explicar los efectos de las ERO en la fatiga y la producción de fuerza en el músculo, concluyendo que sería una consecuencia de la oxidación de grupos tioles en las proteínas de los canales de liberación de Ca^{2+} y en las proteínas miofibrilares, incluyendo la troponina, tropomiosina, miosina y actina que contienen grupos tioles sensibles a la oxidación (Fig. 7) (Crowder y Cooke, 1984; Liu, Wang y Stracher, 1990; Root y Reisler, 1992;. Putkey, Dotson y Mouawad, 1993; Andrade *et al.*, 1998; Dalle-Donne *et al.*, 2003; Tiago *et al.*, 2006; Hertelendi *et al.*, 2008; Prochniewicz, Spakowicz y Thomas, 2008; Mollica *et al.*, 2012).

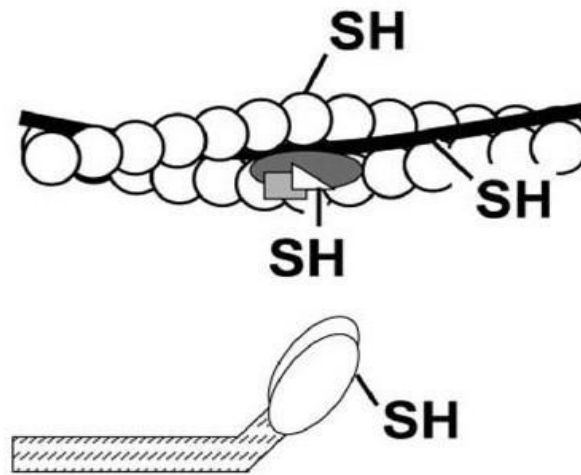


Figura 7: Los grupos tiol de las proteínas miofibrilares. Arriba: círculos – actina; línea gruesa oscura – tropomiosina; ovalada – troponina. Abajo: Miosina. La oxidación (formación de enlaces disulfuro) puede conducir potencialmente a la inhibición de la formación de puentes cruzados, a pesar de las modificaciones en la función de la proteína, la interacción de proteína y la actividad ATP. (modificado de Ferreira y Reid, 2008).

Estudios revelan que las modificaciones de los tiol proteicos pueden alterar el acoplamiento excitación-contracción y la formación de puentes cruzados; asimismo la oxidación de tiol de proteínas de los canales de Ca^{2+} y de las proteínas miofibrilares puede conducir a numerosas modificaciones en la función contráctil de la miofibrilla. Dichos estudios in vitro sugieren, que niveles bajos de ERO pueden mejorar la producción de la fuerza mediante el control del sensible a Ca^{2+} del acoplamiento excitación – contracción. En tanto el exceso de ERO puede disminuir la fuerza por diversos mecanismos: modulaciones de los niveles de Ca^{2+} , disminución de la producción de ATP, alteraciones de proteínas y modificaciones de unión a proteínas. (Williams Jr. Et al., 1992; Anzaj et al., 2000; Pessah y Feng, 2000; Andrade et al., 2001; Dalle-Donne et al., 2003; Aracena-Parks et al., 2006; Tiago et al., 2006;

Zissimopoulos et al., 2007; Hertelendi et al., 2008; Prochniewicz et al., 2008; Pinto et al., 2011; Mollica et al., 2012).

Existe evidencia que demuestra que el EO está implicado en los distintos tipos de distrofias musculares, dentro de estas las Disferlinopatías.

2.3 Distrofia Muscular

Las distrofias musculares (DM) comprenden más de 30 trastornos clínicos genéticos que se caracterizan por debilidad y degeneración progresiva del músculo esquelético usado durante movimientos voluntarios (Manzur y Muntoni, 2009). La palabra distrofia deriva del griego dis, que significa "difícil" o "defectuoso," y trof, "nutrición." Por lo general, comparten características histológicas comunes, incluyendo variación en el tamaño de miofibras, degeneración de miofibras y regeneración, y la sustitución de tejido muscular por tejido conectivo y grasa (Manzur y Muntoni, 2009). Estas condiciones varían en muchos aspectos, entre ellos la prevalencia, la edad de inicio, la gravedad, los músculos afectados y el defecto genético subyacente (Emery, 2002). A pesar de estas variabilidades, la característica común más importante entre todos estos trastornos es la degeneración necrótica de las células del músculo esquelético (Rando, 2002).

La literatura describe 9 grupos de distrofias musculares diferentes. Si bien algunas aparecen en edad temprana (infancia o niñez), otras pueden aparecer durante la adolescencia y/o adultez. Dentro de las distrofias que comienzan

en la infancia encontramos la distrofia muscular de Duchenne, de Becker, congénita y de Emery-Dreifuss. Por otra parte, las distrofias de inicio más tardío encontramos la distrofia muscular facioescapulohumeral (FEH), Distrofia de Cintura o del anillo óseo, Distrofia de Miyoshi o muscular distal, Distrofia muscular miotónica y Distrofia muscular oculofaríngea (Fig. 8) (Mercuri y Muntoni, 2013).

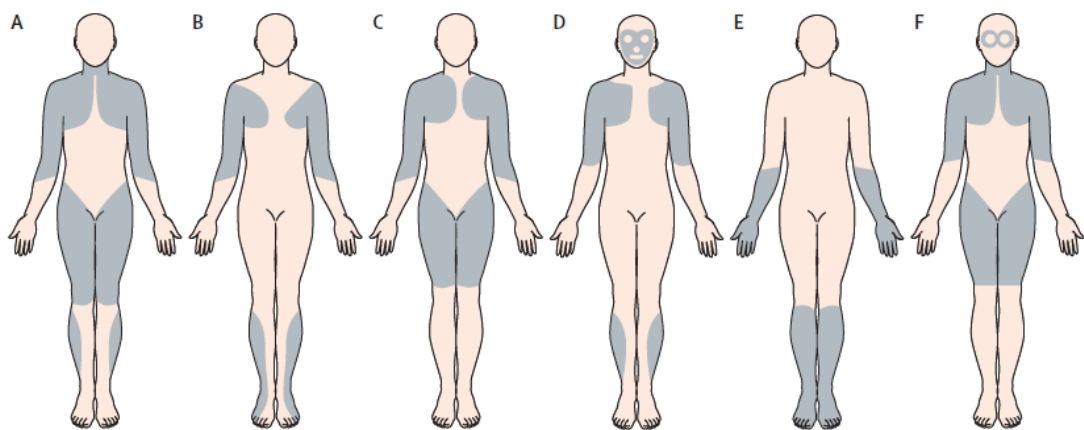


Figura 8: Patrones de distribución de la debilidad. (A) Distrofia muscular de Duchenne y Becker. (B) Distrofia muscular de Emery-Dreifuss. (C) Distrofia muscular de cinturas. (D) Distrofia muscular facioescapulohumeral. (E) Distrofia muscular distal o de Miyoshi (F) Distrofia muscular Oculofaríngea. El sombreado representa las zonas afectadas. (traducido al español desde Mercuri y Muntoni, 2013).

Estos trastornos se deben a mutaciones en una amplia variedad de proteínas, incluyendo la matriz extracelular del sarcolema, del citoesqueleto, citosólicas y de la membrana nuclear (Cohn y Campbell, 2000). Aunque la base genética de muchos de estos trastornos se ha identificado, el mecanismo exacto de la patogénesis no está claro; actualmente la evidencia experimental sugiere que la interacción entre el defecto genético primario y niveles elevados de ERO

contribuyen a la patología de varias distrofias musculares (Tidball y Wehling-Henricks, 2007).

Si bien se aprecia evidencia científica en la mayoría de las distrofias musculares, el mayor aporte ha sido en la distrofia muscular de Duchene, dando las bases para comprender las Disferlinopatías.

2.3.1 Rol del Estrés Oxidativo en DMD

La literatura evidencia que la generación de ERO en el músculo distrófico implica la oxidación irreversible de lípidos de membrana y de proteínas, lo que responde a la necrosis causada por el aumento de la afluencia de Ca^{2+} (Rando 2002). Otra hipótesis que explica la relación de las ERO en el músculo distrófico es que éstos conllevan a modificaciones, reversibles, de los tioles de proteínas, provocando alteraciones en la señalización celular, la contractilidad y la inflamación (Terrill *et al.*, 2012).

La producción de ERO en el músculo distrófico también puede reflejar una falta de integridad del sarcolema, dando lugar a un exceso de Ca^{2+} intracelular y cascadas de señalización inflamatoria. En la década del 70, se describió que en el músculo esquelético de la DMD existe un aumento de Ca^{2+} y desde entonces los investigadores se han dividido entre dos hipótesis sobre la entrada de Ca^{2+} a la célula, si esta ocurre principalmente a través de roturas de la membrana o mediante la alteración de los canales de iones (Whitehead *et al.*, 2008).

Como consecuencia de este desequilibrio de los niveles de Ca^{2+} citosólico, se puede inducir la activación excesiva de las proteasas tales como la calpaína que promueven la proteólisis y necrosis (Whitehead *et al.*, 2008). Está bien documentado que altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico a su vez aumentan el Ca^{2+} mitocondrial para impulsar la síntesis de ERO, mediante el aumento del potencial de membrana mitocondrial y un aumento en la síntesis de ATP (Brookes *et al.*, 2004; Camello-Almaraz *et al.*, 2006; Feissner *et al.*, 2009).

Finalmente, la literatura sugiere otro mecanismo potencial para la generación de ERO en el músculo distrófico, a través de la inflamación. Como en este tipo de patologías se observa un estado inflamatorio persistente, existe un aumento del número y activación de mastocitos, de citoquinas y de la señalización de quimiocinas, además invasión de células del sistema inmune (Porter *et al.*, 2002; Radley y Grounds, 2006).

2.3.2 Disferlinopatías

La literatura sugiere que el término disferlinopatías abarca dos tipos de miopatías: distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD 2B) y miopatía de Miyoshi (MM). Ambas se describen como enfermedades raras para adultos, donde los pacientes muestran debilidad funcional en cualquiera de los músculos distales (Miyoshi) o músculos de las extremidades proximales de cintura (LGMD 2B) (Laval y Bushby, 2004; Rocha y Hoffman, 2010). La LGMD 2B y MM se considera que son variaciones alélicas del mismo gen DYSF, un gen de gran tamaño que abarca más de 150 kb de ADN genómico que se

La patología se presenta con una reducción o ausencia de Dysf, como resultado de mutaciones recesivas autosómicas en el gen que codifica para Dysf, y que comprende un número de diferentes fenotipos de distrofia muscular conocidos como disferlinopatias (Aoki *et al.*, 2001).

La Dysf se localiza en el sarcolema y túbulos T de miofibras, cardiomiocitos y, en menor grado, se encuentra en otros tejidos tales como monocitos, cerebro y riñón (Anderson *et al.*, 1999; Bansal *et al.*, 2003; Glover y Brown, 2007; Lek *et al.*, 2012). Esta proteína tiene un papel esencial en la reparación de la membrana y se ha comprobado que músculos deficientes en Dysf es incapaz de volver a sellar adecuadamente la membrana de miofibrillas después de la lesión mecánica (Bansal *et al.*, 2003). Sin embargo, músculos deficientes de Dysf después de un daño experimental y mionecrosis parecen tener una excelente capacidad para la nueva formación de músculo *in vivo* como se muestra por muchos experimentos en ratones SJL / J (McGeachie y Grounds, 1995; Mitchell, Grounds y Papadimitriou, 1995; Rocha y Hoffman, 2010). También se ha informado alteraciones en el proceso inflamatorio y regenerador en los ratones deficientes de Dysf (Chiu *et al.*, 2009; Roche y Hoffman, 2010).

Clínicamente, ambas enfermedades, LGMD 2B y MM, son trastornos que progresan lentamente con patología muscular heterogénea, y la edad de aparición es muy variable, pero es en promedio ocurre durante la edad adulta temprana (Linssen *et al.*, 1997; Klinge *et al.*, 2010).

2.3.3 Tratamientos actuales para disferlinopatías

Actualmente no existe evidencia que demuestre una cura para las disferlinopatías, siendo los tratamientos paliativos la única opción para los pacientes con esta patología (Urtizberea *et al.*, 2008). Ha habido poco éxito con medicamentos farmacológicos. Un estudio refleja que el fármaco dantroleno (un relajante muscular que suprime el acoplamiento excitación-contracción) redujo los niveles de CK en 2 pacientes, pero no se ha mostrado ninguna mejora de la patología muscular (Hattori *et al.*, 2007). Del mismo modo, otro estudio demostró que dos pacientes tratados con el anticuerpo monoclonal para la proteína CD20 (que se encuentran en la superficie de los linfocitos de células B) parecieron aumentar la fuerza muscular (Lerario *et al.*, 2010), pero, de nuevo, no se han establecido los efectos sobre el fenotipo muscular.

Actualmente gran parte de las investigaciones sobre los tratamientos para disferlinopatías se ha centrado en la definición de la base de los enfoques de la enfermedad y de la transferencia de genes, utilizando un adenovirus asociado a un vector de transferencia (AAV) (Bartolomé *et al.*, 2011). Estos tratamientos han mostrado una mejora en ratones con deficiencia de Dysf, pero aún están en etapas tempranas de desarrollo.

2.3.4 Rol del Estrés Oxidativo en Disferlinopatía

Según la revisión de la literatura se sugiere que una posible consecuencia de la ausencia de Dysf es la generación excesiva de ERO; puesto que la falta de

esta proteína podría conducir a la desregulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular a través de modificaciones de la membrana plasmática y de la disfunción de señalización celular (Bansal et al., 2003; McNeil y Kirchhausen, 2005; Covián-Nares *et al.*, 2010; De Morrée *et al.*, 2010). Está bien documentado que los niveles elevados de Ca^{2+} citosólico puede aumentar el Ca^{2+} mitocondrial que conduce a la síntesis de ERO, producto de un aumento del potencial de membrana mitocondrial y un aumento en la síntesis de ATP (Brookes *et al.*, 2004; Camello-Almaraz *et al.*, 2006; Feissner *et al.*, 2009).

Hoy en día, existe poca investigación sobre el papel del EO en las disferlinopatías, hay referencias de un estudio de caso en un solo paciente presentó un aumento de la oxidación de proteínas, lípidos y el contenido de tioles en proteínas de los músculos afectados, lo que sugiere una mayor presencia de ERO en músculos deficiente de Dysf, así como alteraciones en grupos tioles de proteínas (Dhanarajan *et al.*, 2011). En este estudio también se observó un aumento de los antioxidantes endógenos incluyendo glutatión y catalasa.

La identificación de los posibles cambios en el EO en disferlinopatías representa una posible vía para el tratamiento terapéutico con ayuda de fármacos antioxidantes que ya han sido exploradas para la DMD.

2.3.5 El Estrés Oxidativo como un objetivo terapéutico para las distrofias musculares

Gracias a la amplia evidencia que se refiere a la relación del estrés oxidativo en la DMD, es posible que se realicen más investigaciones sobre el efecto benéfico que pueden tener los tratamientos con antioxidantes. Éstos estudios se han llevado a cabo en pacientes con DMD y modelo animal (ratones mdx); donde se han utilizado numerosos antioxidantes, incluyendo compuestos tales como vitamina E (tocoferol α -) que son esencialmente eliminadores de ERO, enzimas antioxidantes, tales como catalasa y superóxido dismutasa que funcionan para reducir el daño oxidativo mediante la descomposición de ERO en agua y oxígeno, y el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) es un tiol precursor de L-cisteína y glutatión reducido (Roelofs *et al.* , 1979; Stern *et al.*, 1982; Fenichel *et al.*, 1988; Buetler *et al.*, 2002; Dorchies *et al.*, 2006; Call *et al.*, 2008; Nakae *et al.*, 2008; Whitehead *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2010; Hori *et al.*, 2011; Selsby, 2011; Spurney *et al.*, 2011; Nakae *et al.*, 2012; Senzi Moraes Pinto *et al.*, 2012).

Si bien se han realizado estudios con tratamiento de antioxidante, la literatura muestra que los ensayos en humanos con terapias AO no han tenido éxito, aunque muchos estudios en ratones mdx indican que los AO pueden disminuir la patología muscular y mejorar la función (Grounds, 2008). Esta disparidad podría atribuirse a las diferencias fenotípicas entre los niños con DMD y ratones mdx, que tienen un fenotipo relativamente suave, debido a las diferentes fases de crecimiento y las propiedades biomecánicas entre las

especies, además de la gran variación entre la severidad y la progresión de la enfermedad a edades específicas para niños con DMD (Giustarini *et al.*, 2009)

Frente a esto, distintos autores sugieren que la interrupción de la función y la homeostasis de los sistemas de proteínas con grupos tioles es la característica más central del EO en condiciones tales como el envejecimiento y la enfermedad relacionada con la edad (Jones, 2008). Un AO que ha mejorado la patología mdx través de la modulación de los procesos redox es la que contiene tiol, NAC.

2.4 N-acetilcisteína precursores de la cisteína

Existe evidencia que describe que NAC es un suplemento disponible por vía oral que se ha utilizado clínicamente para tratar diversas condiciones, incluyendo, sobredosis con acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol), también conocido como paracetamol (Aruoma *et al.*, 1989; Zafarullah *et al.*, 2003).

Como la literatura lo describe, NAC tiene un grupo tiol que le permite ejercer sus propiedades antioxidantes, ya que reacciona con numerosos oxidantes biológicos incluyendo ERO y ERN y a su vez reducir los disulfuros (Aruoma *et al.*, 1989; Gillissen *et al.*, 1997; Zafarullah *et al.*, 2003; Ferreira y Reid, 2008).

NAC es un derivado acetilado de la cisteína, por lo tanto, puede aumentar las concentraciones intracelulares y extracelulares de cisteína. Se ha descrito que la cisteína puede funcionar directamente como un antioxidante, además de

ser utilizada en la síntesis de los principales antioxidantes endógenos, glutatión (GSH) (Medved *et al.*, 2004; Dilger *et al.*, 2007); el GSH se compone de tres aminoácidos: glutamato, glicina y cisteína, siendo la cisteína un precursor de la síntesis de GSH, por lo cual su disponibilidad puede afectar la velocidad de su síntesis (Ferreira y Reid 2008).

Ghezzi (2005) sugiere que el tratamiento con NAC disminuye la oxidación de tioles de proteínas a través de la oxidación directa o aumentando las concentraciones de cisteína y GSH; por tanto, es la base para que se utilice con éxito en el tratamiento de numerosas patologías. Por ejemplo, estudios han demostrado que el tratamiento con NAC puede reducir la fatiga muscular durante la actividad muscular contráctil realizada durante la respiración en ejercicios de resistencia inspiratoria (Travaline *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2009.) y en ejercicios en bicicleta hasta el agotamiento (Medved *et al.*, 2004; McKenna *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2011).

Por otra parte, el tratamiento con NAC ha demostrado que mejora la patología del músculo esquelético después de la lesión producto de una contracción muscular fatigante, ya que existe una disminución plasmática de inflamación y CK (Pinheiro *et al.*, 2012).

NAC se ha utilizado en experimentos preclínicos con ratones mdx (Whitehead *et al.*, 2008) tratados con una solución de agua potable 1% NAC durante 6 semanas, lo que da como resultado una reducción significativa en miofibras

nucleadas centralmente (lo que indica una reducción de la necrosis), así como la reducción de expresión de NF- κ B. Por otra parte, el tratamiento *ex vivo* de los músculos mdx con NAC disminuyó el déficit de fuerza de estiramiento después del daño muscular inducido y la reducción de la permeabilidad de la membrana (Terrill *et al.*, 2012).

Dado los antecedentes revisados anteriormente sobre las distrofias musculares y como estas se relacionan estrechamente con la producción de ERO, alterando el balance REDOX en esta patología, se podría pensar que el consumo del antioxidante NAC modifica los niveles de ERO, y, por ende, reduciría la progresión de las disferlinopatías.

CAPÍTULO III

1. Tipo de investigación

Este estudio es de tipo cuasi-experimental, transversal, cuantitativa con muestreo no probabilística y mediciones posteriores a tratamiento.

2. Diseño de la investigación

En esta investigación se utilizaron ratones *wild type* (WT, C57 BL/6) y ratones deficientes de Dysf (B6.A/J Dysf^{prmd}). La utilización de los ratones fue aprobada por el Comité Institucional de Bioética para la investigación en animales de experimentación de la Universidad de Valparaíso (Anexo 1). Los ratones deficientes de Dysf se dividieron en dos grupos: uno alimentado con dieta normal y el segundo grupo alimentado con dieta normal más NAC (1% disuelta en el agua), ad libitum, desde el sexto mes de vida. La dosis administrada de NAC fue seleccionada de acuerdo con lo utilizado por otros autores (Terrill *et al.*,2012). Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados a los ocho meses y dos semanas de edad. A los cuatro grupos se les evaluó la función muscular durante el período de estudio, y parámetros de daño oxidativo (TBARS y carbonilo) y AO enzimáticos (SOD, CAT, GSH/GSSG) y AO no enzimáticos (TRAP) al octavo mes de vida (Fig.10).

Características de diseño específico para cada grupo:

Grupo 1 (G1): Ratones WT (C57 BL/6) con dieta normal.

Grupo 2 (G2): Ratones WT (C57 BL/6) con dieta normal más NAC al 1% durante 10 semanas.

Grupo 3 (G3): Ratones deficientes de Dysf (B6.A/J Dysf^{prmd}) con dieta normal.

Grupo 4 (G4): Ratones deficientes de Dysf (B6.A/J Dysf^{prmd}) con dieta normal más NAC al 1% durante 10 semanas.

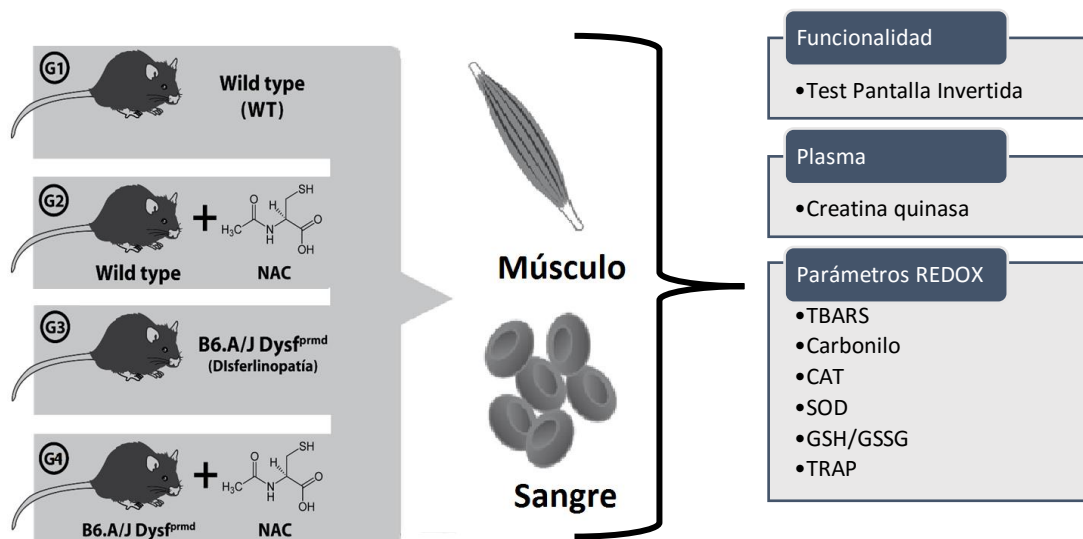


Figura 10: Diseño experimental

3. Definición de variables e indicadores (Tabla 1)

Tabla 1: Variables de estudio

Variable	Tipo de Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores
Grupos	Independiente	Tratamientos	G1: Ratón C57 BL/6 G2: Ratón C57 BL/6 + NAC G3: Ratón B6.A/J Dysf ^{prmd} G4: Ratón B6.A/J Dysf ^{prmd} + NAC	n ratones (n por grupo)
Test pantalla invertida	Dependiente	Prueba mide función muscular	Funcionalidad en el tiempo	Segundos
Creatina quinasa	Dependiente	Prueba mide CK	Concentración proteína	U/L
TBARS	Dependiente	Prueba que mide daño a lípidos.	Concentración de MDA	nM MDA / mg proteína
CARBONILO	Dependiente	Prueba que mide daño a proteínas	Concentración grupo carbonilo	nM carbonilo / mg proteína
SOD	Dependiente	Prueba que mide actividad enzimática de SOD	Actividad enzimática	U enzima SOD / mg proteína
CAT	Dependiente	Prueba que mide actividad enzimática de CAT	Actividad enzimática	U enzima CAT / mg proteína
GSH/GSSG	Dependiente	Prueba que mide complejo glutatión	Complejo glutatión	
TRAP	Dependiente	Prueba que mide capacidad antioxidante total	Concentración equivalente Trolox [®]	TEAC μ M

4. Población y muestra

4.1 Población

El estudio se llevó a cabo en un modelo de ratón deficiente de Dysf (ratón B6.A/J Dysf^{prmd}), que se mantienen en el Bioterio de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. La aparición de la enfermedad se observa a los siete meses de edad, y el deterioro en la mayoría de los músculos se consigue a los cuatro meses de edad. El orden de gravedad de los músculos más afectados son psoas, cuádriceps femoral, tibial anterior y gastrocnemio (Lostal *et al.* 2010). Asimismo, se trabajará con una cepa de animal *wild type* (C57 BL/6), que también se mantiene en esta instalación, para ser utilizado como un control. El ratón deficiente de Dysf fueron donados del Bioterio de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile.

Para corroborar la cepa de los animales se realizó genotipificación de los roedores utilizando un pequeño trozo de la cola (Fig. 11).

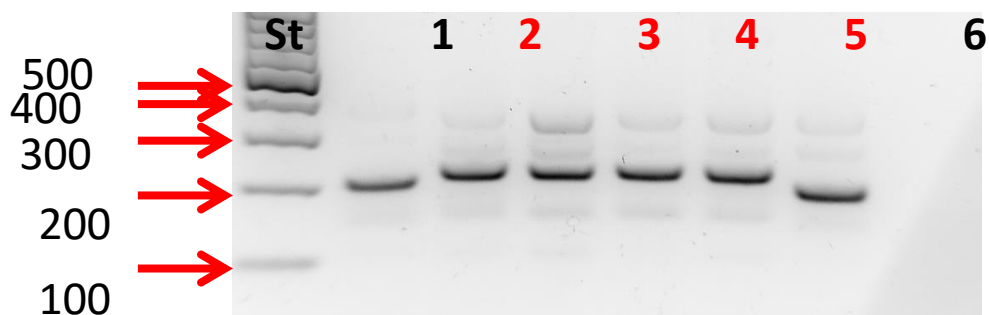


Figura 11: Bandas detectadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en los animales 1 (C57 BL/6), peso molecular 207 bd, animales 2, 3, 4 y 5 (B6.A/J Dysf^{prmd}) peso molecular 234 bp y 7 (control negativo).

4.2 Muestra

El cálculo del tamaño muestral fue obtenido utilizando la ecuación de recursos proporcionada por Centro Nacional de Refinamiento, Reemplazo y Reducción de Animales para la Investigación de Reino Unido (Charan, J. y Kantharia, N. D., 2016).

La fórmula consiste en:

$E = (\text{Número de experimentos por condición}) \times (\text{número de grupo por condición}) - \text{número de grupos por condición}.$

Donde E es el número de animales que se podrá utilizar. Para este estudio se harán 4 experimentos para cada condición y serán 4 condiciones: (G1) Animales control, (G2) control suplementado con NAC, (G3) deficientes- Dysf y (G4) deficientes- Dysf suplementado con NAC, todos de 8 meses y 2 semanas.

Para las mediciones se utilizarán los mismos animales para extraer sangre y los distintos tipos de músculos.

5. Método de trabajo

Para el estudio se utilizarán cuatro grupos de ratones y desde el sexto mes a su dieta habitual se les administrará NAC en el agua durante 10 semanas, lo cual es descrito a continuación (Tabla 2):

Tabla 2: Protocolos de administración de NAC (Terrill et al. (2012).

Grupos	Tipo Ratón	Características
G1	Ratón WT, C57 BL/6	Durante 34 semanas los ratones tuvieron un ciclo de 12 h de luz / oscuridad, en condiciones normales, con acceso libre a comida y agua potable.
G2	Ratón WT, C57 BL/6 más NAC	Durante 34 semanas los ratones tuvieron un ciclo de 12 h de luz / oscuridad, en condiciones normales, con acceso libre a comida y agua potable, durante las últimas 10 semanas a la dieta se suma 1% de NAC, con un consumo aproximadamente de 2 g de NAC / kg por día.
G3	Ratón B6.A/J Dysf ^{prmd}	Durante 34 semanas los ratones tuvieron un ciclo de 12 h de luz / oscuridad, en condiciones normales, con acceso libre a comida y agua potable.
G4	Ratón B6.A/J Dysf ^{prmd} más NAC	Durante 34 semanas los ratones tuvieron un ciclo de 12 h de luz / oscuridad, en condiciones normales, con acceso libre a comida y agua potable, durante las últimas 10 semanas a la dieta se suma 1% de NAC, con un consumo aproximadamente de 2 g de NAC / kg por día.

5.1 Test Pantalla Invertida

Los animales de los cuatro grupos fueron sometidos a una prueba de fuerza muscular usando las cuatro extremidades desde el comienzo hasta finalizar las 10 semanas del estudio; la prueba se realizará cada 15 días.

Esta prueba se llevó a cabo según lo descrito por Kondziela (1969), se utilizó una pantalla cuadrada de 43 cm de malla de alambre de 12 cuadrados de 1 mm de diámetro. Estará rodeado de madera de un cm de ancho por 4 cm de profundidad (Fig.12).



Figura 12: Test pantalla invertida con roedor al centro de la pantalla cuadrada

Dicha prueba consta de colocar al roedor en el centro de la malla de alambre, inicial el cronómetro y girar la pantalla a una posición invertida (gírala en 180°). Mantener la pantalla de manera constante a 40 – 50 cm sobre una superficie acolchada. El roedor queda suspendido boca abajo sobre la superficie acolchada y se registrará la latencia al caer en segundos (Fig. 13).

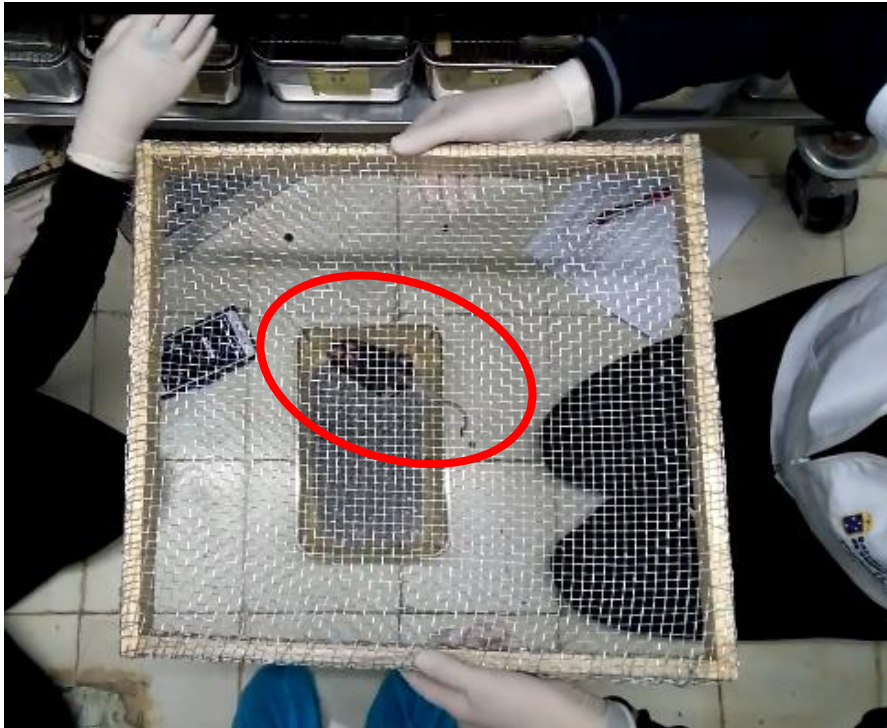


Figura 13: Test pantalla invertida con roedor en suspensión de la malla de la pantalla.

5.2 Extracción muestra de sangre y de tejidos

Los animales de los cuatro grupos fueron sacrificados a las 36 semanas de edad mediante decapitación, con previa anestesia (isoflurano). En primera instancia se extrajo un volumen de sangre total, el cual se agregó a un tubo heparinizado post decapitación y se dejó a temperatura ambiente para análisis de creatina quinasa. Posteriormente, se extrajeron los músculos: cuádriceps, gastrocnemio y tibial anterior, para el análisis de parámetros redox, que se almacenarán a -80°C y un trozo de cola para la genotipificación.

5.3 Preparación de las muestras

a) Sangre

La muestra sanguínea fue sometida a un proceso de centrifugación durante 15 minutos a 3000 r.p.m., una vez finalizado este proceso se obtendrán tres fases en la muestra: plasma, glóbulos blancos y glóbulos rojos (GR).

b) Tejido Muscular

Para los análisis de parámetros redox se utilizaron macerados musculares, de las muestras musculares previamente extraídas. Se homogeneizaron en 3 mL de tampón de lavado NaCl 0.15 M, Na₂HPO₄ 0.01, NaH₂PO₄ 0.01, pH 7.4) y se centrifugaron a 3000g por 15 minutos a 4 °C. Luego, con el fin de obtener la muestra más homogenizada se sonicaron. Una vez obtenidos los macerados, se almacenaron a -20°C en 4 tubos eppendorf para las pruebas: carbonilo, SOD, CAT, GSH/GSSG y TRAP. Finalmente, para la prueba TBARS se extrajo en un tubo eppendorf, prueba que debió realizarse inmediatamente.

Para la determinación de carbonilo, SOD, CAT y GSH/GSSG, previamente se estableció la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry (1951) que mide la reacción de los residuos de tirosina con el reactivo Folin-Ciocalteu.

5.4 Determinación de Creatina Quinasa

La determinación de la creatina quinasa (CK) se obtuvo mediante la extracción de sangre, los cuales fueron llevados al Laboratorio Clínico Etcheverry, donde se analizaron las muestras de sangre.

Este análisis se realizó según Valtek, proveedor del kit CK-NAC. La actividad de CK se utilizó el plasma sanguíneo de las muestras de los roedores y se determinó por duplicado utilizando el kit CK-NAC. El método utiliza creatina fosfato y ADP como sustrato de la CK. Para la lectura de las muestras se realizó un barrido en espectrofotómetro a 340 nm con el fin de determinar la formación de NADPH, que es proporcional a la actividad de la enzima presente en la muestra (Tietz, 1976; Szasz & Clin, 1976; Moren *et al.* 1977).

5.5 Determinación de parámetros REDOX

La determinación de parámetros REDOX se obtuvo mediante la extracción de tejido muscular, los cuales fueron llevadas al Laboratorio de Investigación – Estrés Oxidativo de la Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Valparaíso –, donde se analizaron, parámetros oxidativos de daño a través de la prueba TBARS y carbonilo, además de defensa enzimática (SOD, CAT y GSH/GSSG) y AO no enzimática (TRAP).

5.5.1 Determinación de Daño Oxidativo

a) Lipoperoxidación (TBARS)

Este análisis se realizó según lo descrito en Esterbauer *et al.* (1982). Para el análisis se utilizaron macerados musculares de cuádriceps, gastrocnemio y tibial anterior, los que se mezclaron con ácido tricloroacético (TCA) al 30% p/v, luego se centrifugaron por 15 minutos a 3000 r.p.m. para obtener un pellet (precipitación de proteínas) y sobrenadante. A continuación, al sobrenadante extraído se le agregó ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% p/v que reacciona con el aldehído de la muestra. Posteriormente la solución se llevó a ebullición por 20 minutos. Para la lectura de las muestras se realizó un barrido en espectrofotómetro entre 400- 600 nm con el fin de determinar la absorbancia máxima de MDA, a los 535 nm aproximadamente.

a) Carbonilo

Este análisis se realizó según lo descrito en Levine y cols. (1990). Este método se basa en la reacción de los grupos carbonilo generado por la oxidación de proteínas con 2,4 dinitrofenilhidracina (DNPH). Para el análisis se utilizaron macerados musculares que se mezclaron con ácido tricloroacético (TCA al 20% p/v). Ellos se dejaron en hielo por 5 minutos y luego fueron centrifugados por 3 minutos a 11000 r.p.m., resultando un pellet y sobrenadante, este último fue eliminado. Posteriormente, a las muestras se le DNPH 0,3% en HCl 2M, mientras que en el tubo control se agregó 500 µL de HCl 2M; los cuales fueron agitados y almacenados en oscuridad durante una hora a temperatura

ambiente, agitando cada 15 minutos. Transcurrida la hora se agregó a cada tubo TCA al 20% p/v, luego la mezcla fue agitada, dejada en hielo por 5 minutos y centrifugada durante 3 minutos a 11000 r.p.m., resultando un pellet y sobrenadante, este último fue eliminado. El pellet fue suspendido en etanol:acetato de etilo (1:1), y fue agitada y dejada en reposo durante 10 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugo por 3 minutos a 11000 r.p.m., y se eliminó el sobrenadante (se repetirá 3 veces). Tras los pasos anteriores, el precipitado será secado con N₂ gaseoso. Finalmente, el precipitado, se mezcló con urea 6 M disuelta e incubo durante 15 minutos a 37°C. El producto fue leído en un espectrofotómetro a 370 nm.

5.2.2 Determinación de Defensa Antioxidante

a) SOD

Este análisis se realizó según lo descrito en Fridovich (1994). Utilizando la muestra SOD guardada previamente, se midió espectrofotométricamente la formación de radical superóxido en el sistema xantina/xantina oxidasa. Se preparó una solución A compuesta de xantina y citocromo C en una relación 1:11 disueltos en un tampón fosfato (EDTA 0,1 mM, Na₂HPO₄ 50 mM y NaH₂PO₄ 50 mM) ajustado a pH=7,8; y una solución B compuesta por Xantina Oxidasa (XO) y EDTA en una relación 1:40 la que se mantuvo en hielo. La actividad enzimática fue detectada a 550 nm, durante dos minutos, mezclando la solución A, más la solución B y el macerado muscular de muestra SOD, por separado. Los resultados se expresaron como unidades de enzima/mg

proteína usando la determinación de proteínas totales obtenidas mediante el método de Lowry.

b) CAT

Este análisis se realizó según lo descrito en Aebi (1984). Utilizando la muestra CAT guardada previamente, se midió la cinética de degradación de H₂O₂, detectando la pérdida de la absorbancia a 240 nm mediante espectrofotometría; en una solución de H₂O₂ más la muestra macerado muscular de muestra CAT, por separado más PBS (Na₂HPO₄ 50mM y NaH₂PO₄ 50 nM) ajustado a un pH 7,0. La lectura se realizó a 240 nm durante 90 segundos y los valores se expresaron como unidades de enzima/mg proteína usando la determinación de proteínas totales obtenidas mediante el método de Lowry.

c) GSH/GSSG

Este análisis se realizó según lo descrito en Rahman *et al.* (2006) con la muestra guardada previamente. Los macerados musculares fueron resuspendidos y homogenizadas en tampón de extracción (0,1% Triton-X y 0,6% de ácido sulfosalicilico en KPE) y en hielo, y sonicados por 2-3 minutos agitando por 30 segundos en agua con hielo. Para asegurarse de que las muestras estaban bien lisadas, se congelaron a -70°C. Posteriormente, se descongelaron los tubos y se centrifugaron a 3.000 g por 4 minutos a 4°C. Una vez realizado este paso, el sobrenadante fue transferido a un tubo

Eppendorf, previamente refrigerado, el que fue utilizado para la estimación de GSH/GSSG.

Para el análisis se mezclarán tampón KPE (potasio fosfato 0.1M con EDTA 5 Mm, pH 7,5), más macerado muscular y solución DTNB / GR (1:1) (2 mg de DTNB en 3 mL de tampón KPE; 40 μ L de GR (25 unidades mL⁻¹) en 3 mL de KPE). Se esperó 30 segundos, se agregó β -NADPH (2 mg de β -NADPH en 3 mL de KPE), se agitó y leyó a 412 nm por 2 min. La cantidad de GSH y GSSG se determinó desde una curva estándar y se expresó en equivalentes GSH (ejemplo nM o μ M * mg de proteína⁻¹) de acuerdo al trabajo de Rahman *et al.* (2006).

d) Proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó mediante la reacción entre los residuos de tirosina presentes en la muestra y el reactivo Folin-Ciocalteu, según lo descrito en Lowry *et al.* (1951). Para el análisis se preparó el reactivo de cobre alcalino (RCA) (Na_2CO_3 a 0,94 M, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ a 3,5 mM, CuSO_4 a 2 mM y NaOH a 0,5M) y se mezcló con el reactivo Folin-Ciocalteu (1:20 en agua destilada) más el macerado muscular. La solución resultante fue incubada a 55°C durante 5 minutos. Finalmente, se leyó en espectrofotométricamente a 650 nm.

e) Capacidad antioxidante total (TRAP)

Este análisis se realizó según lo descrito por Romay et al. (1996) con la muestra previamente guardada. Para el análisis se preparó una mezcla de 1:1 de ABTS con ABAP, la cual fue incubada durante 30 minutos a 45°C, dando una solución verde azulada. Luego, se utilizó macerado muscular y se mezcló con tampón TRAP PBS (NaCl 0,005 mL, Na₂HPO₄ 0,01M, Na₂H₂PO₄ 0,01M ajustado a pH 7,4). La mezcla se hizo reaccionar y la solución restante fue leída en una cinética de espectrofotométrica a 734 nm durante 50 segundos. Los datos se extrapolaron en una curva TROLOX® y se expresará en µM TEAC.

6. Técnicas de análisis de datos

Mediante la determinación de creatina quinasa, pesos, test funcional, daño oxidativo y defensa antioxidante, se reportaron los datos, promedios y desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 8; donde los datos fueron sometidos a prueba de distribución de normalidad (paramétrica) de Pearson. En el caso de ser paramétrica, se realizó el análisis ANOVA y la prueba *a posteriori* de Tukey; en el caso de los datos no paramétricos, se utilizó Kruskal-Wallis para múltiples muestras independientes y Wilcoxon para dos muestras dependientes. En cualquiera de los casos se utilizó un nivel de significancia de $p = 0,05$ (Zar, 1999).

7. Instrumentos de colección de datos

Espectrofotómetro UV visible. Marca Rayleigh. UV-2601

Software estadístico GraphPad Prism versión 8. Año 2018.

Balanza analítica. Marca RADWAG, modelo AS220-C/2

8. Limitaciones

El siguiente estudio puede tener limitaciones metodológica, ya que hay pruebas que no han sido evaluadas en los distintos músculos de estudio. De igual manera el modelo animal que se ocupara para dicho estudio fue sometido a estrés por trabajos cercanos al bioterio que pudieran afectar los parámetros a medir.

CAPÍTULO IV

1. Seguimiento durante estudio

Los animales desde su nacimiento tuvieron acceso libre tanto a ingesta de agua como alimento. Desde la semana 24 se comenzó la administración del tratamiento con NAC, el cual duró 10 semanas, período en el cual se realizó un seguimiento de los animales. Durante esta etapa se observó y monitorizó la ingesta diaria de agua, alimento y variación de peso corporal.

La variación de peso corporal fue determinada mediante la medición del peso corporal de los animales durante las 10 semanas de tratamiento.

Los resultados obtenidos arrojaron que la muestra en estudio posee valores dentro de los rangos de normalidad del peso de los animales según edad y especie animal. El peso promedio de los animales de G1 fue de $34,7 \pm 5,52$, de G2 fue de $33,3 \pm 1,6$, de G3 3 fue de $32,8 \pm 2,5$ y de G4 4 fue de $32,1 \pm 2,2$ (Fig.14).

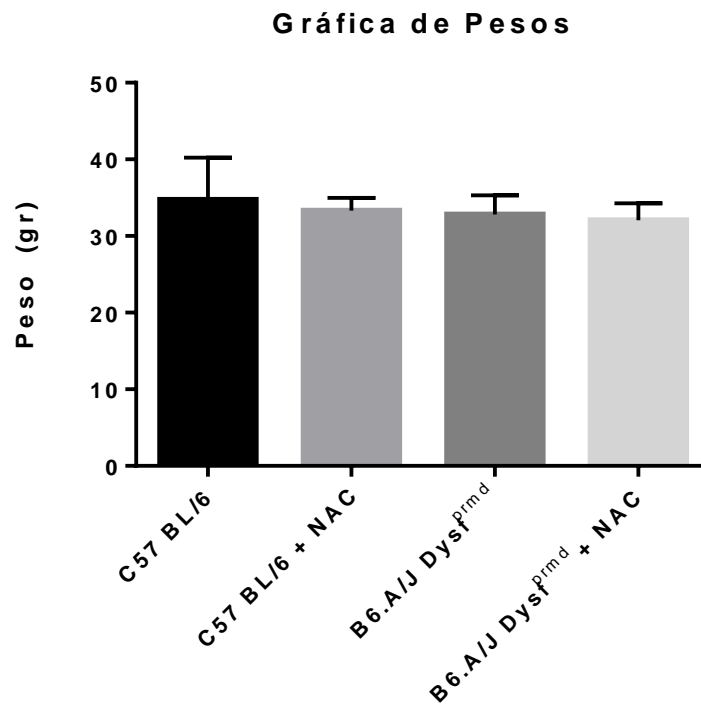


Figura 14: Control de peso durante el estudio de los grupos G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedio \pm desviación estándar).

2. Prueba Funcional

La prueba de pantalla invertida fue aplicada a los cuatro grupos de estudio, al inicio y al final de la administración de NAC. Los roedores de G1 (C57 BL/6) y G2 (C57 BL/6 + NAC) no presentaron cambios significativos en sus tiempos de mantención en la pantalla. El tiempo promedio de los animales de G1 al inicio fue de $151,8 \pm 175,72$ y al final fue de $112,8 \pm 131,25$. Por otra parte, los tiempos de G2 al inicio fue de $50,7 \pm 54,84$ y al final fue de $102,8 \pm 66,23$ (Fig.15).

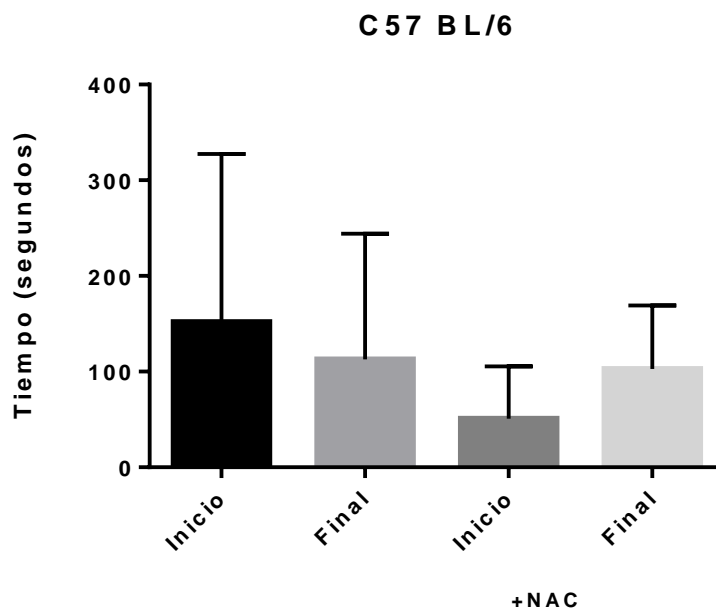


Figura 15: Test pantalla invertida realizado en los grupos G1 (C57 BL/6) y G2 (C57 BL/6 + NAC) (n=6, promedio \pm desviación estándar) Las dos barras de la izquierda corresponden a animales sin NAC, las de la derecha a animales tratados con NAC

Los roedores de G3 (B6.A/J $Dysf^{prmd}$) no presentan cambios significativos en el tiempo que se mantienen sostenidos en la pantalla. Sin embargo, los roedores de G4 (B6.A/J $Dysf^{prmd}$ + NAC) presentan cambios significativos, aumentando el tiempo de mantención en la pantalla al final del consumo del NAC ($p= 0,0011$). El tiempo promedio de los animales de G3 al inicio fue de $37,6 \pm 47,76$ y al final fue de $39,4 \pm 70,8$. Por otra parte, los tiempos de G4 al inicio fue de $29,9 \pm 16,50$ y al final fue de $148,8 \pm 62,09$ (Fig.16).

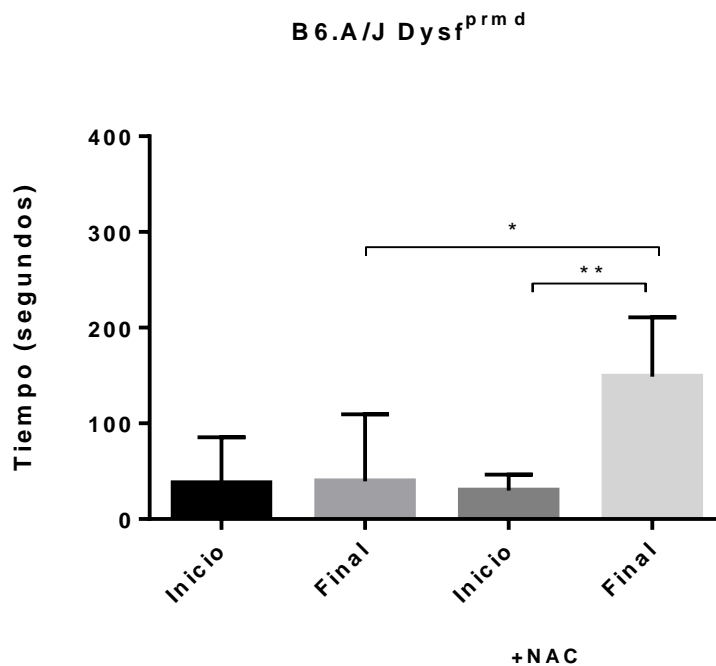


Figura 16: Test pantalla invertida realizado en los grupos G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedio \pm desviación estándar). Las dos barras de la izquierda corresponden a animales sin NAC, las de la derecha a animales tratados con NAC. * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$ respectivamente.

3. Creatina Quinasa

La actividad enzimática de CK se determinó en el plasma de los cuatro grupos de estudio. Los resultados obtenidos arrojaron que la muestra en estudio posee valores dentro de los rangos de normalidad de CK y no presenta variaciones según cepa del roedor. El promedio de G1 (C57 BL/6) fue de $9735,4 \pm 1599,71$, de G2 (C57 BL/6 + NAC) fue de $12552,0 \pm 5624,4$, de G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) fue de $12619,8 \pm 2970,3$ y de G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) fue de $10531,3 \pm 6,83,8$ (Fig. 17).

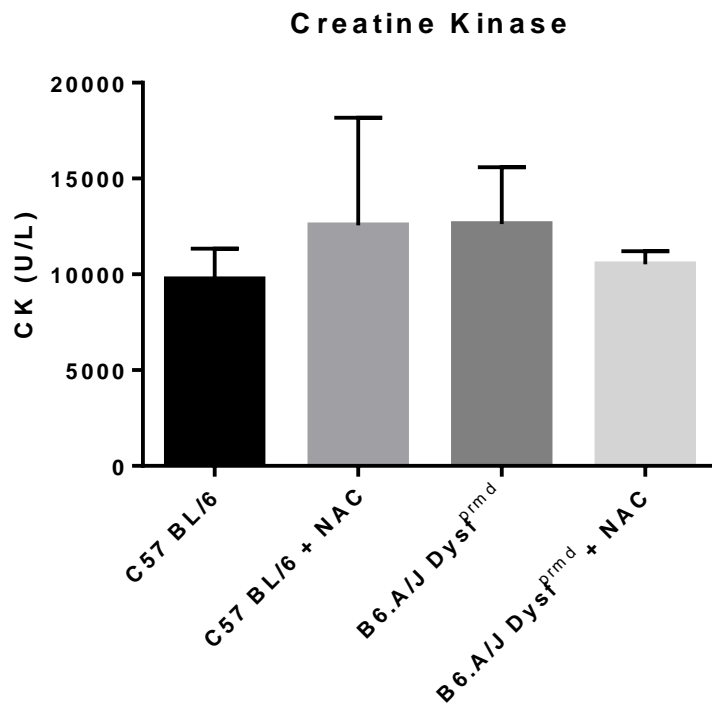


Figura 17: Actividad enzimática de CK (U/L) plasmática de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios ± desviación estándar).

4. Parámetros de Daño Oxidativo

El daño oxidativo de los ratones fue determinado a través de la evaluación de lipoperoxidación (ensayo TBARS) y daño a proteínas (ensayo carbonilo).

4.1 Ensayo TBARS

El daño a lípidos se determinó en los tres músculos de los cuatro grupos de estudio. En el músculo cuádriceps al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayores parámetros de lipoperoxidación que G1 (C57 BL/6) ($p= 0,0007$) y G4 (B6.A/J

Dysf^{prmd} + NAC) disminuye sus parámetros de lipoperoxidación en relación con G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) (p= 0,0018) (Fig. 18).

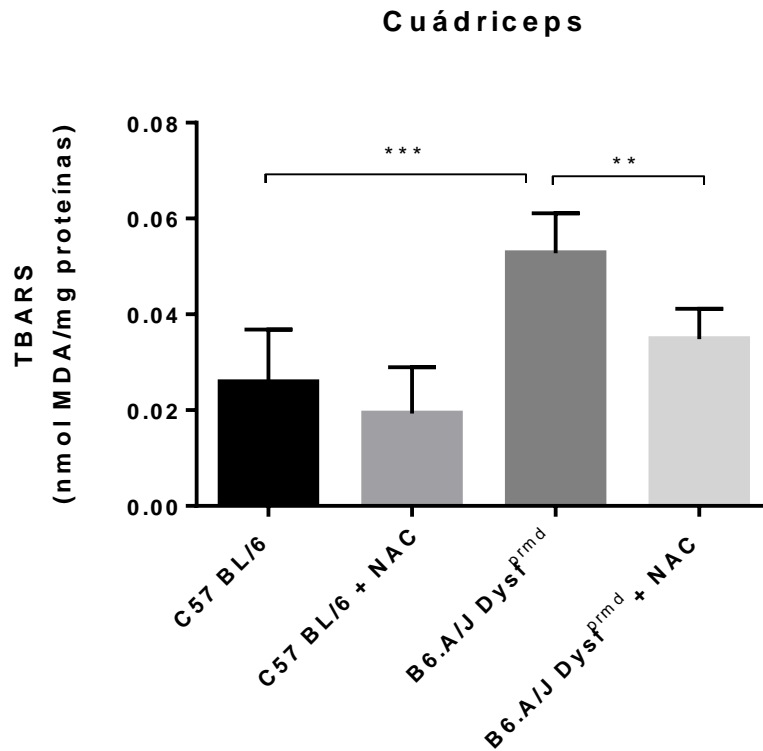


Figura 18: Lipoperoxidación (nM MDA/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). ** p < 0,001 y *** p < 0,0001 respectivamente.

En el músculo gastrocnemio al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) que disminuye sus parámetros de lipoperoxidación en relación con G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) (p= 0,0021) (Fig. 19).

Gastrocnemio

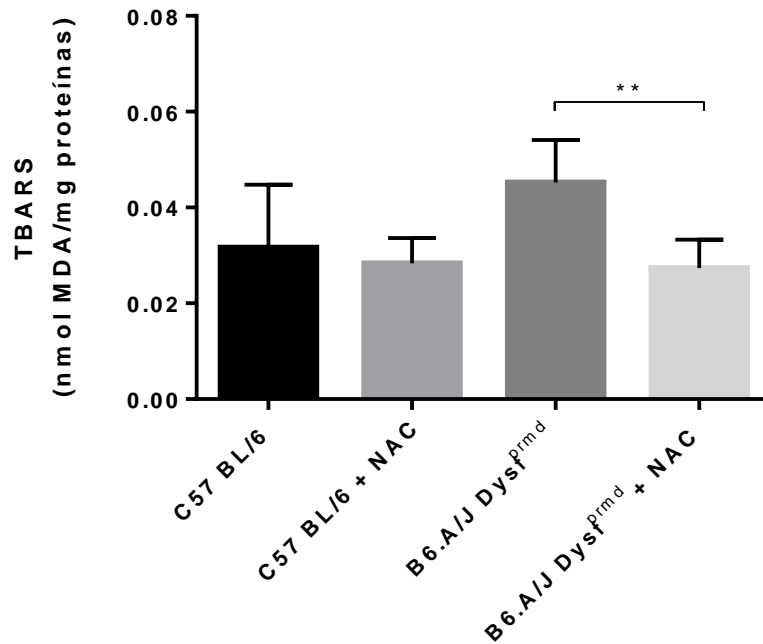


Figura 19: Lipoperoxidación (nM MDA/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{Prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{Prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). ** $p < 0,001$.

En el músculo tibial anterior al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G1 (C57 BL/6) y G2 (C57 BL/6 + NAC) donde el grupo con NAC aumenta sus parámetros de lipoperoxidación ($p = 0,046$), al igual que entre G3 (B6.A/J Dysf^{Prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{Prmd} + NAC) ($p = 0,0319$) (Fig. 20).

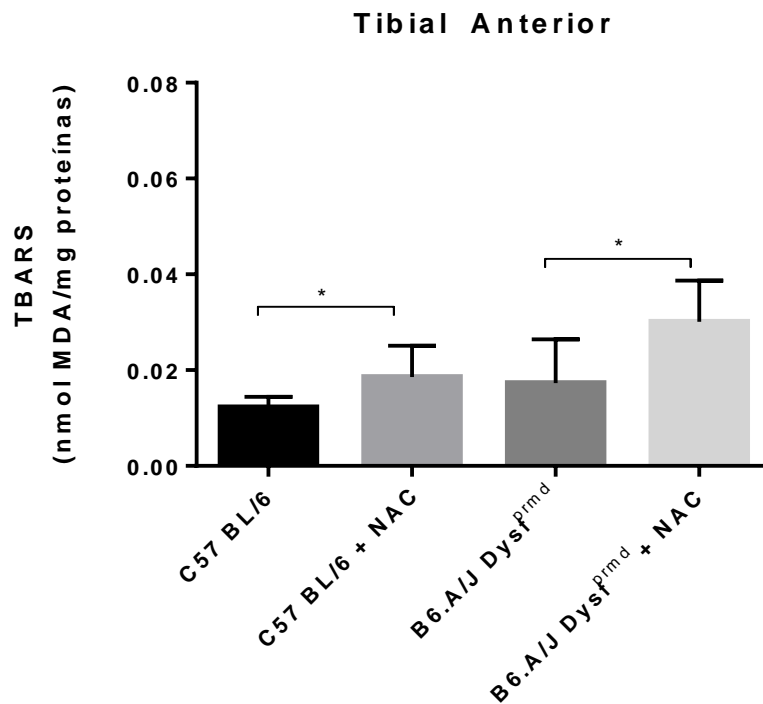


Figura 20: Lipoperoxidación (nM MDA/mg proteínas) músculo tibial anterior de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$.

4.2 Ensayo Carbonilo

El daño a proteínas se determinó en los tres músculos de los cuatro grupos de estudio. En el músculo cuádriceps al evaluar diferencias entre grupos se evidenció que G4 (B.6A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó significativamente versus G3 (B.6A/J Dysf^{prmd}) ($p=0,0012$) (Fig. 21).

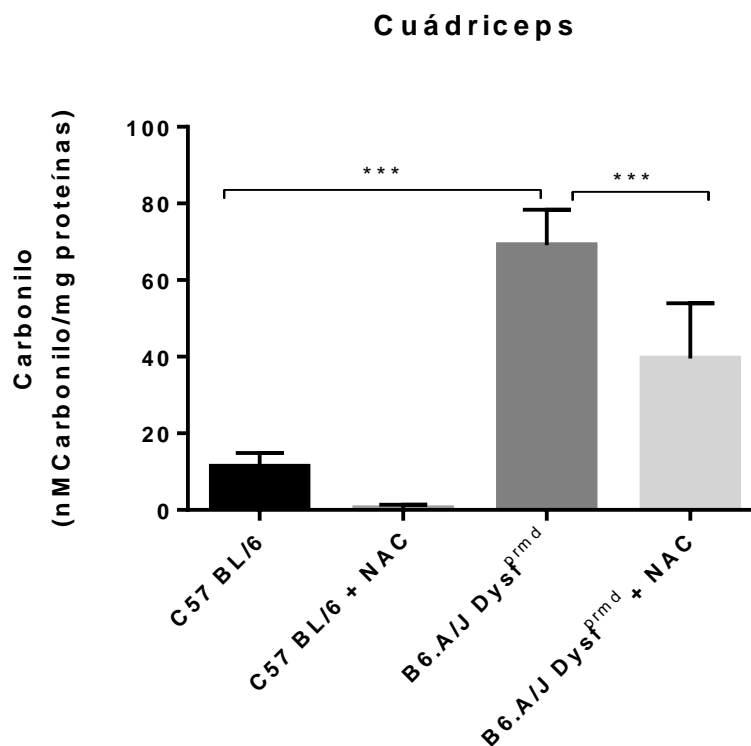


Figura 21: Daño a proteínas (nM carbonilo/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). *** $p < 0,0001$.

En el músculo gastrocnemio al evaluar diferencias ente grupos se evidencio que G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) presenta mayor oxidación de proteínas versus G1 (C57 BL/6) ($p=0,002$). Por otra parte, G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} +NAC) disminuyó su oxidación versus el grupo sin NAC G3 ($p=0,0109$) (Fig. 22).

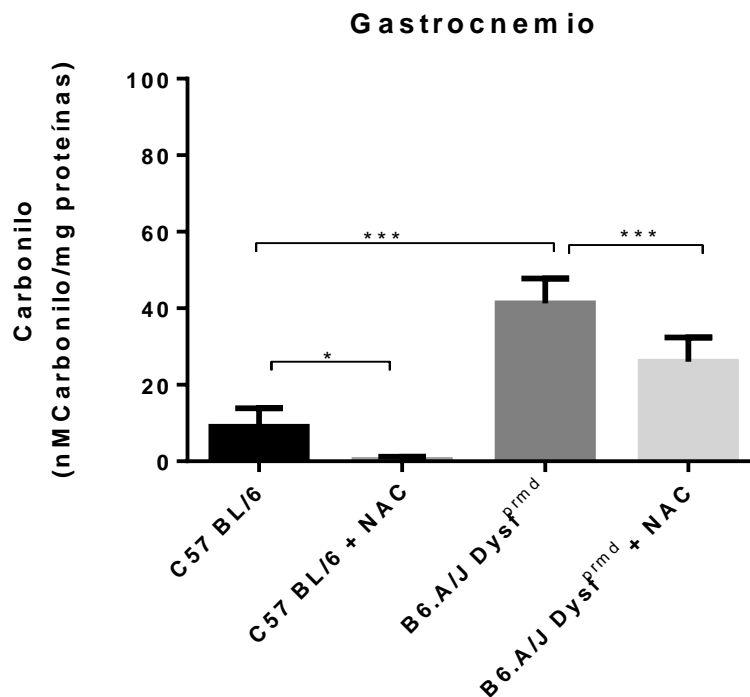


Figura 22: Daño a proteínas (nM carbonilo/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

En el músculo tibial anterior al evaluar diferencias ente grupos se evidencio que entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) posee mayor oxidación de proteínas versus G1 (C57 BL/6) ($p = 0,022$), entre G2 (C57 BL/6 + NAC) y G1 (C57 BL/6) se evidenció que el primero disminuye su daño ($p = 0,0483$) y finalmente entre G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} +NAC) versus G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) el primero disminuyó su daño a proteínas ($p = 0,0145$) (Fig. 23).

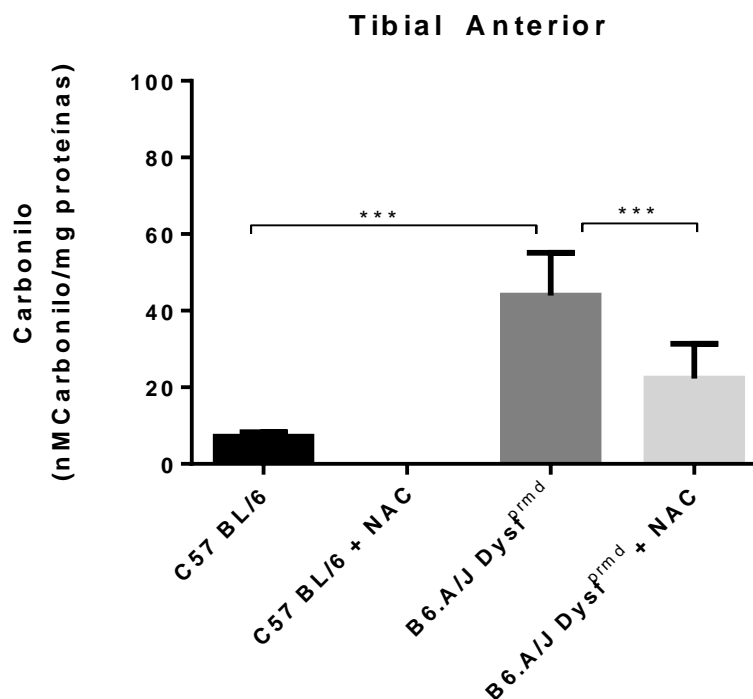


Figura 23: Daño a proteínas (nM carbonilo/mg proteínas) músculo tibial anterior de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$.

5. Parámetros de Defensa Antioxidante Enzimático

La capacidad AO enzimática de los ratones fue determinada a través de las evaluaciones de la actividad enzimática de SOD, CAT y GSH/GSSG.

5.1 Actividad de SOD

La actividad enzimática de SOD se determinó en los tres músculos de los cuatro grupos de estudio. En el músculo cuádriceps al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayor actividad enzimática que G1 (C57 BL/6) ($p = 0,0005$). Además, se evidenció que G2 (C57 BL/6 + NAC) aumentó su actividad enzimática en

comparación a G1 (C57 BL/6) ($p= 0,015$) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p= 0,0034$) (Fig. 24).

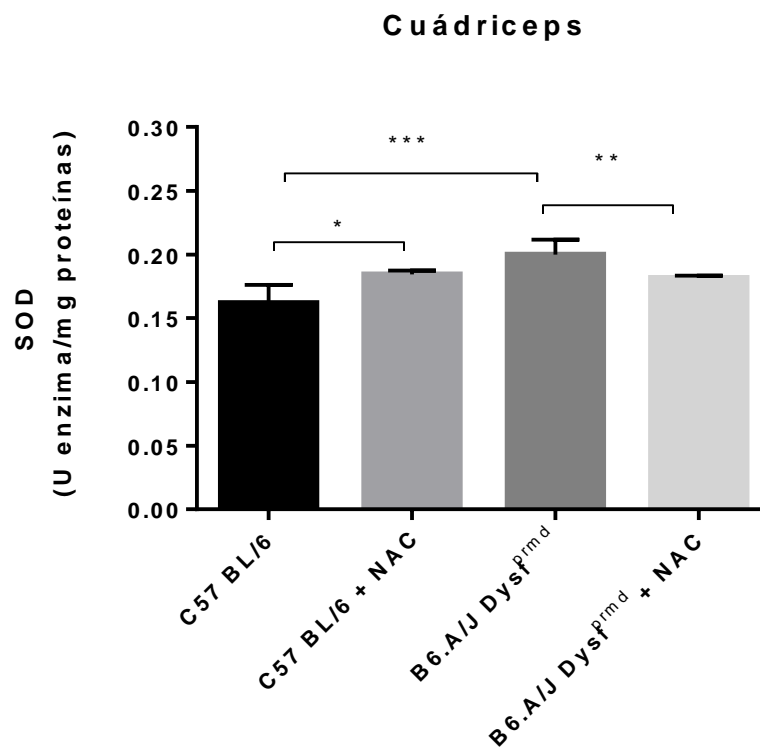


Figura 24: Actividad enzimática de SOD (U enzima/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) ($n=6$, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

En el músculo gastrocnemio al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayor actividad enzimática que G1 (C57 BL/6) ($p= 0,0001$). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p= 0,0072$) (Fig. 25).

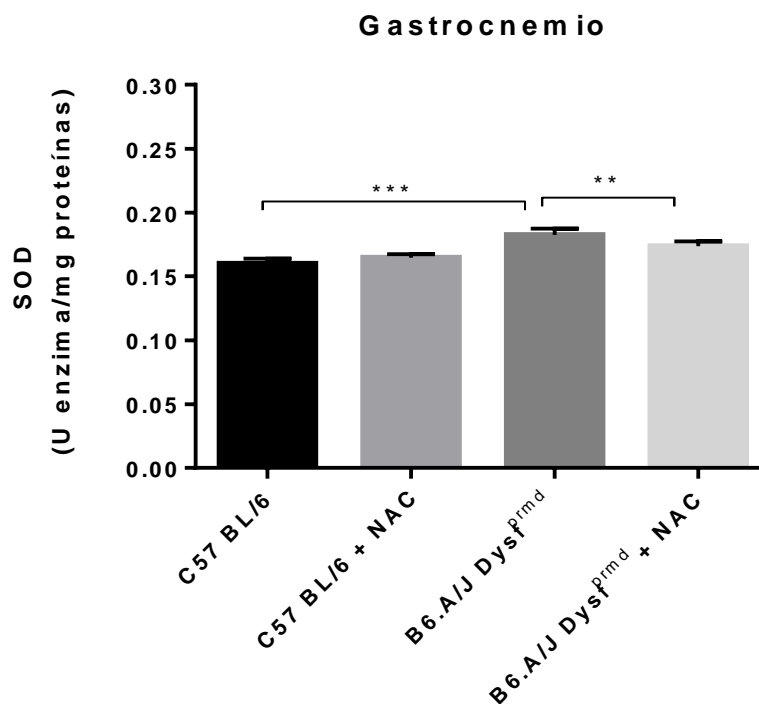


Figura 25: Actividad enzimática de SOD (U enzima/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

En el músculo tibial anterior al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayor actividad enzimática que G1 (C57 BL/6) ($p = 0,0001$). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p = 0,007$) (Fig. 26).

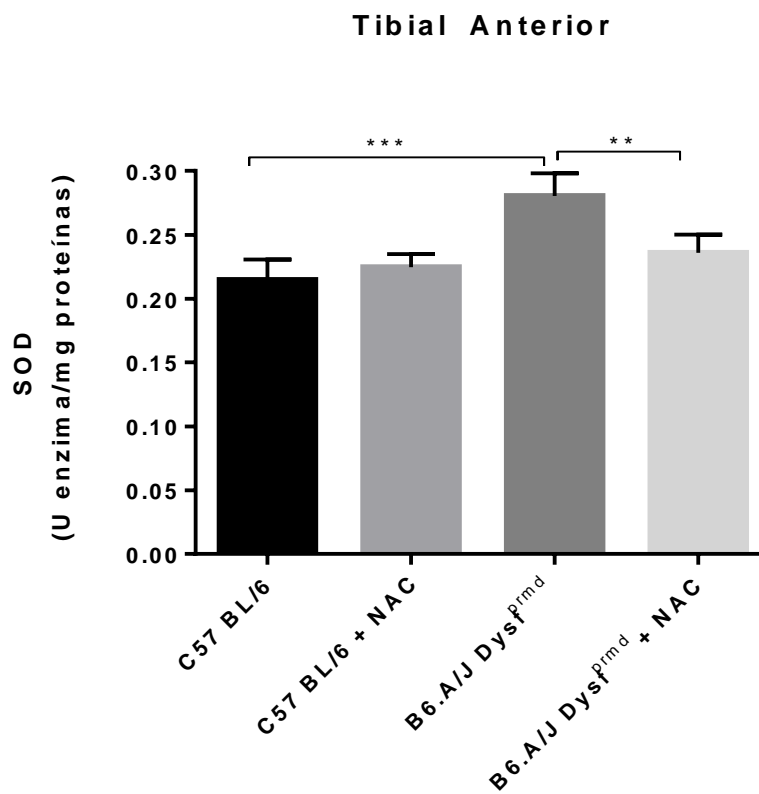


Figura 26: Actividad enzimática de SOD (U enzima/mg proteína) músculo tibial anterior de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dys^{f^{prmd}}) y G4 (B6.A/J Dys^{f^{prmd}} + NAC) (n=6, promedios ± desviación estándar). ** p < 0,001 y *** p < 0,0001 respectivamente.

5.2 Actividad de CAT

La actividad enzimática de CAT se determinó en los tres músculos de los cuatro grupos de estudio. En el músculo cuádriceps al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G2 (C57 BL/6 + NAC) que tiene menor actividad enzimática que G1 (C57 BL/6) (p= 0,0319). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dys^{f^{prmd}} + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G3 (B6.A/J Dys^{f^{prmd}}) (p= 0,0145) (Fig. 27).

Cuádriceps

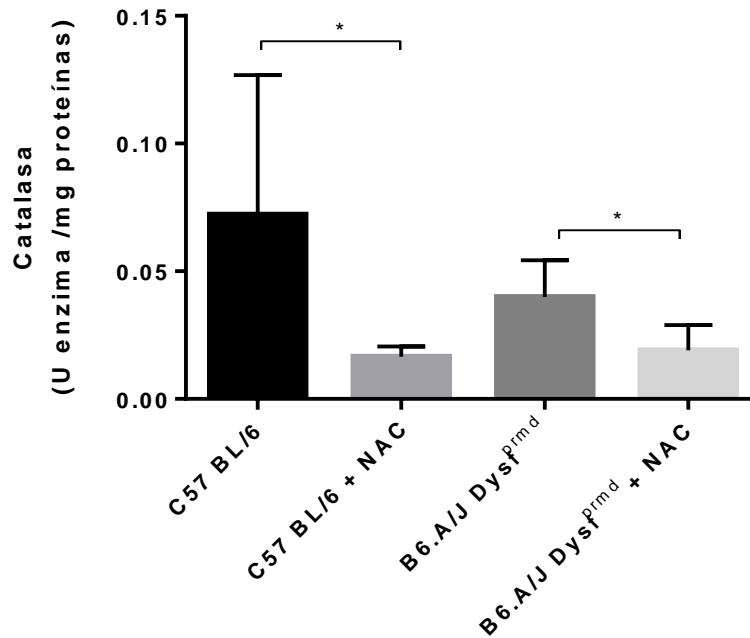


Figura 27: Actividad enzimática de CAT (U enzima/mg proteínas) músculo cuádriceps de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * p < 0,01.

En el músculo gastrocnemio al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayor actividad enzimática que G1 (C57 BL/6) (p= 0,0197). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) (p= 0,0001) (Fig. 28).

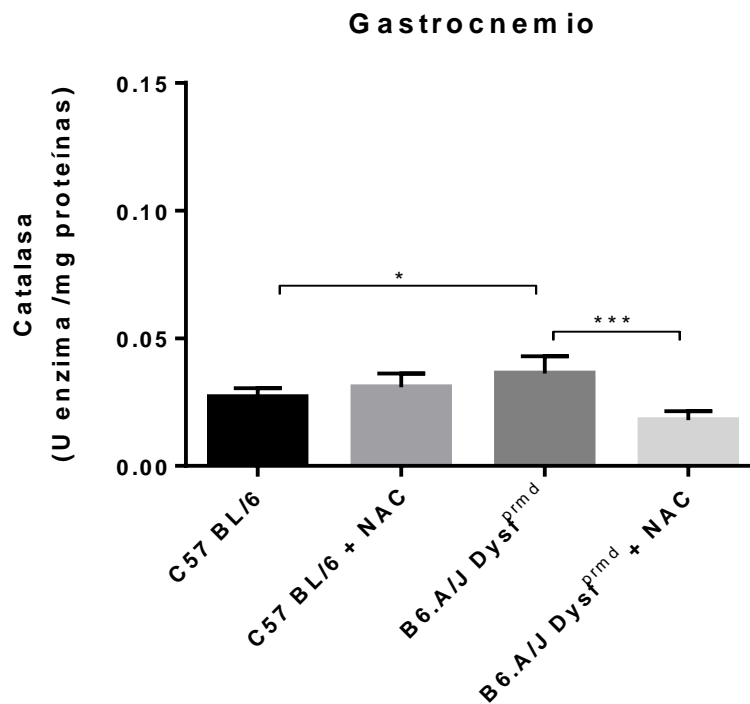


Figura 28: Actividad enzimática de CAT (U enzima/mg proteínas) músculo gastrocnemio de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

En el músculo tibial anterior al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene menor actividad enzimática que G1 (C57 BL/6) ($p = 0,0457$). Además, se evidenció que G2 (C57 BL/6 + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G1 (C57 BL/6) ($p = 0,0093$), al igual que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su actividad enzimática en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p = 0,004$) (Fig. 29).

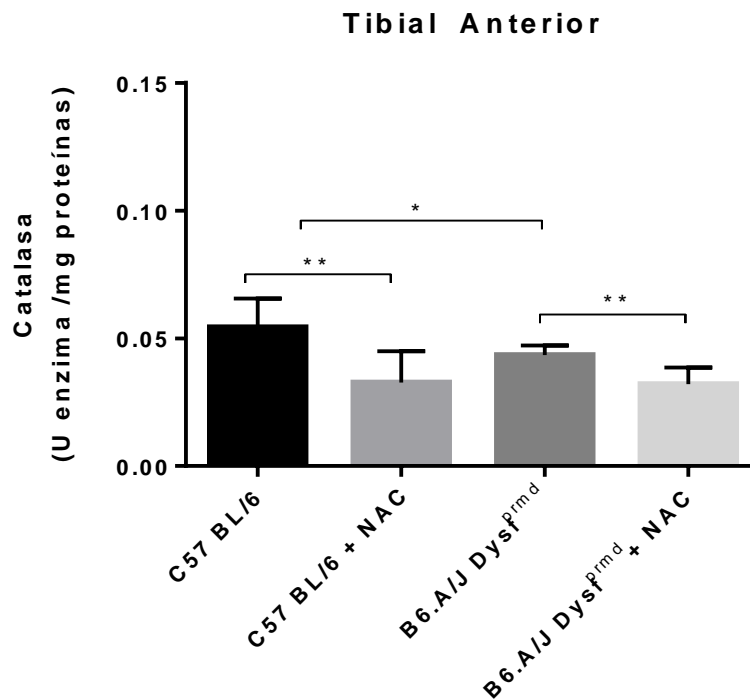


Figura 29: Actividad enzimática de CAT (U enzima/mg proteínas) músculo tibial anterior de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * p < 0,01 y ** p < 0,001 respectivamente.

5.3 GSH/GSSG

La relación de GSH/GSSG se determinó en los tres músculos de los cuatro grupos de estudio. En el músculo cuádriceps al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayor relación del complejo glutatión que G1 (C57 BL/6) (p= 0,0056). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó la relación del complejo glutatión en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) (p= 0,0001) (Fig. 30).

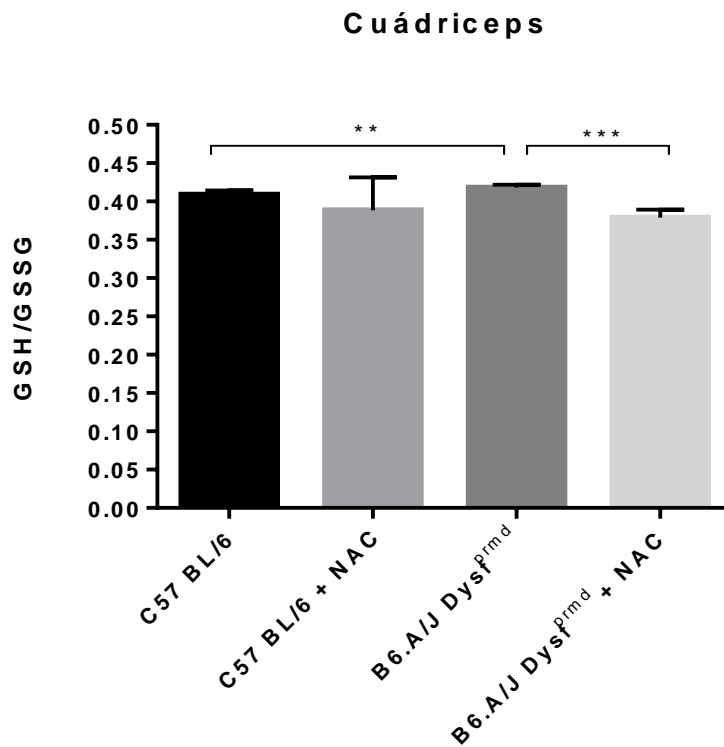


Figura 30: Relación complejo glutatión (GSH/GSSG) músculo cuádriceps de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

En el músculo gastrocnemio al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G2 (C57 BL/6 + NAC) que tiene menor relación del complejo glutatión que G1 (C57 BL/6) ($p = 0,007$). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su relación del complejo glutatión en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p = 0,0003$) (Fig. 31).

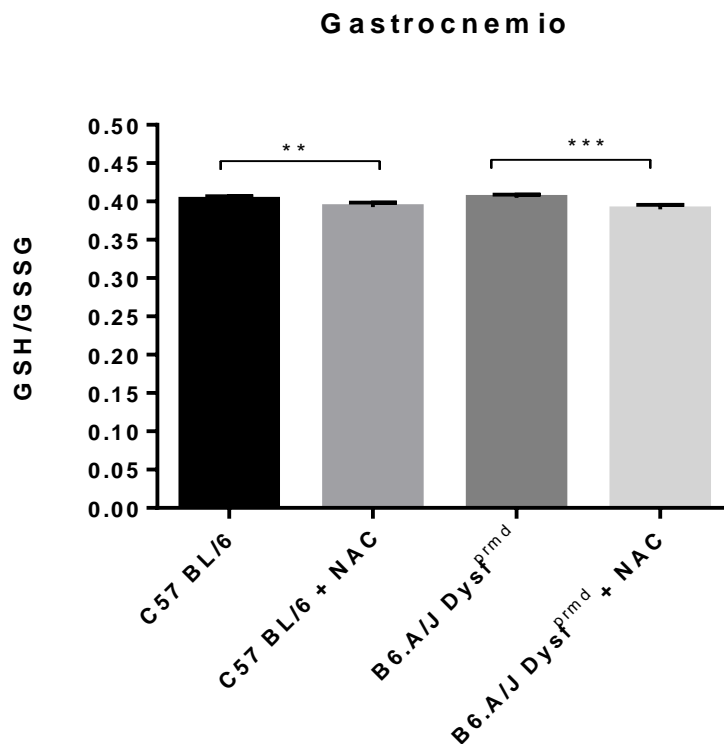


Figura 31: Relación complejo glutatión (GSH/GSSG) músculo gastrocnemio de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

En el músculo tibial anterior al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G2 (B6.A/J Dysf^{prmd}) que tiene mayor relación del complejo glutatión que G1 (C57 BL/6) ($p = 0,0415$). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) disminuyó su relación del complejo glutatión en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p = 0,0323$) (Fig. 32).

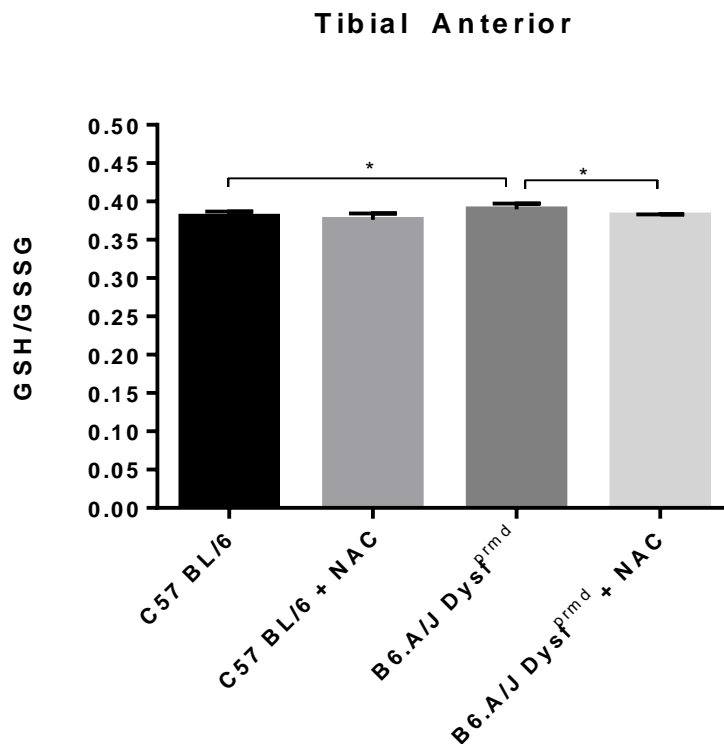


Figura 32: Relación complejo glutatión (GSH/GSSG) músculo tibial anterior de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$.

6. Parámetros de Defensa Antioxidante No Enzimático

La capacidad antioxidante no enzimática de los ratones fue determinada a través de la evaluación de TRAP

6.1 TRAP

La capacidad AO no enzimática se determinó en los tres músculos de los cuatro grupos de estudio. En el músculo cuádriceps al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G2 (C57 BL/6 + NAC) que tiene menor capacidad AO que G1 (C57 BL/6) ($p = 0,0001$). Además, se evidenció

que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) aumentó su concentración en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p= 0,0001$) (Fig. 33).

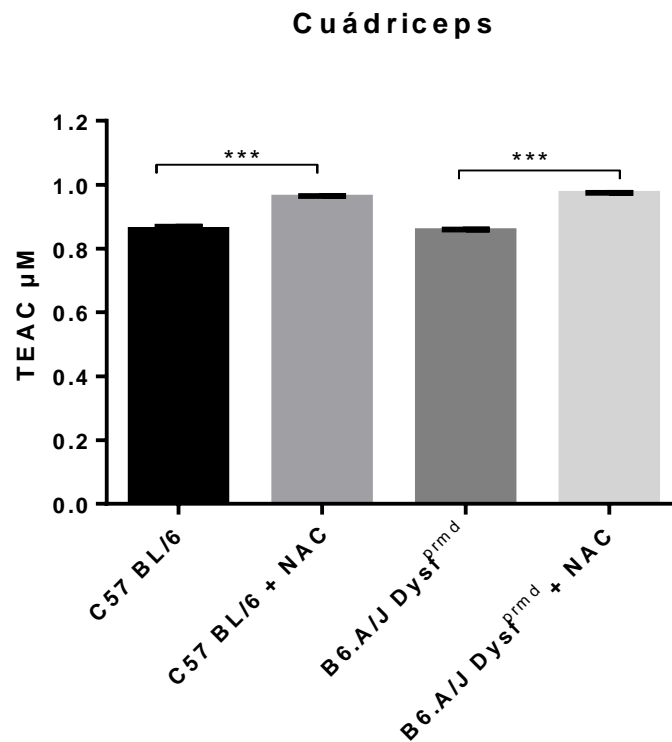


Figura 33: Capacidad antioxidante total (TEAC μM) músculo cuádriceps de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) ($n=6$, promedios \pm desviación estándar). *** $< 0,0001$.

En el músculo gastrocnemio al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G2 (C57 BL/6 + NAC) que tiene mayor capacidad AO que G1 (C57 BL/6) ($p= 0,001$). Además, se evidenció que G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) aumentó su capacidad AO en comparación a G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) ($p= 0,001$) (Fig. 34).

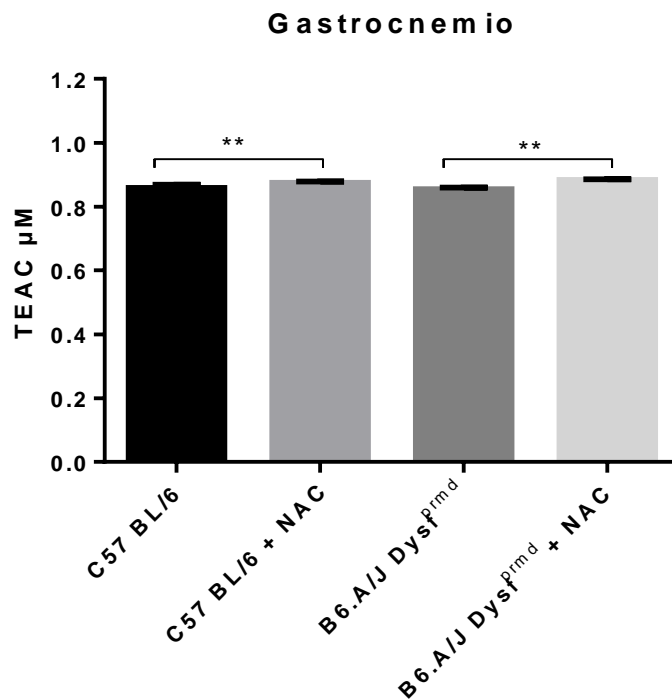


Figura 34: Capacidad antioxidante total (TEAC μM) músculo gastrocnemio de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). ** p < 0,001.

En el músculo tibial anterior al evaluar diferencias entre grupos se evidencia una diferencia entre G1 (C57 BL/6) que tiene menor capacidad AO que G2 (C57 BL/6 + NAC) (p= 0,01). Además, se evidenció que el G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) aumentó su capacidad AO en comparación al grupo tres (B6.A/J Dysf^{prmd}) (p= 0,0001) (Fig. 35).

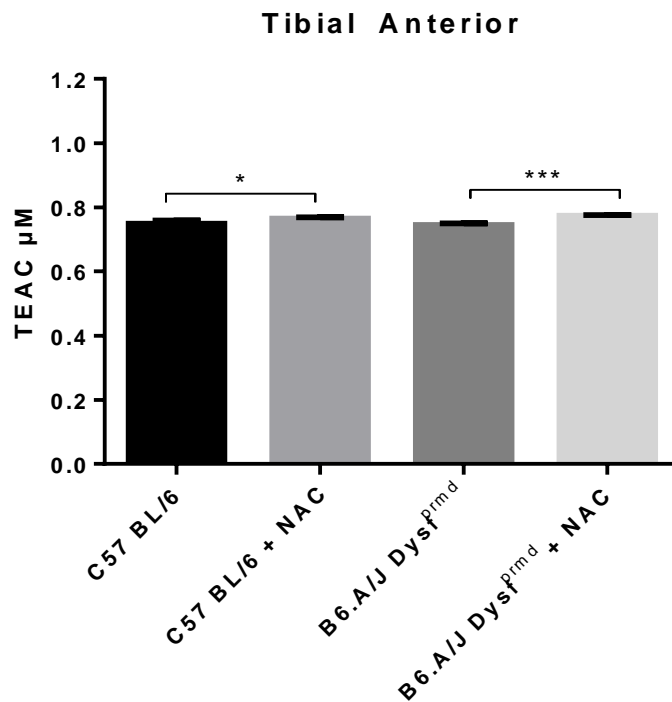


Figura 35: Capacidad antioxidante total (TEAC μM) músculo tibial anterior de los G1 (C57 BL/6), G2 (C57 BL/6 + NAC), G3 (B6.A/J Dysf^{prmd}) y G4 (B6.A/J Dysf^{prmd} + NAC) (n=6, promedios \pm desviación estándar). * $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ respectivamente.

7. Discusión

Las distrofias musculares comprenden más de 30 trastornos clínicos hereditarios diferentes que se caracterizan por la degeneración y deterioro progresivo del músculo esquelético; y aunque existen investigaciones que describen una consecuencia del estrés oxidativo, el daño irreversible a los componentes celulares de las distrofias musculares aún no es del todo claro, asimismo, las modificaciones de los parámetros redox en el modelo de disferlinopatía no ha sido evaluado a cabalidad (Kar *et al.* 1979; Mechler *et al.* 1984; Haycock *et al.* 1996; Ragusa *et al.* 1997; Disatnik *et al.* 1998; Kaczor *et al.* 2007; Renjini *et al.* 2012).

A consecuencia que los antioxidantes son una terapia complementaria durante los tratamientos de diversas patologías (Ho *et al.*, 2004); y teniendo en consideración la relación del balance REDOX con patologías (Cordero,2009; Hernández-García *et al.*,2010), para este estudio se hace necesario conocer la posible conexión entre el uso de un antioxidante y el estrés oxidativo en el transcurso de la enfermedad progresiva de distrofia muscular, ya que estas podrían atenuar el efecto nocivo de las especies reactivas, y de esta forma, retrasar el proceso de evolución de dicho tipo de enfermedad.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de una dieta con NAC sobre los parámetros REDOX tisulares y cambios funcionales asociados a la disferlinopatía en un modelo animal. Los parámetros REDOX, tras la administración de un suplemento – antioxidante no enzimático – durante el período de 10 semanas, fueron determinados en tejido muscular mediante biomarcadores de defensa y daño oxidativo en roedores WT (C57 BL6) y roedores con disferlinopatía (B6.A/J Dysf^{Prmd}).

Para esta investigación se utilizaron roedores de 24 semanas de vida, los cuales contaron con un seguimiento en su ingesta de agua y alimento junto con variaciones de peso. Según lo recién mencionado, se pudo observar que los roedores de los cuatro grupos de estudio no tuvieron una variación en su peso corporal, por lo que se asume que la ingesta de líquidos es adecuada y el NAC no está generando efectos nocivos a los roedores.

Clínicamente la disferlonopatía, más comúnmente, comienza entre la segunda y tercera década en pacientes previamente asintomáticos. Al comienzo, la mayoría de los pacientes suelen ver afectada su musculatura de extremidades inferiores, asociado a una debilidad muscular, que como consecuencia causa dificultades para correr o subir escaleras y a veces acompañados de dolor (Klinge *et al.* 2008; Parada *et al.* 2009; Klinge *et al.* 2010). Estos síntomas, junto a la pérdida de la disferlina en humanos y roedores, suelen ir acompañados de un aumento en los niveles de creatina quinasa (CK) en el plasma, un marcador de lesión, debilidad y enfermedad muscular (Selcen *et al.* 2001; Confalonieri *et al.* 2003). Sin embargo, esto puede variar en el modelo animal, y como lo demuestra este estudio, los niveles de CK no son significativamente diferentes al modelo control al momento de expresar la patología. Dichos resultados se pueden contrastar con la literatura donde Chiu y cols. (2009) y Farini y cols. (2012) encontraron altos niveles de CK en sus respectivos estudios. Aunque Demonbreun y cols. (2016) demostró que los niveles de CK dependen del modelo de estudio y de la edad de expresión de la patología.

Como lo demuestra la literatura, el estrés oxidativo y la oxidación de grupos tioles en proteínas están involucrados en la patología del músculo mdx y en el modelo de ratón A/J deficiente en disferlina, mostrando una fuerte correlación entre el inicio de aparición y la gravedad de la patología en músculos específicos. Esto sugiere un papel potencialmente importante en la manifestación de la patología en las disferlinopatías (Terrill *et al.* 2013).

Frente a lo descrito anteriormente, el estrés oxidativo puede conducir a disfunción celular a través de daño permanente a lípidos, proteínas y ADN, así como causar modificaciones reversibles a las cadenas laterales de tiol en los residuos de cisteína, dando lugar a alteraciones en la función de las proteínas. El ensayo de oxidación de proteínas, que mide los carbonilos, se utiliza comúnmente como indicador de daño oxidativo irreversible a las proteínas, y se han reportado altos niveles de carbonilo en músculos – tanto de modelo animal como humano – que carecen de disferlina (Dhanarajan *et al.*, 2011). El hecho que el producto de término de la lipoperoxidación (MDA) y la carbonilación de proteínas se encontrara aumentada al comparar el grupo B6.A/J *Dysf^{prmd}* v/s el grupo C57 BL/6, en la mayoría de los músculos estudiados, da cuenta de esto; que la producción descontrolada de especies radicalarias en el modelo patológico estén reaccionando con los fosfolípidos de membrana y proteínas del modelo muscular; y que posteriormente al momento de consumir el NAC, por vía oral, en todos los músculos de los roedores B6.A/J *Dysf^{prmd}* disminuyera significativamente. Este patrón se correlaciona con la manifestación de la enfermedad en los músculos más específicos y la progresión con la edad.

Sin embargo, al comparar la lipoperoxidación entre los grupos B6.A/J *Dysf^{prmd}* v/s el grupo C57 BL/6, no siempre dio una diferencia significativa y/o un aumento en la producción de MDA en el modelo patológico, lo que puede reflejar que el fenotipo del modelo elegido puede requerir de mayor edad para expresar a la totalidad su daño oxidativo, o de igual manera, las especies

radicalarias estén reaccionando con otro blanco de reacción, pues la literatura demuestra que la oxidación de cadenas laterales de tioles si se ven altamente afectadas en la patología estudiada.

Estudios anteriores, demuestran que las enzimas AO endógenas también se ven afectadas por el aumento de oxidación presente en las patologías del tipo de distrofia muscular, pues un aumento de EO puede llegar a dañar a estas mismas al estar formadas de proteínas, donde las ERO son uno de sus blancos de acción (Gao *et al.*, 2007; Cortés-Rojo, 2009). Es así como en este estudio se puede evidenciar que, en todos los músculos estudiados, la actividad de SOD en el modelo deficiente de disferlina se encuentra aumentada, versus el comportamiento de la actividad de catalasa que no presenta dicho comportamiento; por consiguiente, se puede inducir que en este tipo de modelo patológico hay un aumento de anión radical superóxido, el cual termina dañando tanto lípidos como proteínas.

Para prevenir el exceso de EO, las células deben responder a este aumento de ERO montando un sistema de defensas antioxidantes, por lo cual, las enzimas AO juegan un rol fundamental en la reducción de ERO. La literatura da la evidencia que el factor de transcripción primario involucrado en la activación de la región de elementos de respuesta antioxidante (ARE) en condiciones de aumento de EO es el factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), el cual en condiciones de balance REDOX se encuentra, a nivel citoplasmático, asociado a una proteína dimérica inhibidora, proteína asociada

a ECH similar a Kelch (Keap1), la cual interactúa con una cullin 3 E3 ubiquitina ligasa E3 (Cul3), el cual se ubiquitinizará y degradará protosómicamente (Ray *et al.* 2012; Ma, Q 2013; Filomeni *et al.* 2015; Krajka-Kuźniak *et al.* 2017). Las cisteínas reactivas de Keap1 son sensores REDOX, por lo cual, tras un aumento de ERO, Keap1/Cul3 se oxida disociándose de Nrf2, lo que permite la estabilización y Nrf2 trasloca al núcleo (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012). Nrf2 en el núcleo se dimeriza con una proteína Maf y forman un heterodímero el cual se une al potenciador de ARE y activa la transcripción de genes dependiente de ARE transcribiendo las enzimas antioxidantes (Ray *et al.* cols 2013).

En base a lo descrito anteriormente, los resultados demostraron que en el modelo B6.A/J Dysf^{prmd} el daño a lípidos de membrana y proteínas del sistema se encuentran elevados, conjuntamente los niveles de la actividad de SOD, probablemente producto de la inducción del factor Nrf2 quien induce la vía para la transcripción de enzimas antioxidantes (Lesser, 2006; Lozada y García, 2009; Nquyen, Nioi y Pickett, 2009).

Por otra parte, lo que puede explicar el aumento de actividad de SOD, es que el exceso de ERO estén estimulando otra vía de señalización que induzca la transcripción de defensas AO endógenas, como la vía de FoxO3a, donde las ERO desencadenan una cascada de quinasas que activan a Sirtuina 1 (SIRT1) y/o a quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), las cuales terminan fosforilando o acetilando a FoxO 3a el cual inducirá a la región del ADN para

que transcribir las defensas AO (Coffer & Burgering 2004; Van der Horst *et al.* 2007; Hagenbuchner & Ansserlechner, 2013; Filomeni *et al.* 2015), lo cual explicaría el aumento de la actividad de SOD en el modelo patológico.

Rajakumar *et al.* (2014) demuestra que biopsias musculares de humanos con disferlinopatía existen alteraciones en el estrés oxidativo, como lo indica una mayor peroxidación de lípidos, glutatión reducido y proteína tiol en comparación con los músculos de control. Así mismo, se observa un aumento en la oxidación de proteínas, alteraciones en la actividad de catalasa, gamma glutamil cisteína ligasa (GCL) y glutatión reductasa; y por otra parte demostró una disminución del glutatión peroxidasa y glutatión-s-transferasa.

Como la literatura lo ha demostrado, en los modelos con disferlinopatía se ve una alteración en el complejo de glutatión reducido/oxidado, es que en este estudio evaluamos dicha relación, donde los resultados demuestran que entre el modelo con disferlinopatía versus el control este presenta una mayor relación, lo cual demuestra que podría existir una mayor concentración de glutatión oxidado (GSSG), dando cuenta de que el glutatión reducido (GSH) está tomando las ERO del sistema, oxidando sus grupos de cisteína y junto con otro GSH terminan formando puentes disulfuros y así generar GSSG y así hacer funcionar el complejo.

Uno de los antioxidantes que se dirige a combatir el ERO, siendo de fácil administración por vía oral, es el NAC, que incluso ha sido utilizado

clínicamente para combatir la sobredosis por paracetamol (Terrill *et al.*, 2013). Sumado a lo anterior, este AO puede ejercer sus propiedades directamente sobre algunos tipos de ERO, éste también es precursor de L-cisteína que se requiere para la síntesis de un importante antioxidante endógeno como lo es el glutatión intracelular (Renjini *et al.*, 2012). Dicho lo anterior, el tratamiento con NAC modifica los parámetros redox mostrando una disminución del daño oxidativo y por un lado estaría potenciando el complejo glutatión favoreciendo su biosíntesis y, por otra parte, estaría actuando como antioxidante de sacrificio, y de esta forma, tal vez enlenteciendo la progresión de la enfermedad, lo que queda manifestado cuando se realiza la prueba funcional donde el roedor con disferlinopatía que consumió el NAC muestra más resistencia y fuerza.

En base lo descrito anteriormente, los resultados obtenidos en este estudio muestran cambios en el equilibrio de óxido-reducción tras la administración de NAC. De los resultados se desprende que podría existir una disminución de las ERO producto de la administración vía oral del NAC, actuando este como antioxidante exógeno como de sacrificio, pues los niveles de daño a lípidos disminuyeron en la mayoría de los casos, a excepción de la lipoperoxidación en el músculo tibial anterior; en el cual este suplemento pueda estar actuando de forma prooxidante.

A raíz de estos resultados se abre una brecha de investigación, ya que la administración de este tipo de antioxidantes, siendo un precursor del glutatión,

al llegar a la célula blanco puede contribuir a la disminución del estrés oxidativo, siempre y cuando las enzimas que participan en los procesos de formación de glutatión y/o de conversión de glutatión reducido a oxidado. A su vez, abre una hipótesis que durante las patologías con daño a membrana del músculo se encuentran bajas concentraciones de glutatión, debido a que la gamma glutamil cisteína ligasa, gamma glutamil cisteína sintetasa, glutatión peroxidasa y glutatión-s-transferasa pueden estar siendo afectadas por el exceso de producción de especies reactivas de oxígeno.

Este estudio puede dar lineamientos del funcionamiento a nivel fisiológico, proyectando a futuras investigaciones comparativas entre protocolos de distintos tipos de antioxidante o estos en conjunto a un programa de ejercicios.

Además, se hace necesario realizar estudios más específicos que demuestren el comportamiento de los distintos tipos de antioxidantes, con el fin de esclarecer las vías de señalización en las cuales interfiere y como se relacionan éstas con las distintas patologías neuromusculares. Otra proyección interesante para investigar sería el complejo glutatión en su cabalidad y así determinar en qué momento de su formación podría estar siendo afectado y/o interferido por un antioxidante más específico.

Esta investigación, a pesar de ser realizada en un modelo animal, siendo una muestra homogénea con todos los componentes ambientales controlados, pudo verse afectada en más de una manera en el balance REDOX, debido a

factores ambientales externos al lugar de estudio que no se podían controlar; como lo fueron trabajos de construcción realizados a los alrededores del bioterio causando un estrés a los animales.

En este estudio la edad a la cual se le comenzó a administrar el NAC fue una variable más que pudo generar una alteración en los resultados, pues no existe la evidencia suficiente que demuestre que a esa edad la patología se comience a expresar en todos los animales y que los cambios tanto morfológicos como funcionales sean evidentes en todos por igual. Así, para futuras investigaciones se sugiere tener animales con mayor rango etario, teniendo un mayor número de roedores de distintas edades y así tener mayor control de esta variable y tener una tendencia más clara con el menor error posible.

Por otra parte, la forma de administración del NAC fue otra restricción que tuvo este estudio, por la vida media que puede presentar, las veces que fue reemplazada el agua de los bebederos y si este era consumido o no por los mismos roedores.

Finalmente, se requieren más estudios en modelo animal, que puedan medir la mayor cantidad de variables que puedan ser modificable en este tipo de patologías, para que futuras investigaciones puedan ser probadas en humanos con el fin de ofrecerles otra alternativa a su terapia de rehabilitación y así disminuir la progresión de las enfermedades de distrofias musculares.

8. Conclusiones

Este estudio demostró que el uso de NAC mejoró la funcionalidad medida a través de la resistencia en la pantalla invertida, en los animales que presentaban la patología, sugiriendo un retraso en la evolución de esta misma.

La administración de una dieta con NAC no tuvo efecto alguno en los niveles de creatina quinasa en ninguno de los grupos de estudio.

El NAC disminuyó el daño a lípidos y a proteínas, en el músculo cuádriceps y gastrocnemio, sin embargo, en el músculo tibial anterior los aumentó.

De igual forma, el NAC disminuyó la actividad enzimática de SOD y CAT, tanto en el músculo cuádriceps, gastrocnemio y tibial anterior. A su vez, el NAC disminuyó la relación GSS/GSSG en todos los músculos de estudio.

Por lo tanto, la administración de una dieta con NAC n-acetilcisteína modificó los parámetros del balance óxido-reducción – a nivel tisular – y mejoró la funcionalidad de los roedores.

Sin embargo, se requieren más estudios que validen o no esta evidencia, abriendo más vías de investigación que sustenten el uso clínico de este tipo de antioxidante en el tratamiento de distrofias musculares.

9. Referencias

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzimol* 105:121–126
- Anderson, L. V., Davison, K., Moss, J. A., Young, C., Cullen, M. J., Walsh, J., & Argov, Z. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human molecular genetics*, 8(5), 855-861.
- Andrade, F. H., Reid, M. B., Allen, D. G., & Westerblad, H. (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *The Journal of physiology*, 509(2), 565-575.
- Andrade, F. H., Reid, M. B., & Westerblad, H. (2001). Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *The FASEB Journal*, 15(2), 309-311.
- Anzai, K., Ogawa, K., Ozawa, T., & Yamamoto, H. (2000). Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxidants & redox signaling*, 2(1), 35-40.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aoki, M., Liu, J., Richard, I., Bashir, R., et al., 2001. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 57, 271–278
- Aracena-Parks, P., Goonasekera, S. A., Gilman, C. P., Dirksen, R. T., Hidalgo, C., & Hamilton, S. L. (2006). Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40354-40368.
- Aragno, M., Mastrocola, R., Brignardello, E., Catalano, M., Robino, G., Manti, R., et al., 2002. Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor- κ B activation in hippocampus of diabetic rats. *Endocrinology* 143 (9), 3250–3258.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., & Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(6), 593-597.
- Arthur, P. G., Grounds, M. D., & Shavlakadze, T. (2008). Oxidative stress as a therapeutic target during muscle wasting: considering the complex interactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(4), 408-416.
- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5), 1464-1476.
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 109(1), 33-44.
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C. C., Williamson, R., ... & Campbell, K. P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, 423(6936), 168-172.
- Bansal, D., & Campbell, K. P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in cell biology*, 14(4), 206-213.
- Barthélémy, F., Wein, N., Krahn, M., Lévy, N., & Bartoli, M. (2011). Translational research and therapeutic perspectives in dysferlinopathies. *Molecular Medicine*, 17(9), 875.
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., ... & Sadeh, M. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature genetics*, 20(1), 37-42.

Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 994-1003.

Biswas S, Chida AS & Rahman I (2006) Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol* 71, 551–564.

Bonetto, A., Penna, F., Muscaritoli, M., Minero, V. G., Fanelli, F. R., Baccino, F. M., & Costelli, P. (2009). Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy?. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(7), 906-916.

Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, DiMauro S, et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988; 54: 447-52.

Bonnemann CG, Finkel RS. Sarcolemmal proteins and the spectrum of limb-girdle muscular dystrophies. *Semin Pediatr Neurol* 2002; 9: 81-99

Bönnemann, C. G., & Laing, N. G. (2004). Myopathies resulting from mutations in sarcomeric proteins. *Current opinion in neurology*, 17(5), 529-537.

Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4), C817-C833.

Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12-23.

Brunelli, S., & Rovere-Querini, P. (2008). The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacological research*, 58(2), 117-121.

Buck, M., Chojkier, M., 1996. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in amurine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J.* 15 (8), 1753–1765.

Buetler, T.M., Renard, M., Offord, E.A., Schneider, H., Rüegg, U.T., 2002. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (4), 749–753.

Burr IM, Asayama K, Fenichel GM (1987) Superoxide dismutases, glutathione peroxidase, and catalase in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 10(2):150–154.

Cabrera, T. C., & Serrano, D. S. (2014). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*, 14(1).

Cai, C., Weisleder, N., Ko, J. K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., ... & Ma, J. (2009). Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), 15894-15902.

Cadet J, M Berger, T Douki & JL Ravanat. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 131: 1-87.

Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(5), C1082-C1088.

Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeletonextracelular matrix linkage. *Cell* 1995; 80: 675-9.

Castiglioni, C., Bevilacqua, J. A., & Hervias, K. C. (2015). Enfermedades neuromusculares en el adolescente. síntomas y signos clínicos orientadores al diagnóstico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(1), 66-73.

- Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies?. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303.
- Charge, S. B., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, 84(1), 209-238.
- Chiu, Y. H., Hornsey, M. A., Klinge, L., Jørgensen, L. H., Laval, S. H., Charlton, R., ... & Bushby, K. (2009). Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Human molecular genetics*, 18(11), 1976-1989.
- Clarke, M. S., Khakee, R., & McNeil, P. L. (1993). Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. *Journal of Cell Science*, 106(1), 121-133.
- Coffer, P. J., & Burgering, B. M. (2004). Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 889.
- Cohn, R. D., & Campbell, K. P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & nerve*, 23(10), 1456-1471.
- Collins, R. A., & Grounds, M. D. (2001). The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in skeletal muscle regeneration: studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-)/LT- α (-/-) mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(8), 989-1001.
- Covian-Nares, J. F., Koushik, S. V., Puhl, H. L., & Vogel, S. S. (2010). Membrane wounding triggers ATP release and dysferlin-mediated intercellular calcium signaling. *J Cell Sci*, 123(11), 1884-1893.
- Crowder, M. S., & Cooke, R. (1984). The effect of myosin sulphydryl modification on the mechanics of fibre contraction. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 5(2), 131-146.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Rossi, R., Colombo, R., & Milzani, A. (2003). Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1), 23-32.
- De Luna, N., Díaz-Manera, J., Paradas, C., Iturriaga, C., Rojas-García, R., Araque, J., Genebriera, M., Gich, I., Illa, I., Gallardo, E., 2012. 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ increases dysferlin expression in vitro and in a human clinical trial. *Mol. Ther.* 20, 1988–1997.
- De Morrée, A., Hensbergen, P. J., van Haagen, H. H., Dragan, I., Deelder, A. M., AC't Hoen, P., ... & van der Maarel, S. M. (2010). Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity. *PLoS One*, 5(11), e13854.
- Demonbreun, A. R., Allen, M. V., Warner, J. L., Barefield, D. Y., Krishnan, S., Swanson, K. E., ... & McNally, E. M. (2016). Enhanced muscular dystrophy from loss of dysferlin is accompanied by impaired annexin A6 translocation after sarcolemmal disruption. *The American journal of pathology*, 186(6), 1610-1622.
- Dhanarajan, R. P. A. B., Patil, A. B., Alexander, M., Chacko, G., & Oommen, A. (2011). Degradation of myofibrillar proteins and inadequate antioxidants in selective muscle wasting of limb girdle muscular dystrophy. *International Journal of Case Reports and Images (IJCRI)*, 2(6), 6-11.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., & Jewell, C. S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(12), 1103-1123.

- Dilger, R. N., & Baker, D. H. (2007). Oral-acetyl--cysteine is a safe and effective precursor of cysteine. *Journal of animal science*, 85(7), 1712-1718.
- Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 18(6), 337-347.
- Disatnik, M.H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M.F., Whirl, M.M., Franco, A.A., et al., 1998. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J. Neurol. Sci.* 161 (1), 77–84.
- Dutka, T. L., Verburg, E., Larkins, N., Hortemo, K. H., Lunde, P. K., Sejersted, O. M., & Lamb, G. D. (2012). ROS-mediated decline in maximum Ca²⁺-activated force in rat skeletal muscle fibers following in vitro and in vivo stimulation. *PLoS one*, 7(5), e35226.
- Elejalde, J. I. (2001, June). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de Medicina Interna* (Vol. 18, No. 6, pp. 50-59). Arán Ediciones, SL.
- El-Khamisy, S. F., & Caldecott, K. W. (2006). TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis*, 21(4), 219-224.
- Emery AEH. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; 2: 687-95
- Erazo-Torricelli, R. (2004). Actualización en distrofias musculares. *Rev Neurol*, 39, 860-71.
- Esterbauer, KH., Cheeseman, MU., Dianzani, G., Slater, TF. (1982), Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J*, 208(1), 129–140.
- Farini, A., Sitzia, C., Navarro, C., D'Antona, G., Belicchi, M., Parolini, D., ... & Torrente, Y. (2012). Absence of T and B lymphocytes modulates dystrophic features in dysferlin deficient animal model. *Experimental cell research*, 318(10), 1160-1174.
- Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., & Sheu, S. S. (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14, 1197.
- Ferreira LF & Reid MB (2008) Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol* 104, 853–860.
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation*, 22(3), 377.
- Fridovich, I. (1994) Superoxide radical and superoxide dismutase, *Ann. Rev. Biochem*, 64, 97-112.
- Ghezzi, P. (2005). Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochemical Society Transactions*, 33(6), 1378-1381.
- Gillissen, A., Schärting, B., Jaworska, M., Bartling, A., Rasche, K., & Schultze-Werninghaus, G. (1996). Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine. *Research in experimental medicine*, 196(1), 389-398.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*, 39(8), 1529-1542.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., & Rossi, R. (2009). Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 46(5-6), 241-281.
- Glover, L., & Brown, R. H. (2007). Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic*, 8(7), 785-794.
- Grounds, M.D., McGeachie, J.K., 1989. A comparison of muscle precursor replication in crush-injury
- Grounds, M. D. (1991). Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathology-Research and Practice*, 187(1), 1-22.

- Grounds, M. D., White, J. D., Rosenthal, N., & Bogoyevitch, M. A. (2002). The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(5), 589-610.
- Grounds, M. D. (2008). Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), 1621-1625.
- Grune T, B Catalgol & T Jung. (2013). Protein oxidation and aging, 516 pp. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Gutteridge, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological interactions*, 91(2-3), 133-140.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications*, 393(4), 561-564.
- Hagenbuchner, J., & Ausserlechner, M. J. (2013). Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Frontiers in physiology*, 4, 147.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3), S14-S22.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B & Gutteridge JM (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Vol. 4. Oxford University Press, New York.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes & development*, 18(18), 2195-2224.
- Hattori, H., Nagata, E., Oya, Y., Takahashi, T., Aoki, M., Ito, D., & Suzuki, N. (2007). A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *European journal of neurology*, 14(11), 1288-1291.
- Hertelendi, Z., Toth, A., Borbely, A., Galajda, Z., Van Der Velden, J., Stienen, G. J., ... & Papp, Z. (2008). Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxidants & redox signaling*, 10(7), 1175-1184.
- Huard, J., Li, Y., & Fu, F. H. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 84(5), 822-832.
- Hughes, G., Murphy, M. P., & Ledgerwood, E. C. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor κ B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochemical Journal*, 389(1), 83-89.
- Illa, I, De Luna, N, Domínguez-Perles, R, Rojas-García, R, Paradas, C, Palmer, J et al. (2007). Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 68: 1284–1289.
- Imlay JA & S Linn. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240(4857): 1302-1309.
- Jackson, M.J., Jones, D.A., Edwards, R.H., 1984. Techniques for studying free radical damage in muscular dystrophy. *Med. Biol.* 62 (2), 135–138.
- Jackson, M. J. (2011). Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxidants & redox signaling*, 15(9), 2477-2486.

- Järvinen, T. A., Järvinen, T. L., Kääriäinen, M., Kalimo, H., & Järvinen, M. (2005). Muscle injuries. *The American journal of sports medicine*, 33(5), 745-764.
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849-C868.
- Jongpiputvanich S, Sueblinvong T, Norapucsunton T (2005) Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular diseases. *J Clin Neurosci* 12(4):426–428
- Kahleova, H., Matoulek, M., Malinska, H., Oliyarnik, O., Kazdova, L., Neskudla, T., & Pelikanova, T. (2011). Vegetarian diet improves insulin resistance and oxidative stress markers more than conventional diet in subjects with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 28(5), 549-559.
- Kaplan, J.C., Hamroun, D., 2014. The 2015 version of the gene table of neuromuscular disorders. *Neuromuscul. Disord.* 24, 1123–1153.
- Kar, N.C., Pearson, C.M., 1979. Catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and thiobarbituric acid-reactive products in normal and dystrophic human muscle. *Clin. Chim. Acta* 94 (3), 277–280.
- Kaczor, J.J., Hall, J.E., Payne, E., Tarnopolsky, M.A., 2007. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdxmice. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 145–154.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kim, M. K., Cho, S. W., & Park, Y. K. (2012). Long-term vegetarians have low oxidative stress, body fat, and cholesterol levels. *Nutrition research and practice*, 6(2), 155-161.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., & Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH Kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908-13914.
- Klinge, L., Aboumoussa, A., Eagle, M., Hudson, J., Sarkozy, A., Vita, G., ... & Lochmüller, H. (2010). New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 81(9), 946-953.
- Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., & Baer-Dubowska, W. (2017). The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacological reports*, 69(3), 393-402.
- Laval, S. H., & Bushby, K. M. D. (2004). Limb-girdle muscular dystrophies—from genetics to molecular pathology. *Neuropathology and applied neurobiology*, 30(2), 91-105.
- Lek, A., Evesson, F. J., Sutton, R. B., North, K. N., & Cooper, S. T. (2012). Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic*, 13(2), 185-194.
- Lerario, A., Cogiமானian, F., Marchesi, C., Belicchi, M., Bresolin, N., Porretti, L., & Torrente, Y. (2010). Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC musculoskeletal disorders*, 11(1), 157.
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 253-278.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 186, 464-478.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.
- Linssen, W. H., Notermans, N. C., Van der Graaf, Y., Wokke, J. H., Van Doorn, P. A., Höweler, C. J., ... & De Visser, M. (1997). Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain*, 120(11), 1989-1996.

- Liu, D. F., Wang, D., & Stracher, A. (1990). The accessibility of the thiol groups on G-and F-actin of rabbit muscle. *Biochemical Journal*, 266(2), 453-459.
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., ... & Bohlega, S. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature genetics*, 20(1), 31-36.
- Lostal et al (2010). Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Human molecular genetics*, 19(10), 1897-1907.
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 401-426.
- MacIntosh, B. R., Holash, R. J., & Renaud, J. M. (2012). Skeletal muscle fatigue—regulation of excitation–contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. *J Cell Sci*, 125(9), 2105-2114.
- Manzur, A. Y., & Muntoni, F. (2009). Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *Postgraduate medical journal*, 85(1009), 622-630.
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 424(1): 83-95.
- Marnett LJ. 2002. Oxyl radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182: 219-222.
- Mathangi, D. C., Shyamala, R., & Subhashini, A. S. (2012). Effect of REM sleep deprivation on the antioxidant status in the brain of Wistar rats. *Annals of neurosciences*, 19(4), 161.
- McArdle, W. D., Katch, F. I., & Katch, V. L. (2010). *Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance*. Lippincott Williams & Wilkins.
- McNeil, A. K., Rescher, U., Gerke, V., & McNeil, P. L. (2006). Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *Journal of biological chemistry*, 281(46), 35202-35207.
- McGeachie, J. K., & Grounds, M. D. (1995). Retarded myogenic cell replication in regenerating skeletal muscles of old mice: an autoradiographic study in young and old BALBc and SJL/J mice. *Cell and tissue research*, 280(2), 277-282.
- McNeil, P. L., & Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), 499-505.
- Mechler, F., Imre, S., Dioszeghy, P., 1984. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 63 (3), 279–283.
- Medved, I., Brown, M. J., Bjorksten, A. R., Murphy, K. T., Petersen, A. C., Sostaric, S., ... & McKenna, M. J. (2004). N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *Journal of Applied Physiology*, 97(4), 1477-1485.
- Mellgren, R. L., Zhang, W., Miyake, K., & McNeil, P. L. (2007). Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane. *Journal of biological chemistry*, 282(4), 2567-2575.
- Mercuri, E., & Muntoni, F. (2013). Muscular dystrophies. *The Lancet*, 381 (9869), 845-860.
- Mitchell, C. A., Grounds, M. D., & Papadimitriou, J. M. (1995). The genotype of bone marrow-derived inflammatory cells does not account for differences in skeletal muscle regeneration between SJL/J and BALB/c mice. *Cell and tissue research*, 280(2), 407-413.

- Mollica, J. P., Dutka, T. L., Merry, T. L., Lamboley, C. R., McConell, G. K., McKenna, M. J., ... & Lamb, G. D. (2012). S-Glutathionylation of troponin I (fast) increases contractile apparatus Ca²⁺ sensitivity in fast-twitch muscle fibres of rats and humans. *The Journal of physiology*, 590(6), 1443-1463.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B., & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, 12(1), 75-92.
- Montero, M. (1996). Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 57, No. 4, pp. 278-281).
- Moylan, J. S., & Reid, M. B. (2007). Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle & nerve*, 35(4), 411-429.
- Paolinelli C, González M. Epidemiología de la discapacidad en Chile, niños y adultos. *Rev Med Clin Condes* 2014; 25 (2): 177-82.
- Papadimitriou, J. M., Robertson, T. A., Mitchell, C. A., & Grounds, M. D. (1990). The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers. *Journal of structural biology*, 103(2), 124-134.
- Paradas, C, González-Quereda, L, De Luna, N, Gallardo, E, García-Consuegra, I, Gómez, H et al. (2009). A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* 19: 21–25.
- Pinto, J. R., de Sousa, V. P., & Sorenson, M. M. (2011). Redox state of troponin C cysteine in the D/E helix alters the C-domain affinity for the thin filament of vertebrate striated muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(4), 391-397.
- Potgieter, M., Pretorius, E., Van der Merwe, C. F., Beukes, M., Vieira, W. A., Auer, R. E. G., ... & Meyer, S. (2011). Histological assessment of SJL/J mice treated with the antioxidants coenzyme Q10 and resveratrol. *Micron*, 42(3), 275-282.
- Porter, J. D., Khanna, S., Kaminski, H. J., Rao, J. S., Merriam, A. P., Richmonds, C. R., ... & Andrade, F. H. (2002). A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Molecular Genetics*, 11(3), 263-272.
- Powers, S. K., Talbert, E. E., & Adihetty, P. J. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 589(9), 2129-2138.
- Prochniewicz, E., Spakowicz, D., & Thomas, D. D. (2008). Changes in Actin Structural Transitions Associated with Oxidative Inhibition of Muscle Contraction†. *Biochemistry*, 47(45), 11811-11817.
- Prütz, W. A. (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Archives of biochemistry and biophysics*, 332(1), 110-120.
- Putkey, J. A., Dotson, D. G., & Mouawad, P. (1993). Formation of inter- and intramolecular disulfide bonds can activate cardiac troponin C. *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 6827-6830.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(5), 463-488.
- Radley, H. G., & Grounds, M. D. (2006). Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiology of disease*, 23(2), 387-397.
- Rando, T. A. (2002). Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 81(11), S175-S186.
- Ragusa, R.J., Chow, C.K., Porter, J.D., 1997. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 7 (6–7), 379–380.
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.

- Reid, M. B. (2001). Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of Applied Physiology*, 90(2), 724-731.
- Renjini, R., Gayathri, N., Nalini, A., & Bharath, M. S. (2012). Oxidative damage in muscular dystrophy correlates with the severity of the pathology: role of glutathione metabolism. *Neurochemical research*, 37(4), 885-898.
- Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1), 15-20.
- Rocha, C. T., & Hoffman, E. P. (2010). Limb-girdle and congenital muscular dystrophies: current diagnostics, management, and emerging technologies. *Current neurology and neuroscience reports*, 10(4), 267-276.
- Romay, C., Pascual, C., Lissi, E.A. (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz. J. Med. Biol.* 29, 175-183.
- Root, D. D., & Reisler, E. (1992). Cooperativity of thiol-modified myosin filaments. ATPase and motility assays of myosin function. *Biophysical journal*, 63(3), 730.
- Rowe, L. A., Degtyareva, N., & Doetsch, P. W. (2008). DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(8), 1167-1177.
- Saladin, K. (2007). *Anatomy and Physiology. The Unity of Form and Function*. New York, USA, McGraw-Hill Higher Education.
- Schraufstatter, I. U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P. A., Jackson, J. H., Quehenberger, O., & Cochrane, C. (1990). Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *The Journal of clinical investigation*, 85(2), 554-562.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213-219.
- Smith, M. A., & Reid, M. B. (2006). Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respiratory physiology & neurobiology*, 151(2), 229-241.
- Sohal RS. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology & Medicine* 33(1): 37-44.
- Song, D. W., Lee, J. G., Youn, H. S., & Eom, S. H. (2011). Ryanodine receptor assembly: a novel systems biology approach to 3D mapping. *Progress in biophysics and molecular biology*, 105(3), 145-161.
- Spikes JD. (1989). Photosensitization. In: Smith KC (ed). *The Science of Photobiology*, pp. 79-110. Plenum Press, New York.
- Steinhardt, R. A., Bi, G., & Alderton, J. M. (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science*, 263(5145), 390-393.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Grounds, M. D., & Arthur, P. G. (2012). N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis. *Neuromuscular Disorders*, 22(5), 427-434.
- Tiago, T., Simao, S., Aureliano, M., Martín-Romero, F. J., & Gutiérrez-Merino, C. (2006). Inhibition of skeletal muscle S1-myosin ATPase by peroxynitrite. *Biochemistry*, 45(11), 3794-3804.
- Tidball, J. G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(2), R345-R353.

- Tidball, J. G., & Wehling-Henricks, M. (2007). The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *Journal of Applied Physiology*, 102(4), 1677-1686.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-189.
- Van der Horst, A., & Burgering, B. M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(6), 440.
- Van Enckevort, P., Van Kessel, K. P. M., Van Dijk, H., & Labadie, R. P. (1988). Evidence that superoxide-anion, produced by PMA-activated human polymorphonuclear leukocytes, is the cytolytic agent for rabbit, but not for sheep red blood cells. *Immunology Letters*, 18(2), 139-144.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Verkhatsky, A. (2007). Calcium and cell death. In *Calcium Signalling*
- Williamson, J. M., Boettcher, B., & Meister, A. (1982). Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(20), 6246-6249
- Wolff, S. P., Garner, A., & Dean, R. T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), 27-31.
- Whitehead, N. P., Pham, C., Gervasio, O. L., & Allen, D. G. (2008). N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *The Journal of physiology*, 586(7), 2003-2014.
- Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Froehner, S. C., & Allen, D. G. (2010). Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS one*, 5(12), e15354.
- Ueyama, H., Kumamoto, T., Nagao, S. I., Masuda, T., Horinouchi, H., Fujimoto, S., & Tsuda, T. (2001). A new dysferlin gene mutation in two Japanese families with limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Neuromuscular Disorders*, 11(2), 139-145.
- Urtizberea, J. A., Bassez, G., Leturcq, F., Nguyen, K., Krahn, M., & Levy, N. (2008). Dysferlinopathies. *Neurology India*, 56(3), 289.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(1), 6-20.
- Zar J. 1999. *Biostatistical Analysis*, 663 pp. Prentice Hall, New Jersey.
- Zelickson BR, SW Ballinger, LJ Dell'Italia, J Zhang & M Darley-Usmar. (2013). Reactive oxygen and nitrogen species: interactions with mitochondria and pathophysiology. In: Lennarz WJ & MD Lane (eds). *Encyclopedia of Biological Chemistry*, pp. 17-22. Academic Press, Burlington.
- Zissimopoulos, S., Docrat, N., & Lai, F. A. (2007). Redox sensitivity of the ryanodine receptor interaction with FK506-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 6976-6983.

10. ANEXOS



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para
la Investigación con Animales

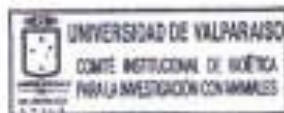
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA080-2016

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 29 de abril de 2016, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA058-2016 titulado "Rol de disterlina en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y su impacto en el tráfico de vesículas y reparación muscular en distrofia muscular asociada a mutaciones en disterlina", de la investigadora responsable Ana María Cárdenas, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso y que se presentó a concurso Fondecyt regular 2016 de Conicyt.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.




Chita Guisado Aránguiz

Presidente

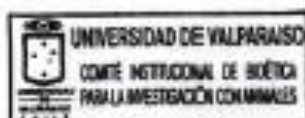
Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales


Blanco 337, Valparaíso | Fono-Fax: +56 (32) 2003184
www.uv.cl

**ADENDUM
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA
BEA080-2016**

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 16 de diciembre de 2016, declara haber evaluado el protocolo de Mantención de animales del proyecto BEA058-2016 titulado "Rol de disferlina en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y su impacto en el tráfico de vesículas y reparación muscular en distrofia muscular asociada a mutaciones en disferlina", de la investigadora responsable Ana María Cárdenas, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso y que se presentó a concurso Fondecyt Regular 2016 de Conicyt.

II. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo de Mantención de animales dentro del marco del proyecto evaluado.




Chila Gulsado Aránguiz

Presidente

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

Valparaíso, diciembre 20 de 2016