

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS –
UNIFAL-MG**

BEATRIZ GODINHO NASCIMENTO

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
FRACIONADO DA SOJA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DISTRÓFICO DE
CAMUNDONGOS MDX.**

ALFENAS/ MG

2025

BEATRIZ GODINHO NASCIMENTO

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
FRACIONADO DA SOJA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DISTRÓFICO DE
CAMUNDONGOS MDX.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Túlio de Almeida Hermes.

ALFENAS/ MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Nascimento, Beatriz Godinho .

Estudo do potencial efeito antioxidante do extrato fracionado da soja no músculo esquelético distrófico de camundongos *mdx* / Beatriz Godinho Nascimento. - Alfenas, MG, 2025.

83 f. : il. -

Orientador(a): Túlio de Almeida Hermes.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Estresse oxidativo. 2. Isoflavonas da soja. 3. Camundongo *mdx*. 4. Distrofia Muscular de Duchenne. 5. Fitoestrógenos. I. Hermes, Túlio de Almeida, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

BEATRIZ GODINHO NASCIMENTO

ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO FRACIONADO DA SOJA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DISTRÓFICO DE CAMUNDONGOS MDX.

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicada à Saúde

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Túlio de Almeida Hermes

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Matheus Perez

Instituição: Universidade São francisco

Profa. Dra. Luciana Azevedo

Instituição:

Universidade federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por Túlio de Almeida Hermes, Professor do Magistério Superior, em 20/02/2025, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador 1441763 e o código CRC 4C0C9B01.

“Quando algo é importante o suficiente, você realiza, mesmo que as chances não estejam a seu favor.”

Elon Musk

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos, me guiando e direcionando na direção do melhor caminho, sempre. Sou grata por todas as bênçãos, acalento nos dias difíceis e amor incondicional. Que eu continue sendo um reflexo do Teu amor e da Tua bondade no mundo.

À minha família que sempre acreditou em mim e me apoiou. Um agradecimento especial à minha mãe, Mônica, e à minha irmã, Marcella, que desde sempre me ofereceram todo o suporte e o acolhimento de que eu precisava. Mais do que isso, vocês acreditaram, me apoiaram e viveram comigo cada passo rumo à realização dos meus sonhos. Também deixo minha gratidão ao meu sobrinho Augusto, que, com sua inocência, sempre trouxe calma e conforto ao meu coração inquieto.

Ao meu orientador, professor Túlio, minha gratidão por sua paciência, apoio, dedicação e confiança que foram fundamentais ao longo da realização deste trabalho. Espero ter conseguido expressar, como sua aluna e colega de profissão, o quanto admiro sua trajetória e o quanto sou grata por ter acreditado em mim, mesmo quando eu ainda era apenas uma iniciante cheia de vontade de aprender.

Todo meu carinho e agradecimento aos colegas de graduação, pós graduação e laboratórios que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à UNIFAL por ter sido a instituição formadora de familiares e por conceder a bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Pós-Graduação (PIB-PÓS) e ao Programa de Biociências Aplicadas à Saúde (PPGB) por me mostrar tantas versões diferentes do mundo.

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ/processo 402493/2021-4); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP n. Proc.: 2023/05097-4).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O influxo de cálcio é um dos principais mecanismos envolvidos na degeneração muscular na distrofia muscular de Duchenne (DMD). O excesso de cálcio no citoplasma das células musculares distróficas acumula-se nas mitocôndrias. Esse processo intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando estresse oxidativo e inflamação. Em camundongos mdx, a genisteína demonstrou efeitos antioxidantes e benefícios superiores quando administrada como parte do Ex-EtOH 70%, em comparação à genisteína isolada. Este estudo investiga o efeito antioxidante do extrato fracionado de soja contendo 2 mg/kg de genisteína no músculo distrófico de camundongos mdx. Foram realizadas as seguintes técnicas: análise da toxicidade do extrato fracionado da soja (AST e ALT); análise de CK; análise histopatológica de fígado e rins; avaliação de força antes, durante e após os tratamentos; quantificação dos grânulos de lipofuscina dos músculos e análise da área de DHE dos músculos BB, DIA, TA e EDL; níveis de CAT, SOD2, NF- κ B e 4-HNE dos músculos BB e DIA; dosagem de GSH do músculo BB, DIA, TA e EDL; análise de área de inflamação e macrófago dos músculos BB, DIA, TA e EDL; quantificação de fibras positivas ao IgG e quantificação de fibras com núcleo central dos músculos BB, DIA, TA e EDL. O Ex-EtOH 70% rico em isoflavonas não teve efeito tóxico em camundongos mdx e atenuou o dano muscular (aumentou a força muscular e reduziu os níveis de IgG-positivo (21%-BB; 65,7%-DIA; 50,6%-TA e 37%-EDL) e CK (92,5%)), o processo inflamatório (reduziu NF- κ B (58,2%-BB; 46,9%-DIA)), área inflamatória (7,9%-BB; 44,6%-DIA e 8,3%-TA) e de macrófagos (21,3%-BB e 89,2%-DIA)) e o estresse oxidativo ((reduziu a produção de EROS (19,1%-BB e 62,4%-DIA), 4-HNE (18,1%-BB), lipofuscina (67,7%-BB; 46,9%-DIA; 60,8%-TA e 33,2%-EDL) e aumentou os níveis de catalase e GSH (37,2% e 58,5%-BB)); e modulou a regeneração (aumento de núcleos centralizados (11,4%-BB; 120,1%-DIA; 11%-TA e 25,7%-EDL). O Ex-EtOH 70% rico em isoflavonas demonstrou ser seguro e benéfico no modelo de camundongo mdx, promovendo melhora na função muscular e redução da miopatia.

Palavras Chaves: estresse oxidativo; fitoestrógeno; isoflavonas de soja; distrofia muscular de Duchenne; camundongos *mdx*.

ABSTRACT

Calcium influx is one of the main mechanisms involved in muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Excess calcium in the cytoplasm of dystrophic muscle cells accumulates in the mitochondria, This process intensifies the production of reactive oxygen species (ROS), triggering oxidative stress and inflammation. In mdx mice, genistein demonstrated superior antioxidant effects and benefits when administered as part of soy extract, compared to genistein alone. This study investigates the antioxidant effect of fractionated soy extract containing 2 mg/kg genistein on dystrophic muscle of mdx mice. The following techniques were performed: analysis of the toxicity of fractionated soy extract (AST and ALT); CK analysis; histopathological analysis of liver and kidneys; strength assessment before, during and after treatments; quantification of lipofuscin granules in muscles and analysis of the DHE area of the BB, DIA, TA and EDL muscles; levels of CAT, SOD2, NF- κ B and 4-HNE in the BB and DIA muscles; GSH dosage in the BB, DIA, TA and EDL muscles; analysis of the inflammation and macrophage area of the BB, DIA, TA and EDL muscles; quantification of IgG-positive fibers and quantification of fibers with a central nucleus in the BB, DIA, TA and EDL muscles. Isoflavone-rich soybean extract had no toxic effect in mdx mice and attenuated muscle damage (increased muscle strength and reduced IgG-positive (21%-BB; 65.7%-DIA; 50.6%-TA and 37%-EDL) and CK (92.5%) levels), the inflammatory process (reduced NF- κ B (58.2%-BB; 46.9%-DIA)), inflammatory area (7.9%-BB; 44.6%-DIA and 8.3%-TA) and macrophages (21.3%-BB and 89.2%-DIA)) and oxidative stress ((reduced the production of ROS (19.1%-BB and 62.4%-DIA), 4-HNE (18.1%-BB), lipofuscin (67.7%-BB; 46.9%-DIA; 60.8%-TA and 33.2%-EDL) and increased catalase and GSH levels (37.2% and 58.5%-BB)); and modulated regeneration (increased centralized nuclei (11.4%-BB; 120.1%-DIA; 11%-TA and 25.7%-EDL)). Soy extract rich in isoflavones proved to be safe and beneficial in the mdx mouse model, promoting improved muscle function and reducing myopathy.

Keywords: oxidative stress; phytoestrogen; soy isoflavones; Duchenne muscular dystrophy; mdx mice.

LISTA DE SIGLAS

4-HNE	4-Hidroxinoneal
AAV	Vetor Viral Adeno Associado
AST	Aspartato Aminotransferase
BAX	Regulador Apoptótico
BSA	Bovine Serum Albumine
C57BL/10	Camundongo controle
CA ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CDG	Complexo Distrofina-Glicoproteínas
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comissão Etica no Uso de Animais
CID	Dissociação Induzida Por Colisão
CK	Creatina quinase
COBEA	Colegio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Cicloxigenase 2
Ctrl	Grupo Controle C57BL/10
CypD	Ciclofina D
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DHE	Reação Dihydroetídeo
DIA	Músculo Diafragma
DMD	Distrofia Muscular De Duchenne
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ER β	Receptor Estrogênico Beta
ERE	Elemento Responsivo Ao Estrógeno
EROs	Espécies Reativas De Oxigênio
ERs	Receptores Estrogênicos
ESI	Ionização Por Electrospray
Ex-EtOH 70%	Extrato Seco Hidroetanólico 70%

Fe ²⁺	Ferro
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido De Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IgG	Imunoglobulina G
IκB-α	I-Kappa-B-Alpha
IKK	Inibidor Do Fator De Transcrição Kappa B
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
i-NOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP	Intraperitoneal
Kappa-β	Fator Nuclear
kDa	Kilodalton
Lipo	Lipofuscina
LOOH	Peróxido Lipídico
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas Por Mitógenos
MC	Massa Corporal
<i>Mdx</i>	Camundongo Murine Dystrophin X-Linked
<i>mdxCT</i>	Grupo Mdx Tratado Com Salina
<i>mdxP</i>	Grupo Mdx Tratado Com Prednisona
<i>mdxS</i>	Grupo Mdx Tratado Com Extrato Fracionado De Soja
MeOH	Metanol
MeOH/ H ₂ O	Metanol/ Água
MMPS	Matriz Metaloproteinase
NF-κB	Fator De Transcrição Nuclear

O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{·-}	Ânion Radical Superóxido
OH [°]	Radical Hidroxila
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão Fosfato Salina)
PTP	Poros De Transição De Permeabilidade
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA Mensageiro
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
S-equol	[7-Hidroxi-3-(4'-Hidroxifenil)-Cromano]
SERMS	Moduladores Seletivos Dos Receptores De Estrógeno
SOD	Superóxido Dismutase
SPE	Extração Em Fase Sólida
TBS-T	Tris-Buffered Saline - Tween 20
TNF- α	Fator De Necrose Tumoral Alfa
TPM	Tensão De Permeabilidade Mitocondrial
UFLC	High-Performance Liquid Chromatography
UNIFAL	Universidade Federal De Alfenas
VDAC	Canais Iônicos Voltagem Dependentes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	14
1.2	HIPÓTESE MECÂNICA E RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
1.3	MODELO MURINO DA DMD: A LINHAGEM MDX.....	19
1.4	INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NO FENÓTIPO DA DMD	20
1.5	FITOESTRÓGENOS (FITOSERMS).....	21
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO FRACIONADO DE SOJA E SUA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	27
4.1.1	<i>Análises químicas por espectrometria de massas (HPLC-ESI-IT-Sn e FIA-ESI-IT-MSn).....</i>	27
4.2	ANIMAIS.....	28
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	29
4.4	FORÇA MUSCULAR DOS MEMBROS.....	30
4.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CREATINA QUINASE (CK) E AMINOTRANSFERASES (ALT E AST).....	31
4.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO E RINS.....	32
4.7	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	33
4.7.1	Coloração com Hematoxilina e Eosina – H&E.....	33
4.7.2	Anticorpo Anti-Mouse IgG-FITC.....	33
4.7.3	Anticorpo F4/80.....	34
4.7.4	Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical ânion superóxido – O₂⁻).....	34
4.7.5	Contagem de lipofuscina.....	35

4.8	QUANTIFICAÇÃO DE CAT, SOD2, NF-KB E 4-HNE POR WESTERN BLOTTING.....	35
4.9	DOSAGEM DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA – GSH.....	36
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6	RESULTADOS	39
6.1	PERFIL QUÍMICO DO Ex-EtOH 70%.....	39
6.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM EX-ETOH 70% NO CAMUNDONGO MDX.....	42
6.3	EFEITO NA FORÇA MUSCULAR.....	45
6.4	EFEITO NA LESÃO MUSCULAR	46
6.5	EFEITO DO Ex-EtOH 70% NO ESTRESSE OXIDATIVO.....	46
6.6	EFEITO DO Ex-EtOH 70% NO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	53
6.7	EFEITO DO Ex-EtOH 70% NA DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO.....	56
7	DISCUSSÃO.....	59
8	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE






A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética progressiva que provoca a degeneração da musculatura esquelética, afetando predominantemente indivíduos do sexo masculino (Bonfante *et al.*, 2024; Caromano, 1999). Por ser ligado ao cromossomo X, é mais frequentemente manifestada no sexo masculino, afetando aproximadamente 1 em cada 3500-6000 nascidos vivos (Mendell, Shilling *et al.*, 2012). Essa condição resulta de mutações no gene DMD, localizado no cromossomo X, que comprometem a produção de distrofina, uma proteína essencial para a integridade muscular (Campos *et al.*, 2024).

A doença é caracterizada por fraqueza muscular progressiva iniciada na primeira infância, com dificuldade para ficar de pé por volta dos 2 a 3 anos de idade, dependência de cadeira de rodas por volta dos 10 a 12 anos de idade, necessidade de ventilação assistida no final da segunda década de vida e morte por insuficiência cardiorrespiratória entre 20 e 40 anos de idade (Duan *et al.*, 2021; Figura 1).

A causas genéticas da DMD estão relacionadas a mutações no braço curto do cromossomo X (lócus Xp21), que afetam a expressão da distrofina, proteína que desempenha função estrutural no sarcolema das fibras musculares, garantindo estabilidade às fibras musculares para suportar as tensões mecânicas geradas durante os ciclos de contração e relaxamento muscular (Biggar *et al.*, 2022; Bogdanovich *et al.*, 2004).

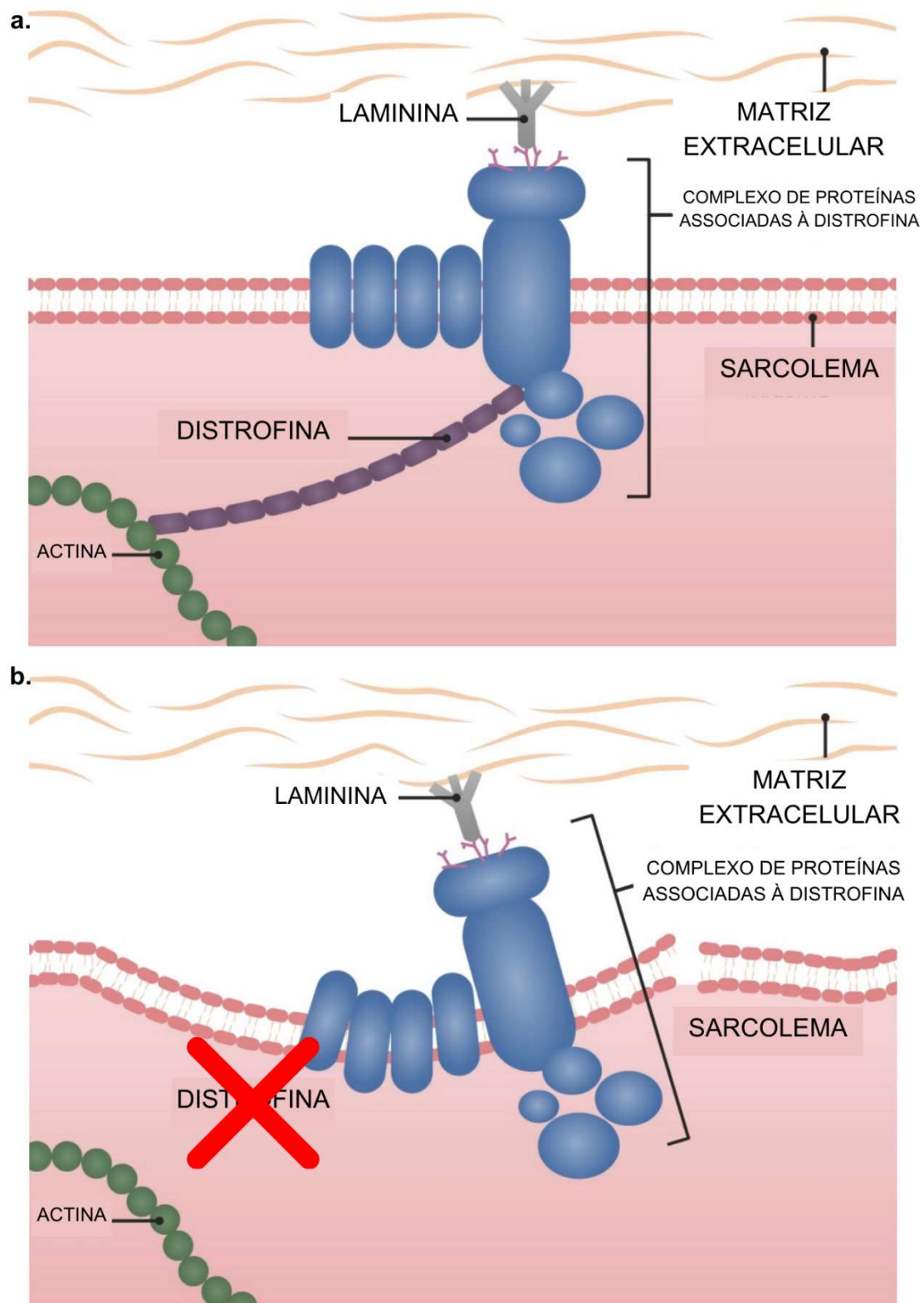
Na DMD, a ausência da distrofina causa o colapso funcional entre as proteínas do citoesqueleto e a matriz extracelular. Isso resulta em instabilidade do sarcolema durante as contrações musculares, levando a desequilíbrios na homeostase intracelular de cálcio, hiper contração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e, por fim, necrose das fibras musculares (Bogdanovich *et al.*, 2004; Bonfant *et al.*, 2024; Figura 2).

Figura 1 - Evolução da Distrofia Muscular de Duchenne.

ESTÁGIO	IDADE	CARACTERÍSTICAS
 Pré sintomático	Nascimento aos 2 anos	Pode ter atrasos nos marcos motores
 Inicial dos sintomas	~ 2 a 6 anos	Dificuldade para sentar, pular e subir escadas. Atraso motor.
 De transição	~ 6 a 9 anos	Dificuldade para andar. Sinal de Gowers e marcha na ponta dos pés.
 Inicial de perda de marcha	~ 10 a 12 anos	Fraqueza intensa nas pernas, mas capacidade de usar os braços (escrever, comer). Aparecimento da escoliose.
 Tardio	~ 20 a 40 anos	Problemas respiratórios e cardíacos. Ajuda para atividades de vida diária.

Fonte: Adaptado de Movimento Duchenne, 2021.

Figura 2 - Papel da Distrofina na Integridade do Sarcolema: Comparação entre a Estrutura Normal e a Deficiência na Distrofia Muscular



Fonte: Adaptado de Lecturio, 2022.

Legenda: **(a)** Distrofina mantendo a ligação do complexo proteico associado à distrofina ao citoesqueleto da célula muscular; **(b)** instabilidade celular devido à ausência da distrofina.

1.2 HIPÓTESE MECÂNICA E RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO.

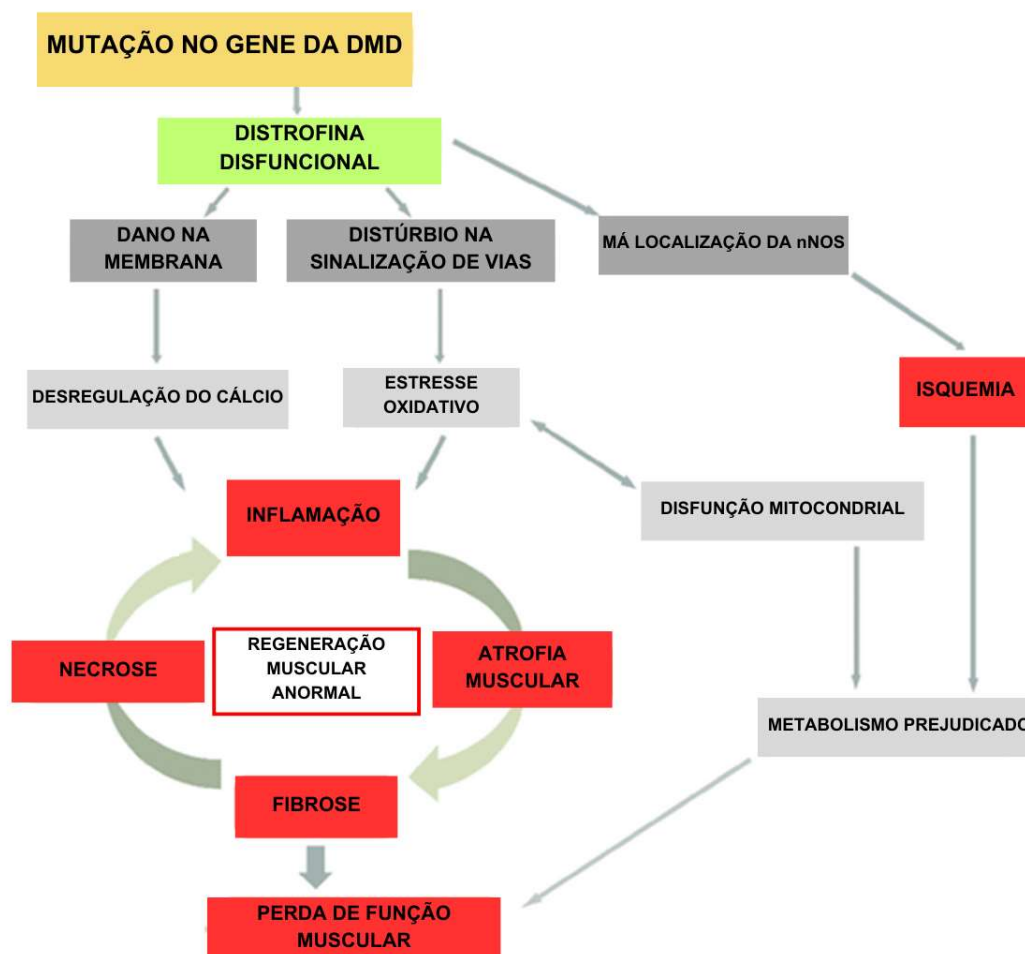
Algumas hipóteses procuram explicar os mecanismos que levam à degeneração muscular nos músculos distróficos, dentre estas destaca-se a hipótese mecânica, a qual sugere que os músculos se tornem susceptíveis à lesão durante os ciclos de contração e relaxamento, devido a deficiência de ligação entre os meios intra e extracelular pela ausência da distrofina (Engel, Yamamoto *et al.* 1998). Em virtude desta fragilidade, ocorrem áreas de descontinuidade do sarcolema, permitindo a passagem de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, como a enzima creatina quinase (CK) e do meio extracelular para o meio intracelular, como o cálcio (Engel, Yamamoto *et al.* 1998). O acúmulo intracelular de cálcio resulta na captação anormal deste pela mitocôndria, ocasionando aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Brookes, Yoon *et al.* 2004). A forma reduzida do oxigênio molecular, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é a primeira classe das EROs produzida, formado a partir da transferência incompleta de elétrons do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (Trachootham *et al.* 2008). Por não atravessar facilmente as membranas celulares, normalmente permanece confinada na matriz mitocondrial (Evans, 2000). No entanto, o $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer dismutação espontânea ou por ação enzimática da Superóxido dismutase (SOD), levando à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao contrário do $O_2^{\bullet-}$, possui a capacidade de atravessar facilmente as membranas biológicas (Droge, 2002; Fridovich 1995). O H_2O_2 formado, é também potencialmente perigoso, pois a partir da oxidação de metais de transição que se encontram livremente disponíveis na célula, como o ferro (Fe^{2+}), pode produzir o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Reação de Fenton) (Barreiros and David, 2006).

O OH^{\bullet} causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA, ele afeta tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA e quando produzido perto de uma membrana, os lipídeos podem ser oxidados por ele e iniciar uma reação em cadeia com radicais livres, que danificam a membrana, gerando no final um peróxido lipídico (LOOH). Um dos perigos da peroxidação lipídica além do dano à membrana é a produção de subprodutos, tais como 4-hidróxi-2-nonenal (4-HNE) (Barreiros and David, 2006; Forman, Zhang *et al.* 2009).

A produção de EROs como parte integrante do metabolismo humano é normalmente controlada por um eficiente sistema antioxidante composto por enzimas (Superóxido Dismutase, SOD; Catalase, CAT e Glutathione Peroxidase, GPx) e substâncias protetoras não enzimáticas (inclui especialmente compostos de origem dietética, dentre os quais se destacam as vitaminas, minerais e compostos fenólicos). Algumas dessas enzimas atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radiculares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os (de Zwart, Meerman *et al.*, 1999). No entanto, em condições de exaustão como observado na DMD, é criado um estado de estresse oxidativo, levando a danos no sistema biológico (Vasconcelos, 2007). Associado a este processo, a resposta inflamatória, a qual é bastante pronunciada na DMD, vem sendo considerada um mecanismo de ordem secundária, que contribui para a progressão da doença (Hodgetts, Radley *et al.*, 2006), dando lugar ao estresse oxidativo, como um dos eventos iniciais e desencadeadores da mionecrose (Whitehead, Yeung *et al.*, 2006; Figura 3). Estudos demonstram aumento expressivo de indicadores oxidativos antes mesmo dos 2 anos de idade em pacientes distróficos e das 4 semanas de idade em camundongos mdx (Nakae, Stoward *et al.*, 2004).

As EROs em altas concentrações ativam a enzima IKB-kinase (IKK), que induz a ativação do NF- κ B a partir fosforilação da sua proteína inibitória (IKB- α) (Ghosh and Hayden, 2008; Ogihara, Asano *et al.*, 2004,). Desta forma, o NF- κ B se transloca para o núcleo, ativando processos de transcrição de diversos genes relacionados à inflamação, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), moléculas de adesão, matriz metaloproteinase (MMPs), cicloxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) (Tak and Firestein, 2001). Evidências indicam também o envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) na patogênese da inflamação; particularmente no animal distrófico, observa-se uma up-regulação dessas proteínas (Nakamura, Yoshida *et al.*, 2005). Embora as MAPKs possam regular o próprio NF- κ B (Kyriakis and Avruch, 2001), estas proteínas, especificamente a p38, são ativadas diretamente pela produção das EROs (Jia, Wei *et al.*, 2007) regulando a produção de citocinas (Lee, Prabhakar *et al.*, 1994).

Figura 3 - Representação esquemática da DMD.



Fonte: Adaptado de Yao *et al.*, 2021.

1.3 MODELO MURINO DA DMD: A LINHAGEM MDX

O estudo e compreensão destes e demais eventos biológicos ocorridos na DMD tiveram grande avanço com o aparecimento de linhagem de camundongos *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) (Bulfield, Siller *et al.*, 1984). Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos *mdx*, o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD, apresentando também ausência de distrofina, tornando-o um valioso modelo para estudos da DMD. O camundongo *mdx* é o modelo animal preferido da DMD, devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (Tanabe, Esaki *et al.*, 1986). Embora o camundongo *mdx* apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos, além do fato de os

músculos do mdx regenerarem sucessivamente após necrose, pelo menos durante a fase adulta do animal (Cullen and Jaros, 1988). Estudos mostraram que no período entre 21 e 28 dias de vida pós-natal, observa-se extensa área de necrose no músculo tibial anterior destes animais (Shavlakadze, White *et al.*, 2004). A intensa necrose miofibrilar observada neste período providencia um excelente modelo para o estudo de intervenções terapêuticas designadas para prevenir ou reduzir a necrose, uma vez que a redução da miopatia é facilmente identificada (Radley and Grounds, 2006). Entre 35 e 90 dias após o nascimento, a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras. Neste período, encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (Tanabe, Esaki *et al.*, 1986).

1.4 INFLUENCIA DO ESTROGÊNIO NO FENÓTIPO DA DMD

Estudos com camundongos mdx machos e fêmeas sugerem diferenças entre os sexos, principalmente em relação ao metabolismo energético, composição do tipo de fibra e velocidade contrátil (Grounds, Radley *et al.* 2008). Geralmente, os músculos de machos tendem a ser mais rápidos e com maior potência que o das fêmeas, enquanto que os músculos das fêmeas são mais resistentes à fadiga, recuperam-se mais rapidamente das contrações repetidas e apresentam menos danos mecânicos após o exercício (Glenmark, Nilsson *et al.* 2004). Estas diferenças são em grande parte atribuídas aos níveis de estrógeno presentes nas fêmeas (Grounds, Radley *et al.* 2008). Estudos suportam esta hipótese, demonstrando que hormônios femininos, como o estrógeno, podem promover regeneração muscular em lesões musculares esqueléticas tanto em camundongos normais como em mdx (Tiidus 2001, Tiidus, Holden *et al.* 2001). Recentemente, foi demonstrado atenuação de marcadores estruturais e bioquímicos no tecido muscular distrófico de camundongos mdx fêmeas em relação aos machos em resposta ao exercício físico (Hermes, Kido *et al.* 2018).

Esta influência ocorre a partir da interação do hormônio com seus receptores específicos, alpha (ER- α) e beta (ER- β), que atuam como fatores de transcrição através de uma sequência específica do DNA denominada elemento responsivo ao estrogênio (ERE) (Klinge 2001, Klinge, Jernigan *et al.*, 2004). Estudos demonstraram a expressão destes receptores no músculo estriado esquelético (Kalbe, Mau *et al.*, 2007; Lemoine,

Granier *et al.*, 2003; Pfaffl, Lange *et al.*, 2001;). O estrógeno, portanto, a partir da interação com seus receptores, parece exercer ação benéfica nas distrofinopatias. Reforçando esta hipótese, experimentos com cães distróficos já demonstraram que as fêmeas apresentam uma distrofia mais branda em relação aos machos (Valentine, Cooper *et al.*, 1988).

1.5 FITOESTRÓGENOS (FITOSERMS)

Os chamados Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrógeno (Selective Estrogen Receptor Modulators - SERM), possuem a capacidade de se ligar aos ERs e ativar os ERE, localizados na região promotora dos genes alvo de estrogênio, iniciando o processo de transcrição e síntese de RNAm (Diez-Perez, 2006). Dentre os tipos de SERMs existentes, a administração de tamoxifeno em camundongos mdx demonstrou efeito benéfico sobre o tecido muscular esquelético e cardíaco, melhorando as propriedades contráteis do músculo esquelético, favorecendo a regeneração, reduzindo a CK sérica e a fibrose ventricular (Dorchies, Reutenauer-Patte *et al.*, 2013). Apesar destes serem resultados promissores, explicações sobre a prevenção da mionecrose e a modulação das respostas inflamatórias são inconclusivos. Ainda, estudos demonstram que o tamoxifeno pode agir com padrão de resposta inverso na dependência do tecido alvo, podendo atuar como agonista do estrógeno, estimulando a proliferação celular, como visto no endométrio de ratas (Katzenellenbogen, Choi *et al.*, 2000), e no tecido ósseo, produzindo efeitos positivos na osteoporose (Marttunen, Hietanen *et al.*, 1999; Singh, Martin-Hirsch *et al.*, 2008), porém, em contrapartida, no tecido mamário ele age como antagonista, ligando-se aos ER das células cancerígenas inibindo sua proliferação (Sengupta and Jordan, 2008). A dominância do tipo de padrão de resposta, pode estar associado às especificidades funcionais de cada ER. O ER- β desempenha funções importantes na fisiologia de diversos tecidos, além de ser o receptor de estrogênio geralmente mais expresso, enquanto que o ER- α domina em poucos tecidos específicos, estando principalmente envolvido em eventos proliferativos (Bhat-Nakshatri, Wang *et al.*, 2008; Gustafsson, Puntschart *et al.*, 1999,). No tecido muscular esquelético, os ER- α e ER- β são co-expressos no núcleo da célula, mas também se encontram presentes nas células endotelial dos capilares sanguíneos (Wiik, Ekman *et al.*, 2009). No camundongo

mdx, já foi demonstrado aumento da expressão destes receptores em comparação aos camundongos saudáveis (Feder, Rodrigues Barros Godoy *et al.*, 2013).

Assim como os SERMs sintéticos, as isoflavonas, encontradas em grandes quantidades em grãos ou subprodutos da soja, são compostos naturais da família dos flavonoides com propriedades de interação e modulação dos ERs, desempenhando ação mimética ao estrogênio, por esta razão são denominadas de fitoestrógenos ou fitoSERMs (Hernandez, Zhao *et al.*, 2018; Reinli and Block, 1996; Tham, Gardner *et al.*, 1998).

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonoides (Figura 4), encontrados principalmente em leguminosas, como a soja. Estruturalmente, enquanto os flavonoides tradicionais possuem o anel B ligado à posição 2 do anel C, as isoflavonas apresentam essa ligação na posição 3, garantindo propriedades químicas e biológicas específicas (Harborne & Williams, 2000).

Ainda de acordo com estudos de Harborne & Williams (2000), as isoflavonas agrupam um núcleo esquelético baseado no 2-fenilbenzopirano (ou flavano), caracterizado por três anéis:

- a) Anel A (benzeno), derivado do ácido shiquímico, comum em metabólitos secundários de plantas;
- b) Anel B (fenil), ligado à posição 3 do anel C, diferenciando-se estruturalmente dos flavonoides tradicionais;
- c) Anel C (pirona), essencial para a reatividade química e interação biológica.

As principais isoflavonas incluem genisteína, daidzeína e gliciteína, que podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou conjugadas com glicosídeos, sendo estas últimas a forma predominante na natureza. Sua conversão para agliconas no organismo ocorre por hidrólise enzimática no trato gastrointestinal, aumentando a biodisponibilidade e facilitando a interação com receptores hormonais (Setchell *et al.*, 2002).

Dentre as propriedades bioativas, destacam-se os efeitos estrogênicos e antioxidantes. As isoflavonas são opções como fitoestrógenos, devido à semelhança estrutural com o estradiol, o que permite interagir com os receptores de estrogênio α e β . Essa interação pode exercer efeitos moduladores no metabolismo ósseo, na regulação do ciclo celular e na prevenção de doenças hormonais, incluindo câncer de mama e próstata (Messina, 2010).

Além disso, estudos demonstram que as isoflavonas atuam como antioxidantes, inibindo a peroxidação lipídica e diminuindo o estresse oxidativo celular, mecanismo

crucial para a prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Vitale *et al.*, 2013). Sua capacidade de vias modulares de sinalização celular, como MAPK e PI3K/Akt, também tem sido explorada no contexto da oncologia e na busca por novas estratégias terapêuticas contra o câncer (Guo *et al.*, 2015).

O consumo regular de alimentos que contêm isoflavonas de soja biologicamente activas é benéfico para a saúde humana (Chen, 2021; Setchell, 2017). A genisteína e a daidzeína, as formas agliconas das isoflavonas, estão entre as formas predominantes de isoflavonas na soja (Nakai *et al.*, 2020). Na presença de bactérias intestinais, a daidzeína é transformada em S-equol [7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-cromano] (Axelson *et al.*, 1982; Setchell *et al.*, 2002), um metabolito com uma estrutura estrogénica não esteroide e uma afinidade de ligação muito elevada ao ER- β (Setchell *et al.*, 2005). Tanto a genisteína como a daidzeína têm efeitos semelhantes na modulação dos estrogénios (Setchell *et al.*, 2009; Setchell, 2017). As agliconas têm geralmente uma elevada atividade biológica; no entanto, são menos abundantes na soja. Em contrapartida, as formas glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina) estão presentes em grandes quantidades (aproximadamente 95%) e são biodisponíveis após sofrerem hidrólise intestinal e conversão em agliconas (Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023; Nakai *et al.*, 2020).

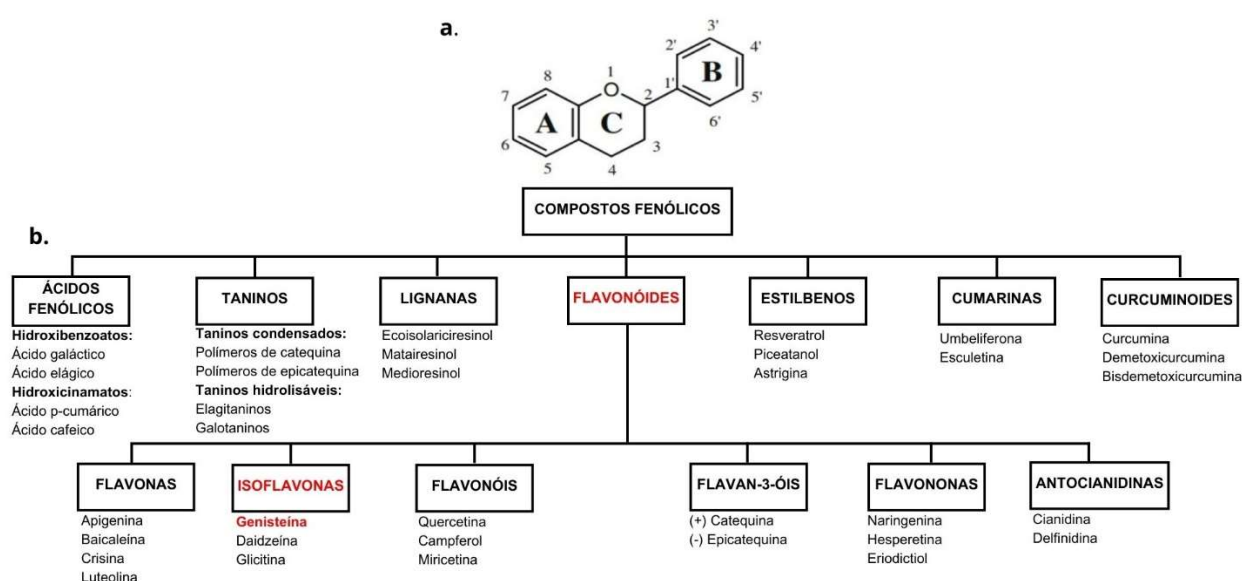
A modulação específica do ER- β pode tornar as mitocôndrias resistentes ao influxo de cálcio, pela inibição da enzima ciclofilina D (CypD) e assim reduzir a produção de EROs e do estresse oxidativo (Burstein, Kim *et al.*, 2018; Millay, Sargent *et al.*, 2008). Em adição, estudos demonstram que as isoflavonas exibem uma atividade antioxidante considerável, que é independente de suas propriedades estrogénicas (Choi, 2009; Moosmann and Behl, 1999; Ruiz-Larrea, Mohan *et al.*, 1997). O aumento da capacidade de enzimas antioxidantes foi descrito na epiderme e intestino delgado de camundongos após administração de genisteína (Amigo-Benavent, Silvan *et al.*, 2008). A suplementação de isoflavonas aumentou a ação antioxidante com atenuação do estresse oxidativo induzido pelo exercício em ratos por meio do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Yoon and Park, 2014).

Estudos preliminares mostram que a administração de 2mg/kg da isoflavona genisteína em camundongos mdx melhora a função muscular associado a atenuação da ativação de fator nuclear kappa-B, MAPKs e ativação de TNF- α , bem como reduz a apoptose (Messina, Bitto *et al.*, 2011, Messina, Bitto *et al.*, 2015). O estudo de Kim *et al.*, (2008) apresenta um caminho promissor e de maior acessibilidade, uma vez que se

verificou que a administração do extrato da soja, contendo quantidade equivalente de genisteína, se mostrou mais potente do que a própria genisteína isolada na inibição da proliferação do câncer de mama em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c (Kim, Jeong *et al.*, 2008).

Sendo assim, é possível que a administração Ex-EtOH 70% apresente efeito positivo frente aos indicadores lesão do músculo distrófico de camundongos mdx pela atividade sinérgicas das isoflavonas totais.

Figura 4 - Classificação dos Compostos Fenólicos: Estrutura e Principais Subgrupos



Fonte: Adaptado de DO CARMO, *et al.*, 2018.

Legenda: **(a)** Estrutura geral do flavano, mostrando a numeração e rotulagem dos anéis; **(b)** Classificação dos compostos fenólicos.

2 JUSTIFICATIVA

Por ser considerada a forma mais grave e comum dentre todas as distrofias musculares, a DMD é foco de diversos estudos que buscam encontrar potenciais terapias para o seu tratamento. Apesar dos avanços científicos nas áreas de terapia genética e celular, até o momento, ainda não há um tratamento efetivo para esta doença. Glicocorticoides sintéticos, como a prednisona, vem sendo vastamente investigados e aceitos como tratamento para a DMD por apresentar significativa melhora da condição danosa destes pacientes (Brooke, Fenichel *et al.*, 1987, Fenichel, Florence *et al.*, 1991, Li, Cai *et al.*, 2013). Porém, esses fármacos podem apresentar efeitos adversos como, ganho de peso, desenvolvimento de catarata e glaucoma, retardo no desenvolvimento ósseo e surgimento de osteoporose, decorrente da perda de osso trabecular, e alterações no metabolismo da glicose, com indução ou agravamento de quadro de diabetes mellitus, quando administrados por um longo período (Ricotti, Ridout *et al.*, 2013). Além destas constatações, a disponibilidade de receptores glicorticóides no músculo esquelético é extremamente baixa quando comparada aos receptores estrogênicos (Feder, Ierardi *et al.*, 2018). Os SERMs já demonstraram efeito benéfico sobre o tecido muscular distrófico (Dorchies, Reutenauer-Patte *et al.*, 2013), porém algumas explicações de seus efeitos são inconclusivas, possivelmente pelas diferentes respostas na interação com todos os tipos de ERs. A modulação do ER- β melhora o influxo exacerbado de cálcio pela inativação da enzima CypD o que pode tornar as mitocôndrias resistentes ao influxo exacerbado intracelular de cálcio (Burstein, Kim *et al.*, 2018, Millay, Sargent *et al.*, 2008). Também, uma vez que o estresse oxidativo se apresenta logo nos estágios primários da degeneração muscular no músculo distrófico (Whitehead, Yeung *et al.*, 2006) e sabendo que atividade antioxidante das isoflavonas já foi comprovada em experimentos tanto *in vitro* e *in vivo* (Ruiz-Larrea, Mohan *et al.*, 1997), a utilização do extrato fracionado da soja em camundongos mdx mostra-se promissora pelos possíveis efeitos benéficos de redução do estresse oxidativo no músculo distrófico pela atividade sinérgica das isoflavonas na modulação dos ERs e regulação da atividade de enzimas antioxidantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar o efeito antioxidante do extrato fracionado da soja sobre músculo distrófico de camundongos mdx.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Verificar o perfil químico do extrato fracionado de soja;
- b) Verificar a toxicidade do tratamento (AST e ALT; avaliação histopatológica dos fígados e rins por coloração H&E);
- c) Verificar o efeito do tratamento na força muscular dos animais (Força muscular dos membros);
- d) Verificar os marcadores de lesão muscular (níveis séricos de CK; marcação com IgG; contagem de núcleos centrais);
- e) Verificar o efeito do tratamento na produção de EROs (determinação da área de DHE);
- f) Verificar o efeito do tratamento no estresse oxidativo crônico (quantificação dos grânulos de lipofuscina);
- g) Verificar o efeito do tratamento na inflamação (quantificação de NF-kB; contagem da área inflamatória; anticorpo F4/80 – detecção de macrófagos);
- h) Verificar o efeito do tratamento na peroxidação lipídica (quantificação dos níveis de 4-HNE);
- i) Verificar o efeito do tratamento no sistema enzimático antioxidante (quantificação dos níveis de SOD, CAT e GSH) nos camundongos mdx;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO FRACIONADO DE SOJA E SUA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.

Os grãos de soja foram adquiridos pela COOPER Natural (Produto orgânico Brasil. Serra Gaúcha); 10 kg; Lote: 26; Fab.25/02/2022; Val.: 25/08/2023. Possui a certificação produto Ecológico ECOVIDA (Anexo 2).

Os grãos de soja foram submetidos à secagem em estufa de circulação e renovação de ar, a 45°C, durante 72 horas, quando apresentaram peso constante nas 3 pesagens consecutivas. Após a secagem, passou por uma divisão grosseira, seguida pela pulverização em moinho de facas. O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulado. O preparo do extrato seco do material vegetal foi realizado pelo método de maceração (Prista *et al.*, 1981), utilizando como líquido extrator, hexano e etanol 70% (v/v). Toda a solução extrativa foi concentrada em rota-evaporador e secas no liofilizador. O extrato seco foi rotulado como extrato seco hidroetanólico 70% (Ex-EtOH 70%).

4.1.1 Análises químicas por espectrometria de massas (HPLC-ESI-IT-MSn e FIA-ESI-IT-MSn)

As análises por HPLC-ESI-IT-MSn e FIA-ESI-IT-MSn foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista (São Vicente-SP), sob colaboração e supervisão do Prof. Dr. Vagner Vilegas e do professor visitante da UNIFAL-MG Prof. Dr. Marcelo José Dias Silva.

O Ex-EtOH 70% foi submetido à etapa de clean-up por extração em fase sólida (SPE) em cartuchos de fase reversa C18 com 500 mg 6 mL⁻¹ (45 µm, Chromabond®). Os cartuchos foram previamente ativados com MeOH (4,5 mL) e equilibrados com H₂O (4,5 mL) e MeOH/H₂O (85:15, v/v) (4,5 mL). O Ex-EtOH 70% (10 mg) foi previamente solubilizados em 1,5 mL da solução MeOH/H₂O (85:15, v/v), eluídos com a mesma proporção de fase móvel. Após a secagem, 2 mg da amostra foi ressuspensa em 2 mL de uma solução MeOH/H₂O (1:1, v/v) fornecendo uma solução com uma concentração

de 1 mg mL⁻¹. Ao fim, as soluções foram filtradas em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm. O perfil químico cromatográfico da amostra foi realizado em um sistema High-performance Liquid Chromatography (UFLC) Shimadzu (Kioto, Japão) acoplado a um detector de arranjo de foto diodo (PDA), modelo MD-2010 (Shimadzu®) e a um espectrômetro de massas Ion Trap (IT) com uma fonte de ionização por Electrospray (ESI) em modo positivo.

As separações em UFLC foram conduzidas em uma coluna Kinetex (Phenomenex®, Torrance, CA, USA) de fase reversa C18 (150 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm). O volume de injeção foi de 1 µL e a vazão de 1 mL min⁻¹. Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente linear com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B), de 5 a 100% (B) em 45 min. A voltagem do capilar foi ajustada para 2500 V e a temperatura do capilar para 300°C. Os experimentos de fragmentação foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) e foram executados no modo auto MSⁿ (fragmentação inteligente) usando o modo UltraScan para aquisição de MS/MS e um aumento de energia de colisão com a máxima amplitude de fragmentação definida para 60%. A faixa de aquisição foi de m/z 100-1800. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo e processados no software DataAnalysis (versão 4.3, Bruker®).

Para a determinação da substância marcadora – genisteína - o Ex-EtOH 70% (5 mg) foi dissolvido em 4 mL de uma solução contendo 90% de ACN/água ultrapura. Volumes de 20, 50 e 100 µL desta solução foram utilizados para a preparação de soluções padrão (1 mL) de concentração de 0,025; 0,0625 e 0.125 mg mL⁻¹, respectivamente. Estas soluções e o material dissolvido foram submetidos a análise por meio de CLAE em coluna analítica em sistema Waters, com coluna C18 marca XBridge (tamanho 15 x 0,46 cm, tamanho da partícula de 5 µm) e com detecção em 259 nm. O gradiente utilizado para essa etapa foi de 5 a 95% de solução B em 30 min com fluxo de 1 mL min⁻¹.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos das linhagens *mdx* e C57BL/10 (camundongos heterozigotos para o gene que desencadeia a DMD e que deram origem à linhagem *mdx*) (Bulfield, Siller *et al.*, 1984), machos, com 14 de vida pós-natal, obtidos de casais mantidos no biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. O

número de animais estipulados está de acordo com as recomendações descritas por Collins e Morgan, 2003; Denayer *et al.*, 2014 e Perrin, 2014 sobre o uso do modelo *mdx* em estudos experimentais. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea 28 dias até o desmame. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração Nuvilab CR-1 e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e será desenvolvido após ser aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG, de protocolo número 0019/ 2021 (Anexo I).

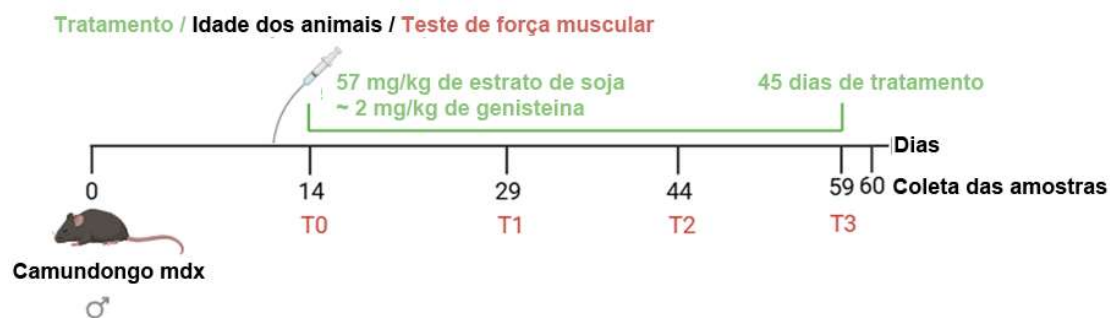
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais com 14 dias de vida foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 4):

- 1) Grupo controle: constituído de 14 camundongos da linhagem C57BL/10 (Ctrl).
- 2) Grupo *mdx* com 14 dias de vida: constituído de 42 camundongos da linhagem *mdx* divididos em 3 subgrupos (n=14 cada).
 - a. Grupo *mdxCT*: camundongo tratado com solução veículo (*mdx*);
 - b. Grupo *mdxP*: camundongo *mdx* tratado com 5 mg/kg de prednisona (Wuebbles, Sarathy et al. 2013);
 - c. Grupo *mdxS*: camundongo *mdx* tratado com 57mg/kg de Ex-EtOH 70% contendo quantidade fracionada mínima de 2 mg/kg de genisteína (Messina, Bitto et al. 2011, Messina, Bitto et al. 2015).

A partir do 14º dia de vida pós-natal, antes do início dos ciclos de degeneração/regeneração muscular nos camundongos *mdx*, os camundongos *mdx* foram pesados e tratados diariamente de Ex-EtOH 70% diluído em solução veículo (solução salina) e/ou prednisona e/ou com solução veículo por gavagem, por 46 dias consecutivos.

Figura 5 – Desenho Experimental



Fonte: Autora – Criado com BioRender.com.

Legenda: Ilustração esquemática do desenho experimental mostrando a idade do animal (em preto), o tratamento com Ex-EtOH 70% rico em isoflavonas (em verde) e o teste de força muscular no primeiro dia antes do tratamento (T0); 15 dias após o início do tratamento (T1); 30 dias após o início do tratamento (T2); fim do tratamento (T3) (em vermelho).

4.4. FORÇA MUSCULAR DOS MEMBROS

Existem várias formas não invasivas para medição da força muscular dos membros que fornecem informações relevantes sobre a fraqueza muscular, coordenação motora, comprometimento neuromuscular e a eficácia do tratamento em vários modelos de camundongos para distúrbios neuromusculares (Carlson *et al.*, 2010). O teste de suspensão pelas quatro patas é uma medida eficiente e confiável, mas, não é possível relacionar o resultado a um único e específico distúrbio neuromuscular (Carlson, 2011).

O teste seguiu o protocolo TREAT-NMD “*Four limb hang test*” (Carlson, 2011). Os animais passaram por três testes, nas semanas 0 (T1), 2 (T2) e 4 (T3) após o início dos tratamentos, e nas semanas equivalentes nos animais do grupo controle.

Sua fácil aplicabilidade e reprodutibilidade permitiram que o teste fosse feito usando topo de gaiola suspensa a 35 cm do solo, com o solo forrado por 5 a 7 centímetros de maravalha, para evitar que os animais se machucassem ao cair (Figura 6; Carlson, 2011). Foram realizados três testes com cada animal, com descanso de dois minutos entre as repetições. Fatores como local e horário de realização e aplicador do teste foram os mesmos para obtenção de valores confiáveis.

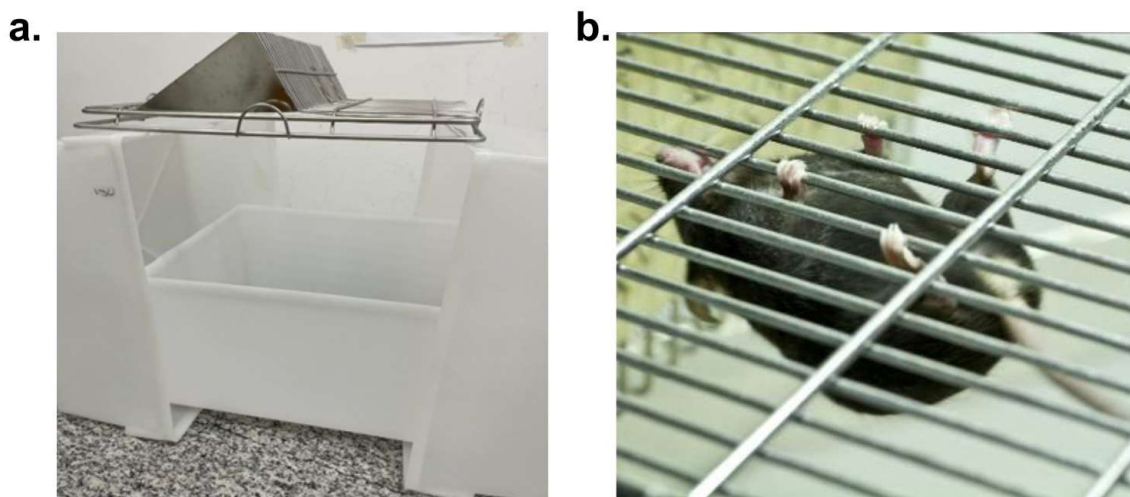
O peso corporal do camundongo foi obtido antes de iniciar o teste. O camundongo foi colocado no topo da grade por um período de acomodação de 3 a 5 segundos e o cronômetro foi ativado assim que a gaiola foi invertida. Normalmente, pouco antes de cair, o animal se sustentou com 1 ou 2 patas, e nesse momento, o cronômetro foi parado.

Sendo assim, o cronômetro começou a contar quando a gaiola foi invertida e foi parado quando o animal se soltou ou se suspendeu por 1 ou 2 patas. O tempo foi contado em segundos, sendo 600 segundos o maior tempo obtido e feita a média dos tempos.

O resultado é dado em *gms*, sendo o *Impulso de Segurar (gms) = peso corporal (g) x o tempo que o animal sustentou (seg)*.

Embora exija supervisão constante dos animais e um animal por vez seja analisado, o teste é de fácil realização, baixo custo e alta confiabilidade (Carlson *et al.*, 2010).

Figura 6 – Realização Do Teste De Suspensão Pelas Quatro Patas



Fonte: TREAT-NMD (Carlson, 2011).

Legenda: (a) Plataforma suspensa para realização do teste de força muscular. (b) Camundongo mdx pendurado com os quatro membros em grade suspensa.

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CREATINA QUINASE (CK) E AMINOTRANSFERASES (ALT E AST).

Após o tratamento, os animais foram anestesiados por via intra-peritoneal com solução de cloridrato de xilazina 2% (*Vyrbaxyl, Virbac*) e cloridrato de quetamina (*Francotar, Virbac*) na proporção de 1:1 e dose de 0,1 mL/30 g de peso corporal e então eutanasiados por exsanguinação seguida de perfusão com PBS. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18K) a 10000 rpm, por 10 minutos (Nagaraju, Gordish, 2008).

O soro obtido foi usado para avaliar a atividade da creatina quinase (CK) pelo uso do Kit CK NAC UV (BioClin, Quibasa) e dosagem da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com uso do kit GOT (AST) UV e GPT (ALT) UV (LaborLab). Foram utilizados espectrofotômetro BioPlus BIO-200 semiautomático seguindo os parâmetros do fabricante e Bioespectro SP 220 seguindo os parâmetros do fabricante. A CK é uma enzima encontrada no músculo esquelético e cardíaco. A análise bioquímica de CK é usada em camundongos distróficos como marcador de dano muscular, com seus níveis proteicos medidos no soro, sob pretexto de que níveis aumentados de CK no sangue são representativos de dano muscular aumentado, fragilidade do sarcolema e fenótipo negativo da doença (Nagaraju, Gordish, 2008). As aminotransferases (ALT e AST) tem ampla utilização para avaliar a condição hepática devido sua acurácia diagnóstica elevada e custos reduzidos (Aragon, Younossi, 2010). A elevação dessas enzimas é a anormalidade mais encontrada em testes hepáticos, tornando-se, marcador útil para diagnóstico e monitoramento das doenças do fígado.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO E DOS RINS.

Após o tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados conforme descrito no item 4.5. A seguir, fragmentos de fígado e de rim foram coletados e fixados em solução de formaldeído 10% por 24 horas e, em seguida, desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes seriados de 7 µm de espessura foram coletados em lâminas de vidro utilizando um micrótomo manual LEICA - RM 2145 e corados por hematoxilina-eosina para as avaliações histológicas.

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol (100%, 95% e 70%), corados durante dois minutos na Hematoxilina de Harris, lavados durante três minutos em água destilada e contra corados com Eosina aquosa durante quatro minutos. Depois de coradas, as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas em gradiente crescente de etanol (70%, 95% e 100%) e montadas com Entellan®. Então, foram analisadas, sob microscopia de luz, e fotografadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse E200®.

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Os animais foram eutanasiados conforme descrito anteriormente (4.5). Os músculos, bíceps braquial (BB), diafragma (DIA), tibial anterior (TA) e extensor digital longo dos dedos (EDL) foram retirados, congelados em isopentano resfriado a -159°C (nitrogênio líquido) e armazenados em biofreezer a -80°C .

Para obtenção dos cortes em criostato (Microm-HS505E), os músculos foram mantidos a -23°C , seccionados transversalmente na espessura de $8\ \mu\text{m}$ e coletados em lâmina. Foram obtidas lâminas com 6 cortes dos referidos grupos experimentais. Foram utilizadas 02 lâminas para cada uma das seguintes análises:

4.7.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

Duas lâminas dos cortes obtidos no criostato foram coradas durante dois minutos na Hematoxilina de Harris, lavados durante três minutos em água destilada e contra corados com Eosina aquosa durante quatro minutos. Depois de coradas, as lâminas serão lavadas em água destilada, desidratadas em gradiente crescente de etanol (70%, 95% e 100%) e montadas com Entellan®.

Após coloração em H&E e secagem, as lâminas então foram analisadas sob microscopia de luz e fotografadas em foto-microscópio ZEISS®, com câmera de vídeo em objetiva de 20x. A partir das fotos obtidas, foi realizada determinação do número de fibras que apresentarem núcleo central – (indicativo de fibras musculares regeneradas), número de fibras com núcleo periférico (característica de fibras normais) e áreas com infiltrado inflamatório em relação a área total do músculo (Grounds 2010).

4.7.2 Anticorpo Anti-Mouse IgG-FITC

A degeneração muscular foi analisada por imunofluorescência baseada na marcação da imunoglobulina G (IgG) (Bencze 2019). Duas lâminas de cortes obtidos em criostato foram previamente descongeladas lavadas com PBS 3x por 5 min. Após a lavagem, foram incubadas com solução de bloqueio (BSA 5%) por 30 minutos e novamente lavadas com PBS 3x 5 minutos, e, por fim, incubadas com anticorpo FITC-conjugado anti-mouse IgG (SIGMA) por 1 hora e lavadas novamente com PBS 3x de 5

minutos. Finalmente, as lâminas foram montadas com solução TBS-T + Glicerol (proporção 1:4) e observadas em microscopia de fluorescência.

4.7.3 Anticorpo F4/80

Para detecção de macrófagos as lâminas foram incubadas com anticorpo F4/80 (Macedo 2020). Os músculos BB, DIA, TA e EDL foram fixados em formalina 9% por 20 segundos, lavados com TBS-T 0,1M 3x por 5 min e bloqueados BSA 3% diluído em TBS-T por 1 h. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados por 30 min com anti F4/80 (1:200- BSA3%, overnight a 4°C; ab90247, Abcam, Waltham, MA, EUA). Posteriormente lavados em TBS-T 0,1M 3x por 5 min e incubados com o anticorpo secundário IgG anti-rato Texas Red (1:250 – BSA 1%; ab119986, Abcam) por 1 h, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em TBS-T 0,1 M 3x por 5 min e as lâminas montadas em meio de montagem TBST e Glicerol (1:3). As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico de fluorescência ZEISS Scope A1 conectado a uma câmera de vídeo Axion 503 Color e a área (μm^2) contendo o sinal F4/80 foi determinada utilizando o software ImageJ®.

4.7.4 Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical ânion superóxido - O_2^-)

A produção de EROs, radical ânion O_2^- especificamente, foi determinada por incubação dos cortes histológicos dos músculos BB e DIA, com 5 μl de DHE em PBS a 37°C durante 30 min. Usando microscópio óptico de fluorescência ZEISS Scope A1 conectado a uma câmera de vídeo Axion 503 Color, a intensidade de DHE reativo por área do músculo foi quantificada através da mensuração de pixels excedente a um limite 70-255 comprimento de onda, que foi ajustado de forma a eliminar a interferência de qualquer fluorescência de fundo, utilizando o software ImageJ® (Whitehead, Yeung et al. 2006).

4.7.5 Contagem de lipofuscina

A lipofuscina resulta da degradação oxidativa de macromoléculas e serve como indicativo de estresse oxidativo (Nakae, Dorchies et al. 2012). Uma vez que a lipofuscina é auto fluorescente, secções transversais dos músculos DIA, BB, TA e EDL foram montadas diretamente em meio de montagem TBST e Glicerol (1:3), para fluorescência, sob lamínula. Os cortes foram analisados em microscópio óptico de fluorescência ZEISS Scope A1 conectado a uma câmera de vídeo Axion 503 Color. O número total de grânulos de lipofuscina foi determinado em relação à área total do corte pela sua espessura (número de lipofuscina/ μm^3) pelo software ImageJ®.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CAT, SOD2, NF-KB E 4-HNE POR WESTERN BLOTTING (N=7)

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com PBS e os músculos BB e DIA removidos e cortados em pequenos pedaços, homogeneizados imediatamente em 100 μl de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando homogeneizador tipo D1000 Handheld Homogenizer (BENCHMARK) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos serão centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante será utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras do extrato proteico foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100 mM, aquecidas em banho seco, Heatinh Dry Bath (KASVI) por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 30 μg de proteína serão aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose será realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween 20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com

10 µg de anticorpo primário: anticorpo policlonal anti-NF-κBp65 (SAB5700046, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); e/ou anticorpo monoclonal anti-Catalase, (SAB 5700937, Sigma-Aldrich); e/ou anticorpo policlonal anti-SOD2, (EAB-10606, Elabscience); e/ou anticorpo policlonal anti-4HNE, (AB46545, Abcam) diluído em 10 ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário (anti-rabbit IgG Peroxidase, AB6721, Abcam) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência por 5 minutos, seguido de exposição capturado pelo sistema GeneGnome XRQ (Syngene, Frederick, MD, EUA) e o software ImageJ foi usado para quantificar as intensidades das bandas.

Para a normalização, o protocolo consiste na reutilização das membranas, onde foi realizada lavagem das membranas com TBS-T 3 vezes por 10 minutos, e em seguida, incubadas com 10 ml de Stripping Buffer (10mM Tris-HCl pH 7,5; β-Mercaptoetanol 0,1 M; Ureia 8 M) durante 1 hora, à 60°C. Após esse período, as membranas foram re-equilibradas e lavadas com TBS-T. A seguir foram incubadas com 10 mg do anticorpo primário GAPDH e 2,5mg do anticorpo secundário gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (anti-GAPDH, SAB4300645, Sigma-Aldrich), seguindo o protocolo acima descrito.

4.9 DOSAGEM DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA – GSH

A glutationa (GSH) é o tiol não proteico mais abundante e é crucial para manter o status redox favorável nas células. A concentração de proteínas foi determinada pela curva de GSH, de acordo com método descrito por Bradford. As amostras dos músculos BB, DIA, TA e EDL foram centrifugadas (12000 rpm, a 4°C, por 20 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH = 7,4). Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância de 100 mL da amostra, usando o espectrofotômetro ThermoScientific GENESYS 10 UV Scanning UV/ Visible, acrescidos de 100 mL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura foi adicionado 30 µL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e então foi realizada uma nova leitura (A2), a 412 nm, após 15 min de reação,

para determinação de grupamentos sulfidrila não protéicos (GSH). A concentração de grupamentos sulfidrila (tiol) foi dada por $(A1-A2) \times 1,57$ (Faure and Lafond 1995).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para análise estatística foi aplicado o teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para as devidas comparações entre os grupos. O nível de significância foi estabelecido como sendo de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 PERFIL QUÍMICO DO EX-ETOH 70%

O extrato de soja tinha um elevado teor de compostos bioativos, incluindo flavonoides e fenóis. O teor total de flavonoides foi de 100 mg/g e o teor total de fenóis foi de 200 mg/g. O potencial anti-radicalar do extrato foi de 95%, indicando uma potente atividade antioxidante. O Ex-EtOH 70% continha 0,0438 mg/mL de genisteína, o que permitiu determinar a quantidade equivalente desta isoflavona no tratamento proposto. Os grãos de soja são uma fonte importante destes compostos, com teores que variam entre 0,4 mg e 9,5 mg de isoflavonas totais por grama. No entanto, a quantidade presente pode ser influenciada por diversos fatores, sendo os mais importantes a genética, o ano de cultivo e o local de crescimento (Rostagno *et al.*, 2004).

No perfil fitoquímico efetuado, foram identificadas 12 isoflavonas principais no extrato de soja: genisteína (4,5,7-trihidroxiisoflavona), daidzeína (4,7-dihidroxiisoflavona), gliciteína (4,7-dihidroxi-6-metoxi-isoflavona) e as respectivas formas acetil, malonil e aglicona. A identificação dos compostos foi confirmada pela comparação do tempo de retenção e da massa dos espectros (Tabela 1; figura 7a) (Bettaiah e Prabhushankar, 2021; Chen *et al.*, 2024; Jung *et al.*, 2020; Manchon *et al.*, 2010; Rashid *et al.*, 2023; Rostagno *et al.*, 2004; Rostagno *et al.*, 2009).

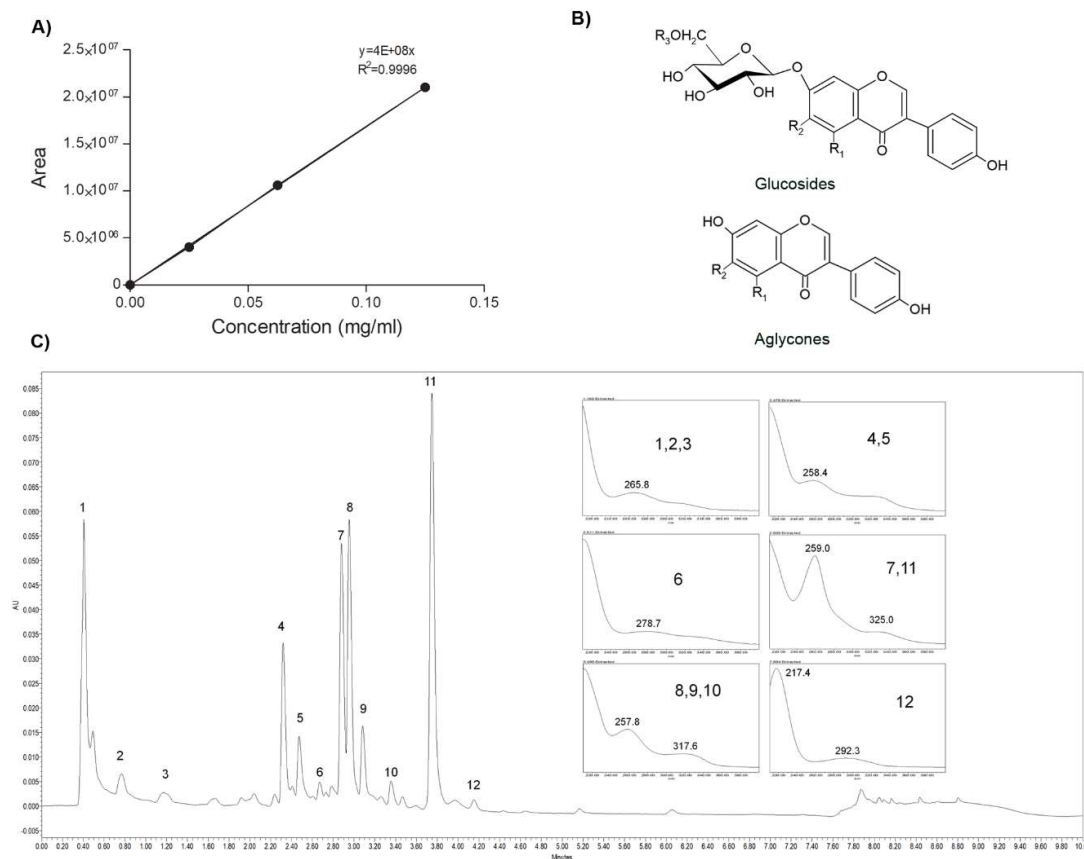
A estrutura característica básica da isoflavona é um núcleo de flavona, composto por dois anéis de benzeno (A e B) ligados a um anel heterocíclico C (Rostagno *et al.*, 2009) (Tabela 2; figura 6b).

Tabela 1. Detecção de íons positivos no Ex-EtOH 70% obtido por UPLC-PDA-MS

Pico	Rt (min)	Composto	Símbolo	Formula Molecular	m/z
1	0,40	Daidizina	Di	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417,16
2	0,70	Glicitina	Gly	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447,13
3	1,20	Genistina	Gi	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433,23
4	2,38	Malonildaidzina	MDi	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	503,17
5	2,50	Malonilglicitina	MGly	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	533,24
6	2,70	Acetildaizina	ADi	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	459,10
7	2,90	Acetilglicitina	AGly	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	489,14
8	3,00	Malonilgenistina	MGi	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	519,15
9	3,10	Daidzeina	De	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,98
10	3,39	Gliciteina	Gle	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,28
11	3,80	Acetilgenistina	AGi	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	475,12
12	4,20	Genisteina	Ge	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,04

Tempo de retenção (Rt); minutos (min); *razão de massa/carga* (m/z).

Figura 7 – Análise química do Ex-EtOH 70%



Fonte: Adaptado de Rostagno *et al.*, 2009.

Legenda: (a) Curva de calibração da área de pico para o composto. (b) Estruturas químicas das isoflavonas de soja; R1-3 representa os substituintes indicados na Tabela 3. (c) Cromatogramas acoplados UPLC-PDA-MS do Ex-EtOH 70% (210 a 400 nm com λ_{max} de 254). As fórmulas estruturais foram preparadas com ChemDraw Pro 8.

Tabela 2. Isoflavonas de soja e grupos substituintes da estrutura química (R1-3)

Isoflavone	R1	R2	R3
Glicosides			
Malonildaidzina	H	H	COCH ₂ COOH
Malonilglicitina	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
Malonilgenistina	OH	H	COCH ₂ COOH
Acetildaidzina	H	H	COCH ₃
Acetilglicitina	H	OCH ₃	COCH ₃
Acetilgenistina	OH	H	COCH ₃
Daidizina	H	H	H
Glicitina	H	OCH ₃	H
Genistina	OH	H	H
Agliconas			
Daidzeina	H	H	Nenhum
Gliciteina	H	OCH ₃	Nenhum
Genisteina	OH	H	Nenhum

Fonte: Adaptado de Rostagno et al. 2009.

6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM EX-ETOH 70% NO CAMUNDONGO MDX

O peso corporal de todos os animais utilizados foi registrado ao 14^o dia de vida (T₀), 30^o dia de vida (T₁), 45^o dia de vida (T₂) e 60^o dia de vida (T₃). Após o período de tratamento, estipulou-se o ganho em porcentagem de peso corporal dos animais de todos os grupos experimentais. Todos grupos estudados apresentaram ganho de peso corporal no período descrito. No que se refere ao registro de peso por período avaliado, no T₂, os grupos mdxP e mdxS apresentaram o peso estatisticamente inferior ao grupo Ctrl (16,4% e 10,6%, respectivamente). No T₃, apenas o grupo mdxP manteve valores significativos inferiores aos grupos controles (Ctrl, 11,6%; mdxCT, 10,6%; Tabela 4).

Tabela 3. Peso corporal

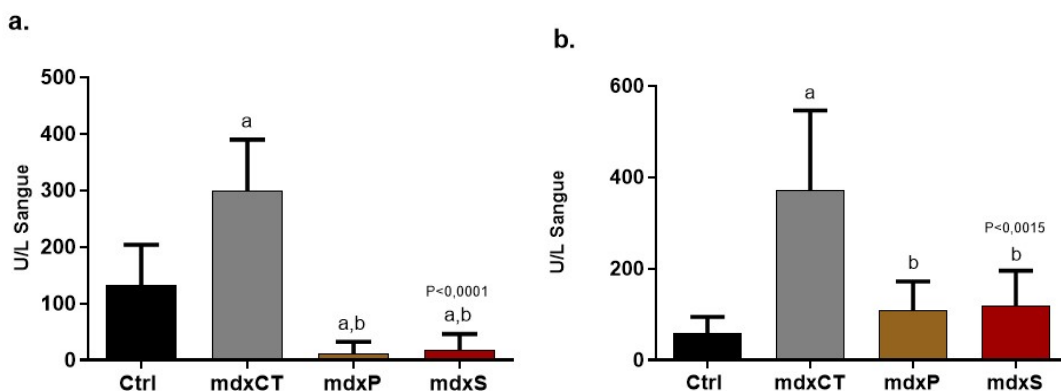
	Peso – gramas (g)			
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Ctrl	8,6±0,8	16±5,3	23,5±2,3	25,2±3,1
mdxCT	6,7±1,8	15,3±2	21,2±1	25,5±1,3
mdxP	6,8±1,5	14±3,6	19,6±2,1 ^a	22,5±2,3 ^{a, b}
mdx	8,1±2,1	15,6±3	21±2,9 ^a	23,9±2,4

Fonte: Autora.

Legenda: Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Ctrl: grupo de controle; mdxCT: camundongos mdx tratados com solução salina; mdxP: camundongos mdx tratados com prednisona; mdxS: camundongos mdx tratados com Ex-EtOH 70%. T0: 14 dias de vida; T1: 30 dias de vida; T2: 45 dias de vida, T3: 60 dias de vida; difere do grupo Ctrl^a; difere do grupo mdxCT^b; $p \leq 0,01$. ANOVA One-way com teste post hoc de Tukey.

A avaliação das atividades de AST e ALT contidas no soro sanguíneo dos animais não apresentou indícios quantitativos de possíveis lesões ou desordens hepáticas de naturezas diversas causadas pela administração das terapias descritas. Nos valores de AST (Figura 8a), os grupos tratados mdxP e mdxS apresentaram redução estatisticamente significativa com relação ao mdxCT (95,9% e 93,9%, respectivamente). Além disso, também apresentaram redução significativa comparadas ao grupo Ctrl (90,7% e 86,2%, respectivamente). Os valores obtidos em ALT (Figura 8b) apresentaram redução estatística dos grupos tratados, mdxP e mdxS com relação ao mdxCT (71% e 67,8%, respectivamente).

Figura 8 – Atividade das Enzimas Hepáticas

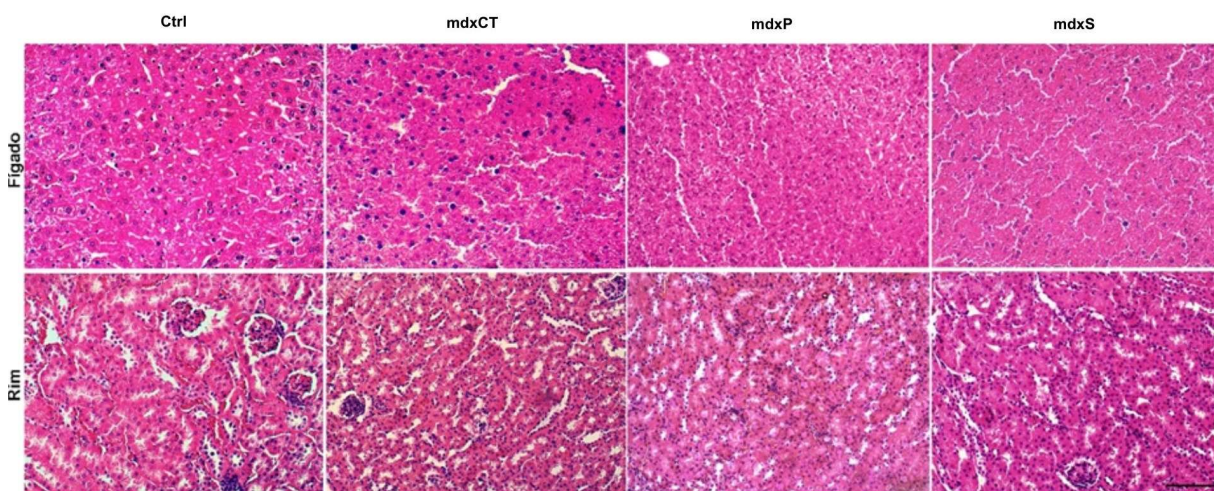


Fonte: Autora.

Legenda: Média e desvio padrão da atividade das enzimas hepáticas (a) AST $p \leq 0,0001$ ANOVA One-way com teste post hoc de Tukey e (b) ALT $p \leq 0,0015$ ANOVA One-way com teste post hoc de Tukey nos diferentes grupos experimentais. *Ctrl*: camundongos C57BL/10 utilizados como controle; *mdxCT*: camundongos mdx tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos mdx tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos mdx tratados com extrato fracionado da soja. Valores estão evidenciados em U/L de sangue. Difere do grupo Ctrl^a; difere do grupo mdxCT^b.

A avaliação histopatológica dos fígados e rins dos grupos experimentais estudados não apresentou indícios qualitativos de possível toxicidade das terapias empregadas no presente estudo (Figura 9).

Figura 9 - Secções transversais do fígado e rim dos animais dos diferentes grupos



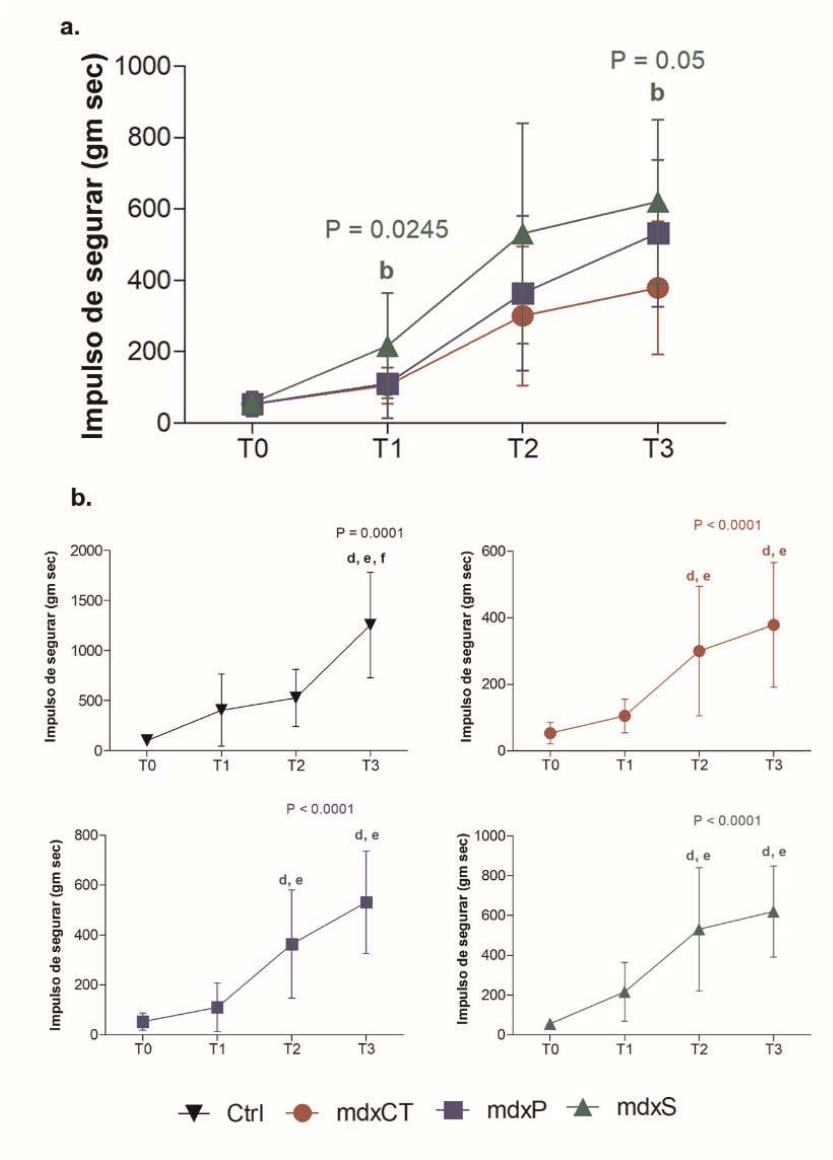
Fonte: Autora.

Legenda: *Ctrl*: camundongos C57BL/10 utilizados como controle; *mdxCT*: camundongos mdx tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos mdx tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos mdx tratados com extrato fracionado da soja. Barra de escala: 100 μ m.

6.3 EFEITO NA FORÇA MUSCULAR

O teste suspensão de quatro patas mostrou que os grupos experimentais de animais distróficos apresentaram diferenças estatísticas na força muscular em comparação ao grupo de camundongos saudáveis, em todos os períodos avaliados. Entretanto, analisando individualmente cada grupo, observamos que apenas os grupos de camundongos mdx tratados com prednisona e Ex-EtOH 70% apresentaram ganho de força significativo ao longo do período experimental em comparação à primeira medição (Figura 10). Ao final do tratamento, apenas o grupo tratado com Ex-EtOH 70% apresentou ganho significativo na força muscular comparado ao grupo mdxCT.

Figura 10 – Comparação do ganho de força muscular ao longo do tratamento



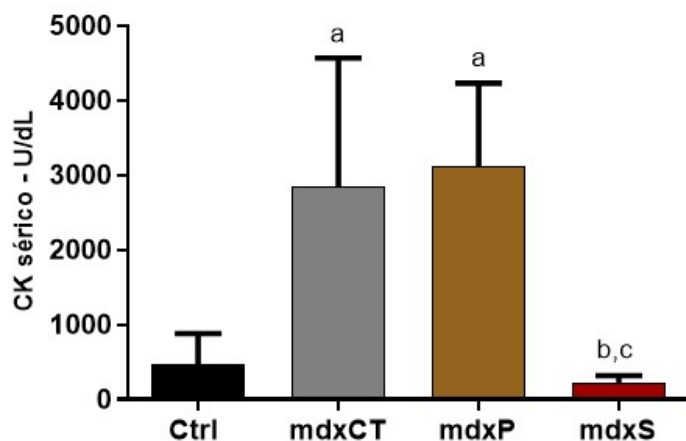
Fonte: Autora.

Legenda: Impulsos de manutenção (g s): peso corporal (g) × tempo de permanência do animal em suspensão (s).

6.4 EFEITO NA LESÃO MUSCULAR

Os animais dos grupos mdxCT apresentaram níveis aumentados dos níveis séricos de CK em relação aos animais do grupo Ctrl. Após o tratamento com Ex-EtOH 70%, os camundongos mdxS apresentaram redução significativa de CK no sangue em relação aos animais distróficos mdxCT e mdxP (92,5% e 93,2%, respectivamente, Figura 11).

Figura 11 – Níveis Séricos de Creatina Quinase (CK)



Fonte: Autora.

Legenda: Os valores são expressos como média ± desvio padrão dos grupos *Ctrl*: camundongos C57BL/10 utilizados como controle; *mdxCT*: camundongos mdx tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos mdx tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos mdx tratados com extrato fracionado da soja. Difere de Ctrl^a; difere do mdxCT^b; difere do mdxP^c; ($p \leq 0,0005$ ANOVA One-way com teste post hoc de Tukey).

6.5 EFEITO DO EX-ETOH 70% NO ESTRESSE OXIDATIVO

O BB do grupo mdxCT apresentou um grande acúmulo de grânulos de lipofuscina no tecido muscular quando comparado ao grupo Ctrl (Figura 12a). Após os tratamentos, observou-se uma redução estatisticamente significativa no acúmulo de lipofuscina nos grupos mdxP (66,8%) e mdxS (67,7%) em relação ao grupo mdxCT, indicando que ambos os tratamentos foram eficazes em diminuir esse acúmulo nos músculos dos animais distróficos (Figura 12b). Além disso, o tratamento do grupo mdxS reduziu de

forma significativa o sinal do DHE (Figura 13a) em relação ao grupo mdxCT neste mesmo, com uma redução de 70,4% (Figura 13b). Em relação aos níveis de catalase, observou-se um aumento significativo no grupo tratado com o Ex-EtOH 70% em comparação aos animais do tipo selvagem e mdx (Figura 14a). Por outro lado, os níveis de SOD2 e 4-HNE não apresentaram variações entre os grupos estudados (Figuras 15a e 16a). Quanto às quantidades de GSH, foi identificado que, em ambos os grupos tratados, mdxP e mdxS, houve uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo mdxCT, com reduções de 35,6% e 44,6%, respectivamente (Figura 17b).

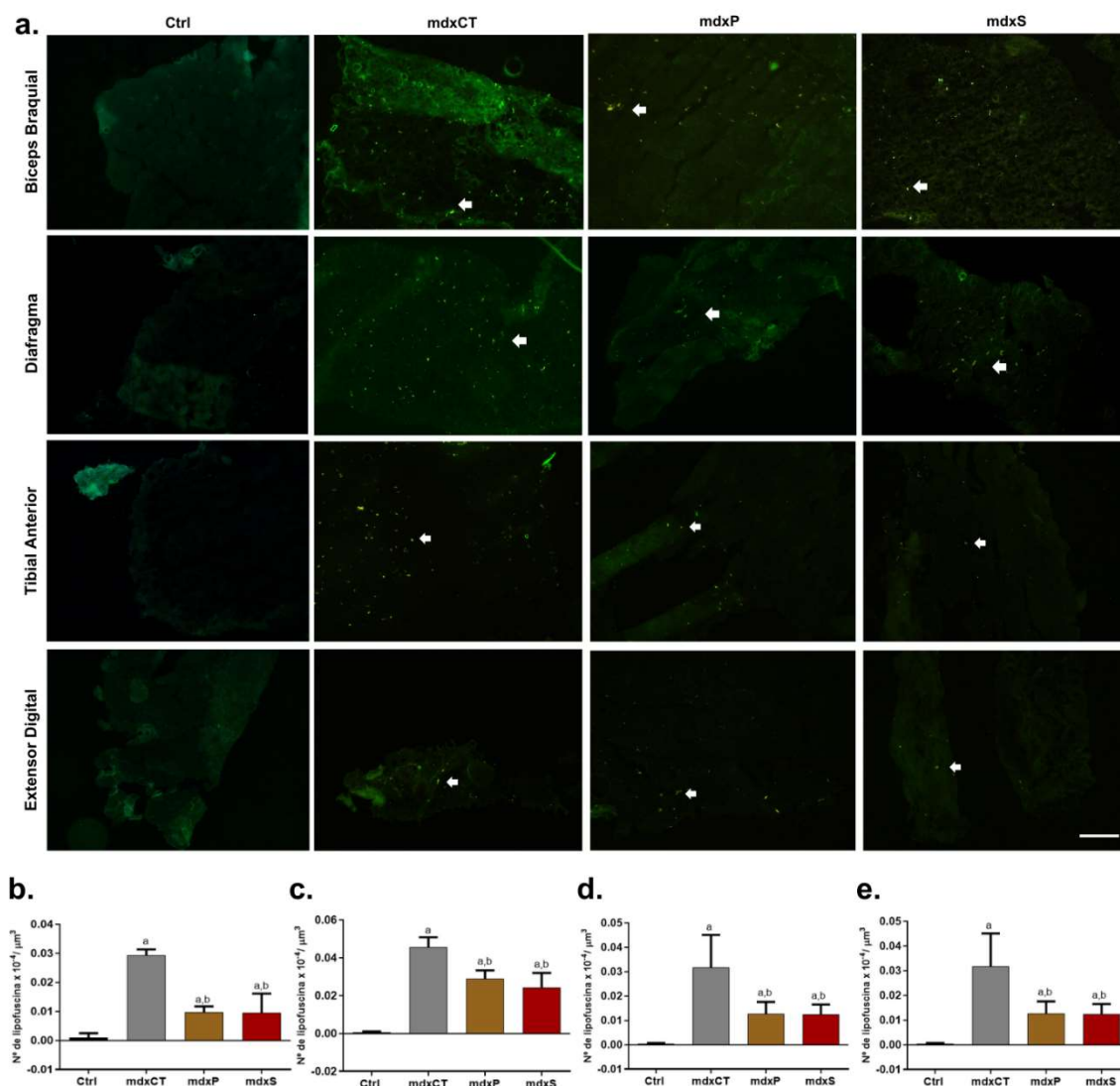
O DIA do grupo mdxCT apresentou um expressivo acúmulo de grânulos de lipofuscina no tecido muscular em comparação ao grupo Ctrl. Ambos os tratamentos propostos reduziram estatisticamente o acúmulo nos músculos dos animais distróficos, com reduções de 36,9% no grupo mdxP e 46,9% no grupo mdxS, em relação ao grupo mdxCT (Figura 12c). Além disso, o DIA dos camundongos do grupo mdxCT mostrou significativa produção de EROs em relação ao grupo Ctrl. O tratamento com prednisona não conseguiu reduzir esses valores, por outro lado, os animais tratados com o Ex-EtOH 70% apresentaram uma redução significativa do sinal do DHE, com reduções de 62,4% em relação ao grupo mdxCT e 62,1% em relação ao grupo mdxP, evidenciando uma ação radical scavenger (Figura 13c). Os níveis de CAT permaneceram significativamente reduzidos no músculo DIA distrófico dos camundongos mdx com 8 semanas de idade, mesmo após os tratamentos propostos, apresentando reduções de 51,2% no grupo mdxCT, 44,3% no grupo mdxP e 45,2% no grupo mdxS, em comparação aos animais saudáveis (Figura 14b). Por outro lado, os níveis de SOD2 e 4-HNE não variaram entre os grupos estudados (Figuras 15b e 16b). Com relação ao GSH, observou-se que em ambos os grupos tratados, mdxP e mdxS, houve uma redução estatisticamente significativa em comparação ao grupo mdxCT, com valores de 35,6% e 44,6%, respectivamente (Figura 17c).

No músculo TA, observou-se uma maior quantidade de grânulos de lipofuscina no grupo mdxCT em comparação ao grupo Ctrl. Após os tratamentos administrados, ambos os grupos tratados, mdxP e mdxS, apresentaram uma redução significativa na quantidade de grânulos de lipofuscina em relação ao grupo mdxCT, com reduções de 60% e 60,8%, respectivamente (Figura 12d). Em relação à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o músculo TA dos camundongos dos grupos mdxCT e mdxP mostrou um aumento significativo em comparação ao grupo Ctrl (Figura 13d). No entanto, o grupo

mdxS não apresentou alterações significativas na produção de EROs, seja para aumento ou redução. Por fim, os níveis de glutathiona reduzida (GSH) não mostraram variações significativas em nenhum dos grupos mdx avaliados (Figura 17d).

No EDL, o grupo mdxCT apresentou um acúmulo estatisticamente significativo de grânulos de lipofuscina no tecido muscular em comparação ao grupo Ctrl. Após os tratamentos, verificou-se no EDL uma redução estatística nos grupos mdxP e mdxS em relação aos animais selvagens, com diminuições de 20,1% e 16,1%, respectivamente (Figura 12e). Além disso, o músculo EDL dos camundongos do grupo mdxCT exibiu uma produção significativa de espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação ao grupo Ctrl. O tratamento com prednisona não foi capaz de reduzir esses níveis nos camundongos mdx, mas, os animais tratados com o Ex-EtOH 70% apresentaram uma redução significativa do sinal do DHE em comparação aos grupos mdxCT (62,4%) e mdxP (62,1%), indicando uma ação radical scavenger (Figura 13e). Por fim, em relação aos níveis de glutathiona reduzida (GSH), não foram observadas alterações estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Figura 17e).

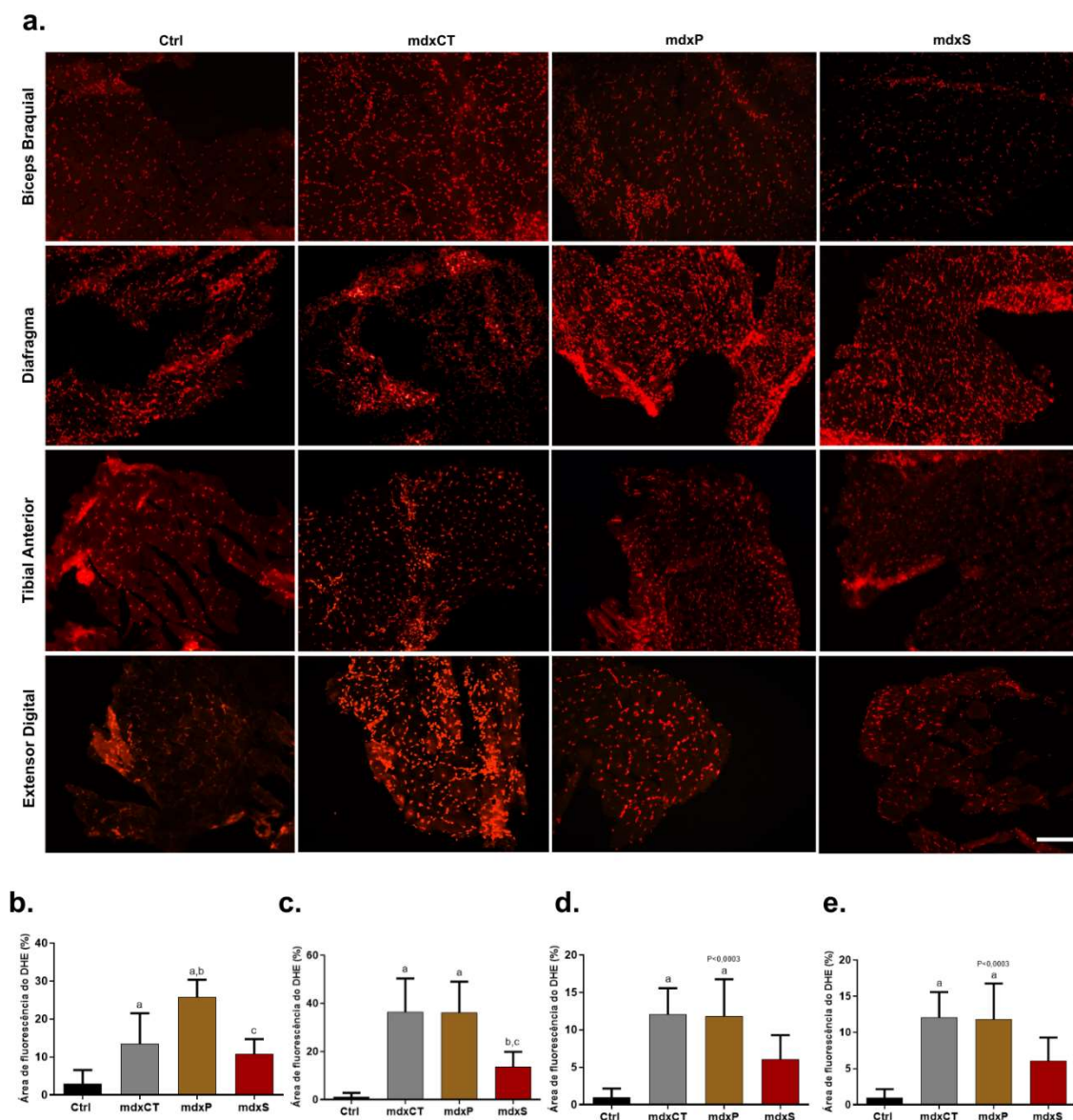
Figura 12 - Lipofuscina



Fonte: Autora.

Legenda: **(a)** cortes transversais dos músculos BB, DIA, TA e EDL dos diferentes grupos experimentais, mostrando a autofluorescência dos grânulos de lipofuscina (seta branca). *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Média e desvio padrão da contagem de grânulos de lipofuscina no músculo **(b)** BB, **(c)** DIA, **(d)** TA e **(e)** EDL dos diferentes grupos experimentais. Difere do grupo *Ctrl*^a; difere do grupo *mdxCT*^b $p \leq 0,0001$, One-way, ANOVA, pós teste de Tukey. Barra de escala: 100 µm.

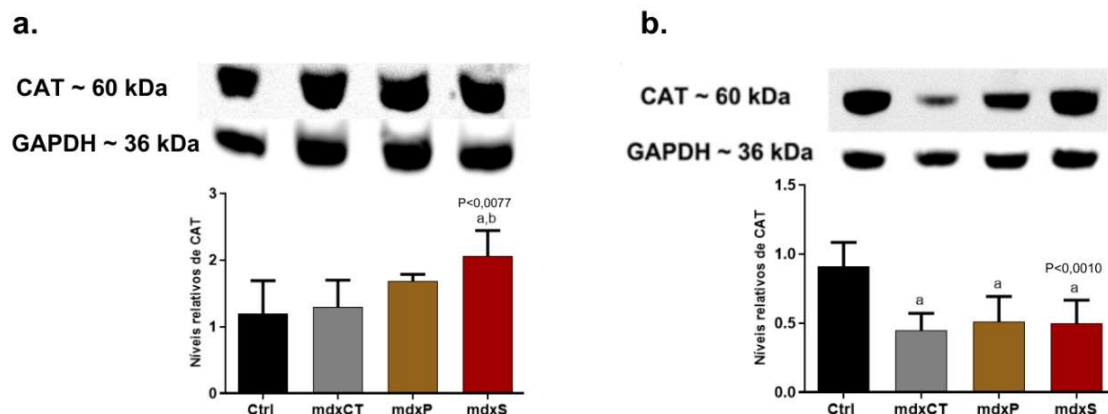
Figura 13 – Reação de DHE



Fonte: Autora.

Legenda: **(a)** Cortes transversais dos músculos BB, DIA, TA e EDL dos diferentes grupos experimentais, mostrando a fluorescência da reação do DHE. *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Média e desvio padrão da fluorescência do DHE no músculo **(b)** BB, **(c)** DIA, **(d)** TA e **(e)** EDL dos diferentes grupos experimentais. Difere do grupo *Ctrl*^a; difere do grupo *mdxCT*^b; difere do grupo *mdxP*^c; $p \leq 0,0003$, One-way, ANOVA, pós teste de Tukey. Barra de escala: 100 μm .

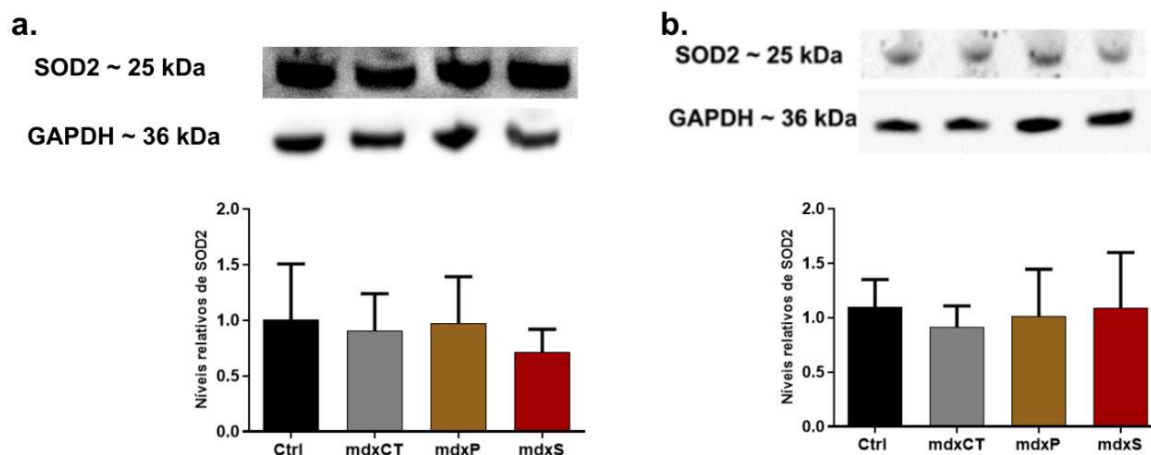
Figura 14 - Catalase.



Fonte: Autora.

Legenda: Observam-se as bandas imunorreativas para CAT nos músculos (a) BB e (b) DIA. *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. (a) Difere de *Ctrl*^a; difere do grupo *mdxCT*^b $p < 0,0077$; (b) Difere de *Ctrl*^a; $p < 0,001$. One-way, ANOVA, pós teste de Tukey.

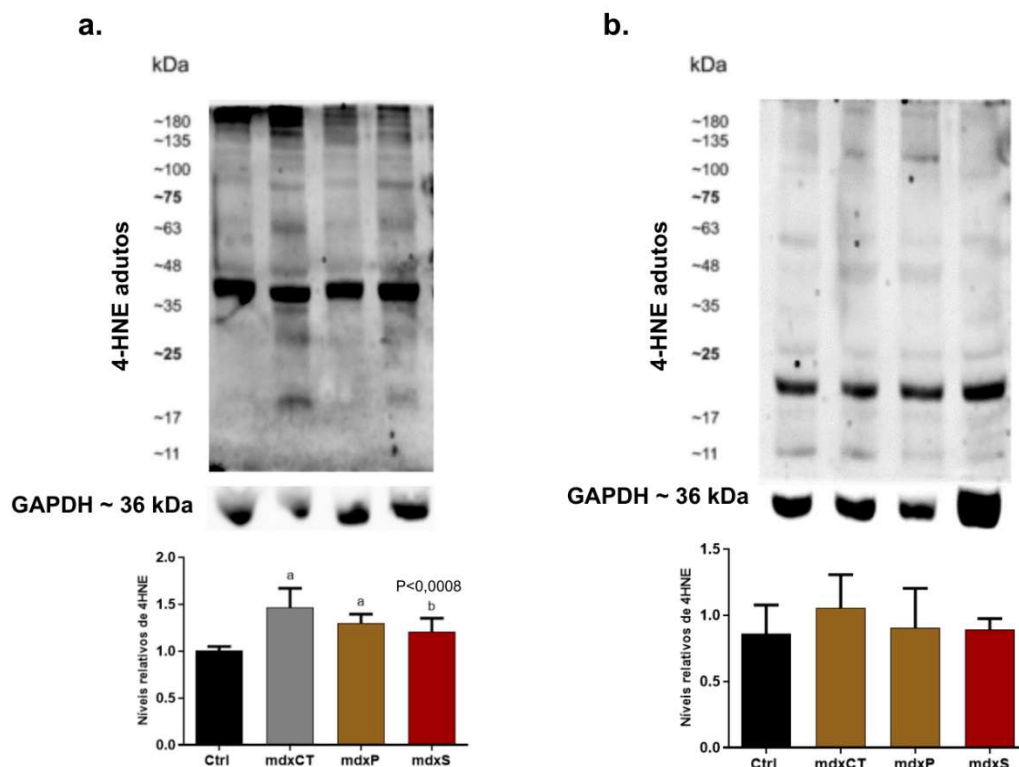
Figura 15 - SOD2.



Fonte: Autora.

Legenda: Observam-se as bandas imunorreativas para SOD2 nos músculos (a) BB e (b) DIA. *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Níveis relativos de SOD2 não apresentaram diferenças estatísticas relevantes.

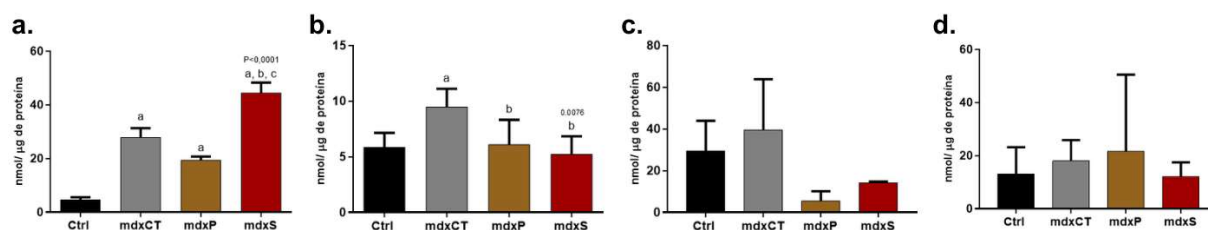
Figura 16 - 4-HNE.



Fonte: Autora.

Legenda: Observam-se as bandas imunorreativas para 4-HNE nos músculos BB e DIA. *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Níveis relativos de 4-HNE no músculo **(a)** BB em que difere do grupo *mdxCT*^b $p < 0,0008$; e no músculo **(b)** DIA não apresentaram diferenças estatísticas relevantes.

Figura 17 - GSH.



Fonte: Autora.

Legenda: Média e desvio padrão do conteúdo de GSH nos músculos BB, DIA, TA e EDL nos diferentes grupos experimentais. *Ctrl*: camundongos C57BL/10 do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Valores foram dados em nmol/mg de proteína para GSH. **(a)** Difere do grupo *Ctrl*^a; difere do grupo *mdxCT*^b; difere do grupo *mdxP*^c $p < 0,0001$; **(b)** difere do grupo *Ctrl*^a; difere do grupo *mdxCT*^b; $p < 0,0076$; One-way, ANOVA, pós teste de Tukey. Os níveis de GSH não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos músculos **(d)** TA e **(e)** EDL.

6.6 EFEITO DO EX-ETOH 70% NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os camundongos do grupo mdxS apresentaram uma redução significativa no infiltrado inflamatório no músculo BB em comparação aos grupos mdxCT e mdxP, com diminuições de 67,5% e 94%, respectivamente (Figura 18a e Figura 18f). Em relação à população de macrófagos (Figura 19a), foi identificado um aumento estatisticamente significativo no grupo mdxP em comparação aos grupos Ctrl e mdxCT. Por outro lado, o grupo mdxS exibiu uma redução expressiva e significativa na quantidade de macrófagos em relação ao grupo mdxP, com uma diminuição de 86,7% (Figura 19b). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis relativos de NF- κ B entre os grupos analisados no músculo BB (Figura 20a).

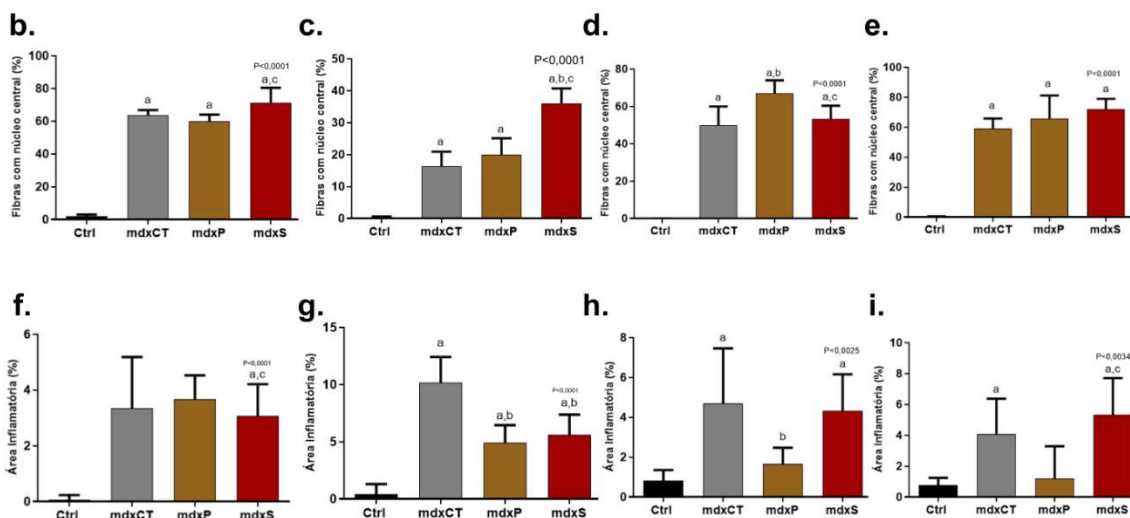
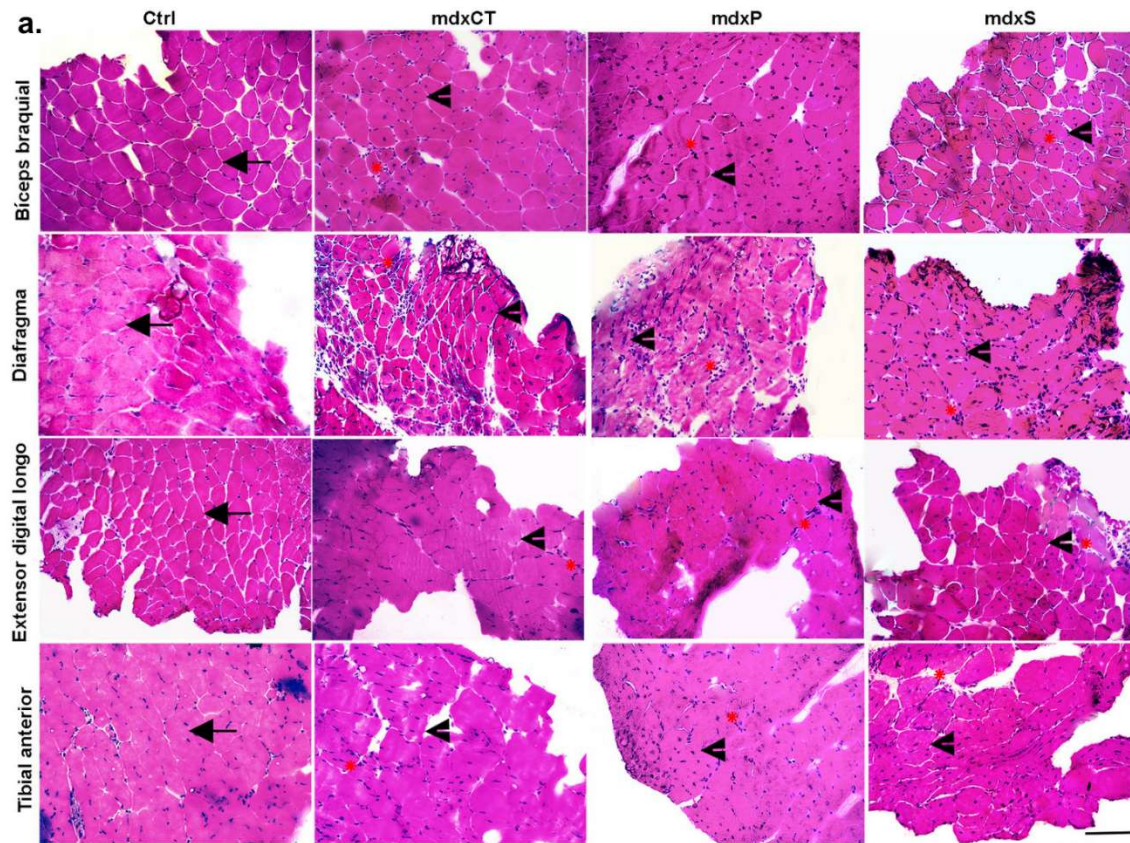
Os animais distróficos sem tratamento apresentaram um infiltrado inflamatório significativamente maior no DIA em comparação aos camundongos do tipo selvagem. Após os tratamentos, os grupos mdxP e mdxS mostraram uma redução estatisticamente significativa na área inflamatória em relação ao grupo mdxCT, com diminuições de 51,6% e 44,6%, respectivamente (Figura 18g). Em relação à população de macrófagos, observou-se um aumento estatisticamente significativo nos grupos mdxCT e mdxP em comparação ao grupo Ctrl. No entanto, no grupo mdxS, houve uma redução expressiva e significativa dessa população, com diminuições de 89,2% em relação ao grupo mdxCT e 91,1% em relação ao grupo mdxP (Figura 19c). Além disso, os camundongos do grupo mdxCT apresentaram níveis significativamente elevados de NF- κ B no músculo distrófico, quando comparados aos animais do grupo controle. Tanto a prednisona quanto o Ex-EtOH 70% demonstraram um efeito positivo na redução estatística do conteúdo desse marcador inflamatório, com reduções de 55,3% e 51,4%, respectivamente (Figura 20b).

No músculo TA, foi observado um aumento da área de infiltrado inflamatório nos camundongos dos grupos mdxCT e mdxS em comparação ao grupo Ctrl (Figura 18h). Em relação à área com infiltrado de macrófagos, os camundongos do grupo mdxS apresentaram uma redução na população de macrófagos, porém sem significância estatística. Por outro lado, o grupo mdxP mostrou um aumento estatisticamente significativo na população de macrófagos em relação ao grupo Ctrl (Figura 19d).

Após o término dos tratamentos, os camundongos dos grupos mdxCT e mdxS apresentaram um infiltrado inflamatório expressivo no EDL em comparação ao grupo

Ctrl (Figura 18i). Além disso, a população de macrófagos no EDL apresentou um aumento estatisticamente significativo nos camundongos mdx tratados com Ex-EtOH 70% em relação ao grupo de animais selvagens (Figura 19e).

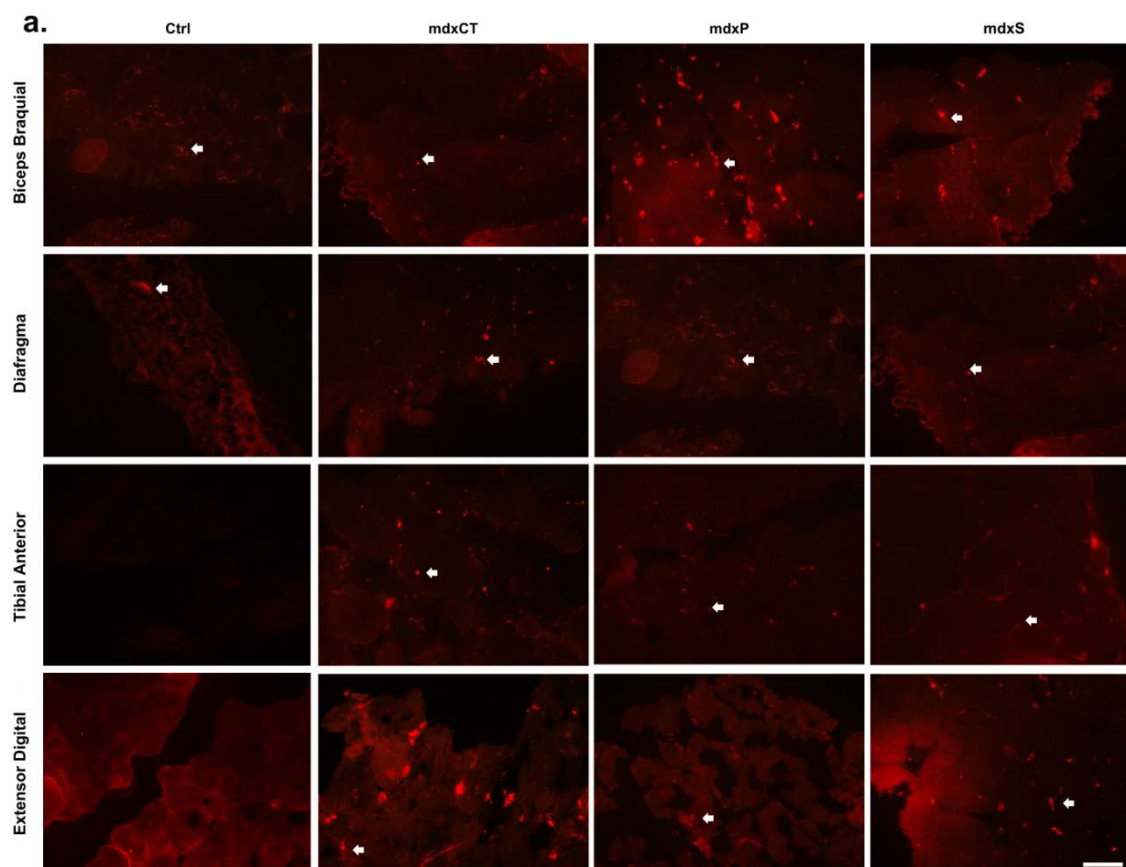
Figura 18 - Inflamação e Núcleo central



Fonte: Autora.

Legenda: Cortes histológicos dos músculos **(a)** BB, DIA, TA e EDL corados com H&E com núcleos periféricos indicados pelas setas pretas, núcleos centrais indicados pelas cabeças de setas e áreas inflamatórias indicadas por asteriscos vermelhos. *Ctrl*: camundongos C57BL/10 do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Aumento significativo na porcentagem de fibras com núcleos centrais nos músculos **(b)** BB, **(c)** DIA, **(d)** TA e **(e)** EDL, em que: difere do grupo *Ctrl*^a, *mdxCT*^b e *mdxP*^c; $P < 0,0001$; Diminuição significativa da área inflamatória nos músculos **(f)** BB e **(g)** DIA, em que difere do grupo *Ctrl*^a, *mdxCT*^b e *mdxP*^c; $P < 0,0001$; **(h)** TA, em que difere do grupo *Ctrl*^a, *mdxCT*^b; $P < 0,0025$; e **(i)** difere do grupo *Ctrl*^a, *mdxCT*^b e *mdxP*^c; $P < 0,0034$. One-way, ANOVA, pós teste de Tukey. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 19 - Macrófagos (F4/80)

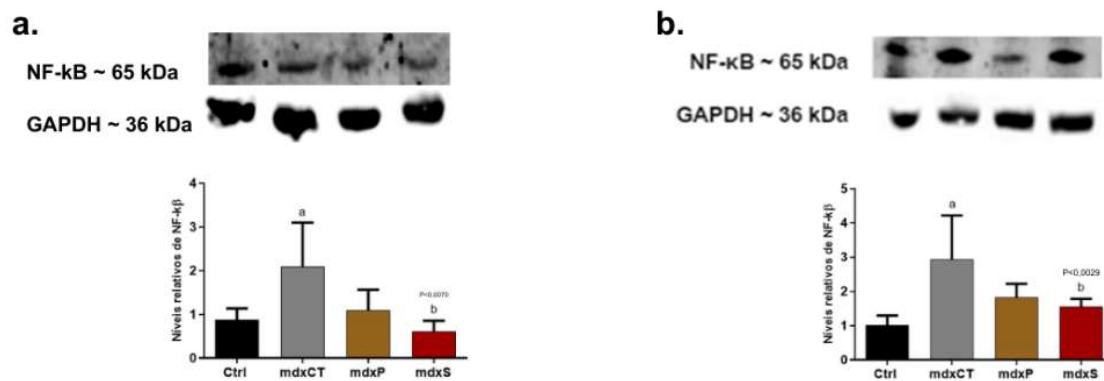


Fonte: Autora.

Legenda: Cortes transversais dos músculos BB, DIA, TA e EDL dos diferentes grupos experimentais com a **(a)** imunofluorescência, incubação com F4/80 mostrando áreas com infiltrado de macrófagos. *Ctrl*: camundongos C57BL/10 do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Média e desvio padrão **(b)** difere de *Ctrl*^a, difere do grupo *mdxCT*^b e difere do grupo e *mdxP*^c; $p < 0,0001$; **(c)** difere de *Ctrl*^a, difere do grupo *mdxCT*^b e difere do grupo e *mdxP*^c; $p < 0,0001$; **(d)** difere de

Ctrl^a; $p < 0,0066$; (e) difere de Ctrl^a; difere do grupo mdxCT^b; $p < 0,0001$. One-way, ANOVA, pós teste de Tukey. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 20 - NF- κ B



Fonte: Autora.

Legenda: Observam-se as bandas imunorreativas para NF- κ B. *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Níveis relativos de NF- κ B no músculo (a) BB: difere do grupo Ctrl^a; difere do grupo mdxCT^b; $p < 0,0070$; e músculo (b) DIA: difere do grupo Ctrl^a; difere do grupo mdxCT^b; $p < 0,0029$. One-way, ANOVA, pós teste de Tukey.

6.7 EFEITO DO EX-ETOH 70% NA DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO

No BB, os animais do grupo *mdx*, tanto os controles quanto os tratados com prednisona, exibiram miofibras necróticas positivas para IgG (Figura 21a). No entanto, o tratamento com o Ex-EtOH 70% foi capaz de reduzir significativamente essa incidência, com diminuições de 65,7% e 46,1%, respectivamente, em relação aos grupos *mdxCT* e *mdxP* (Figura 21b). Além disso, os animais *mdx* apresentaram uma quantidade significativa de fibras com núcleos centralizados (Figura 18a) quando comparados ao grupo controle (Ctrl). Após o tratamento com o extrato fracionado de soja, o grupo *mdxS* demonstrou um aumento significativo na proporção de fibras musculares regeneradas com núcleos centrais em comparação aos grupos *mdxCT* e *mdxP* no BB, com aumentos de 107,2% e 52,6%, respectivamente (Figura 18b).

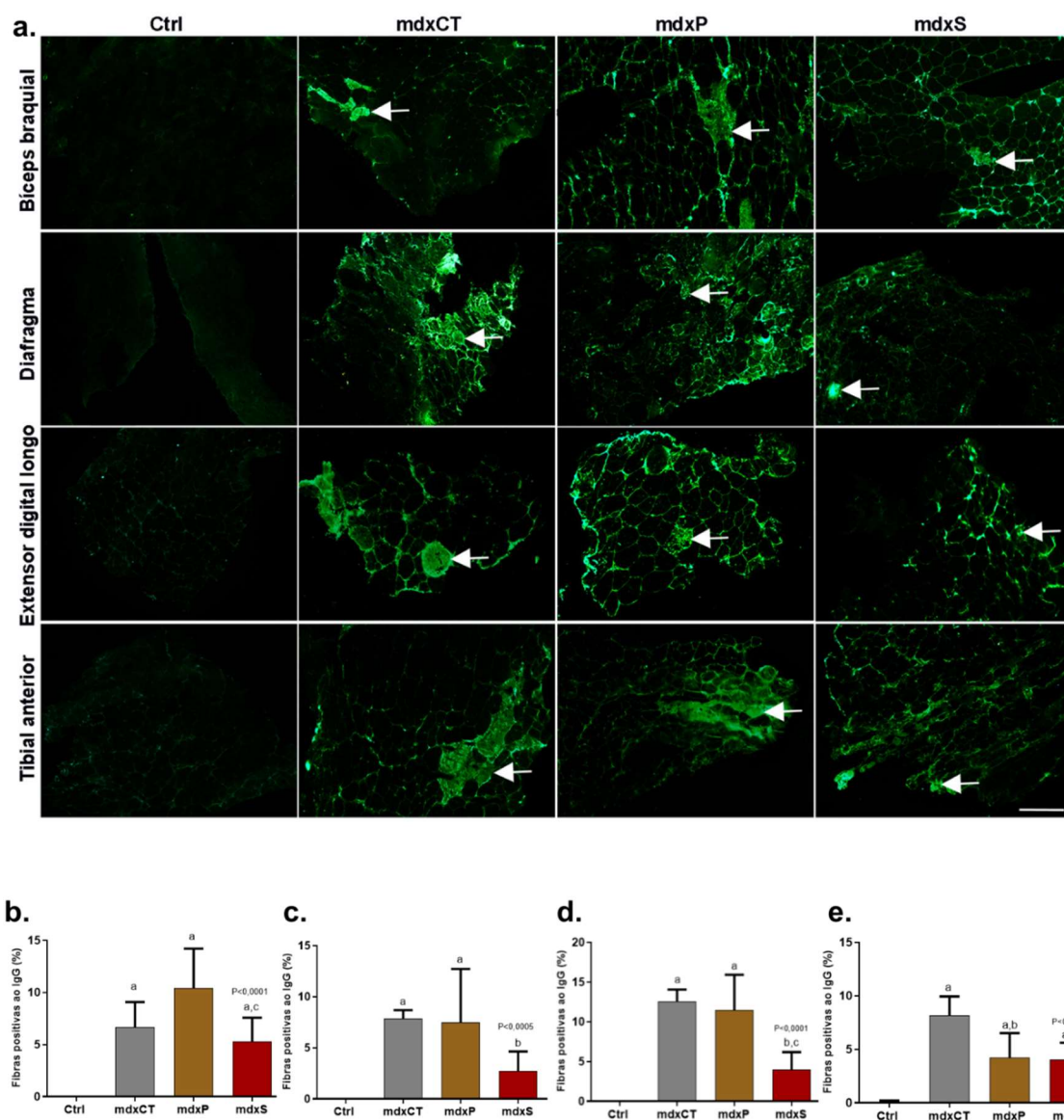
No DIA, os animais do grupo *mdx* controle e aqueles tratados com glicocorticoide apresentaram miofibras necróticas positivas para IgG. Esse marcador foi significativamente reduzido pelo tratamento com o Ex-EtOH 70%, com diminuições de 65,7% e 46,1%, respectivamente, em relação aos grupos *mdxCT* e *mdxP* (Figura 21c). Além disso, todos os grupos *mdx* apresentaram um número significativamente maior de

fibras musculares com núcleos centralizados em comparação ao grupo Ctrl. Após o tratamento com o Ex-EtOH 70%, observou-se um expressivo aumento no número de fibras regeneradas no músculo DIA, com aumentos de 120,1% e 72,8% em relação aos grupos mdxCT e mdxP, respectivamente (Figura 18c).

Os camundongos do grupo mdx apresentaram uma maior incidência de miofibras necróticas positivas para IgG no TA em comparação ao grupo Ctrl. Após o tratamento com o extrato fracionado de soja, observou-se uma redução significativa na porcentagem de miofibras necróticas nos grupos tratados, com diminuições de 50,6% e 45,9% em relação aos grupos mdxCT e mdxP, respectivamente (Figura 21d). Além disso, os camundongos mdx exibiram fibras musculares com núcleos centralizados em maior quantidade em comparação ao grupo Ctrl. O tratamento com o Ex-EtOH 70% resultou em um aumento significativo na proporção de fibras regeneradas com núcleos centralizados no grupo mdxS neste músculo, com incrementos de 40% e 11% em relação aos grupos mdxCT e mdxP, respectivamente (Figura 18d).

No EDL, os animais do grupo mdx controle apresentaram miofibras necróticas positivas para IgG. Embora o tratamento com o Ex-EtOH 70% tenha reduzido a incidência dessas miofibras, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 21e). Quanto às fibras musculares com núcleos centralizados, os animais mdx mostraram um aumento significativo em comparação ao grupo Ctrl. Após o tratamento com o extrato fracionado de soja, o grupo mdxS exibiu um aumento significativo na proporção de fibras regeneradas com núcleos centrais, com incrementos de 25% e 13% em relação aos grupos mdxCT e mdxP, respectivamente (Figura 18e).

Figura 21 - IgG



Fonte: Autora.

Legenda: **(a)** Cortes histológicos dos músculos BB, DIA, TA e EDL com fibras positivas ao IgG indicadas pela seta branca. *Ctrl*: camundongos do grupo controle; *mdxCT*: camundongos *mdx* tratados com solução salina; *mdxP*: camundongos *mdx* tratados com Prednisona; *mdxS*: camundongos *mdx* tratados com extrato fracionado da soja. Média e desvio padrão da porcentagem de fibras positivas ao IgG nos músculos **(b)** BB em que: difere do grupo Ctrl^a; difere do grupo mdxP^c; P<0,0001; **(c)** DIA em que: difere do grupo Ctrl^a; difere do grupo mdxCT^b; P<0,0005; **(d)** TA em que: difere do grupo Ctrl^a; mdxCT^b; e mdxP^c; P<0,0001 e **(e)** EDL, em que: difere do grupo Ctrl^a; mdxCT^b; P<0,0001; *One way ANOVA*, pós teste de Tukey. Barra de escala: 100 μ m.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta o potencial efeito antioxidante do extrato fracionado de soja no modelo experimental da DMD, o camundongo mdx. A análise funcional, bioquímica e histopatológica demonstra ser benéfica e de boa tolerância para os animais distróficos, com grande implicação protetora à condição severa da doença nos músculos distróficos estudados. As isoflavonas presentes no Ex-EtOH 70% possuem as propriedades bioativas que melhor atuam frente a lesão muscular.

A relação entre a genisteína e o sistema antioxidante é multifacetada e evidencia seu papel como um agente antioxidante eficaz. A genisteína apresenta propriedades antioxidantes significativas ao atuar na eliminação de radicais livres por meio de mecanismos de transferência sequencial de elétrons com perda de prótons (Sharifi-Rad *et. al.*, 2021). Esse processo permite a neutralização dos radicais livres, o que melhora diversas vias antioxidantes, reduz o estresse oxidativo e minimiza a inflamação em diferentes contextos biológicos (Barbosa *et. al.*, 2010). Dessa forma, a genisteína desempenha um papel relevante na promoção da saúde ao contribuir para o equilíbrio redox celular e a mitigação de danos oxidativos (Paciotti *et. al.*, 2022). A administração da genisteína em ratos resultou entre outros efeitos, normalização das irregularidades histológicas, indução de respostas antioxidantes, atenuação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e proteção contra o estresse oxidativo (Xiao e Hendry, 2023). Mohamed *et. al.* (2009) concluíram que a genisteína induz ativação do perfil antioxidante, reduz os níveis de IL-6 e TNF- α e atenua o dano oxidativo em ratos.

Os glicocorticóides sintéticos, como a prednisona, são investigados e aceitos como tratamento para a DMD por apresentar significativa melhora da condição danosa desses pacientes (Brooke, Fenichel *et. al.*, 1987; Fenichel, Florence *et. al.*, 1991; Li, Cai *et. al.*, 2013). No presente estudo, a prednisona não foi efetiva na prevenção da degeneração muscular em nenhum dos músculos avaliados e não foi capaz de reduzir lesão muscular do modelo mdx no período de tratamento proposto, mesmo contribuindo com a melhora da força muscular. Mesmo assim, o estudo de Matthews *et. al.*, (2016), mostra que o tratamento a longo prazo com este anti-inflamatório corticosteroide não foi capaz de evitar o declínio progressivo da força muscular dos animais distrófico. Além destas constatações, a disponibilidade de receptores de glicocorticoides no músculo esquelético

é extremamente baixa quando comparada aos receptores estrogênicos (Feder, Ierardi *et al.*, 2018).

O Ex-EtOH 70% foi benéfico no camundongo mdx, muito provavelmente pela ação estrogênica das isoflavonas no tecido muscular distrófico, pela interação e modulação dos ERs (modulador seletivo do receptor de estrogênio-SERM) (Reinli and Block 1996; Hernandez, Zhao *et al.*, 2018; Tham, Gardner *et al.*, 1998). Não só por suas ligações aos ERs, as isoflavonas manifestam sua bioatividade por inibir tirosinas quinases, possuir atividade antioxidante, ligar e ativar os reguladores proliferadores de peroxissoma α e γ , inibir enzimas na biossíntese de esteroides, exercer forte influência na função das células *natural killer*, promover a ativação de subconjuntos específicos de células T e impedir a metástase especificamente no câncer de mama (Barnes, 2010). A ação protetora do estrogênio no tecido muscular distrófico já é conhecida. Camundongos mdx fêmeas submetidas ao exercício físico intenso apresentam indicadores de lesão muscular menores em comparação aos animais machos (Hermes *et al.*, 2018).

Da mesma forma, os SERMs já demonstraram efeito benéfico sobre o tecido muscular distrófico (Dorchies, Reutenauer-Patte *et al.*, 2013). Porém, algumas explicações de seus efeitos são inconclusivas, possivelmente pelas diferentes respostas na interação com todos os tipos de ERs. A modulação do ER- β melhora o influxo exacerbado de cálcio pela regulação da TPM e inativação da enzima CypD (Burstein, Kim *et al.*, 2018). A inativação da expressão de CypD em camundongos mdx, tornou as mitocôndrias resistentes ao influxo exacerbado intracelular de cálcio, reduzindo assim a mionecrose (Millay, Sargent *et al.*, 2008).

Colaborando com nossos achados, estudos preliminares mostram que a administração de 2mg/kg da isoflavona genisteína em camundongos mdx tem a capacidade de melhorar a função muscular associado a uma atenuação da ativação de fator nuclear kappa-B, MAPKs e ativação de TNF- α , bem como reduz a apoptose (Messina, Bitto *et al.*, 2011, Messina, Bitto *et al.*, 2015). O músculo esquelético demonstra alta adaptabilidade e potencial regenerativo, capaz de compensar a perda de até 20% de sua massa muscular, que ocorre após a resposta inflamatória: reparo, regeneração e crescimento muscular, que inclui a ativação e proliferação de células satélites e finalmente, sua diferenciação (Liu *et al.*, 2018).

O aumento da inflamação e da fibrose são comuns na DMD, contribuindo para o dano muscular e, conseqüentemente, a formação do núcleo central (Michelucci *et al.*,

2017). A presença de fibras com núcleo central está associada à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo. As abordagens antioxidantes sugerem um papel protetor contra a degeneração muscular (Klingler *et. al.*, 2012). Conforme exposto nos resultados do BB, DIA, TA e EDL, foi possível observar que a administração do Ex-EtOH 70% tem ação protetora devido ao aumento de fibras com núcleo central e diminuição de marcadores de lesão.

Considerando o estudo de Kim *et. al.*, (2018), nossos resultados são promissores, uma vez que a administração do Ex-EtOH 70% contendo quantidade equivalente de genisteína se mostrou mais potente do que a própria isoflavona isolada na inibição da proliferação do câncer de mama em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c (Kim, Jeong *et. al.*, 2008). Sabendo que a atividade antioxidante das isoflavonas já foi comprovada em experimentos tanto *in vitro* e *in vivo* (Ruiz-Larrea, Mohan *et. al.*, 1997), a utilização do Ex-EtOH 70% em camundongos mdx mostra-se promissora pelos possíveis efeitos benéficos de redução do estresse oxidativo e regulação da atividade de enzimas antioxidantes. De acordo com estudos realizados por Tan *et. al.*, (2019) incluindo soja na dieta de peixes, as enzimas antioxidantes SOD e GSH peroxidase tiveram sua expressão aumentada.

A energia gerada pelas células é de responsabilidade mitocondrial, que também conta com a produção de EROs em concentrações equilibradas. Para manter os níveis de EROs estáveis, as mitocôndrias possuem um sistema antioxidante próprio, responsável pela eliminação e neutralização dos radicais livres, compreendido pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Belhadj Slimen, 2014). Como dito por Barbieri e Sestili (2011), as enzimas SOD e NF- κ B são componentes cruciais na resposta adaptativa das células musculares esqueléticas ao estresse oxidativo, com importância na manutenção da homeostase redox. Sendo assim, os efeitos de Ex-EtOH 70% foram benéficos no tecido muscular distrófico dos camundongos estudados pela redução de marcadores inflamatórios e oxidativos. Sobrecargas de Ca^{2+} na matriz mitocondrial promove danos a longo prazo, principalmente abertura prolongada do PTP, incitando a despolarização mitocondrial, redução da síntese de ATP e hidrólise do ATP glicolítico (Casati, *et. al.*, 2024).

Conforme já visto, o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre EROs e as defesas antioxidantes do organismo, levando à danos celulares. A lipofuscina é um marcador do estresse oxidativo, acumulando-se nas células como subproduto da

peroxidação lipídica e do envelhecimento celular (Gagné, 2013). Conforme observado no presente estudo, houve diminuição dos grânulos de lipofuscina em todos os músculos observados, podendo indicar redução no estresse oxidativo e na peroxidação lipídica nas células. O DHE é utilizado para detectar níveis de superóxido, fornecendo indicações de estresse oxidativo nos tecidos (Vincent *et. al.*, 2021). A catalase desempenha um papel essencial na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Srivastava *et. al.*, 2017; Vincent *et. al.*, 2021). O aumento da catalase visto no BB pode indicar que o tratamento com Ex-EtOH 70% pode ter estimulado a atividade antioxidante celular, aumentando a capacidade das células musculares de neutralizarem o peróxido de hidrogênio e, assim, reduzir o estresse oxidativo. Esse efeito pode ajudar a minimizar os danos musculares e inflamação, contribuindo para a proteção e regeneração muscular na DMD.

De acordo com os resultados observados nos baixos níveis de adutos de 4-HNE, os camundongos mdx possuem baixa peroxidação lipídica. A enzima 4-HNE é um aldeído altamente reativo formado como um subproduto da oxidação de ácidos graxos insaturados durante o estresse oxidativo (Esterbauer *et. al.*, 1990). De acordo com Uchida *et. al.*, (2017), a 4-HNE é capaz de modificar proteínas, lipídios e DNA, levando a disfunção celular e contribuindo para o desenvolvimento de várias doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares. Além de ser considerada uma toxina celular, também pode atuar como um segundo mensageiro intracelular, modulando a atividade de várias proteínas quinases e fatores de transcrição que regulam respostas celulares ao estresse oxidativo (Li *et. al.*, 2022). Ayala *et. al.*, (2014) mostraram que níveis elevados dessa enzima estão associados a diversas doenças humanas, ressaltando seu papel crítico como marcados do estresse oxidativo e mediador direto de danos celulares e disfunção tecidual. O 4-HNE é um aldeído reativo gerado durante a peroxidação lipídica, contribuindo para o estresse oxidativo e danos às estruturas celulares (Cao *et. al.*, 2002). Sua detoxificação ocorre principalmente por meio da conjugação com GSH, processo fundamental para minimizar os efeitos citotóxicos do 4HNE (Alary *et. al.*, 2003). Nesse cenário, a ação antioxidante do extrato da soja foi capaz de melhorar a peroxidação lipídica no BB.

O GSH é um dos principais antioxidantes endógenos presentes nas células e atua neutralizando espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres que são produtos do metabolismo celular e podem causar danos às células e aos tecidos (Ballatori, 2009). A

glutathiona desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio redox celular, participando de reações de oxirredução, alternando entre sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A forma reduzida (GSH) é essencial para neutralizar EROs e restaurar o GSSG para GSH através da ação da enzima glutathiona redutase (Dickinson e Forman, 2002). O GSH atua como um antioxidante essencial, protegendo as células contra danos oxidativos. Na DMD, a redução dos níveis de GSH está associada ao aumento do estresse oxidativo e à intensificação da lesão muscular (Almeida-Becerril *et. al.*, 2023; Khouzami *et. al.*, 2010). Evidências sugerem que o aumento dos níveis de GSH pode atenuar a citotoxicidade induzida por 4HNE, reforçando seu papel protetor (Cao *et. al.*, 2002). Dessa forma, o equilíbrio redox se justifica para limitar os danos celulares e retardar a progressão de doenças associadas ao estresse oxidativo. Nossos resultados indicam ação benéfica do extrato da soja por restaurar o estado redox no DIA dos animais distróficos. No BB, o aumento do GSH pode sugerir um mecanismo compensatório para neutralização das EROs.

O NF- κ B é um fator de transcrição que controla a expressão de genes associados à resposta inflamatória, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Lawrence, 2009). Ele desempenha um papel fundamental na ativação de macrófagos e outras células imunes quando confrontada com estímulos inflamatórios. No contexto da DMD, o NF- κ B tem sido associado ao desenvolvimento de inflamação muscular crônica (Acharyya *et. al.*, 2005). Pesquisas indicam que a ativação sustentada do NF- κ B pode contribuir para o dano muscular persistente observado na DMD, estimulando a produção de citocinas inflamatórias e promovendo a quebra de proteínas (Falzarano *et. al.*, 2015; Acharyya *et. al.*, 2005). A relação entre NF- κ B, inflamação crônica e a DMD é fundamental para compreender a patologia da doença e as possíveis abordagens terapêuticas. O NF- κ B é um fator de transcrição que, quando ativado, contribui para a inflamação e degeneração muscular na DMD. Estudos sugerem que a inibição de NF- κ B pode reduzir a patologia muscular e a inflamação em modelos da doença. Estudos de Acharyya *et. al.*, (2007) demonstram que a ativação de NF- κ B permanece persistentemente elevada em células imunes e fibras musculares, resultando em inflamação crônica e necrose muscular. Por outro lado, Proto (2013) e Yang *et. al.*, (2012) em seus achados mostram que a inibição especialmente da subunidade p65, melhoraram a regeneração muscular e reduziram a inflamação em modelos de camundongos mdx. A terapia genética, por meio da administração mediada por AAV de p65-shRNA, resultou em uma redução significativa

dos níveis de NF- κ B, melhorando a patologia muscular em camundongos mdx (Yang *et al.*, 2012). Entretanto, embora a inibição de NF- κ B seja promissora, a ubiquitinação da via representa desafios para a aplicação clínica, uma vez que a inibição generalizada pode resultar em efeitos adversos, como a toxicidade renal, observada em alguns estudos (Reay *et al.*, 2015). Várias estratégias terapêuticas com foco na modulação do NF- κ B foram exploradas como meios potenciais para aliviar a inflamação e retardar a progressão da DMD (Malik *et al.*, 2012).

A interação entre macrófagos, inflamação e a via de sinalização NF- κ B é central para a compreensão da DMD. Os macrófagos desempenham um papel dual na doença, contribuindo tanto para a inflamação quanto para a regeneração muscular, enquanto a via NF- κ B atua como um regulador essencial desses processos. Durante o reparo tecidual, os macrófagos alternam entre estados pró-inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios (M2), sendo indispensáveis para a regeneração muscular. No entanto, na DMD, essa transição é desregulada, resultando em inflamação persistente, regeneração muscular prejudicada e acúmulo de fibrose no tecido muscular (He, 2016; Hernández-Torres *et al.*, 2024). Além disso, a via NF- κ B está hiperativada na DMD, particularmente em macrófagos e fibras musculares, promovendo inflamação crônica e necrose muscular (Acharyya *et al.*, 2007). A inflamação crônica na DMD, gerada pela ativação contínua de macrófagos e da via NF- κ B, leva a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, exacerbando a degeneração muscular (Messina *et al.*, 2011). Essa interação entre macrófagos e NF- κ B não só amplifica os danos musculares, como também sugere que intervenções voltadas para essa relação podem ser eficazes no manejo da doença (He, 2016; Acharyya *et al.*, 2007). Assim, nós observamos que o Ex-EtOH 70% teve ação anti-inflamatória por reduzir os níveis de macrófagos e NF- κ B no BB e DIA dos camundongos mdx.

Os núcleos centrais são prevalentes em músculos distróficos devido aos ciclos repetidos de degeneração e regeneração (Saponjian, 2016). No entanto, com o avanço da DMD, a capacidade regenerativa das fibras musculares diminui, levando ao aumento da nucleação central (Chemello *et al.*, 2020). O índice nuclear central, usado como medida de regeneração muscular, tende a diminuir com tratamentos eficazes, indicando uma melhora na saúde muscular (Zschüntzsch *et al.*, 2020).

8 CONCLUSÃO

O Ex-EtOH 70% rico em isoflavonas demonstrou ser seguro e benéfico no modelo de camundongo mdx, promovendo melhora na função muscular e redução da miopatia. As isoflavonas atuaram por meio da via de inibição de NF- κ B e da redução da produção de EROs, modulando o estresse oxidativo e a inflamação, além de regular os processos de degeneração e regeneração no músculo distrófico. Investigações futuras desses mecanismos podem esclarecer o potencial terapêutico das isoflavonas na ativação da via miogênica para o reparo muscular em casos de DMD.

REFERÊNCIAS

AARTSMA-RUS, A.; VAN PUTTEN, M. Assessing Functional Performance in the Mdx Mouse Model. **Journal of Visualized Experiments**, Massachusetts: Cambridge.n. 85, 27 mar. 2014.

ACHARYYA, S. *et al.* Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Clinical Investigation**, EUA. v. 117, n. 4, p. 889–901, 2 abr. 2007.

ACHARYYA, S. *et al.* Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: A regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. **Cancer Cell**, [S. l.]. v. 8, n. 5, p. 421–432, nov. 2005.

ALARY, J. *et al.* Identification of Intermediate Pathways of 4-Hydroxynonenal Metabolism in the Rat. **Chemical Research in Toxicology**, D.C.: Washington. v. 16, n. 3, p. 320–327, 7 fev. 2003.

TOMÁS ALMEIDA-BECERRIL *et al.* Circulating Nrf2, Glutathione, and Malondialdehyde Correlate with Disease Severity in Duchenne Muscular Dystrophy. **Antioxidants**, Suíça: Basileia. v. 12, n. 4, p. 871–871, 3 abr. 2023.

AMIGO-BENAVENT, M. *et al.* Protein Quality, Antigenicity, and Antioxidant Activity of Soy-Based Foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, D.C.: Washington. v. 56, n. 15, p. 6498–6505, 12 jul. 2008.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London. v. 2014, n. 360438, p. 1–31, 2014.

ARAGON, G., YOUNOSSI, Z. M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. **Cleveland Clinic Journal Of Medicine**. Ohio: Cleveland. 2010; v. 77 n. 3. p. 195–204. doi: 10.3949/ccjm.77a.09064.

BAINES, C. P.; KAISER, R. A.; PURCELL, N. H.; BLAIR, N. S.; OSINSKA, H.; HAMBLETON, M. A.; BRUNSKILL, E. W.; SAYEN, M. R.; GOTTLIEB, R. A.; DORN, G. W.; ROBBINS, J.; MOLKENTIN, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**, EUA. v. 434, n. 7033, p. 658–662, mar. 2005.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of

human diseases. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland: Rockville. v. 390, n. 3, p. 191–214, 1 mar. 2009.

BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. **Journal of Signal Transduction**, [S. l.]. v. 2012, p. 1–17, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, São Paulo: Campinas. v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARNES, S. The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products. **Lymphatic Research and Biology**, New York: New Rochelli. v. 8, n. 1, p. 89–98, 1 mar. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, Campinas. v. 29, n. 1, p. 113–123, fev. 2006.

BASSO, E.; FANTE, L.; FOWLKES, J.; PETRONILLI, V.; FORTE, M. A.; BERNARDI, P. Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland: Rockville. v. 280, n. 19, p. 18558–18561, 25 mar. 2005.

BELHADJ SLIMEN, I.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; DABBEBI, H.; BEN MRAD, M.; ABDREBBAH, M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **International Journal of Hyperthermia**, London. v. 30, n. 7, p. 513–523, 30 out. 2014.

BENCZE, M.; PERIOU, B.; BABA-AMER, Y.; AUTHIER, F. J. Immunolabelling Myofiber Degeneration in Muscle Biopsies. **Journal of Visualized Experiments**, Massachusetts: Cambridge. n. 154, 5 dez. 2019.

BERNARDI, P.; BROEKEMEIER, K. M.; PFEIFFER, D. R. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, [S.l.]. v. 26, n. 5, p. 509–517, out. 1994.

BHAT-NAKSHATRI, P. *et al.* AKT Alters Genome-Wide Estrogen Receptor α Binding and Impacts Estrogen Signaling in Breast Cancer. **Molecular and Cellular Biology**, London. v. 28, n. 24, p. 7487–7503, 15 dez. 2008.

BETTAIAH, A.; PRABHUSHANKAR, H. B. Screening of Novel Source for Genistein by Rapid and Sensitive UPLC-APCI-TOF Mass Spectrometry. **International Journal of Food Science**, EUA. v. 2021, p. 1–12, 16 mar. 2021.

BIGGAR, W. D.; SKALSKY, A.; MCDONALD, C. M. Comparing Deflazacort and Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, California. v. 9, n. 4, p. 463–476, 1 jul. 2022.

BIGGAR, W. D.; KLAMUT, H. J.; DEMACIO, P. C.; STEVENS D. J.; RAY, P. N. *et al.* Duchenne Muscular Dystrophy: Current Knowledge, Treatment, and Future Prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Alemanha: Berlim. v. 401, p. 88–106, ago. 2002.

BIRNKRANT, D. J.; BUSHBY, K.; BANN, C. M.; APKON, S. D.; BLACKWELL, A.; BRUMBAUGH, D.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; HADJIYANNAKIS, S.; PANDYA, S.; STREET, N.; TOMEZSKO, J.; WAGNER, K. R.; WARD, L. M.; WEBER, D. R. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. **The Lancet Neurology**, Reino Unido. v. 17, n. 3, p. 251–267, mar. 2018.

BOGDANOVICH, S. PERKINS, K. J; KRAG T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, Berlim: Alemanha. v. 82, n. 2, p. 102–115, 1 fev. 2004.

BONFANTE, B. G. BUCCO, S.; PINCULINI, A. P.; HABERMANN, M. A. Distrofia muscular de Duchenne: uma revisão narrativa. **Observatório de la economía latinoamericana**, [S.l.]. v. 22, n. 5, p. e4673–e4673, 14 maio 2024.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Holanda: Amsterdam. v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 29 jan. 1976.

BROOKE, M. H. Clinical Investigation of Duchenne Muscular Dystrophy. **Archives of Neurology**, Illinois: Chicago. v. 44, n. 8, p. 812, 1 ago. 1987.

BROOKES, P. S. *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, EUA. v. 287, n. 4, p. C817–C833, out. 2004.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT P. A.; MOORE K. J. *et al.* X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA. v. 81, n. 4, p. 1189–1192, 1 fev. 1984.

BURSTEIN, S. R.; KIM, H. J.; FELS, J. A.; QIAN, L.; ZHANG, S.; ZHOU, P.; STARKOV, A. A.; IADECOLA, C.; MANFREDI, G. Estrogen receptor beta modulates permeability transition in brain mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Holanda: Amsterdam. v. 1859, n. 6, p. 423–433, 18 mar. 2018.

CAMPOS, R. F. *et al.* Distrofia muscular de duchenne: uma análise abrangente dos avanços diagnósticos, abordagens terapêuticas e desafios contemporâneos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, Washington: Columbia. v. 10, n. 8, p. 1931–1937, 16 ago. 2024.

CAO, Z. *et al.* The Role of Chemically Induced Glutathione and Glutathione S-Transferase in Protecting Against 4-Hydroxy-2-Nonenal- Mediated Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle Cells. **Cardiovascular Toxicology**, Alemanha. v. 3, n. 2, p. 165–178, 2003.

DO CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: Scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, Holanda: Amsterdam. v. 24, p. 26–35. 2018.

CASATI, S. R. *et al.* Mitochondria and Reactive Oxygen Species: The Therapeutic Balance of Powers for Duchenne Muscular Dystrophy. **Cells**, Basileia, Suíça. v. 13, n. 7, p. 574, 1 jan. 2024.

CHEMELLO, F. WANG, Z.; LI, H.; MCANALLY, J. R.; LIU, N.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Degenerative and regenerative pathways underlying Duchenne muscular dystrophy revealed by single-nucleus RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA. v. 117, n. 47, p. 29691–29701, 4 nov. 2020.

CHEN, L.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, W.; HAN, H.; YANG, C.; DONG, X. Superoxide dismutase ameliorates oxidative stress and regulates liver transcriptomics to provide therapeutic benefits in hepatic inflammation. **PeerJ**, Reino Unido. v. 11, p. e15829–e15829, 11 ago. 2023.

CHOI, E. J. Evaluation of Equol Function on Anti- or Prooxidant Status in vivo. **Journal of Food Science**, EUA. v. 74, n. 2, p. H65–H71, mar. 2009.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, EUA. v. 84, n. 4, p. 165–172, 22 out. 2003.

CONNERN, C. P.; HALESTRAP, A. P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. **Biochemical Journal**, Oregon: Portland. v. 302, n. 2, p. 321–324, 1 set. 1994.

CULLEN, M. J.; JAROS, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. **Acta Neuropathologica**, Alemanha. v. 77, n. 1, p. 69–81, 1988.

De ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. Biomarkers of free radical damage. **Free Radical Biology and Medicine**, Holanda: Amsterdam. vol. 26, n° 1, janeiro de 1999, p. 202–26, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00196-8).

HAMAM, H. HAMAM, H.; AYDIN, M.; DEMIR, C. Determination of Some Antioxidant Activities (Superoxide Dismutase, Catalase, Reduced Glutathione) and Oxidative Stress Level (Malondialdehyde Acid) in Cirrhotic Liver Patients. **Middle Black Sea Journal of Health Science**, Turquia. 5 set. 2022.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Glutathione in Defense and Signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York. v. 973, n. 1, p. 488–504, nov. 2002.

DIEZ-PEREZ, A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). **Archives Of Endocrinology and Metabology**. São Paulo. v. 50, n. 4, p. 720–734, ago. 2006.

DORCHIES, O. M. *et al.* The Anticancer Drug Tamoxifen Counteracts the Pathology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **The American Journal of Pathology**, USA. v. 182, n. 2, p. 485–504, fev. 2013.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, USA. v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUAN, D. GOEMANS, N.; TAKEDA, S.; MERCURI, E.; AARTSMA-RUS, A. Duchenne Muscular Dystrophy. **Nature Reviews Disease Primers**, London. v. 7, n. 1, p. 1–19, 18 fev. 2021.

DUCHENNE, G.-B. (1806-1875). **De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique**. P. Asselin, 1868, <https://catalog.hathitrust.org/Record/011270963>.

ELANGKOVAN, N.; DICKSON, G. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, California. v. 8, n. s2, p. S303–S316, 1 jan. 2021.

ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology: basic and clinical. 1**. New York, Ny: Mcgraw-Hill, 2004.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, Massachusetts: Cambridge. vol. 186, Academic Press, 1990, p. 407–21.

EVANS, W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **The American Journal of Clinical Nutrition**, EUA. v. 72, n. 2, p. 647S652S, 1 ago. 2000.

RASHID, F.; GHIMIRE, A. K.; MANGALAM, S. GIRI, A. A UPLC-MS/MS Based Rapid, Sensitive, and Non-Enzymatic Methodology for Quantitation of Dietary Isoflavones in Biological Fluids. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 18, p. 6729, Spring 2023.

FALZARANO, M. et al. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. **Molecules**, Basileia: Suíça. v. 20, n. 10, p. 18168–18184, 7 out. 2015.

FAURE, P.; LAFOND, J.-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. **Birkhäuser Basel eBooks**, Suíça. p. 237–248, 1 jan. 1995.

FEDER, D.; GODOY, R. B. I.; PEREIRA, M. L.G.; SILVA, C. S.; SILVESTRE, D. N.; FONSECA, F. L.; CARVALHO, A. A. S.; SANTOS, R. A.; CARVALHO, M. H. C. Hormonal Receptors in Skeletal Muscles of Dystrophic Mdx Mice. **BioMed Research International**, London. v. 2013, p. 1–6, 2013.

FEDER, D. *et al.* Evaluation of the gastrointestinal tract in mdx mice: an experimental model of Duchenne muscular dystrophy. **APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica**, New Jersey: Hoboken. v. 126, n. 8, p. 693–699, ago. 2018.

FENICHEL, G. M. *et al.* Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, Filadelfia. USA. v. 41, n. 12, p. 1874–1874, 1 dez. 1991.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects Of Medicine**, Holanda: Amesterdam. v. 30, n. 1-2, p. 1–12, 2009.

FRANCKE, U. *et al.* Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. **American Journal Of Human Genetics**, Massachusetss: Cambrigde. v. 37, n. 2, p. 250–67, mar. 1985.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review Of Biochemistry**, California: San Matheo. v. 64, p. 97–112, 1995.

GAGNÉ, F. Oxidative Stress. **Biochemical Ecotoxicology**, Holanda: Amsterdam. p. 103–115, 2014.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, London. v. 8, n. 11, p. 837–848, 1 nov. 2008.

GLENMARK, B. NILSSON, M.; GAO, H.; GUSTAFSSON, J. A.; DAHLMAN-WRIGHT K.; WESTERBLAD, H. Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor- β . **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, USA. v. 287, n. 6, p. E1125–E1131, dez. 2004.

GROUND, M. D. *et al.* Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiology of Disease**, Holanda: Amsterdam. v. 31, n. 1, p. 1–19, jul. 2008.

GROUND, M.D. Quantification of histopathology in Haemotoxylin and Eosin stained muscle sections. **TREAT-NMD protocol**. Newcastle: Inglaterra. 2010.

GUO, J.; XIAO, B.; MALHI, A. The effect of isoflavones on cancer and cancer therapy. **Frontiers in Endocrinology**, Suíça. v. 6, p. 152. 2015.

GUSTAFSSON, T. *et al.* Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, USA. v. 276, n. 2, p. H679–H685, 1 fev. 1999.

CHEN, H. AILI, R.; WANG, M.; QIU, F. Transformation profiles of the isoflavones in germinated soybean based on UPLC-DAD quantification and LC-QTOF-MS/MS confirmation. **Food chemistry: X**, Holanda: Amsterdam. v. 22, p. 101413, 2024.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. Holanda: Amsterdam. Nov;55(6):481-504. doi: 10.1016/s0031-9422(00)00235-1. PMID: 11130659. 2000.

HERMES, T. A.; KIDO, L. A.; MACEDO, A. B.; MIZOBUTI, D. S.; MORAES, L. H. R.; SOMAZZ, M. C.; CAGNON V. H. A.; MINATEL, E. Sex influences diaphragm muscle response in exercised mdx mice. **Cell Biology International**, London. v. 42, n. 12, p. 1611–1621, 1 dez. 2018.

HERMES, T. A.; FRATINI, P.; NASCIMENTO, B. G.; FERREIRA, L. L.; PETRI, G.; FONSECA, F. L. A.; CARVALHO, A. A. S.; FEDER, D. Trilobatin contributes to the improvement of myopathy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **International Journal of Experimental Pathology**, EUA. 13 mar. 2024.

HERNANDEZ, G.; ZHAO, L.; FRANKE, A. A.; CHEN, Y. L.; MACK, W. J.; BRINTON, R. D.; SHNEIDER, L. S. Pharmacokinetics and safety profile of single-dose administration of an estrogen receptor β -selective phytoestrogenic (phytoSERM) formulation in perimenopausal and postmenopausal women. **Menopause**, [s.l.]. v. 25, n. 2, p. 191–196, fev. 2018.

HODGETTS, S. *et al.* Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, Reino Unido. v. 16, n. 9-10, p. 591–602, out. 2006.

HOFFMAN, E. P. *et al.* Genetic counseling of isolated carriers of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal Of Medical Genetics**, New Jersey: Hoboken. v. 63, n. 4, p. 573–580, 28 jun. 1996.

JACOBS, P. A. *et al.* Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosomal translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. **American Journal Of Human Genetics**, Massachusetts: Cambridge. v. 33, n. 4, p. 513–8, jul. 1981.

Jl, L. L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. **Experimental Gerontology**, Holanda: Amsterdaam. v. 42, n. 7, p. 582–593, jul. 2007.

JIA, Y. *et al.* Activation of p38 MAPK by Reactive Oxygen Species Is Essential in a Rat Model of Stress-Induced Gastric Mucosal Injury. **Journal of Immunology**, USA. v. 179, n. 11, p. 7808–7819, 1 dez. 2007.

KHOUZAMI, L. *et al.* Delayed Cardiomyopathy in Dystrophin Deficient mdx Mice Relies on Intrinsic Glutathione Resource. **The American Journal of Pathology**, USA. v. 177, n. 3, p. 1356–1364, 1 set. 2010.

KIM, H.-A.; JEONG, K.-S.; KIM, Y. K. Soy extract is more potent than genistein on tumor growth inhibition. **Anticancer research**, Grécia. v. 28, n. 5A, p. 2837–41, 2008.

KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. **Nucleic Acids Research**, Oxford: Reino Unido. v. 29, n. 14, p. 2905–2919, 15 jul. 2001.

KLINGE, C. M.; JERNIGAN, S. C.; MATTINGLY, K. A.; RISINGER, K. E.; ZHANG, J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors α and β by coactivators and corepressors. **Journal of Molecular Endocrinology**, Reino Unido. v. 33, n. 2, p. 387–410, 1 out. 2004.

KLINGLER, W.; JURKAT-ROTT, K.; LEHMANN-HORN, F.; SCHLEIP, R. The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica: Myopathies and Cardiomyopathies: Official Journal of the Mediterranean Society of Myology**, Italia. v. 31, n. 3, p. 184–195, 1 dez. 2012.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiological reviews**, USA. v. 81, n. 2, p. 807–69, 2001.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, New York: Long Island: Cold Spring Harbor. v. 1, n. 6, p. a001651–a001651, 7 out. 2009.

LEMOINE, S.; GRANIER, P.; TIFFOCHE, C.; RANNOU-BEKONO, F.; THIEULANT, M. L.; DELAMARCHE, P. Estrogen Receptor Alpha mRNA in Human Skeletal Muscles. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, USA. v. 35, n. 3, p. 439–443, 1 mar. 2003.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; GUILLAMON, E.; GARCIA-LAFUENTE, A.; MARTINEZ, J. A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, Holanda: Amsterdam. v. 1216, n. 1, p. 2–29, jan. 2009.

MACEDO, A. B.; MIZOBUTI, D. S.; HERMES, T. A.; MANCIO, R. D.; PERTILLE, A.; KIDO, L. A.; CAGNON, V. H. A.; MINATEL, E. Photobiomodulation Therapy for Attenuating the Dystrophic Phenotype of Mdx Mice. **Photochemistry and photobiology**, Florida: Sarasota. v. 96, n. 1, p. 200–207, jan. 2020.

MALIK, V.; RODINO-KLAPAC, L. R.; MENDELL, J. R. Emerging drugs for Duchenne muscular dystrophy. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 17, n. 2, p. 261–277, 25 maio 2012.

MARTTUNEN, M. B. *et al.* Effects of Tamoxifen and Toremifene on Urinary Excretion of Pyridinoline and Deoxypyridinoline and Bone Density in Postmenopausal Patients with Breast Cancer. **Calcified Tissue International**, Alemanha. v. 65, n. 5, p. 365–368, nov. 1999.

MATTHEWS, E. *et al.* Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. **The Cochrane database of systematic reviews**, New Jersey: Hoboken. v. 5, n. 5, p. CD003725, 5 maio 2016.

MENDELL, J. R. *et al.* Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, EUA. v. 71, n. 3, p. 304–313, mar. 2012.

MESSINA, M. A brief historical overview of the last two decades of soy and isoflavone research. **The Journal of Nutrition**, EUA. v. 140. n. 7, p. 1350S-1354S. 2010.

MESSINA, S.; VITA, G. L.; AGUENNOUZ, M.; SGRAMELI, M.; ROMEO, S.; RODOLICO, C.; VITA, G. Activation of NF-kappaB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. **Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology**, Italia. v. 30, n. 1, p. 16–23, jun. 2011.

MESSINA, S. *et al.* Modulation of neuronal nitric oxide synthase and apoptosis by the isoflavone genistein inMdxmice. **BioFactors**, New Jersey: Hoboken. v. 41, n. 5, p. 324–329, 31 ago. 2015.

MESSINA, S. *et al.* The soy isoflavone genistein blunts nuclear factor kappa-B, MAPKs and TNF- α activation and ameliorates muscle function and morphology in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, Reino Unido. v. 21, n. 8, p. 579–589, ago. 2011.

MICHELUCCI, A. *et al.* Antioxidant Treatment Reduces Formation of Structural Cores and Improves Muscle Function in RYR1^{Y522S/WT} Mice. **Oxidative medicine and cellular longevity**, London. v. 2017, p. 6792694, 2017.

MILLAY, D. P. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. **Nature Medicine**, London. v. 14, n. 4, p. 442–447, 1 abr. 2008.

MOHAMED SALIH, S.; NALLASAMY, P.; MUNIYANDI, P.; PERIYASAMI, V.; CARANI VENKATRAMAN, A. Genistein improves liver function and attenuates non-alcoholic fatty liver disease in a rat model of insulin resistance. **Journal of Diabetes**, New Jersey: Hoboken. v. 1, n. 4, p. 278–287, 21 jul. 2009.

MOOSMANN, B.; BEHL, C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA. v. 96, n. 16, p. 8867–8872, 3 ago. 1999.

MANCHÓN, N. *et al.* Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. **Talanta**, Holanda: Amsterdam. v. 82, n. 5, p. 1986–1994, 15 out. 2010.

NAKAE, Y. *et al.* Quantitative evaluation of the beneficial effects in the mdx mouse of epigallocatechin gallate, an antioxidant polyphenol from green tea. **Histochemistry and Cell Biology**, Alemanha. v. 137, n. 6, p. 811–827, 14 fev. 2012.

NAKAE, Y. *et al.* Early Onset of Lipofuscin Accumulation in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscles of DMD Patients and mdx Mice. **Journal of Molecular Histology**, London. v. 35, n. 5, p. 489–499, jun. 2003.

NAKAMURA, A.; YOSHIDA, K.; UEDA, H.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. **Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis Of Disease**, Holanda: Amsterdam. v. 1740, n. 3, p. 326–331, 10 jun. 2005.

OGIHARA, T.; ASANO, T.; KATAGIRI, H.; SAKODA, M.; ANAI, N.; SHOJIMA, H.; ONO, M.; FUJISHIRO, A.; KIKUSHI, N.; NOGUCHI, H.; ABURATANI, Y. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kB pathway

and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. **Diabetologia**, Alemanha. v. 47, n. 5, p. 794–805, 1 maio 2004.

PERRIN, S. Preclinical research: Make mouse studies work. **Nature**, Holanda: Amsterdam. v. 507, n. 7493, p. 423–425, mar. 2014.

PFAFFL, M. W.; LANGE, I. G.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ERalpha and ERbeta mRNA with real-time RT-PCR. **APMIS**: New Jersey: Hoboken. v. 109, n. 5, p. 345–355, maio 2001.

PRISTA, N.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. **Calouste Gulbenkian**, 3.ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. v.2.

PROTO, J. D. An Expanding Role for Nuclear Factor κ B in Muscle Stem Cells: Implications for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy - D-Scholarship@Pitt. **Pitt.edu**, Pensilvânia: Pittsburgh. 4 dez. 2013.

PROTO, J. D.; TANG, Y.; LU, A.; CHEN, W. C. W.; STAHL, E.; PODDAR, M.; BECKMAN, S. A.; ROBBINS, P. D.; NIDERNHOFER, L. J.; IMBROGNO, K.; HANNIGAN, T.; MARS, W. M.; WANG, B.; HUARD, J. NF- κ B inhibition reveals a novel role for HGF during skeletal muscle repair. **Cell Death & Disease**, London. v. 6, n. 4, p. e1730–e1730, abr. 2015.

RADLEY, H. G.; GROUNDS, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiology of disease**, Holanda: Amsterdam. v. 23, n. 2, p. 387–97, 2006.

REAY, D. P. BASTACKY, S. I.; WACK, K. E.; STOLZ, D. B.; ROBBINS, P. D.; CLEMENS, P. R. d-Amino Acid Substitution of Peptide-Mediated NF- κ B Suppression in mdx Mice Preserves Therapeutic Benefit in Skeletal Muscle, but Causes Kidney Toxicity. **Molecular Medicine**, EUA. v. 21, n. 1, p. 442–452, jan. 2015.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, Reino Unido. v. 26, n. 2, p. 123–148, jan. 1996.

RICOTTI, V.; RIDOUT, D. A.; SCOTT, E.; QUINTIVAN, R.; ROBB, S. A.; MANZUR, A. Y.; MUNTONI, F.; NORTHSTAR, N. Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular

dystrophy. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, Reino Unido. v. 84, n. 6, p. 698–705, 1 jun. 2013.

RUIZ-LARREA, M. B.; MOHAN, A. R.; PAGANGA, G.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant Activity of Phytoestrogenic Isoflavones. **Free Radical Research**, Reino Unido. v. 26, n. 1, p. 63–70, jan. 1997.

SAPONJIAN, Y., H. Incessant cycles of dystrophic myofiber degeneration and regeneration result in ubiquitous centrally-nucleated fibers in skeletal muscles of X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Biolog. Journal of Armenia**, Armenia. v. 2, p. 68, 2016.

SCHINZEL, A. C. *et al.* Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America, v. 102, n. 34, p. 12005–12010, 23 ago. 2005.

SENGUPTA, S.; JORDAN, V. C. Selective estrogen modulators as an anticancer tool: mechanisms of efficiency and resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, London. v. 630, p. 206–219, 2008.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, EUA. v. 68, n. 6, p. 1333S1346S, 1 dez. 1998.

SETCHELL, K. D. R. The history and basic science development of soy isoflavones. **Menopause**, [s.l.]. v. 24, n. 12, p. 1338–1350, dez. 2017.

SETCHELL, K. D. *et al.* S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor β , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. **The American Journal of Clinical Nutrition**, EUA. v. 81, n. 5, p. 1072–1079, 1 maio 2005.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, EUA. v. 76, n. 2, p. 447–453, 1 ago. 2002.

SETCHELL, K. D. R.; ZHAO, X.; SHOAF, S. E.; RAGLAND, K. The Pharmacokinetics of S-(-)Equol Administered as SE5-OH Tablets to Healthy

Postmenopausal Women. **The Journal of Nutrition**, EUA. v. 139, n. 11, p. 2037–2043, 23 set. 2009.

SETCHELL, K. D.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the efficacy of soy and its isoflavones. **The Journal of Nutrition**, EUA. v. 132, n. 12, p. 3577–3584. 2002.

SHARIFI-RAD, J.; QUISPE, C.; IMRAN, M.; RAUF, A.; NADEEM, M.; GONDAL, T. A.; AHMAD, B. et al. Genistein: An Integrative Overview of Its Mode of Action, Pharmacological Properties, and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London. v. 2021, p. 3268136, 19 jul. 2021.

SHAVLAKADZE, T.; WHITE, T. J.; HOH, J. F.; ROSENTHAL, N.; GROUNDS, M. D. Targeted expression of insulin-like growth factor-i reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. **Molecular Therapy**, Massachusetts: Cambridge. v. 10, n. 5, p. 829–843, nov. 2004.

SINGH, M. N.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; MARTIN, F. L. The multiple applications of tamoxifen: an example pointing to SERM modulation being the aspirin of the 21st century. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, New Yorl: Melville. v. 14, n. 9, p. RA144-8, set. 2008.

SPENCER, M. J. *et al.* Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. **Journal of Clinical Investigation**, EUA. v. 99, n. 11, p. 2745–2751, 1 jun. 1997.

SRIVASTAVA, S.; SINGH, D.; PATEL, S.; SINGH, M. R. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. **International Journal of Biological Macromolecules**, Holanda: Amesterdam. v. 101, p. 502–517, ago. 2017.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, EUA. v. 107, n. 1, p. 7–11, 1 jan. 2001.

TAN, C. *et al.* Resveratrol attenuates oxidative stress and inflammatory response in turbot fed with soybean meal based diet. **Fish & Shellfish Immunology**, Holanda: Amsterdam. v. 91, p. 130–135, 1 ago. 2019.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathologica**, Alemanha. v. 69, n. 1-2, p. 91–95, 1986.

THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence¹. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, EUA. v. 83, n. 7, p. 2223–2235, jul. 1998.

TIDBALL, J. G. *et al.* Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. **Journal of Cell Science**, Reino Unido. v. 108, n. 6, p. 2197–2204, 1 jun. 1995.

TIIDUS, P. M. Oestrogen and sex influence on muscle damage and inflammation: evidence from animal models. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, Pensilvânia: Filadélfia. v. 4, n. 6, p. 509–513, nov. 2001.

TIIDUS, P. M. *et al.* Estrogen effect on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Canadá. v. 79, n. 5, p. 400–406, 1 maio 2001.

TORRES, L. F. B.; DUCHEN, L. W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. **Brain**, Reino Unido. v. 110, n. 2, p. 269–299, 1987.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; NILSA, R. D.; HUANG, P. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, EUA. v. 10, n. 8, p. 1343–1374, 1 ago. 2008.

UCHIDA, K. HNE as an inducer of COX-2. **Free Radical Biology and medicine**, Holanda: Amsterdam. v. 111, p. 169–172, out. 2017.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; de LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of the Neurological Sciences**, Holanda: Amsterdam. v. 88, n. 1-3, p. 69–81, 1 dez. 1988.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo: Campinas. v. 30, n. 5, p. 1323–1338, out. 2007.

VINCENT, A. *et al.* Evaluation of the compounds commonly known as superoxide dismutase and catalase mimics in cellular models. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Holanda: Amsterdam. v. 219, p. 111431, jun. 2021.

VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Suíça. v. 38, p. 15-25. 2013.

WANG, L. *et al.* Ratio of Creatine Kinase to Alanine Aminotransferase as a Biomarker of Acute Liver Injury in Dystrophinopathy. **Disease Markers**, New Jersey: Hoboken. v. 2018, p. 1–11, 19 jun. 2018.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. MUSCLE DAMAGE IN MDX (DYSTROPHIC) MICE: ROLE OF CALCIUM AND REACTIVE OXYGEN SPECIES. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Australia. v. 33, n. 7, p. 657–662, jul. 2006.

WIIK, A. *et al.* Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. **Histochemistry and Cell Biology**, Alemanha. v. 131, n. 2, p. 181–189, 30 set. 2008.

WUEBBLES, R. D. *et al.* Levels of $\alpha 7$ integrin and laminin-2 are increased following prednisone treatment in the mdx mouse and GRMD dog models of Duchenne muscular dystrophy. **Disease Models & Mechanisms**, Reino Unido. v. 6, n. 5, p. 1175–1184, 11 jul. 2013.

XIAO, C.-W.; HENDRY, A. Hypolipidemic Effects of Soy Protein and Isoflavones in the Prevention of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease- A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Alemanha. 9 jun. 2022.

YANG, Q. *et al.* AAV-based shRNA silencing of NF- κ B ameliorates muscle pathologies in mdx mice. **Gene Ther.** Alemanha. v. 19, p. 1196–1204 (2012).
<https://doi.org/10.1038/gt.2011.207>

YOON, G.-A.; PARK, S. Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats. **Nutrition Research and Practice**, Seoul. v. 8, n. 6, p. 618, 2014.

ZÉTOLA, M.; de LIMA, T. C.; SONAGLIO, D.; GONZALEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*—Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**, Holanda: Amsterdam. v. 82, n. 2-3, p. 207–215, 1 out. 2002.

ZSCHÜNTZSCH, J. *et al.* Long-term human IgG treatment improves heart and muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, New Jersey, Hoboken. v. 11, n. 4, p. 1018–1031, 20 maio 2020.

ANEXOS**ANEXO I***Certificado CEUA*

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito do extrato fracionado da soja no músculo distrófico de camundongos mdx.**, registrada com o nº **0019/2021**, sob a responsabilidade de **Tulio de Almeida Hermes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **29/09/2021 a 30/09/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/10-dmdmdx	20	10	10	Centro multidisciplinar para investigação biológica (cemib)
Roedor / C57bl/10sccr	20	10	10	Centro multidisciplinar para investigação biológica (cemib)

Alfenas, 13 de Outubro de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 9f811e2eb310623bcb6d060b8621d07f

ANEXO II



REDE DE AGROECOLOGIA
ecoVIDA

**ASSOCIAÇÃO ECOVIDA DE
CERTIFICAÇÃO PARTICIPATIVA**

OPAC cadastrada no MAPA sob o Nº 05
CNPJ: 04.371.122/0001-45

CERTIFICADO DE CONFORMIDADE ORGÂNICA


Certificado Nº: RS05070/2021

A Comissão de Ética do Núcleo Serra da Associação Ecovida de Certificação Participativa, CNPJ: 04.371.122/0001-45, declara que a agroindústria de Coopenatural Comercio de Produtos Orgânicos e Naturais Ltda., CNPJ: 09.027.941/0001-93, pertencente ao grupo ecológico COOPERNATURAL- Coop. agrop. de Produção. e Com. Vida Natural filiado a este Núcleo, está em conformidade com as normas e princípios estabelecidos pelo OPAC: ASSOCIAÇÃO ECOVIDA DE CERTIFICAÇÃO PARTICIPATIVA, integrante da Rede Ecovida de Agroecologia, e com a lei 10.831/03 e seus dispositivos complementares.

Validade deste certificado: UM ANO.

Picada Café - RS, 25 de Julho de 2021

Jane da Silva Mattos
Jane da Silva Mattos



REDE DE AGROECOLOGIA
ecoVIDA

**ASSOCIAÇÃO ECOVIDA DE
CERTIFICAÇÃO PARTICIPATIVA**

OPAC cadastrada no MAPA sob o Nº 05
CNPJ: 04.371.122/0001-45

Certificado Nº: RS05070/2021

Data da última avaliação de conformidade pelo núcleo: Visita à agroindústria 28/06/2021

Endereço da agroindústria: Rua Heinrich Bundchen 355, Floresta - Picada Café

Escopo: Processamento de Produtos de Origem Vegetal

Relação de produtos:

1) Açúcar mascavo	26) Feijão carioca
2) Amaranto grão	27) Feijão preto
3) Arroz	28) Feijão vermelho
4) Arroz arbóreo	29) Flocos de amaranto
5) Arroz integral	30) Flocos de aveia
6) Arroz negro	31) Flocos de milho
7) Arroz vermelho	32) Grão de bico
8) Barra de cereais	33) Linhaça dourada
9) Canjica de milho	34) Linhaça marrom
10) Cereal de arroz e cacau	35) Melado de cana
11) Cereal de milho e cacau	36) Milho pipoca
12) Chia	37) Noz-pecã
13) Farelo de aveia	38) Óleo de soja
14) Farinha de amaranto	39) Polvilho azedo
15) Farinha de arroz	40) Polvilho doce
16) Farinha de arroz integral	41) Soja em grão
17) Farinha de aveia	42) Trigo em grão
18) Farinha de centeio	
19) Farinha de cevada	
20) Farinha de mandioca	
21) Farinha de milho	
22) Farinha de sorgo	
23) Farinha de trigo sarraceno	
24) Feijão	
25) Feijão azuki	

Jane Mattos