



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARCOS MACIEL JUNIOR

AUTOFAGIA E RECEPTORES DE ÁCIDOS GRAXOS
LIGADOS A PROTEÍNA-G: MECANISMO DE AÇÃO DO
EPA E DEFLAZACORTE NA DISTROFIA MUSCULAR

CAMPINAS

2019

MARCOS MACIEL JUNIOR

**AUTOFAGIA E RECEPTORES DE ÁCIDOS GRAXOS LIGADOS A
PROTEÍNA-G: MECANISMO DE AÇÃO DO EPA E
DEFLAZACORTE NA DISTROFIA MUSCULAR**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutor em Biologia Celular e
Estrutural, na área de anatomia.*

Orientadora: MARIA JULIA MARQUES

Co-Orientadora: SAMARA CAMAÇARI DE CARVALHO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO MARCOS MACIEL JUNIOR E
ORIENTADA PELA MARIA JULIA MARQUES E
SAMARA CAMAÇARI DE CARVALHO.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M187a Maciel-Junior, Marcos, 1992-
Autofagia e receptores de ácidos graxos ligados a proteína-G : mecanismo de ação do EPA e deflazacorte na distrofia muscular / Marcos Maciel Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Julia Marques.
Coorientador: Samara Camaçari de Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Camundongos endogâmicos mdx. 3. Autofagia. 4. Ácidos graxos Ômega-3. 5. Deflazacorte. I. Marques, Maria Julia, 1961-. II. de Carvalho, Samara Camaçari, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Autophagy and G-protein-linked free fatty acid receptors : mechanism of action of EPA and deflazacort in muscular dystrophy

Palavras-chave em inglês:

Muscular dystrophy, Duchenne

Mice, inbred mdx

Autophagy

Omega-3 fatty acids

Deflazacort

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Julia Marques [Orientador]

Cesar Renato Sartori

Bruno Rodrigues

Luiz Fernando Takase

Selma Maria Michelin Matheus

Data de defesa: 22-11-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7472-0911>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3110370780350204>

Campinas, 22 de Novembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Julia Marques

Prof. Dr. Cesar Renato Sartori

Prof. Dr. Bruno Rodrigues

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico

Aos meninos com DMD, seus responsáveis e cuidadores formais ou informais que direta ou indiretamente sofrem, cuidam e lutam na busca pela cura e qualidade de vida desses meninos.

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Maria Julia Marques, a quem tanto admiro e respeito, pela confiança, incentivo, contribuição didático-científica e pessoal compartilhada e por acreditar em mim, principalmente a partir do momento em que eu dividi minha jornada de trabalho com a docência.

À Profa. Dra. Samara Camaçari de Carvalho, pelo companheirismo, parceria, estímulo nos momentos difíceis e por toda contribuição técnica e intelectual para a execução do presente trabalho.

“Se deres um peixe a um homem faminto, vais alimentá-lo por um dia. Se o ensinares a pescar, vais alimentá-lo toda a vida.”

(Anne Isabella Thackeray Ritchie)

AGRADECIMENTOS

À **Energia Superior, Deus, Cosmos**, ou o nome que cada um queira dar àquele que me deu belas oportunidades e colocou pessoas incríveis para que eu conseguisse aproveitar cada uma delas, todas listadas abaixo.

À **Marlene Ramos Rosa Bertolli**, minha **Mãe**, meu pai, minha companheira, melhor amiga, minha fada madrinha, aquela que sempre deu força e apoiou nas minhas escolhas, aquela que vive meus sonhos comigo e faz meus pesadelos virarem paraíso.

Ao **Marcos Maciel**, meu pai, que confia cegamente nas minhas escolhas e nunca hesitou em me ajudar.

Ao **Robson William Bertolli**, meu padrasto encorajador e companheiro. Obrigado por cuidar da minha família em São Carlos, viabilizando minha tranquilidade durante o doutorado.

Ao **José Paulo Maciel Neto**, meu irmão, criança que me faz acreditar na pureza das atitudes dos seres humanos.

Aos meus avós **Hermínia Ramos Ângulo, José Rosa, Benedicta Maria dos Santos Maciel e José Paulo Maciel** (*in memoriam*), que mesmo sofrendo com a distância e sem entender minha vinda pra Campinas, confiam na minha escolha e me ajudam com suas orações para que tudo fique bem.

À **Cilene Aparecida Ramos Rosa**, minha tia, que deixa minha vida agridoce.

À amiga e irmã, **Marcia Keiko Nosse Araújo**, pela amizade, confiança, respeito e companheirismo.

À todos os meus professores, fontes de profunda inspiração e sabedoria, representados aqui pela “tia” **Ana Sígari**, minha primeira e eterna professora.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela contribuição no desenvolvimento profissional.

Ao Prof. **Humberto Santo Neto** pela colaboração, conhecimento e convívio durante a execução deste trabalho.

À Profa. **Elaine Minatel** e todos os membros do **Laboratório de Plasticidade Muscular** pela amizade e compartilhamento do espaço e equipamentos para realização de alguns experimentos do presente trabalho.

À Profa. **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** e todos os membros do **Laboratório de Biologia de Reprodução** pela amizade e compartilhamento do espaço e equipamentos para realização de alguns experimentos do presente trabalho.

À Profa. **Evanisi Teresa Palomari** e membros do **Laboratório de Eletromiografia e Controle Motor** pela amizade.

Ao Prof. **Wagner José Fávaro** pela confiança e oportunidades concedidas de estágio supervisionado em docência na disciplina de Anatomia Humana e também aos membros do **Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia** pela amizade e compartilhamento do espaço e equipamentos para realização de alguns experimentos do presente trabalho.

Ao Prof. **Alexandre Leite Rodrigues** e membros do **Laboratório de Regeneração Nervosa** pela amizade e compartilhamento do espaço e equipamentos para realização de alguns experimentos do presente trabalho.

Ao Prof. **José Angelo Camilli** e membros do **Laboratório de Plasticidade e Regeneração Óssea** pela amizade e compartilhamento do espaço e equipamentos para realização de alguns experimentos do presente trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, à Sra. **Tanacy de Nazaré**, Sr. **Marco Aurélio Ribeiro de Paula** (*in memoriam*), Sr. **Paulo Francisco dos Santos**, Sr. **Walter Ferreira** e Sr. **Roberto Narciso Basso** pelo auxílio técnico durante os estudos, amizade, e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos professores do Laboratório de Anatomia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), **Maria José Salete Viotto**, **Maíra Aparecida Stefanini**, **Luiz Fernando Takase** e **Marcelo Martinez**, minhas primeiras inspirações anatômicas, que tanto tiveram paciência e me direcionaram para que eu pudesse realizar este sonho.

À professora **Maria José Salete Viotto**, pelo acolhimento no Laboratório de Anatomia da UFSCar, orientação e paciência durante o início da minha jornada científica.

À professora **Maíra Aparecida Stefanini**, pelo acolhimento no Laboratório de Anatomia da UFSCar e orientação durante minhas atividades como monitor de anatomia.

Às amigas enfermeiras que a graduação me deu e que estão sempre presentes na minha vida, **Aline Natalia Domingues, Isabella Nascimbeni Matos, Bianca Ruiz Oliveira, Camila Félix Francisco, Beatriz de Oliveira Deniz, Suzana Maria Nery Carraschi, Daniela Falcão, Ana Carolina Belmonte Assalin, Mariana Ramos da Silva, Camila Casagrande Mela e Bruna Marski.**

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural da Junção Neuromuscular, **Adriana Fogagnolo Maurício, Camila de Jesus Saqueli, Juliano Alves Pereira, Paula Andrea Saenz Suarez, Renata Moreira Acunha** e, pelos bons momentos compartilhados.

Aos Professores **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, André Luis Bombeiro e Candida Luiza Tonizza de Carvalho** pelas excelentes contribuições dadas durante o exame de qualificação.

Aos Professores **André Luis Bombeiro, Bruno Rodrigues, Candida Luiza Tonizza de Carvalho, Cesar Renato Sartori, Larissa Akemi Kido de Barros, Luiz Fernando Takase e Selma Maria Michelin Matheus**, pela disponibilidade em ler o presente trabalho e contribuir para o seu aprimoramento e minha formação.

Aos amigos proporcionados pela convivência na pós-graduação, **Catharina Nucci Martins, Jéssica Silva Ferreira, Isadora Ribeiro, Luciana Ramalho, Luciana Sobral Moreira, Flávia Jacob, Isabela Maria Urra Rossetto, Bruno Henrique Melo Lima, Daniela Mizobuti, Alex Dias, Rodrigo Scarpari Carraro** cada um de vocês contribuiu de maneira única para que o aprendizado durante o doutorado ultrapassasse o que eu aprenderia apenas nos artigos.

Aos amigos com quem dividi teto em Campinas, **Matheus Fernandes dos Santos, Wilgner Silva, Angelo Renato Benitez Ostolaza, Guilherme Augusto**

Campos Costa, Vinícius Abrantes Souza, Renato Rissi, Lucas de Souza, Leonardo Piropo Staffa e Carpegiani Borges, obrigado por ajudarem a tornar Campinas um bom lugar para se viver, morar e dormir.

Ao **Matheus Fernandes dos Santos**, pela amizade, cumplicidade, e pelo companheirismo nos momentos bons e ruins.

À **Jéssica Silva Ferreira**, pela amizade, cumplicidade, por me incentivar a sair da zona de conforto do aprendizado, da pesquisa e da vida.

À **Catharina Nucci Martins**, pela amizade, cumplicidade, pelas risadas, pela descontração e pela irreverência. Por me mostrar os diferentes caminhos e compartilhar diversas oportunidades que me fizeram sair da zona de conforto. Também por todo aprendizado que me proporcionou. Você é a pós-graduanda mais pesquisadora que eu conheço!

Ao **René Juliano Martins**, pela amizade, pelos momentos de descontração e cultura!

Aos senhores **Georges Bizet, Antonio Vivaldi, Wolfgang Amadeus Mozart, Frédéric Chopin, Johann Sebastian Bach, Ludwig van Beethoven** pelas belas composições que tanto me inspiraram durante a jornada resumida nas páginas do presente trabalho.

Ao grupo **Bolsistas CAPES**, pelos momentos de descontração e discussões.

Aos **camundongos**, por terem sido instrumentos fundamentais desta pesquisa.

Aos **Meus Alunos** e todos os professores do **Departamento de Enfermagem do Colégio Técnico de Campinas (COTUCA-UNICAMP)** pela motivação e por me fazerem acreditar que vale a pena lutar pela educação!

À **FAPESP** (processo: 2017/24051-4), pelo apoio financeiro indispensável.

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

Muito Obrigado!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia hereditária que atinge um a cada 3300 meninos nascidos vivos. Assim como seu modelo experimental, o camundongo *mdx*, a DMD é caracterizada pela ausência de distrofina e degeneração muscular progressiva. Além da degeneração, são características da DMD, a inflamação crônica e deposição de fibrose, que acarreta perda da função muscular e insuficiência cardiorrespiratória. A autofagia que é diminuída nos músculos distróficos parece contribuir da progressão da doença. No presente estudo, utilizamos o camundongo *mdx*, para verificar os efeitos do corticóide deflazacorte associado ou não ao ômega-3 (do 5º ao 8º mês de vida), sobre marcadores de autofagia (FOXO3a, LC3, Akt, mTOR) em músculos distróficos mais afetados (diafragma e coração) e menos afetados (quadríceps e bíceps). Observamos que o LC3, principal marcador de autofagia, não estava alterado na maioria dos músculos distróficos estudados, nesta fase tardia da doença (8 meses de idade). Deflazacorte e/ou ômega 3 aumentaram os níveis de FOXO3a em quase todos os músculos estudados. Também estudamos receptores específicos para ácidos graxos livres ligados à proteína G (GPR40 e GPR120), nos músculos diafragma e coração (3º ao 4º mês de vida). Os níveis desses receptores não foram afetados pela falta de distrofina. O efeito anti-inflamatório do ômega-3 nos músculos distróficos, demonstrado pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e NF-kb, foi inibido por bloqueadores específicos dos receptores GPR40 e GPR120. Os resultados sugerem que marcadores da autofagia não se modificam em função da intensidade da distrofinopatia e o corticóide combinado com ômega-3 melhorou alguns marcadores de autofagia. Além disso, o presente estudo sugeriu que o ômega-3 atua através dos receptores GPR40 e GPR120 no diafragma e coração distróficos. Fármacos sintéticos que atuem sobre esses receptores, atualmente em testes clínicos para doenças metabólicas humanas, podem ser uma terapia alternativa potencial à DMD, merecendo estudos pré-clínicos e clínicos.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne; Camundongos endogâmicos *mdx*; Autofagia; Ácidos graxos Ômega-3; Deflazacorte.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a muscle disease characterized by the lack of dystrophin due to a mutation in the dystrophin gene. While gene therapies for DMD are under development, corticoids are still the therapy of choice. The primary event in dystrophy is the absence of dystrophin, with sarcolemma instability, increased influx of calcium and muscle degeneration. The secondary events, a chronic inflammatory reaction and fibrosis deposition, further contribute to the progression of the disease, leading to loss of muscle function and cardiorespiratory failure. Autophagy is decreased in dystrophic muscles and had been suggested to contribute to dystrophy progression. By using the *mdx* mice model of DMD, in the present study we focused on the effects of the corticoid deflazacort associated or not with the anti-inflammatory omega-3, over autophagy markers (FOXO3a, LC3, Akt, mTOR) in dystrophic muscles that are differently affected by the lack of dystrophin (diaphragm and heart more affected than quadriceps and biceps). We observed that LC3, the main autophagy marker, was not altered in most of the dystrophic muscles, at this later stage of the disease (8 months of age). Deflazacort and/or omega 3 increased the levels of FOXO3a in almost all muscles studied. We also studied specific receptors for free fatty acids linked to G-protein, GPR40 and GPR120, in the *mdx* diaphragm and cardiac muscles. The levels of these receptors were not affected by the lack of dystrophin. The anti-inflammatory effect of omega-3 in *mdx* muscles, as demonstrated by a decrease in the pro-inflammatory cytokines TNF- α and NF- κ b, was inhibited by specific blockers of omega-3 receptors. Overall, the present study suggested that autophagy markers in distinct dystrophic muscles are similarly regulated independent of disease severity and that corticoid and omega-3 may improve some autophagy markers. Furthermore, the present study suggested that omega-3 acted through GPR40 and GPR120 in *mdx* diaphragm and cardiac muscles. Synthetic drugs that act on these receptors, which are currently under clinical trials for human metabolic diseases, may be of relevance as potential alternative therapy to DMD deserving preclinical and clinical studies.

Key words: Duchenne Muscular Dystrophy; *mdx* mouse; Autophagy; Omega 3; Deflazacort.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Complexo Distrofina-Glicoproteínas.....	22
Figura 2 - Via do ácido araquidônico.....	26
Figura 3- Via da autofagia.....	29
Figura 4 – Ômega 3.....	33
Figura 5- Vias anti-inflamatórias do GPR120.....	36
Figura 6- Medida de força normalizada pela massa.....	51
Figura 7- Open Field.....	52
Figura 8- RotaRod.....	53
Figura 9- Suspensão em fio metálico.....	54
Figura 10- Retenção de quatro membros.....	55
Figura 11- Calorimetria Indireta.....	56
Figura 12- Cortes transversais do músculo diafragma.....	58
Figura 13- Dados morfométricos do músculo diafragma.....	59
Figura 14- Cortes transversais de corações corados com Hematoxilina e Eosina.....	60
Figura 15- Dados morfométricos do músculo cardíaco.....	61
Figura 16 - Cortes transversais de bíceps braquial corados com Hematoxilina e Eosina	62
Figura 17- Dados morfométricos do músculo bíceps braquial.....	62
Figura 18- Cortes transversais de quadríceps femoral corados com Hematoxilina e Eosina.....	63
Figura 19- Dados morfométricos do músculo quadríceps femoral.....	64
Figura 20- Creatina quinase.....	65
Figura 21- CK-MB e peso relativo do coração.....	66
Figura 22- Média das massas corporais.....	67
Figura 23- Enzimas hepáticas, peso relativo e histologia do fígado.....	68
Figura 24- Marcadores da autofagia no diafragma.....	69
Figura 25- Marcadores da autofagia no coração.....	70
Figura 26- Marcadores da autofagia no músculo bíceps braquial.....	71
Figura 27- Marcadores da autofagia no músculo quadríceps femoral.....	72
Figura 28- Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação no diafragma.....	75
Figura 29- Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação no coração.....	76

Figura 30- Cortes transversais do músculo diafragma	77
Figura 31- Cortes transversais do coração.....	78
Figura 32- Média das massas corporais.....	79
Figura 33- Open Field	80
Figura 34- Creatina Quinase.....	81
Figura 35- Creatina quinase cardíaca e peso relativo do coração.....	82
Figura 36- Enzimas hepáticas e peso relativo do fígado.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de animais, tratamentos e análises realizadas para o estudo da autofagia.....	39
Tabela 2: Distribuição de animais, tratamentos e análises realizadas para o estudo dos receptores de ácidos graxos.	41
Tabela 3: Comparação entre os animais C57BL10 e <i>mdx</i> dos marcadores de autofagia nos músculos estudados.	73
Tabela 4: Efeito das terapias nos níveis de marcadores de autofagia (comparação <i>mdx</i> não tratado x <i>mdx</i> tratado).	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Acido araquidônico
Akt	Proteína quinase B
CDG	Complexo distrofina-glicoproteína
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
BB	Músculo bíceps braquial
CDG	Complexo distrofina-glicoproteína
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Enzima creatina quinase total
CK-MB	Enzima creatina quinase cardíaca
COR	Músculo cardíaco
COX	Cicloxigenase
DFZ	Deflazacorte
DHA	Ácido Docosaheptaenóico
DIA	Músculo diafragma
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
ERMOs	Espécies reativas do metabolismo de oxigênio
FLA	Fosfolipases
FOXO3a	Fator de transcrição da família <i>Forkhead</i> pertencente à subclasse O3a
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase
GPR40	Receptor 40 acoplado à proteína G
GPR120	Receptor 120 acoplado à proteína G
HE	Hematoxilina e Eosina
IKKB	Quinase que fosforila o inibidor do fator nuclear kappa B
IKB	Inibidor do fator nuclear kappa B
IP	Intraperitoneal
LC3	Proteínas associadas a microtúbulos da cadeia leve 3B
LT	Leucotrienos

<i>mdx</i>	X Chromosome-linked muscular dystrophy
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NC	Núcleo central
NP	Núcleo periférico
Ω3	Ômega-3
PG	Prostaglandinas
QDR	Músculo quadríceps femoral
QR	Quoeficiente Respiratório
RL	Radical Livre
RPM	Rotações por minuto
TAK1	TGF-β ativado por quinase 1
TAB1	Proteína de ligação ao TGF-β ativado por quinase 1
TGF-β1	Fator de crescimento transformador beta-1
TM	Tricrômico de Masson
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TX	Tromboxanos
U/I	Unidade Internacional
VCO2	Produção máxima de dióxido de carbono
VO2	Consumo máximo de oxigênio
4-HNE	4-hidroxinonenal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	21
1.2	CAMUNDONGO <i>mdx</i>	23
1.3	FISIOPATOLOGIA.....	24
1.4	AUTOFAGIA	27
1.5	DEFLAZACORTE (DFZ)	31
1.6	ÔMEGA 3 ($\Omega 3$)	32
1.7	RECEPTORES ASSOCIADOS A PROTEÍNA G.....	34
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	OBJETIVOS PRINCIPAIS:	37
2.1.1	Autofagia	37
2.1.2	Mecanismo de ação do omega-3	37
2.2	OBJETIVOS COMPLEMENTARES:	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	ANIMAIS	38
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	38
3.1.1	Estudo da autofagia	38
3.1.2	Estudo dos receptores de ácidos graxos	40
4.3	MASSA CORPORAL	42
3.4	TESTES FUNCIONAIS	42
3.4.1	Medida de força	42
3.4.2	Avaliação da atividade locomotora espontânea (<i>open-field test</i>)	42
3.4.3	Avaliação de locomoção forçada em cilindro giratório (<i>rotarod test</i>)	43
3.4.4	Teste de retenção de quatro membros (<i>four limb hanging test</i>)	43
3.4.5	Teste de suspensão do fio metálico (<i>hanging wire test</i>)	44
3.4.6	Calorimetria indireta.....	45
3.5	ANÁLISE DE CREATINA QUINASE TOTAL (CK) E CARDÍACA (CK-MB) NO PLASMA SANGUÍNEO	45
3.6	ANÁLISE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)	46
3.7	OBTENÇÃO DOS MÚSCULOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	46
3.7.1	Preparo dos músculos para a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).	46
3.7.2	Preparo dos músculos para a coloração de Tricrômico de Masson (TM)	47
3.8	PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS	47
3.9	QUANTIFICAÇÃO PROTEICA PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT	47
3.9.1	Preparo do extrato total.....	48

3.9.2	Quantificação das proteínas.....	48
3.9.3	Anticorpos Primários.....	49
3.9.4	Anticorpos Secundários.....	49
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	RESULTADOS REFERENTES AO ESTUDO DA AUTOFAGIA: CARACTERIZANDO O MODELO	51
5.1.1	Análises funcionais.....	51
5.1.2	Análise morfológica	57
5.1.3	Análise bioquímica.....	65
5.1.4	Análise toxicológica	66
5.1.5	Marcadores de autofagia (<i>Western Blot</i>)	69
5.2	RESULTADOS REFERENTES AO MECANISMO DE AÇÃO DO OMEGA- 3.....	74
5.2.1	Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação (<i>western blot</i>)	74
5.2.2	Análise morfológica	77
5.2.3	Resultados complementares ao estudo do mecanismo de ação do ômega 3	79
6	DISCUSSÃO.....	84
6.1	AUTOFAGIA	84
6.2	EFEITOS DAS TERAPIAS NA AUTOFAGIA	86
6.3	QUANTO AO ESTUDO DOS RECEPTORES DE ÁCIDOS GRAXOS	87
6.4	QUANTO AOS EFEITOS DAS TERAPIAS NA PROGRESSÃO DA DOENÇA	91
6.4.1	Massa corporal e medida de força	91
6.4.2	Motricidade e coordenação motora	92
6.4.3	Função cardiorrespiratória.....	93
6.4.4	Estudo das enzimas hepáticas.....	94
7	CONCLUSÕES	96
7.1	AUTOFAGIA	96
7.2	MECANISMO DE AÇÃO DO ÔMEGA-3.....	96
7.3	COMPLEMENTARES.....	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	ANEXO A.....	110
	ANEXO B.....	111
	ANEXO C.....	112

1 INTRODUÇÃO

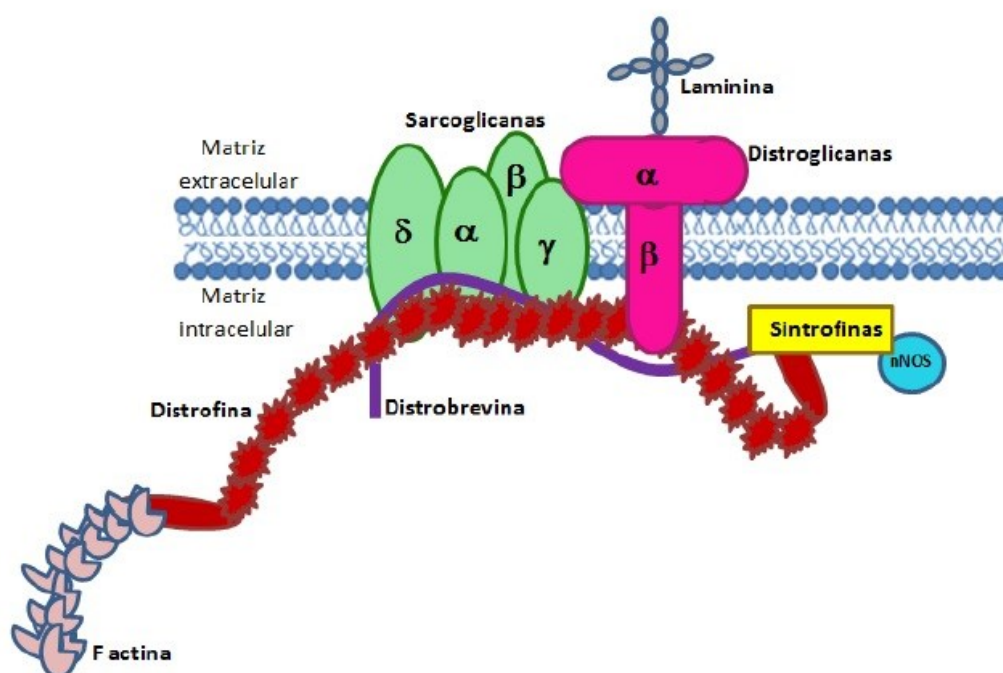
1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Distrofia muscular é um termo genérico que designa um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por degeneração muscular progressiva resultando em comprometimento motor. Dentre esse grupo de doenças, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais debilitante e fatal, afetando aproximadamente 1 a cada 3300 crianças do sexo masculino (ENGEL et al., 2004).

A DMD foi descrita pelo francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne em 1868. Duchenne a descreveu como uma paralisia muscular pseudo-hipertrófica, caracterizada por enfraquecimento muscular que se inicia nos membros inferiores, seguido por pseudo-hipertrofia dos mesmos; comprometimento da deambulação e postura e diminuição da contração muscular conforme a progressão da doença. William Gowers notou a hereditariedade da DMD e descreveu que crianças afetadas pela doença, para assumirem posição ortostática, sustentavam-se pelos membros superiores e escalavam o próprio corpo, definindo o sinal clínico denominado “Sinal de Gowers” (ENGEL et al., 2004).

A etiologia da DMD é uma mutação de um gene que possui 79 exons, localizado no braço curto do cromossomo X (*locus* Xp21) (KOENIG et al., 1987). Tal gene codifica a distrofina, proteína de 427 kDa que desempenha papel essencial em um complexo oligomérico composto por várias glicoproteínas, formando o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG). O CDG (Figura 1) conecta o citoesqueleto de actina da fibra muscular à matriz extracelular circundante através do sarcolema, garantindo estabilidade à fibra muscular durante os ciclos de contração e relaxamento do músculo (MRAK, 1985; HOFFMAN et al., 1987; ENGEL et al, 2004; MARQUES, 2004). A ocorrência de deleções ou mutações pontuais resulta em perda completa da expressão de distrofina ou na sua produção não funcional (RAHIMOV e KUNKEL, 2013). Na ausência de distrofina o CDG fica prejudicado, o que desestabiliza a fibra muscular, tornando-a altamente susceptível a lesões (MARIOL e SÉGALAT, 2001).

Figura 1- Complexo Distrofina-Glicoproteínas



Esquema do complexo distrofina-glicoproteínas representando a α e β distroglicanas; α , β , γ , e δ sarcoglicanas; α e β 1 sintrofinas; distrobrevina e distrofina. A distrofina exerce papel importante na estabilização do sarcolema conectando actina citoesquelética à cadeia da laminina-2 localizada na lâmina basal via complexo de glicoproteínas (Laboratório de Junção Neuromuscular – IB - UNICAMP).

Os primeiros sinais de comprometimento motor se manifestam nos cinco anos iniciais de vida, após a criança já ter adquirido a habilidade de deambular, apresentando quedas frequentes e dificuldades de correr. A rápida progressão da doença somada ao precoce comprometimento da musculatura proximal, perda da deambulação, contraturas articulares e cifoscoliose resultam na dependência de cadeira de rodas ainda na primeira década de vida (ENGEL et al, 2004). Aproximadamente na segunda década de vida os pacientes desenvolvem cardiomiopatia (ENGEL et al, 2004; MACHADO, 2011, SPURNEY, 2011). Embora o avanço da terapia farmacológica, do desenvolvimento de órteses e a ventilação mecânica tenham aumentando a sobrevida dos meninos com DMD, a insuficiência respiratória e a cardiomiopatia são as principais causas do óbito dos pacientes, que ocorre em torno da segunda ou terceira décadas da vida (BOGDANOVICH et al., 2004; MOXLEY et al., 2005).

Embora a DMD seja extensivamente estudada, ainda não existe cura para a doença (BEYTÍA et al. 2012; HOFFMAN et al., 2019; WERNECK et al., 2019). O tratamento para a DMD se baseia em três principais linhas: terapia celular, terapia genética e terapia farmacológica.

A terapia celular possui grande potencial de evolução e consiste na aplicação de células-tronco na tentativa de reposição das fibras musculares degeneradas com a progressão da doença (ICHIM et al., 2010). Porém, ainda não se sabe qual a melhor linhagem celular para ser utilizada, a via, dose e intervalo entre as aplicações (KERKIS et al., 2008; HOFFMAN et al., 2019).

Na terapia genética os tratamentos mais conhecidos se baseiam nas tecnologias de restauração do códon de parada prematura, como a Gentamicina (MALIK et al., 2010) e o Ataluren (SIDDIQUI e SONENBERG et al., 2016) e na tecnologia *Exon Skipping*, como o Drisapersen, testado especificamente para deleção do *exon* 51 (McDONALD et al., 2018) e o Eteplirsen, testado em deleções dos *exons* 45-50; 48-50; 49-50; 50 e 52 (MENDELL, et al, 2016). Os testes recentes envolvendo terapia genética apresentam resultados esperançosos. Entretanto, a terapia genética é destinada para mutações específicas, com alto custo de produção e de difícil acesso à toda comunidade.

Desta maneira, estudos envolvendo a terapia farmacológica são fundamentais, uma vez que é a linha terapêutica que trata a doença independente da diversidade de mutações do *exon*, visando a manutenção de maior número de fibras musculares viáveis. Adicionalmente, quando se utilizam fármacos já em uso para humanos, as doses, vias de administração e efeitos colaterais são conhecidos, sendo economicamente mais acessível para os pacientes (HOFFMAN et al., 2019; WERNECK et al., 2019).

1.2 CAMUNDONGO *mdx*

A descrição do gene defeituoso da DMD permitiu a identificação de uma alteração genética homóloga em outras espécies, como aves, cães, gatos e camundongos. Enquanto que em cães a doença se manifesta de forma mais severa, em que a degeneração muscular se sobrepõe a regeneração, em camundongos e gatos a fibrose do tecido muscular é mais amena, com maior processo de regeneração. As características gerais da distrofia nesses animais são semelhantes ao humano, diferindo em alguns aspectos, como o quadro clínico, início do processo degenerativo e capacidade de regeneração muscular (MRAK, 1985; SEIXAS et al., 1997).

Os camundongos *mdx* (*x chromosome-linked muscular dystrophy*) foram inicialmente identificados na colônia C57BL/10/ScSn por apresentarem altos níveis de creatina quinase (CK), enzima sérica que indica degeneração muscular quando elevada (BULFIELD et al., 1984). Estudos posteriores revelaram que o camundongo *mdx* apresenta mutação específica do gene da distrofina (HOFFMAN et al., 1987). A partir

do 18º dia de vida pós-natal, as principais alterações histológicas encontradas no tecido muscular são a necrose e áreas com inflamação. Ao redor da terceira semana é possível observar necrose seguida por regeneração após a quinta semana (PASTORET e SEBILLE, 1995; SEIXAS et al., 1997; GROUNDS, 2008).

É interessante notar que no *mdx*, os músculos são afetados em diferentes intensidades, sendo o diafragma e coração mais afetados que músculos apendiculares, como o quadríceps e bíceps. Os músculos extraoculares e intrínsecos da laringe, por outro lado, são protegidos da falta da distrofina, não apresentando degeneração, possivelmente devido a diferenças funcionais, ou ao melhor tamponamento do cálcio, ou reduzido diâmetro da fibra (PERTILLE et al., 2010; FERRETI et al., 2011; MATSUMURA et al., 2011). O diafragma do *mdx* idoso apresenta degeneração e fibrose semelhantes às encontradas em músculos apendiculares de humanos distróficos (STEDMAN et al., 1991), o que o torna um modelo ideal. Adicionalmente, camundongos *mdx* idosos apresentam alterações funcionais e morfológicas no coração que caracterizam uma cardiomiopatia distrófica (LEFAUCHEUR et al., 1995; PASTORET e SEBILLE, 1995; SEIXAS et al., 1997; DE OLIVEIRA MOREIRA, 2013). A diferença na intensidade da distrofinopatia, não obstante a falta de distrofina em todos os músculos é um assunto de interesse na presente pesquisa.

Os camundongos *mdx* são considerados excelente modelo pré-clínico, apesar das diferenças da fisiopatologia e quadro clínico de pacientes com DMD, sendo amplamente utilizados para a investigação dos mecanismos da mionecrose e regeneração na distrofia muscular. Os camundongos encontram-se em maior disponibilidade e baixo custo, favorecendo o estudo da doença e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para uso potencial na DMD (MARQUES, 2004; GROUNDS, 2008).

1.3 FISIOPATOLOGIA

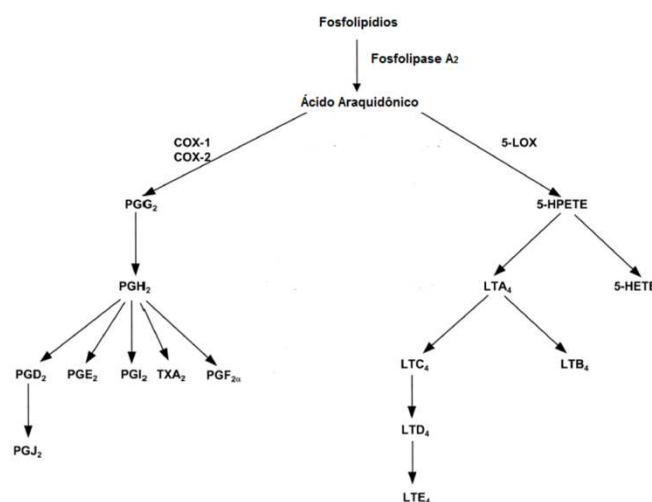
Considerando-se o importante papel estrutural da distrofina, entende-se que sua deficiência ou ausência torna o sarcolema instável, susceptível a lesões, além de alterar o funcionamento de canais de cálcio presentes na membrana, provocando o influxo exacerbado de cálcio na fibra muscular. O excesso de cálcio promove a hipercontração das miofibrilas e ativação de proteases, tais como calpaínas e fosfolipases, levando à mionecrose (MARIOL e SÉGALAT, 2001; ENGEL, 2004). Consecutivamente, células de defesa como macrófagos e neutrófilos são recrutadas para o local da injúria, instalando-se um processo inflamatório crônico (SPENCER e TIDBALL, 2001;

TIDBALL, 2004). Este processo estimula a chegada de mais células inflamatórias nos locais com mionecrose, exacerbando a degeneração muscular (SPENCER e TIDBALL, 2001; MACHADO et al, 2011; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al, 2013).

A ativação de calpaínas e fosfolipases causa proteólise dos constituintes celulares, alterando a homeostase da fibra muscular com o aumento da formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMOs), o que leva à ativação da via do fator nuclear-kappaB (NF-kB), e aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas, como a IL-1B (SPENCER e TIDBALL, 2001). O aumento dessas citocinas contribui para a lesão de outras fibras musculares, que é intensificada pelo aumento do estresse oxidativo (SPENCER e TIDBALL, 2001; WHITEHEAD et al., 2006).

Com a alteração da homeostase na fibra muscular, as fosfolipases A2 (FLA2), uma família de proteínas capazes de hidrolisar os fosfolipídios da membrana, são ativadas e convertem o ácido linoleico (ácido graxo do tipo ômega-6) em ácido araquidônico (AA). A cascata do AA é uma via metabólica que utiliza este ácido para síntese de uma gama de mediadores chamados genericamente de eicosanoides (RANG et al., 2006). Conforme ilustrado na Figura 2, esta cascata pode ser dividida em duas vias principais, uma dependente de ciclo-oxigenase (COX) e outra dependente de lipo-oxigenase (LOX). A via COX oxidará o AA em prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), anti-inflamatórios, enquanto que a via LOX terá como produtos as lipoxinas e leucotrienos (LT) da série par, que são pró-inflamatórios. (BABCOCK, HELTON e ESPAT, 2000; RANG et al., 2006; CALDER, 2008).

Figura 2 - Via do ácido araquidônico.



Vias de síntese de eicosanoides a partir do AA. COX, ciclo-oxigenases; LOX, lipo-oxigenases; HETE, ácido hidroxi-eicosatetraenóico; HPETE, ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico; PG, prostaglandina; TX, tromboxano; LT, leucotrieno. (Adaptado de CALDER et al., 2008)

A regeneração muscular se dá pela ativação de células satélites (CS), que estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema (MAURO, 1961), cuja divisão produzirá outras CS e progenitores miogênicos, também conhecidos como mioblastos. Contudo, com a progressão da doença observa-se declínio da capacidade regenerativa dessas células e as fibras musculares serão substituídas por tecido fibro-adiposo (BLAU et al., 1983; SACCO et al., 2010). Diversas teorias procuram justificar a diminuição da capacidade regenerativa do músculo distrófico; a que parece ser mais aceita sugere que há exaustão de CS devido aos ciclos repetitivos de degeneração e regeneração (BLAU et al., 1983; SACCO et al., 2010).

Em resumo, a ausência de distrofina é considerada o fator primário da fisiopatologia da distrofia muscular, promovendo a degeneração muscular. Eventos secundários, tais como a inflamação e o estresse oxidativo, colaboram para a progressão da doença.

A autofagia, um dos temas de estudo desta tese, também figura como um evento secundário e será abordada a seguir.

1.4 AUTOFAGIA

Nos últimos 15 anos, houve crescente interesse científico na investigação de uma importante via biológica denominada “autofagia” (do grego "auto-comer"). A descoberta dos genes envolvidos nessa via, inicialmente em leveduras e posteriormente em mamíferos, permitiu a descrição de uma vasta gama de funções fisiológicas e de desenvolvimento, relacionadas a autofagia (MIZUSHIMA, YOSHIMORIM e LEVINE, 2010). A desregulação da autofagia contribui para um amplo espectro de doenças de mamíferos (LEVINE e KROEMER, 2008; MIZUSHIMA et al., 2008).

Autofagia é um termo genérico para designar processos pelos quais materiais citoplásmicos como organelas e produtos metabólicos chegam aos lisossomos para subsequente degradação (RUBINSZTEIN, 2006; LEVINE e KROEMER, 2008; MIZUSHIMA et al., 2008). Existem três tipos de autofagia: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por proteína acompanhante. O mais extensivamente estudado é a macroautofagia, muitas vezes referido apenas como autofagia (MIZUSHIMA, YOSHIMORIM e LEVINE, 2010).

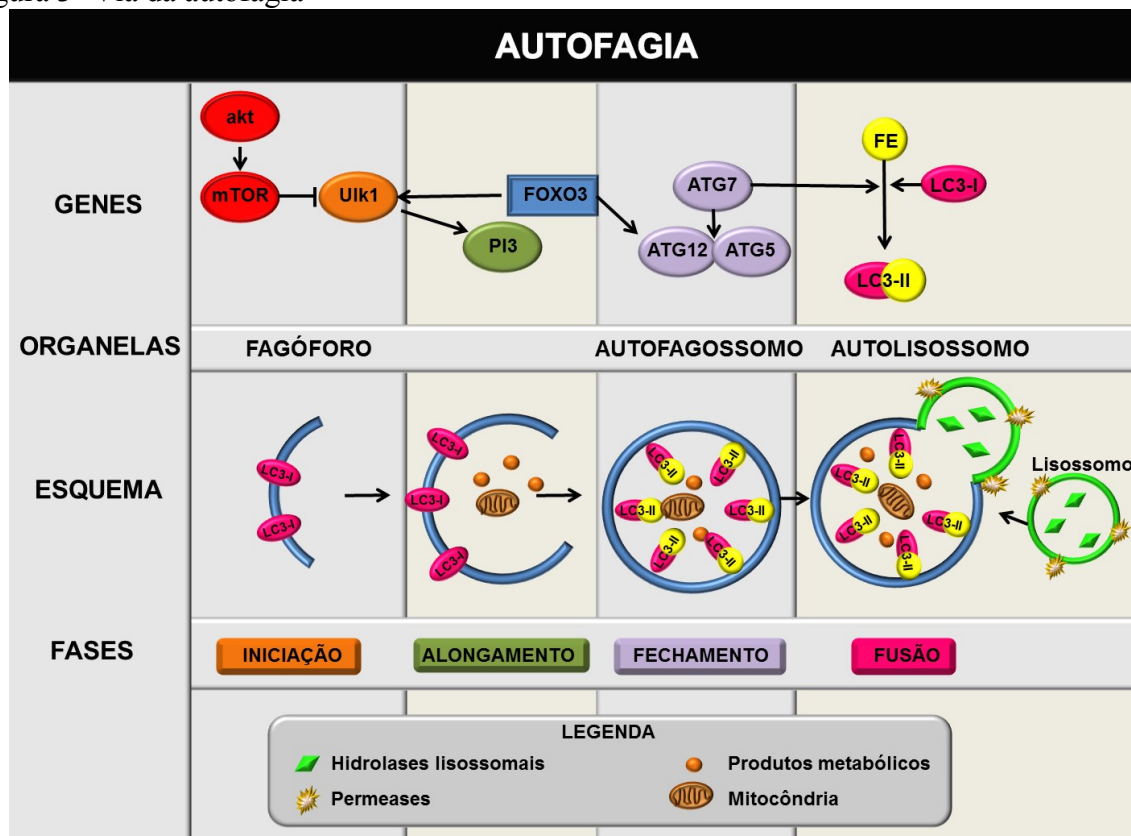
Mediante a indução da via autofágica, um pequeno saco vesicular formado por pequenas elongações de membrana, chamado de fagóforo, envolve uma porção do citoplasma, resultando na formação de uma organela especializada, de dupla membrana, o autofagossomo (GIORGIO, 2014). A formação de autofagossomos é controlada pelos genes da família ATG (AuTophagy related Genes- genes relacionados com a autofagia) e por LC 3 (*microtubule-associated protein1 light chain 3*). Em seguida, a membrana externa dos autofagossomos funde-se com a membrana dos lisossomos formando o autolisossomo, levando à degradação dos materiais anexos e da membrana autofagossômica interna pelas enzimas hidrolases lisossomais (MIZUSHIMA, YOSHIMORIM e LEVINE, 2010; GIORGIO, 2014).

As vias de sinalização molecular que levam à autofagia são complexas e reguladas por ATGs (HURLEY e SCHULMAN, 2014). Os ATGs estão organizados em cinco grupos funcionais, a saber: (i) O ATG 13 (Unc-51-like kinase: Ulk) (GANLEY et al., 2009; HOSOKAWA et al., 2009; JUNG et al., 2010; KIM et al., 2011; MIHAYLOVA e SHAW, 2011); (ii) o ATG 14 (phosphatidylinositol 3 kinase: PI3) (ITAKURA et al., 2008); (iii) o complexo de ligação PI3- WIPI-1/2 (PROIKAS-CEZANNE et al., 2004; VERGNE et al., 2009); (iv) o complexo de conciliação ATG 5- ATG 12 ativado por ATG 7 (MIZUSHIMA et al., 1998); (v) e o ATG 8 (LC 3) (KABEYA et al., 2000). Estes complexos de proteína participam em fases específicas

do processo autofágico: iniciação (i), formação (ii), alongamento (iii) e fechamento (iv) da vesícula autofágica e fusão do autofagossomo com o lisossomo (v) (MEHRPOUR et al., 2010; AWAN e DENG, 2014), conforme ilustrado na figura 3.

Um dos principais mediadores da autofagia é o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que associado ao raptor (proteína reguladora associada ao mTOR), à subunidade beta da proteína do tipo G (GβL) e ao PRAS40 (substrato de Akt rico em prolina) formam um complexo multiproteico denominado mTORC1. A atividade de mTOR, um regulador negativo de autofagia, depende de vários sinais positivos, incluindo normóxia, fornecimento de aminoácidos, energia e fatores de crescimento (DE PALMA et al., 2014). Mediante a superestimulação por fatores de crescimento ou nutrientes, como glicose e aminoácidos a mTORC1 regula negativamente o complexo de iniciação macromolecular mediado pelo gene ATG13, levando a supressão da autofagia (GANLEY et al., 2009; HOSOKAWA et al., 2009; WONG et al., 2013). A principal via de sinalização que controla a mTORC1 é o fosfatidilinositol 3-quinases/Akt (PI3/Akt) ativada pela ligação de fatores de crescimento ou insulina aos seus receptores da superfície celular. A Akt ativada, por sua vez, fosforila e inibe complexo esclerose tuberosa 2 (TSC2) que ativa o complexo mTORC1 (LONG et al., 2005; HUANG e MANNING, 2009), inibindo a autofagia. A mTOR também inibe o fator de transcrição da família *Forkhead* (cabeça de garfo) pertencente à subclasse O3a (FOXO3a), um importante fator de transcrição presente no músculo que aumenta a expressão de genes como ATG12, Ulk1, ATG4b e Gabarapl1, responsáveis por ativar a autofagia (MAMMUCARI et al., 2007; ZHAO et al., 2007).

Figura 3- Via da autofagia



Esquema da via da autofagia: alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR); Ulk1: Unc-51-like kinase; PI3: phosphatidylinositol 3 kinase; FE: fosfatidiletanolamina. Elaborado pelo autor.

Dentre as proteínas relacionadas com a autofagia em mamíferos, a LC 3, proteína homóloga ao ATG8 encontrado em leveduras ainda tem sua função estudada, e está presente na membrana do autolisossomo. A conjugação da LC 3 com outras proteínas ATG resulta na sua ligação com fosfatidiletanolamina originando sua forma lipidada (LC 3-II) (MIZUSHIMA, 2007). Como LC 3-II está presente durante a fase ativa do processo autofágico, ela é considerada um importante marcador do fluxo autofágico (MIZUSHIMA e YOSHIMORIM, 2004).

A relação da autofagia com doenças musculares surgiu da observação de que a manipulação de modelos animais para desregular autofagia também levava a patologia muscular (NEEL et al, 2013; SANDRI et al., 2013).

A autofagia está constantemente ativa no músculo esquelético e o seu papel na homeostase deste tecido é complexo. Em níveis elevados, pode ser prejudicial e contribui para perda de massa muscular. Em contrapartida, em níveis baixos pode provocar fraqueza e degeneração muscular devido ao acúmulo de proteínas e organelas danificadas que culminam no aumento do estresse oxidativo (DE PALMA et al., 2014).

Sugere-se que um desequilíbrio da autofagia promova degeneração muscular (DE PALMA et al., 2012). Foi demonstrado que algumas proteínas relacionadas à autofagia, como a LC 3 e Akt (proteína quinase 2), apresentam-se alteradas em músculos de camundongos *mdx* e de pacientes com DMD (DE PALMA et al., 2012; PETER e CROSBIE, 2006). A proteína Akt, que está relacionada com a inibição do processo autofágico, apresentou níveis elevados tanto em camundongos *mdx* durante os picos de inflamação e mionecrose, quanto em pacientes com DMD (PETER e CROSBIE, 2006). Congruente com esses resultados, os níveis de LC 3 apresentaram-se diminuídos nos camundongos distróficos. A intensificação do estresse oxidativo, o que é observado na distrofinopatia, está relacionada com a diminuição da autofagia (DE PALMA et al., 2012). Desta maneira, a reconstituição do processo autofágico representa um potencial para novas terapias para a DMD.

Em suma, a autofagia está diminuída em músculos distróficos, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a progressão da doença, além de figurar como um potencial alvo para novas terapias. No presente estudo, levantamos as seguintes questões:

i. Será que diferenças na autofagia poderiam explicar o fato dos músculos distróficos serem afetados em diferentes intensidades?

Para responder a esta questão, estudamos marcadores da autofagia em músculos afetados em graus diferentes: diafragma e cardíaco (mais afetados) e quadríceps e bíceps (que apresentam melhor regeneração).

ii. Será que a autofagia é regulada pela terapia clássica com corticoides e com outro anti-inflamatório, o ômega-3?

Para responder a esta questão, verificamos se o tratamento do camundongo distrófico com o corticoide deflazacorte, combinado ou não ao ômega-3, altera os níveis de marcadores da autofagia.

Previamente demonstramos que o ômega-3 melhorou a distrofinopatia no camundongo *mdx*, atuando em vários aspectos, principalmente nos relacionados a inflamação (CARVALHO et al., 2013; FOGAGNOLO MAURICIO et al., 2013; FOGAGNOLO MAURICIO et al., 2016). No presente trabalho, além de verificar o efeito potencial do ômega-3 na autofagia de músculos distróficos, também iremos aprofundar sobre o mecanismo de ação do ômega-3 na distrofia muscular.

Desta forma, nos próximos parágrafos faremos breve descrição do ômega-3 e seus efeitos, também na autofagia.

Entretanto, visto a importância dos corticoides (tal como o deflazacorte) para a DMD, já que são a terapia de escolha e todo paciente distrófico irá receber corticoide em alguma fase da doença, iniciaremos com o deflazacorte, reforçando a sua relevância em estudos pré-clínicos no camundongo *mdx*.

1.5 DEFLAZACORTE (DFZ)

Em 1974, Drachman e colaboradores propuseram o uso de esteróides como forma de tratamento temporário e paliativo para pacientes com DMD, ressaltando os efeitos colaterais e as variações encontradas no prognóstico da doença mediante seu uso (DRACHMAN et al., 1974). Desde então, muitos estudos têm sido realizados em diversos países empregando o tratamento com esteróides, embora ainda não haja consenso internacional sobre o regime mais eficaz com relação à droga e a dose (ANGELINI e PETERLE, 2012) bem como sobre os mecanismos de ação do corticoide no músculo distrófico.

Há aproximadamente duas décadas, um grupo italiano foi o primeiro a testar o deflazacorte (DFZ), uma oxazolidina derivada da prednisona, em pacientes com DMD. Utilizaram 0,9 mg/kg/dia de DFZ que seria a dose equivalente a 0,75 mg/kg/dia de prednisona, droga até então conhecida e utilizada como terapia da DMD (ANGELINI et al. 1994; ANGELINI e PETERLE, 2012). Um estudo recente sugeriu o uso de DFZ, demonstrando que a mudança entre as classes de corticóides durante o tratamento da DMD traz prejuízos na cardiomiopatia (ABUTALEB et al., 2018).

O deflazacorte produz efeito anti-inflamatório semelhante ao da prednisona, porem, com menor risco de ganho de peso, fator que contribui para o aumento do período de deambulação (BONIFATI et al., 2000). Pacientes distróficos tratados com DFZ apresentaram preservação da função respiratória e possível proteção contra desenvolvimento de cardiomiopatia em comparação com os indivíduos do grupo controle, além de menor perda de massa óssea e redução da escoliose (BIGGAR et al. 2001). Vários estudos clínicos evidenciaram que o uso de deflazacorte promoveu melhora da força muscular e prolongamento da deambulação (ANGELINI et al. 1994; BONIFATI et al. 2000; BIGGAR et al. 2001; HOUDE et al. 2008; McADAM et al. 2012.). Estudos em camundongos *mdx* revelaram que o uso de DFZ em longo prazo também retarda a progressão de cardiomiopatia (SKRABEK e ANDERSON, 2001; ACHER et al., 2006; CARVALHO et al., 2013;). Em 2016, a FDA (*food and drug*

administration) aprovou o uso do DFZ nos Estados Unidos da América (HOFFMAN, 2019).

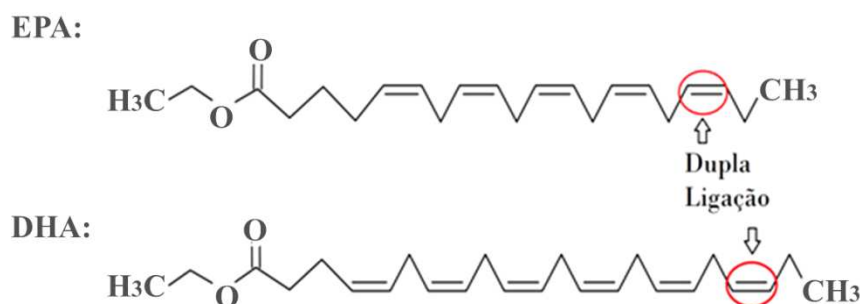
Embora a eficácia do uso de corticóides para tratamento da DMD já seja conhecida, o uso contínuo desta classe de anti-inflamatórios acarreta alguns efeitos colaterais, tais como aumento de peso, alterações na puberdade, osteoporose, dentre outros (ANGELINI e PETERLE, 2012; WOOD et al., 2016), que afetam a qualidade de vida do paciente. Assim, a busca por fármacos alternativos ou complementares é de grande relevância para a terapia farmacológica da DMD (MANZUR et al. 2008; BEYTÍA et al. 2012; HOFFMAN, 2019).

A dexametasona, conhecido fármaco corticosteroide, provocou aumento dos níveis de LC 3-II em condrócitos durante regime terapêutico de curto prazo, demonstrando aumento da atividade autofágica (LIU et al., 2014). A administração de corticoides também aumentou a autofagia no tecido ósseo (WANG et al, 2015; SHI et al., 2015). Já foi descrita a ação do ômega 3 e de corticoides no fluxo autofágico no tecido conjuntivo, porém, ainda não há estudos relacionando a ação desses fármacos no músculo estriado esquelético normal e distrófico (HSU et al., 2014; LIU et al., 2014; SHI et al., 2015; WANG et al., 2015; WILLIAMS-BEY et al., 2014; ZHAO et al., 2014; KOSKELA et al., 2016).

1.6 ÔMEGA 3 (Ω 3)

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeias longas de átomos de carbono que se ligam a átomos de hidrogênio e podem ser classificados em três tipos: saturado, monoinsaturado e poliinsaturado de acordo com o tipo e número de ligações presentes entre os átomos de carbono. Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) são ácidos graxos poliinsaturados em que a primeira ligação dupla da molécula ocorre no terceiro átomo de carbono partindo-se do final da cadeia, sendo por esse motivo denominados Ω 3, conforme ilustra a figura 4. Não são produzidos pelo organismo humano e, portanto, devem ser obtidos através da dieta. O Ω 3 está presente em castanhas e na linhaça, sendo o óleo de peixe a principal fonte de Ω 3 (JAMES et. al., 2000).

Figura 4 – Ômega 3



Ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA). Representados: CH₃ (metil), O (oxigênio). Elaborado pelo autor.

Vários estudos clínicos relataram benefícios com o emprego do $\Omega 3$ em muitas enfermidades, incluindo doenças cardíacas (HARPER et al., 2006; KH et al., 2019), vasculares (SIMONETTO et al., 2019), epilepsia (SCHLANGER et al., 2002; OMRANI et al., 2019), doença inflamatória do intestino (GURA et al., 2019), e caquexia associada ao câncer (BABCOCK et al., 2000; FREITAS e CAMPOS, 2019). O EPA, isoladamente, também foi eficaz na inibição do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF-kB) (BABCOCK et al. 2000), redução da produção de TNF- α por macrófagos (BABCOCK et al., 2002) e para evitar os efeitos prejudiciais do TNF- α durante a diferenciação do músculo esquelético *in vitro* (MAGEE et al., 2008).

Com relação aos efeitos do $\Omega 3$ na autofagia, um estudo demonstrou que o EPA protege o músculo cardíaco, atenuando o estresse oxidativo induzido por apoptose de mioblastos, através da ativação da autofagia (HSU et al., 2014). O EPA, aumentando a autofagia também impediu a degeneração macular relacionada ao envelhecimento (KOSKELA et al., 2016). O $\Omega 3$ também exerceu efeitos protetores em hepatócitos através da indução de autofagia, inibindo o acúmulo de lipídios (CHEN et al., 2015). A administração de DHA *in vitro* reduziu a inflamação através da supressão de NF-kB, com redução os níveis de IL-1 beta e ativação da autofagia (WILLIAMS-BEY et al., 2014).

No organismo, o EPA atua gerando eicosanóides da série ímpar, que são anti-inflamatórios, e na diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . O mecanismo de ação do EPA na diminuição dos níveis desta citocina não está muito esclarecido. Uma hipótese é que ele diminui a transcrição do gene do TNF- α através da redução da translocação de NF-kB. Os efeitos de proteção do EPA podem estar relacionados com a sua habilidade de modular as respostas inflamatórias e

imunológicas. O EPA inibe a dissociação entre I κ B (proteína inibitória) e NF- κ B, impedindo que este último seja translocado para o núcleo, inibindo a transcrição do gene do TNF- α (BABCOCK et al., 2000; MACHADO et al. 2011).

O DHA é um ácido graxo poliinsaturado presente em membranas. Esse ácido graxo influencia as propriedades biofísicas de membranas, tais como fluidez e capacidade de deformação (JUDÈ et al., 2006; TUAZON e HENDERSON, 2012).

Estudos em nosso laboratório (MACHADO et al., 2011; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013) demonstraram que o EPA purificado ou a combinação de EPA com DHA em camundongos *mdx* na fase inicial da doença, melhorou a distrofinopatia ao promover a estabilidade do sarcolema, talvez como resultado da incorporação do DHA na membrana. Tal incorporação também pode proteger a fibra distrófica contra o aumento do influxo de cálcio, naturalmente observado nessas fibras, possivelmente por efeitos diretos do DHA nos canais de cálcio da membrana. Observou-se ainda que o ômega 3 reduziu os níveis de TNF- α e 4-hidroxinonenal (4-HNE), além de diminuir a mionecrose e as áreas com infiltrado inflamatório (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013).

1.7 RECEPTORES ASSOCIADOS À PROTEÍNA G

A busca por novos alvos para fármacos que tratem levou à descoberta de receptores acoplados à proteína G, formados por sete hélices transmembranares, da família de receptores serpenteantes, também chamados de receptores de ácidos graxos livres (*free fatty acid receptor*–FFAR), como o GPR-40 e GPR-120 (BRISCOE et al., 2016; CORNALL et al., 2013). O uso de agonistas para estes receptores foi eficiente na diminuição da inflamação em vários parâmetros sistêmicos analisados, aumentando os níveis destes receptores nos diferentes tecidos estudados (CHESHMEHKANI et al., 2015; LIU et al., 2015).

A literatura sugere que a ativação de GPR120 causa a inibição de NF- κ B, inibindo os efeitos inflamatórios modulados por este fator de transcrição, conforme ilustra a Figura 5 (MONIRI, 2016). Desta forma, os agonistas para esses receptores são uma nova opção terapêutica a ser explorada. Tais receptores encontram-se distribuídos em diferentes tecidos, inclusive no músculo esquelético (CORNALL et al., 2013). Uma vez que são receptores específicos para ácidos graxos livres, os ácidos graxos da família do Ω 3 representam ligantes potentes para este receptor (HIRASAWA et al., 2005; OH et al., 2010). Ressalte-se que bloqueadores específicos para os receptores de ácidos

graxos livres foram descritos e utilizados em diferentes tecidos, fato este de relevância para compreender o mecanismo de ação de diferentes fármacos (CHESHMEHKANI et al., 2015; DRAGANO et al., 2017; HIDALGO et al., 2017; KATO et al., 2019, MOONWIRIYAKIT et al., 2019).

No presente estudo iremos avaliar os efeitos do ômega 3 (EPA+DHA) nos níveis dos receptores GPR-40 e GPR-120, que têm sido sugeridos como alvos terapêuticos para doenças inflamatórias (CORNALL et al, 2013; CHESHMEHKANI et al., 2015; LIU et al., 2015).

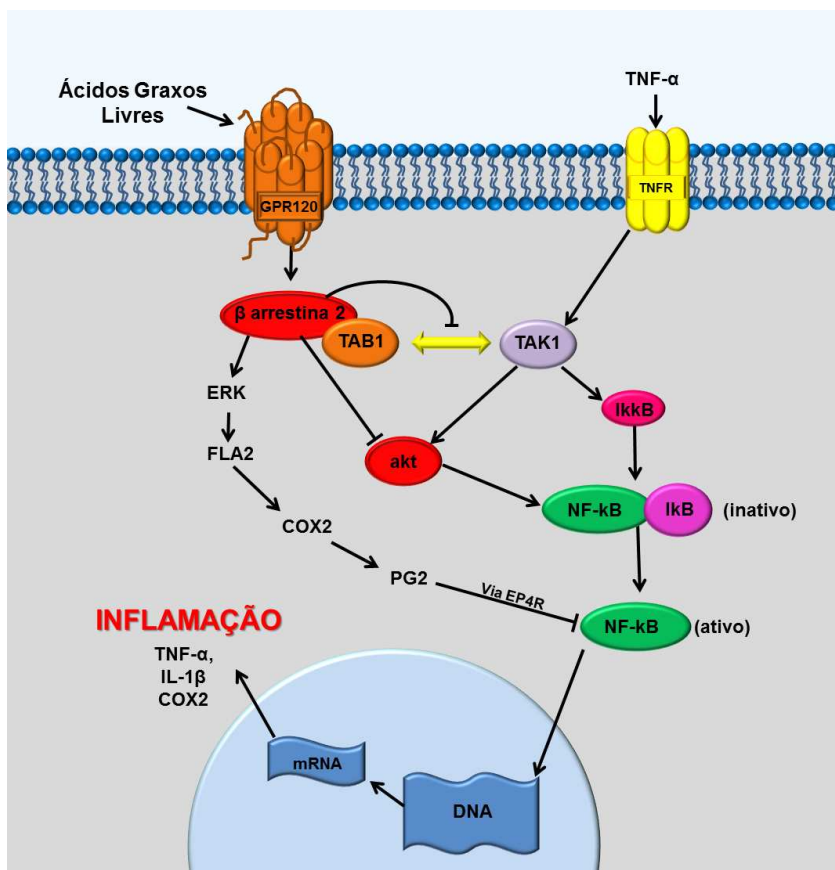
Em resumo: diversos estudos, abordando diferentes patologias, demonstraram que o ômega-3 atua através de receptores de ácidos graxos ligados a proteína G.

No presente estudo levantamos as seguintes questões:

- i. será que músculos distróficos apresentam alterações no níveis destes receptores, visto que são de membrana, e, desta forma, possivelmente afetados pela falta de distrofina?
- ii. será que o ômega-3 altera os níveis destes receptores em músculos distróficos?
- iii. O bloqueio destes receptores com antagonistas específicos (GW1100 e AH7614) irá inibir os efeitos anti-inflamatórios do ômega-3 observados no músculo distrófico?

Para responder a estas questões, estudamos os níveis dos receptores GPR 40 e GPR 120 em diferentes músculos distróficos de camundongos *mdx*, tratados ou não com ômega-3 e com bloqueadores dos receptores de ácidos graxos.

Figura 5- Vias anti-inflamatórias do GPR120



Vias anti-inflamatórias de sinalização do GPR120 em macrófagos. A ativação de GPR120 causa a interação da TAK1 e sua proteína de ligação TAB1 (proteína de ligação ao TAK1), ativando o complexo TAK1. O TAK1 ativo fosforila a IκB-quinase-β, que depois fosforila o IκB (inibidora de NF-κB), deixando de inibir NF-κB. Perdendo o inibidor, o NF-κB promove processo inflamatório aumentando da expressão de mediadores como TNF-α, IL-1β, COX2. O agonismo do GPR120 leva ao recrutamento de β-arrestina-2, que sequestra TAB1, inibindo assim sua interação com TAK1. A perda dessa interação também inibe a ativação de NF-κB. Além disso, a β-arrestina-2 dependente de GPR120 inibe a sinalização de AKT, mais uma vez, inibindo a ativação de NF-κB, promovendo efeitos anti-inflamatórios. Finalmente, a ativação do GPR120, facilita a síntese de PGE2 dependente de ERK 1/2, que pode então agir através de receptores de prostaglandina EP4 para inibir os efeitos inflamatórios modulados por NF-κB (Adaptado de MONIRI, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS:

2.1.1 Autofagia

-Verificar os níveis de marcadores de autofagia em diferentes músculos distróficos (coração, diafragma, bíceps e quadríceps).

-Verificar se os benefícios obtidos com Ômega-3 e DFZ, previamente descritos no camundongo *mdx*, envolvem alterações de marcadores da autofagia.

2.1.2 Mecanismo de ação do omega-3

-Verificar se os níveis de receptores de ácidos graxos (GPR 40 e GPR 120) no coração e diafragma distróficos estão alterados pela falta de distrofina.

-Verificar se o tratamento com Ômega-3 afeta os níveis de receptores de ácidos graxos nos músculos distróficos (coração, diafragma).

-Verificar se o bloqueio dos receptores GPR40 e GPR120 em músculos distróficos inibe os efeitos benéficos do Ômega-3 na distrofia muscular.

2.2 OBJETIVOS COMPLEMENTARES:

Aproveitando o tratamento farmacológico realizado no presente estudo, complementamos nossos trabalhos anteriores com dados funcionais de maior amplitude e análises do fígado, visando uma análise toxicológica inicial das terapias.

Análise funcional: Verificar os efeitos do tratamento com ômega 3 e/ou DFZ no comportamento exploratório (*open field*), na manutenção do equilíbrio (*rotarod*), na força muscular (grip strength, fio metálico, grade invertida) e em fatores metabólicos (consumo de O₂ e produção de CO₂).

Análise toxicológica: Verificar se a terapia com ômega 3 e/ou DFZ resulta em alterações hepáticas morfológicas ou bioquímicas (análise de efeitos tóxicos colaterais).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, da linhagem *mdx* e da linhagem controle C57BL/10. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da UNICAMP e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Bloco-O, prédio da Anatomia- IB, UNICAMP em caixas padrão (28,5cm de comprimento, 18cm de largura e 13cm de altura) em ambiente controlado (23° C, 12 horas de ciclo claro/escuro) com ração Nuvilab CR-1 (Nuvital, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. O uso de animais para o presente trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sob protocolos nº4585-1/2017 e nº5282-1/2019 aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (Anexos A e B).

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.1.1 Estudo da autofagia

Para o estudo da autofagia, iniciamos os tratamentos aos três meses de idade. Os tratamentos ocorreram três vezes por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira) durante cinco meses, via gavagem, conforme descrito abaixo e exposto na tabela 1.

- Grupos tratados com Nujol

Os camundongos da linhagem C57BL/10 e *mdx* foram tratados com óleo mineral de acordo com o regime de tratamento proposto acima (Nujol, Mantecorp, São Paulo, Brasil). Tal tratamento não apresenta efeito farmacológico algum sobre a fisiologia do animal, sendo realizado apenas para equiparar o estresse do procedimento de gavagem entre os grupos (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013).

- Grupo tratado com $\Omega 3$

Os camundongos distróficos foram tratados com óleo obtido das cápsulas de Omega-3 EPA 1000mg (Fabricado por FDC vitamins, Inc., Miami, Flórida, EUA. Importado e distribuído exclusivamente por Fedco Ind. Ltda.), sendo que receberam 300mg/kg de ômega 3 contendo 0,4g de EPA, 0,2g de DHA, 2mg de vitamina E, 0,9g de proteínas, 2,0g de gorduras totais, 0,4g de gordura saturada, 0,0g de gordura trans,

0,0g de gordura monossaturada e 1,0g de gordura poliinsaturada (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013).

- Grupo tratado com DFZ

Os camundongos distróficos foram tratados com 1,2 mg/kg de DFZ (Pharma Nostra, Brasil) em meio aquoso via gavagem (PEREIRA et al., 2017).

- Grupo tratado com associação de $\Omega 3$ e DFZ

Os camundongos distróficos foram tratados com óleo obtido das cápsulas de Omega-3 EPA 1000mg (Fabricado por FDC vitamins, Inc., Miami, Flórida, EUA. Importado e distribuído exclusivamente por Fedco Ind. Ltda.), sendo que receberam 300mg/kg de ômega 3 contendo 0,4 g de EPA, 0,2g de DHA, 2 mg de vitamina E, 0,9g de proteínas, 2,0 g de gorduras totais, 0,4g de gordura saturada, 0,0g de gordura trans, 0,0g de gordura monossaturada e 1,0g de gordura poliinsaturada (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013). Concomitantemente, está sendo administrado 1,2 mg/kg de DFZ (Pharma Nostra, Brasil) em meio aquoso (PEREIRA et al., 2017).

Tabela 1: Distribuição de animais, tratamentos e análises realizadas para o estudo da autofagia.

Linhagem (n)	Tratamento (via) Início: 3 meses Término: 8 meses	Análises realizadas
C57BL/10 (10)	Nujol (gavagem)	<u>-Funcionais (n=10):</u> Open Field, RotaRod, gripstrenght, suspensão em fio metálico, grade invertida e calorimetria indireta. <u>-Marcadores da autofagia (n=5):</u> <i>western blot</i> ; <u>-Histologia (n=5);</u> <u>-Toxicologia (n=10):</u> histologia do fígado e marcadores hepáticos.
<i>mdx</i> (10)	Nujol (gavagem)	
<i>mdx</i> (10)	DFZ (gavagem)	
<i>mdx</i> (10)	$\Omega 3$ (gavagem)	
<i>mdx</i> (10)	DFZ+ $\Omega 3$ (gavagem)	

3.1.2 Estudo dos receptores de ácidos graxos

Para o estudo dos receptores de ácidos graxos, iniciamos os tratamentos aos três meses de idade. Os tratamentos ocorreram em dias alternados durante um mês, conforme descrito abaixo e exposto na tabela 2. Este período foi escolhido pelo fato do ômega-3 ser, principalmente, um anti-inflamatório, pelo fato da inflamação predominar nos estágios mais iniciais da distrofínoptia e por termos larga experiência com o uso do ômega-3 nesse período. Consideramos que, nessas condições, detectaríamos com maior facilidade se os bloqueadores dos receptores de ácidos graxos (que nunca foram usados antes no animal distrófico) inibiriam ou não os efeitos do ômega-3.

- Grupos tratados com Nujol

Os camundongos da linhagem C57BL/10 e *mdx* foram tratados com óleo mineral de acordo com o regime de tratamento proposto acima (Nujol, Mantecorp, São Paulo, Brasil).

- Grupo tratado com $\Omega 3$

Os camundongos distróficos foram tratados com óleo obtido das cápsulas de Omega-3 EPA 1000mg (Fabricado por FDC vitamins, Inc., Miami, Flórida, EUA. Importado e distribuído exclusivamente por Fedco Ind. Ltda.), sendo que receberam 300mg/kg de ômega 3 contendo 0,4g de EPA, 0,2g de DHA, 2mg de vitamina E, 0,9g de proteínas, 2,0g de gorduras totais, 0,4g de gordura saturada, 0,0g de gordura trans, 0,0g de gordura monossaturada e 1,0g de gordura poliinsaturada (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013).

- Grupos tratados com Dimetilsulfóxido (DMSO)

Os camundongos da linhagem *mdx* receberam 0,1ml de DMSO (99,9%, *Sigma*, lote 0001433649) via intraperitoneal conforme exposto na tabela 2. O DMSO foi o diluente utilizado para preparo dos antagonistas GW1100 e AH7614. A literatura sugere que este diluente pode apresentar efeito anti-inflamatório (SOMA et al., 2018), fato que justifica a necessidade de um grupo tratado apenas com DMSO para observação e normalização dos efeitos que observamos.

- Grupos tratados com salina

Os camundongos da linhagem C57BL/10 e *mdx* receberam 0,1ml de soro fisiológico 0,9% via intraperitoneal conforme exposto na tabela 2. Tal tratamento não apresenta efeito farmacológico algum sobre a fisiologia do animal, sendo realizado apenas para equiparar o estresse do procedimento de injeção intraperitoneal realizados nos grupos que receberam os bloqueadores.

- Grupos tratados com GW1100

Os camundongos da linhagem *mdx* receberam 0,1ml de solução contendo 1 mg/kg de GW1100 (*Cayman Chemical*, CAS306974-70-9) diluído em 0,1ml DMSO (99,9%, *Sigma*) via intraperitoneal (i.p.) conforme exposto na tabela 2. O GW110 é um antagonista específico do receptor GPR40.

- Grupos tratados com AH7614

Os camundongos da linhagem *mdx* receberam 0,1ml de solução contendo 2,5 mg/kg de AH7614 (*Cayman Chemical*, CAS6326-06-3) diluído em 0,1ml DMSO (99,9%, *Sigma*) via intraperitoneal (i.p.) conforme exposto na tabela 2. O AH7614 é um antagonista específico do receptor GPR120.

Tabela 2: Distribuição de animais, tratamentos e análises realizadas para o estudo dos receptores de ácidos graxos.

Linhagem (n)	Tratamento (Via) Início: 3 meses Término: 4 meses	Análises realizadas
C57BL/10 (10)	Nujol (gavagem) + salina (IP)	- <u>Marcadores da inflamação e receptores de ácidos graxos (n=5): western blot;</u> - <u>Histologia (n=5);</u> - <u>Estudo complementar (n=10):</u> Open field, avaliação da mionecrose e marcadores hepáticos.
<i>mdx</i> (10)	Nujol (gavagem) + salina (IP)	
<i>mdx</i> (10)	Nujol (gavagem) + DMSO (IP)	
<i>mdx</i> (10)	Ω3 (gavagem) + salina (IP)	
<i>mdx</i> (10)	Ω3 (gavagem) + AH7614 (IP)	
<i>mdx</i> (10)	Ω3 (gavagem) + GW1100 (IP)	

4.3. MASSA CORPORAL

Para todos os grupos analisados, nas duas etapas do estudo, foi realizada a medida da massa dos camundongos antes do início e após o final do tratamento. Para tal foi utilizada uma balança modelo AS2000C (Marte balanças e equipamentos®).

3.4 TESTES FUNCIONAIS

Na primeira etapa do estudo, foram realizados testes funcionais em todos os animais de cada grupo, para avaliação de diferentes grupos musculares e de coordenação motora. Os testes foram realizados em dois momentos do experimento: pré-tratamento: antes de começar o tratamento farmacológico e pós-tratamento: na semana seguinte ao término dos tratamentos. Alguns dos protocolos operacionais serão padronizados tendo como base as diretrizes contidas no TREAT-NMD (Disponível em: <http://www.treat-md.edu/activities/treatment/html>).

3.4.1 Medida de força

(protocolo de referência em TREAT-NMD: DMD_M. 2.1.001)

Os camundongos de cada grupo tiveram a força obtida no início e fim do tratamento. A força foi quantificada no aparelho de medida de força horizontal (Gripstrength; Newprimer®). Os animais foram estabilizados pela cauda e estes, com as patas dianteiras, seguraram uma tela de nylon ligada a um transdutor, que transmitiu a força de contração dos músculos para o aparelho. O pico de força de cinco tentativas, em quilogramas, mostradas no display do aparelho, foram colhidas e utilizadas para composição da média de cada animal, sendo o resultado final expresso em Kg/força (MESSINA et al, 2009).

3.4.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea (*open-field test*)

(protocolo de referência em TREAT-NMD: DMD_M. 2.1.002).

O teste do campo aberto é amplamente utilizado em pesquisa experimental para verificação comportamental ao efeito de drogas. O aparato de avaliação consiste em uma caixa de madeira compensada branca medindo 45cm×60cm (dividido por linhas brancas em 12 quadrantes, cujos quadrados possuem 15cm × 15cm), suas paredes possuem 40 cm de altura. Os animais foram aclimatados no laboratório uma hora antes do teste e o número de cruzamentos atravessados (crossing) com todas as patas foi contado cumulativamente durante seis minutos (MANNING et al., 2014).

Camundongos de ambas as idades e grupos experimentais foram submetidos ao *open-field test* antes do início e ao final dos tratamentos propostos. Na segunda etapa do estudo, o teste do campo aberto foi realizado apenas ao final dos tratamentos.

3.4.3 Avaliação de locomoção forçada em cilindro giratório (*rotarod test*)

O teste Rotarod trata-se de um método eficiente na avaliação de parâmetros de coordenação motora e equilíbrio (RESENDE-PINTO e KO, 2012). Os animais de todos os grupos foram testados no aparelho automatizado modelo EFF 412, Insight, Brasil (Laboratório de Regeneração Nervosa, Depto. Biologia Estrutural e Funcional, IB, Unicamp). Consiste em uma caixa de acrílico que possui um cilindro de 8 cm de diâmetro instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e que é mantido em rotação. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente. O aparelho possui um sensor de queda no chão de cada baia que para automaticamente o cronômetro acoplado quando o animal cai e fica registrada a latência de queda de cada animal.

Os animais foram colocados num cilindro que foi rodado a uma velocidade constante de 5 rpm durante 10 segundos. Os animais receberam apenas três tentativas. Após o tempo de aclimatização de 10 segundos, o cilindro foi acelerado gradativamente durante 6 minutos, elevando a sua velocidade de rotação de 5 rpm para um máximo de 37 rpm, onde a velocidade do cilindro aumentava gradativamente de maneira automática (fase 1: 5rpm; fase 2: 8,6 rpm; fase 3: 12,1 rpm; fase 4: 15,7 rpm; fase 5: 19,2 rpm; fase 6: 22,8 rpm; fase 7: 26,3 rpm; fase 8: 29,9 rpm; fase 9: 33,4 rpm; fase 10: 37rpm). O aparelho possui um indicador luminoso que mostra a progressão das fases que também são contabilizadas na queda do animal. Cada teste possui 4 *trials*, separados por intervalos de 15 minutos entre eles. Em cada sessão, calculou-se a média da latência de queda e a média da fase em que ocorre (4 *trials*).

3.4.4 Teste de retenção de quatro membros (*four limb hanging test*)

(protocolo de referência em TREAT-NMD: DMD_M. 2.1.005).

O teste de retenção de quatro membros foi realizado para demonstrar o comprometimento neuromuscular e coordenação motora. Este teste permite uma medida de resultado eficiente e confiável para a avaliação de efeitos de compostos terapêuticos potenciais sobre a força muscular. Os camundongos foram colocados numa malha de metal (grade com 3,3mm de diâmetro, 35 cm de comprimento e 22 cm largura) a qual

foi virada de cabeça para baixo 35 cm acima de uma gaiola com cama de maravalha que garante pouso suave após a queda. Foram realizados 3 *trials*, com intervalo de 15 minutos entre eles, e o tempo de suspensão de cada animal foi registrado com o auxílio de um cronômetro (VAN PUTTEN, 2012).

O procedimento mede o tempo de suspensão em segundos, bem como o impulso físico, o qual representa a mínima retenção que foi exercida para se opor a força gravitacional.

Para obtenção do impulso físico (IF), além da massa corporal e do tempo de suspensão, é considerada a força gravitacional, relacionando estes parâmetros da seguinte maneira:

$$\text{Massa Corporal (gr)} \times \text{Força Gravitacional (0.00980665 N/gr)} \times \text{Tempo de suspensão (seg)}$$

Após a obtenção do IF de cada trial, o resultado foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{IF do primeiro trial} \times \text{IF de maior valor} \times \text{media dos três IF}}{3}$$

3

3.4.5 Teste de suspensão do fio metálico (*hanging wire test*)

(protocolo de referência: TREAT-NMD:DMD_M.2.1.004)

O teste de suspensão de fio metálico pode ser usado para avaliar o a função muscular e a coordenação motora em modelos experimentais de doenças neuromusculares (Rafael, Nitta, Peters, e Davies, 2000). O teste consiste em deixar o camundongo suspenso utilizando-se das duas patas dianteiras em um fio metálico (2mm de diâmetro e 35cm de comprimento) suspenso 35cm acima de uma gaiola com cama de maravalha que garante pouso suave após a queda. Foram realizados 3 *trials*, com intervalo de 15 minutos entre eles, e o tempo de suspensão de cada animal foi registrado com o auxílio de um cronômetro.

Para obtenção dos resultados foram utilizados a massa corporal e o tempo de suspensão da seguinte maneira:

$$\text{Impulso (g/s)} = \text{Massa Corporal (g)} \times \text{Tempo de suspensão (seg)}$$

3.4.6 Calorimetria indireta

Os camundongos foram alojados individualmente em caixas metabólicas mantidas a 21°C em ciclo de 12 horas de claro/escuro, utilizando um sistema de calorimetria indireta de circuito aberto controlado por software (Oxylet M3 system; PanLab/Harvard Apparatus, Laboratório de Multiusuários, Depto. de Biologia Estrutural e Funcional, IB, Unicamp) com fluxo de ar de 0,6 L/min. Após a adaptação ao ambiente da câmara metabólica durante 10 h, os parâmetros metabólicos como o consumo de oxigênio (VO₂), o consumo de dióxido de carbono (VCO₂) e a relação de troca respiratória (VCO₂ / VO₂) foram avaliados durante 48 h (HUI X et al., 2009).

3.5 ANÁLISE DE CREATINA QUINASE TOTAL (CK) E CARDÍACA (CK-MB) NO PLASMA SANGUÍNEO

A quantificação de CK e CK-MB no plasma sanguíneo é um indicador do processo de mionecrose no músculo esquelético e cardíaco, respectivamente. A isoenzima MB está presente no músculo cardíaco, e é um importante marcador utilizado clinicamente para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio. Nas duas etapas do estudo, para coleta de sangue, os animais foram eutanasiados através de aprofundamento de anestésico composto por uma mistura de cloridrato de cetamina (130mg/kg Francotar, Virbac, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg, 2%, Virbaxyl, Virbac), por via intraperitoneal. Após anestesia foi realizada toracotomia com exposição do coração, e no ventrículo direito foi realizada punção utilizando-se uma agulha com seringa contendo anticoagulante. Aproximadamente 1 ml de sangue foi aspirado e transferido para um *ependorf*. Em seguida, o sangue foi centrifugado (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18k) nas seguintes condições: 3000 RCF (força centrífuga relativa à aceleração da gravidade), 4°C por 15 minutos, separando-se o plasma dos elementos Figurados. O plasma sobrenadante foi utilizado para análise. Para quantificação da CK e CK-MB foram utilizados, respectivamente, os Kits CK-NAC e CK-MB da Bioliquid®. As absorbâncias das amostras foram lidas a 37°C utilizando-se espectrofotômetro (EPOCH 2 TC, BioTek Instruments) com comprimento de onda de

340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

3.6 ANÁLISE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

A partir da obtenção do plasma sanguíneo, conforme descrito no item 3.5, para quantificação das enzimas ALT e AST foram utilizados, respectivamente os Kits Alanina GPT (ALT) e GOT (AST), ambos da Bioliquid®. As absorbâncias das amostras foram lidas a 37°C utilizando-se espectrofotômetro (EPOCH 2 TC, BioTek Instruments) com comprimento de onda de 340nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

3.7 OBTENÇÃO DOS MÚSCULOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a coleta de sangue para quantificação das enzimas citadas nos itens 3.5 e 3.6 foi realizada perfusão vascular com injeção de 10 ml de PBS em ventrículo esquerdo, obedecendo-se o trajeto da circulação sistêmica. Uma pequena incisão foi realizada no átrio direito para ejeção do sangue remanescente na circulação. Em seguida, os músculos diafragma, bíceps braquial, quadríceps femoral e o coração foram dissecados, retirados e fixados em suportes de madeira com uma cola resultante da mistura de *Tissue-Tek* com *Tragacanth* e imersos em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C. Os suportes com os músculos foram retirados do nitrogênio e armazenados à -80°C em Biofreezer (BioFreezer Jouan, VX380). Para obtenção dos cortes histológicos, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -26°C e seccionados transversalmente na espessura de 8µm utilizando criostato (Leica CM1860). Foram utilizados cinco animais de cada grupo. Os cortes foram realizados no terço médio do comprimento de cada músculo, em três pontos distanciados em aproximadamente 300µm e posteriormente foi realizada a média das medidas obtidas nas três secções. Foram quantificadas as áreas ocupadas por fibras com núcleo central e periférico, além de área de inflamação e fibrose, utilizando a ferramenta “polígono” do *Software Image Pro Plus 6.0*.

3.7.1 Preparo dos músculos para a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)

Os cortes congelados foram inicialmente fixados com solução de *Bouin* por três horas e em seguida, imersos em etanol durante duas horas. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por dez minutos e os cortes corados com hematoxilina de Harris e em seguida, com eosina. Posteriormente, os cortes foram desidratados em séries de etanol e diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas com uso de *Entellan* e lamínulas para posterior observação em microscopia de luz. Para esta coloração foram quantificadas as áreas com presença de infiltrado inflamatório, evidenciada pela presença de células polimorfonucleares, assim como a área de fibras regeneradas, indicada pelas fibras com núcleo central (BRIGUET et al., 2004).

3.7.2 Preparo dos músculos para a coloração de Tricrômico de Masson (TM)

Os cortes dos músculos diafragma e coração foram inicialmente fixados com solução de *Bouin* por três horas e em seguida, imersos em etanol durante duas horas. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por dez minutos e corados com hematoxilina de Harris por cinco minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente e imersas em solução de Masson por 15 minutos. As lâminas foram então banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e rapidamente mergulhadas em solução de azofloxina (AFO) por cinco minutos e em seguida, em solução de verde luz (*light green*) por 30 segundos. Após esta etapa, os cortes foram banhados em ácido acético a 0,2% para serem submetidos à desidratação em série de etanol e à diafanização com xilol. As lâminas foram montadas com *Entellan* e os cortes observados em microscópio de luz e submetidos à morfometria. Para esta coloração foi quantificada área ocupada por tecido conjuntivo, indicativo de fibrose.

3.8 PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS

Imediatamente após a eutanásia, o coração e fígado foram retirados e pesados em uma balança eletrônica de precisão (modelo EK-2000G – AND). O peso relativo dos órgãos foi calculado como a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal, sendo calculado o arco-seno da razão peso corporal / peso musculo e extraída a média $\pm$ desvio padrão da média desses dados. Desta forma, esta avaliação comparativa entre os animais submetidos ao tratamento em relação ao grupo controle poderá indicar ou não alguma alteração (KYSELOVA et al., 2003). O peso relativo dos órgãos foi calculado como a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal.

3.9 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

Foi verificado se o tratamento proposto alterou a quantidade de proteínas relacionadas à autofagia (LC 3, FOXO3a, mTOR, akt), inflamação (NF- κ B e TNF- α) e receptores de ácidos graxos (GPR40 e GPR120). Os valores foram normalizados com a proteína gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (GAPDH). Para isso, foram utilizados cinco animais de cada grupo.

3.9.1 Preparo do extrato total

Após o término dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e foi realizada perfusão vascular com PBS conforme apresentado nos itens 3.5 e 3.6, e os músculos diafragma, bíceps braquial, quadríceps femoral e o coração foram retirados. Tais músculos foram seccionados em pequenos fragmentos e homogeneizados por 30 segundos em velocidade máxima (homogeneizador Polytron PTA 20S modelo PT10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) com 2 ml de solução tampão a 4°C (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM [pH 7,4], pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina). Os extratos foram então centrifugados a 11000 rpm, à 4°C por 30 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para análise do extrato total. A quantificação proteica total foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.9.2 Quantificação das proteínas

Às amostras do extrato proteico foi adicionado tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,04 mg/ml e Tris-HCl 0,12 M, glicerol 20%, SDS 2% e β -mercaptoetanol 0,28 M) e aquecidas por 5 minutos a 100°C. Em seguida, 60 μ g de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida 8-15% em aparelho para eletroforese (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V em aparelho de transferência (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,02%) com os respectivos anticorpos primários a 4°C, durante 12 horas. Após este período as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal, para depois serem incubadas com anticorpos secundários, diluídos em 10 ml de solução basal por duas horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas

foram lavadas por 30 minutos com solução basal. As diluições dos anticorpos primários e secundários foram definidas de acordo com a marcação obtida.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas a solução de quimiluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 minutos, seguida de exposição no G-Box. A detecção das bandas imunofluorescentes e a quantificação foram realizadas no aparelho G-Box Chemi pelo *software* de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Maryland-EUA). As densidades das bandas foram quantificadas pelo *software* de análise GeneTools (Syngene, Maryland-EUA).

3.9.3 Anticorpos Primários

- FOX03a (rabbit anti-rabbit; Cell Signaling, Santa Cruz, California, USA);
- Akt (rabbit monoclonal; Cell Signaling, Santa Cruz, California, USA);
- LC 3 (mouse monoclonal; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA);
- mTOR (rabbit monoclonal; Cell Signaling, Santa Cruz, California, USA);
- NF-kB (rabbit/goat polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, California, USA);
- TNF- α (rabbit anti-mouse polyclonal antibody; Millipore, Darmstadt, DEU);
- GPR40 (rabbit polyclonal; BOSTER, Pleasanton, California, USA);
- GPR120 (rabbit polyclonal; ABCAM, USA);
- GAPDH (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, California, USA).

3.9.4 Anticorpos Secundários

IgG *rabbit* e *mouse* conjugados à peroxidase, correspondente do anticorpo primário (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da normalidade e da homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A comparação entre três grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls quando apresentou apenas uma variável e análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste de Sidak quando apresentou duas variáveis. Em todas as análises, os valores de P foram considerados estatisticamente significativos quando inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Para todos os cálculos estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

5 RESULTADOS

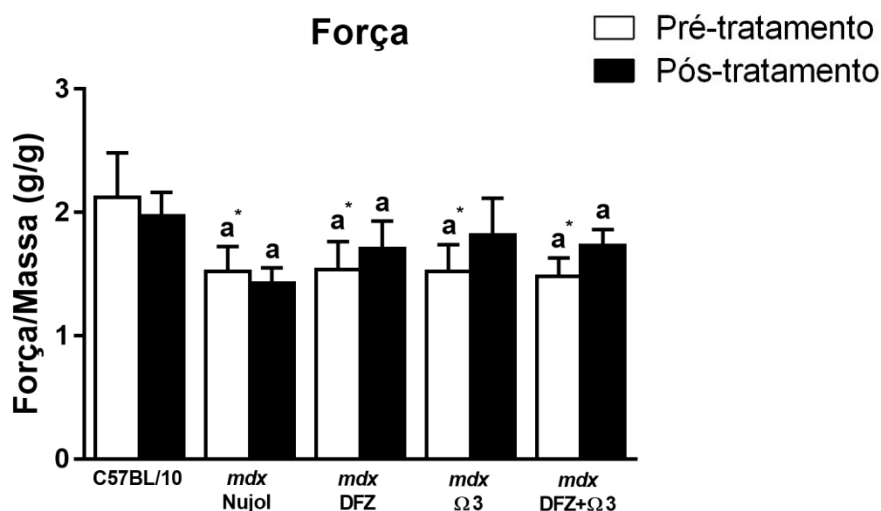
5.1 RESULTADOS REFERENTES AO ESTUDO DA AUTOFAGIA: CARACTERIZANDO O MODELO

5.1.1 Análises funcionais

5.1.1.1 Medida de força

Comparando as medidas de força obtidas antes do início do tratamento com as obtidas após o término do tratamento de cada grupo estudado, notou-se que o animal normal (C57BL/10) não apresentou mudanças significativas antes e após o tratamento. Os animais *mdx* apresentaram diminuição significativa da força dos membros anteriores ao início (28,3%) e final (25,5%) da terapia, comparando com os animais C57BL/10 das respectivas idades ($p < 0,05$). Ao final do tratamento, notou-se que apenas o grupo tratado com ômega-3 exibiu prevenção da perda de força nos membros anteriores, sendo os valores obtidos próximos aos observados nos animais controles. Nos demais grupos tratados, os tratamentos tenderam a aumentar a força, porém não foi significativo em cada grupo (Figura 6).

Figura 6- Medida de força normalizada pela massa

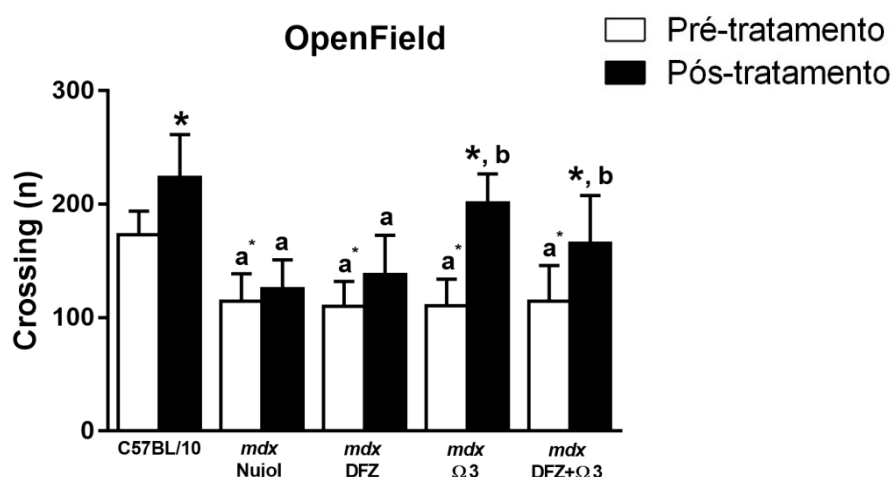


Médias das medidas de força realizadas anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos propostos em cada grupo. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média das medidas de força obtidas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado pela letra com asterisco "a*" quando comparado com o grupo C57BL/10 pré-tratamento e pela letra "a" quando comparado com o grupo C57BL/10 pós-tratamento ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.1.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea (*Open-Field Test*)

Analisando as médias da atividade locomotora horizontal espontânea, ou seja, o número de cruzamento (*crossing*) obtidos antes do início do tratamento com os obtidos após o término do tratamento, notou-se que o animal normal (C57BL/10) não apresentou mudanças significativas antes e após o tratamento. Os animais *mdx* apresentaram diminuição significativa das médias do número de *crossings* (44%) quando comparados com os animais C57BL/10 ao final do tratamento ($p < 0,05$). Os grupos tratados com ômega 3 (monoterapia e terapia combinada), apresentaram aumento significativo de 60% e 32%, respectivamente, no número de *crossings*, quando comparados com o grupo distrófico tratado com nujol (Figura 7).

Figura 7- Open Field

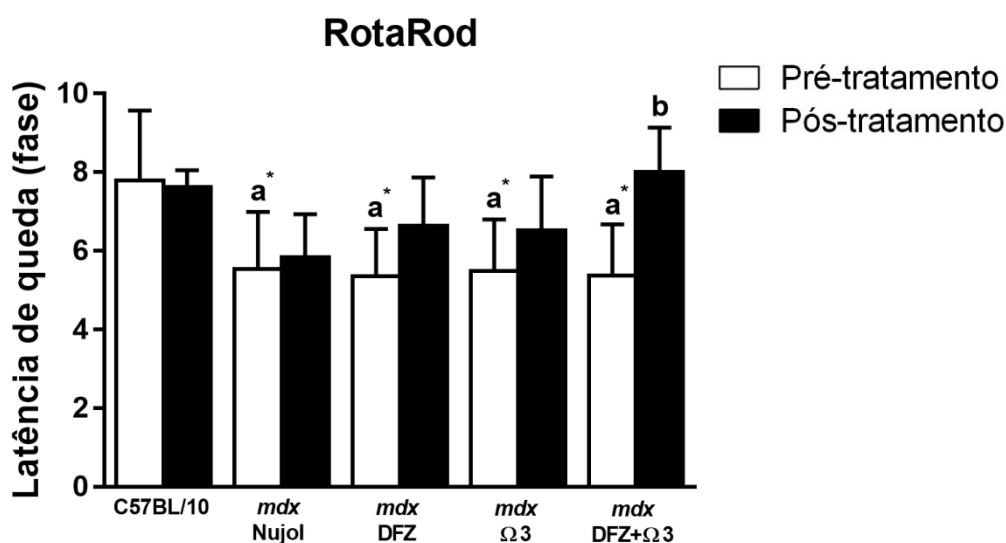


Número de *crossings* realizados anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+O3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média e desvio padrão do número de *crossings* obtidos a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por asterisco (*) quando comparado com o início do tratamento, pela letra "a" com asterisco "a*" quando comparado com o grupo C57BL/10 pré-tratamento, pela letra "a" quando comparado com o grupo C57BL/10 pós-tratamento e pela letra "b" quando comparado com o grupo *mdx* ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.1.3 Avaliação de locomoção forçada em cilindro giratório (*RotaRod test*)

Analisando as médias da latência de queda antes do início do tratamento com as obtidas após o término do tratamento de cada grupo estudado, observou-se que o animal *mdx* apresentou latência de queda de 24,2% a menos que o animal C57BL/10 antes do início do tratamento. Após o tratamento, observou-se aumento (49,2%) significativo da latência de queda apenas no grupo tratado com associação de deflazacorte e ômega 3 (Figura 8).

Figura 8- RotaRod

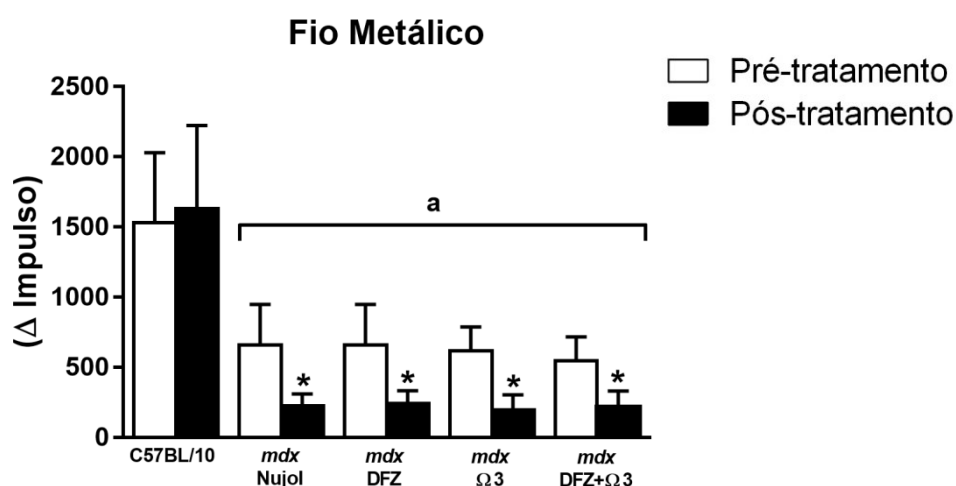


Latência de queda observada anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média e desvio padrão da latência de queda obtida a partir de 10 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” com asterisco “*” (a*) quando comparado com o grupo C57BL/10 pré-tratamento e pela letra “b” quando comparado com o grupo *mdx*. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.1.4 Suspensão em fio metálico

Analisando a variação (Δ) do impulso antes do início do tratamento e após o término do tratamento de cada grupo estudado, observou-se que os animais *mdx* apresentaram diminuição significativa (86,2%) da variação de impulso quando comparados com os animais C57BL/10 ao final do tratamento. Também houve diminuição significativa (65,9%) da variação de impulso do animal distrófico quando comparado o final com o início do tratamento ($p < 0,05$). Após os tratamentos observou-se redução semelhante de aproximadamente 65% em todos os grupos quando comparados à avaliação realizada antes do tratamento (Figura 9).

Figura 9- Suspensão em fio metálico

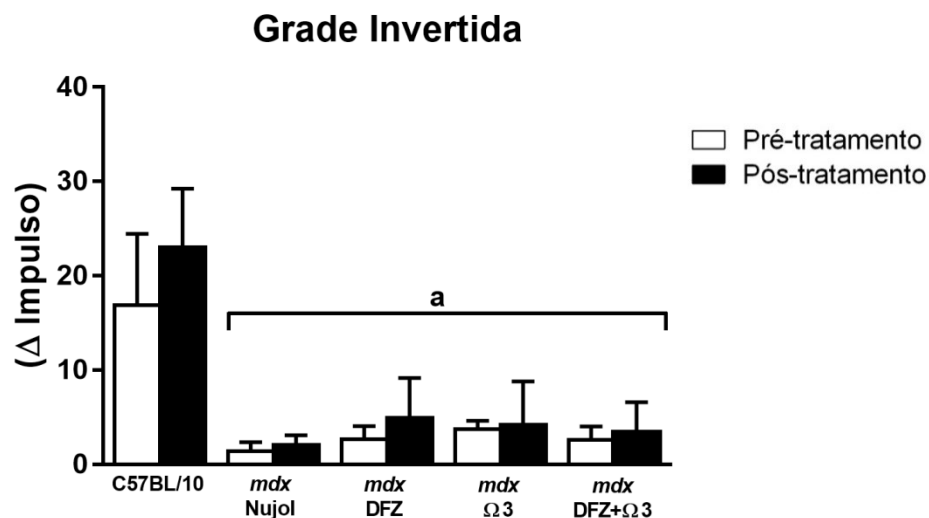


Variação de impulso observadas anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+O3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média e desvio padrão da variação de impulso obtida a partir de 10 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10 e por asterisco “*” quando comparado com o pré-tratamento ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.1.5 Retenção de quatro membros

Os animais distróficos apresentaram queda na variação (Δ) do impulso tanto antes (3 meses), quanto ao término do tratamento (8 meses), em comparação ao grupo C57BL/10 com as mesmas idades. Os tratamentos não influenciaram estes resultados (Figura 10).

Figura 10- Retenção de quatro membros



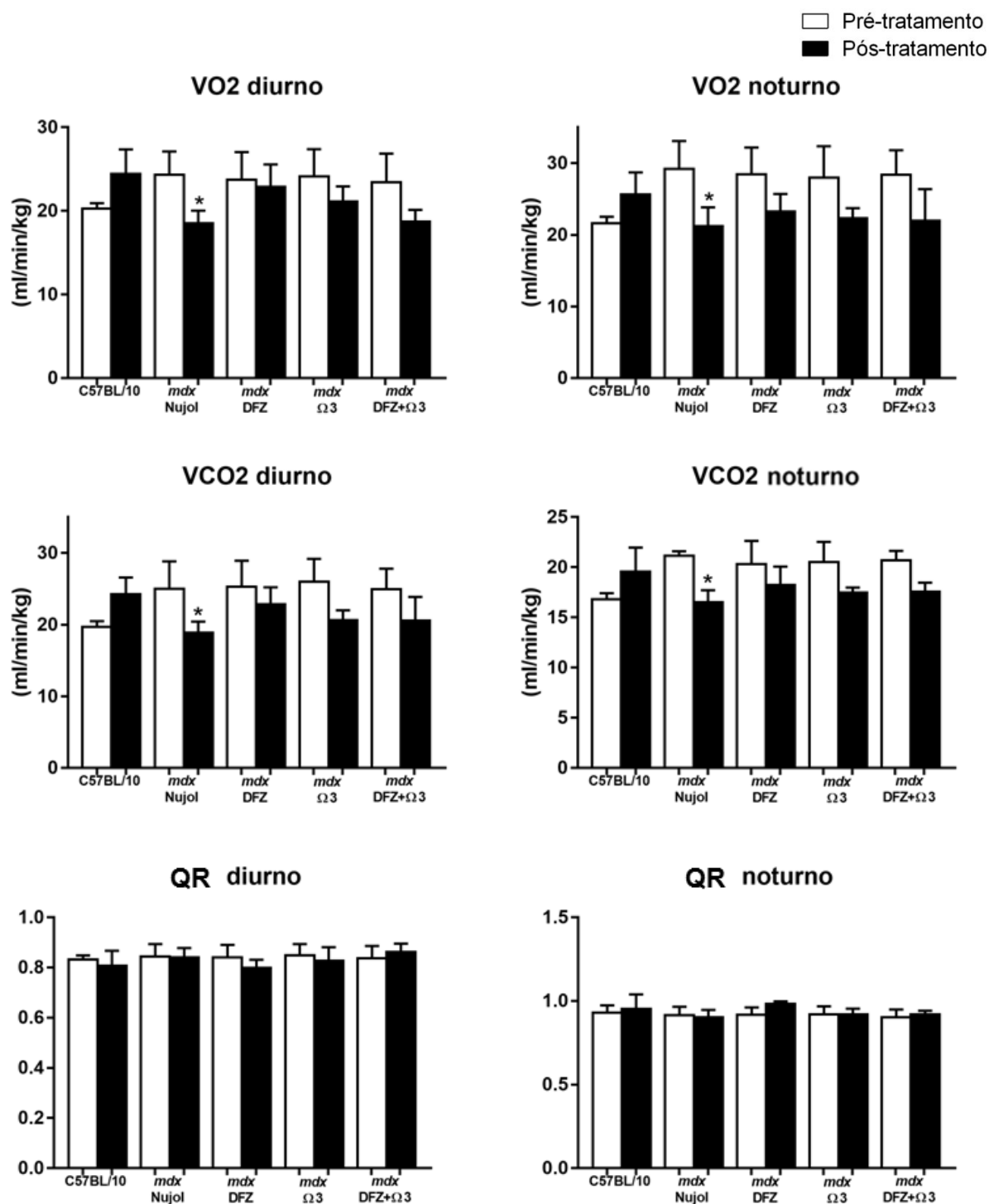
Variação de impulso observadas anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+O3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média e desvio padrão da variação de impulso obtida a partir de 10 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10 ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.1.6 Calorimetria indireta: consumo máximo de oxigênio (VO₂), produção máxima de dióxido de carbono (VCO₂) e quociente respiratório (QR)

O consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono nos períodos diurno e noturno foram semelhantes entre os grupos analisados. Ao final dos tratamentos foi observada redução significativa no consumo de oxigênio e na produção de dióxido de carbono apenas no grupo *mdx* tratado com nujol. Os tratamentos propostos não interferiram no consumo de oxigênio e produção de CO₂ (Figura 11).

O quociente respiratório foi semelhante em todos os grupos experimentais, tanto no período diurno, quanto no período noturno.

Figura 11- Calorimetria Indireta



Consumo de oxigênio (VO₂), produção máxima de dióxido de carbono (VCO₂) e quociente respiratório (QR). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média das medidas obtidas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por asterisco “*” quando comparado com início do tratamento ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.2 **Análise morfológica**

5.1.2.1 **Músculo Diafragma**

5.1.2.1.1 **Análise Qualitativa**

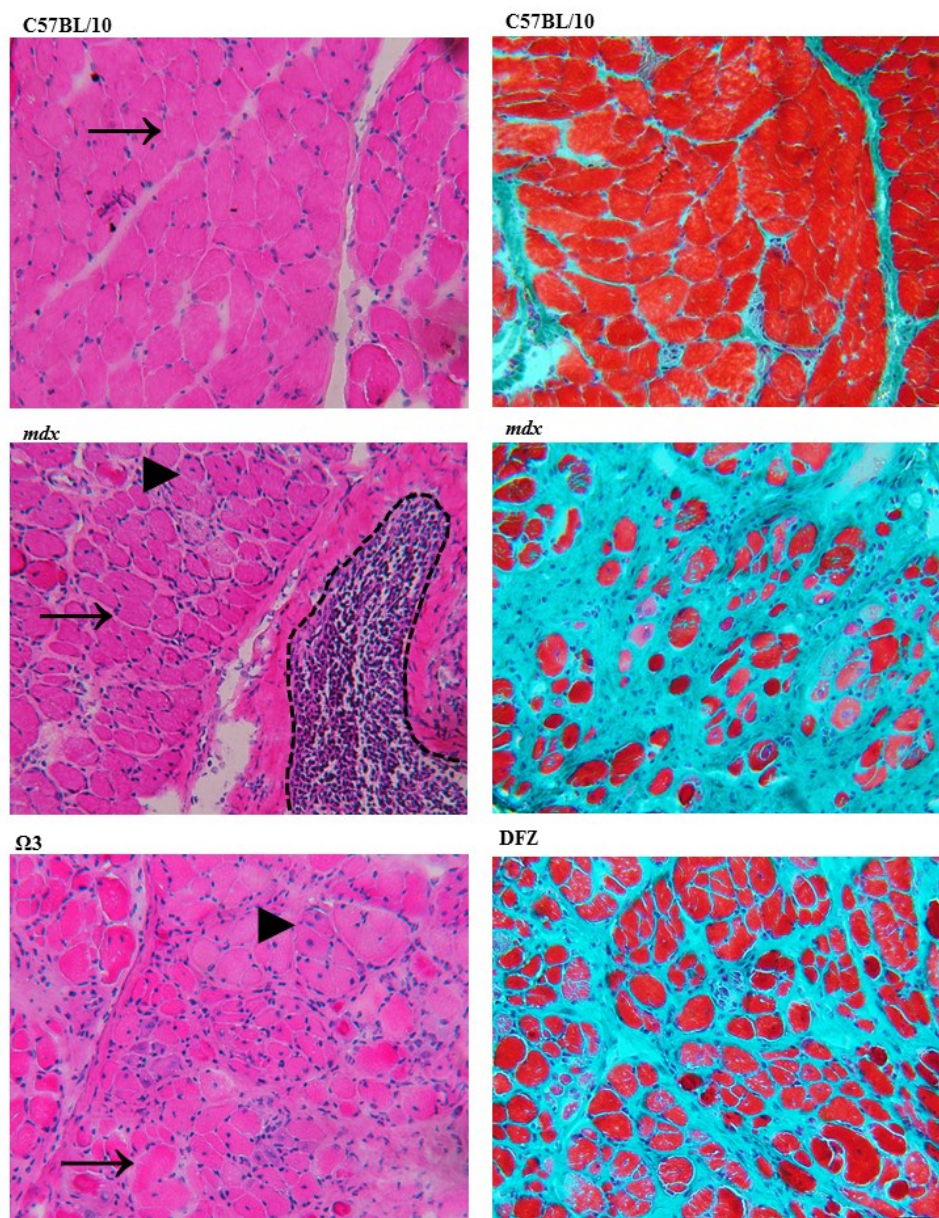
No músculo diafragma do grupo C57BL/10, foram observadas majoritariamente fibras com núcleo periférico, característica do músculo normal, no diafragma distrófico observaram-se fibras com núcleo periférico e com núcleo central, característica de fibras normais e regeneradas, respectivamente (Figura 12). No grupo distrófico tratado com Nujol, foram observadas áreas com a celularidade aumentada, representando área com presença de inflamação (Figura 12).

No músculo diafragma do grupo C57BL/10, foi observada discreta área corada com verde-luz referente à fáscia muscular, composta por tecido conjuntivo (Figura 25). A fibrose foi evidenciada em todos os grupos dos animais distróficos, através da presença de abundante tecido conjuntivo corado por verde-luz pela coloração de Tricrômico de Masson (Figura 12).

5.1.2.1.2 **Análise Quantitativa**

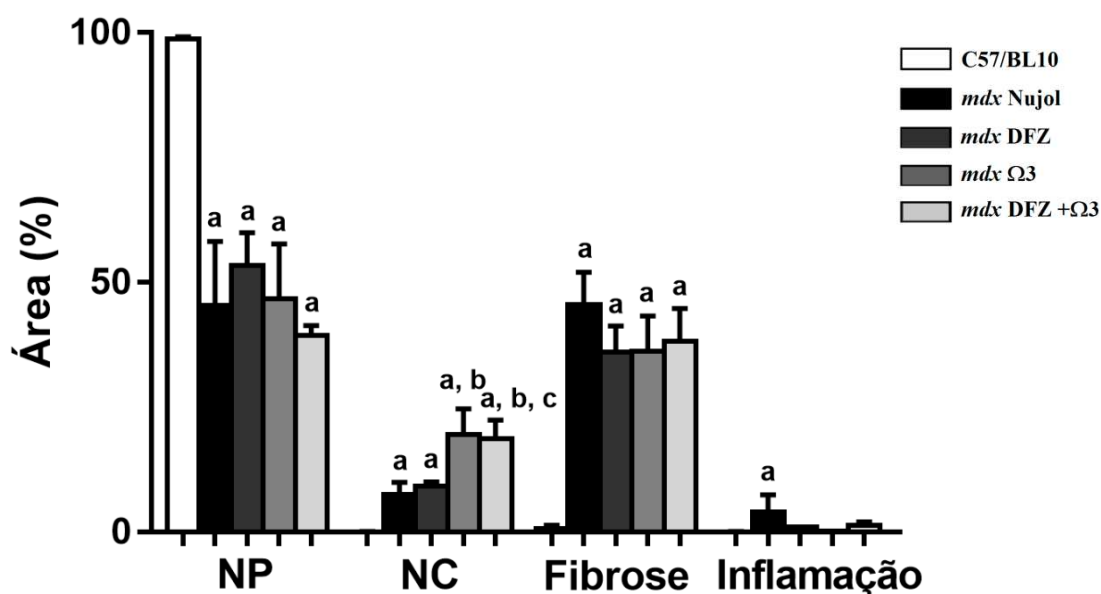
No músculo diafragma, foi observado aumento significativo (aproximadamente 2,5 vezes) nas áreas ocupadas por fibras com núcleo central, indicativo de regeneração muscular, nos grupos tratados com $\Omega 3$ e DFZ+ $\Omega 3$, quando comparados com o grupo tratado com nujol (Figura 13). Para este mesmo parâmetro observou-se que o grupo tratado com a associação dos fármacos apresentou o dobro de área regenerada (18,80%), quando comparado com o grupo tratado com nujol (9,20%). Ambos os tratamentos não protegeram o músculo diafragma da distrofinopatia no estágio tardio da doença, não havendo diferença na área ocupada por fibras com núcleo periférico (Figura 13). Embora não tenha sido significativa, foi observada uma tendência à redução da área de fibrose dos animais tratados com DFZ (20,6%), $\Omega 3$ (20,5%) e DFZ+ $\Omega 3$ (16%), quando comparadas ao grupo tratado com Nujol. Foi observado aumento significativo na área de inflamação do grupo tratado com nujol, quando comparado com o grupo C57BL/10, porém, não foi observada diferença significativa deste parâmetro nos grupos tratados com os fármacos, quando comparados com o grupo distrófico tratado com nujol (Figura 13).

Figura 12- Cortes transversais do músculo diafragma.



Cortes transversais de músculo diafragma corados com Hematoxilina e Eosina (primeira coluna) e Tricrômico de Masson (segunda coluna). Indicados: inflamação (área circundada por traços), fibra com núcleo periférico (seta) e fibra com núcleo central (cabeça de seta). Fibrose representada pela cor verde-luz Aumento 20X. Escala 100µm.

Figura 13- Dados morfométricos do músculo diafragma



Porcentagem das áreas ocupadas por núcleo periférico (NP), núcleo central (NC), fibrose e inflamação no músculo diafragma. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a porcentagem das áreas analisadas obtidas a partir de 5 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol e “c” quando comparado com o grupo tratado com DFZ. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.1.2.2 Coração

5.1.2.2.1 Análise Qualitativa

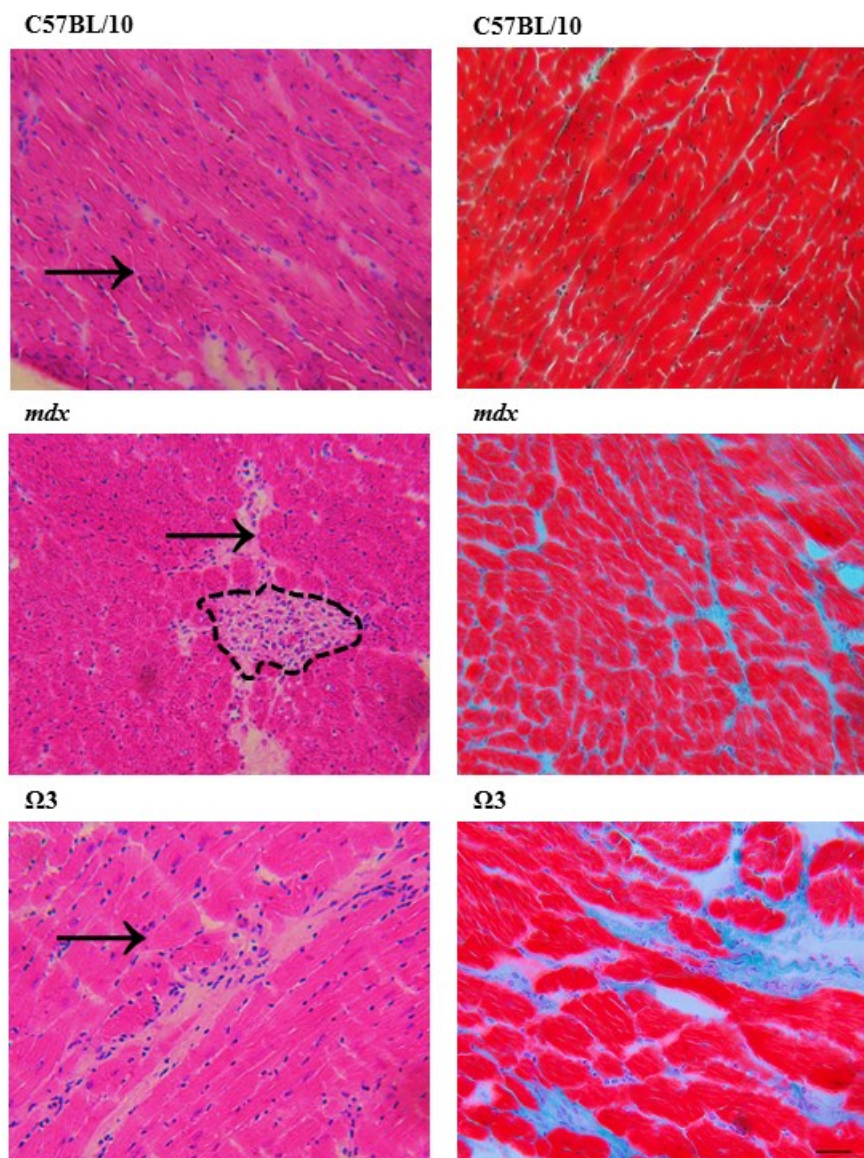
Nos cortes de corações corados com Hematoxilina e Eosina foram observadas fibras em secções transversais e longitudinais, característica deste órgão que possui camadas de fibras musculares com essas disposições. Devido a essa característica, não são quantificadas as áreas com fibras com centralização nuclear, uma vez que, para fazer essa análise, precisamos visualizar a fibra muscular seccionada transversalmente (Figura 14).

No coração dos animais distróficos a presença de fibrose foi evidenciada através de abundante tecido conjuntivo corado com verde-luz pela coloração de Tricrômico de Masson (Figura 14).

5.3.2.2.2 Análise Quantitativa

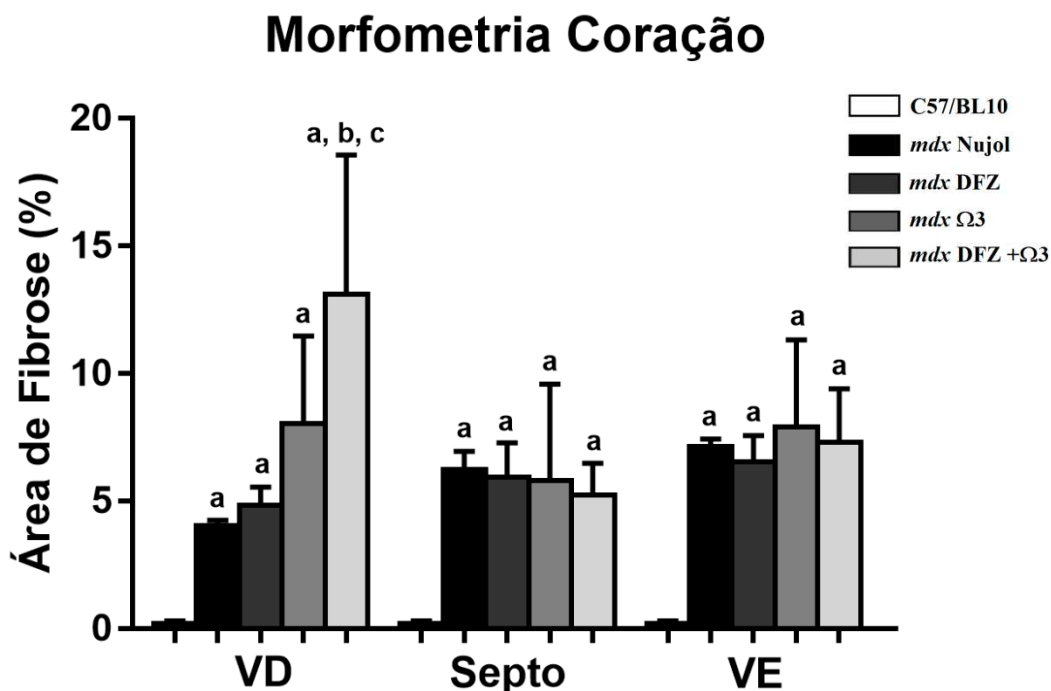
Para quantificação da área ocupada por fibrose, analisamos o ventrículo direito, ventrículo esquerdo e o septo interventricular separadamente. Todos os animais distróficos apresentaram aumento significativo da fibrose quando comparados com os animais C57BL/10, nessas três regiões. O ventrículo direito do grupo distrófico tratado com associação dos fármacos apresentou significativo aumento (aproximadamente três vezes) da área de fibrose quando comparado com o grupo distrófico tratado com Nujol e com DFZ (Figura 15).

Figura 14- Cortes transversais de corações corados com Hematoxilina e Eosina.



Cortes transversais de corações corados com Hematoxilina e Eosina (primeira coluna) e Tricrômico de Masson (segunda coluna). Indicados: inflamação (área circundada por traços), cardiomiócito (seta). Fibrose representada pela cor verde-luz. Aumento 20X. Escala 100µm.

Figura 15- Dados morfométricos do músculo cardíaco.



Porcentagem da área de fibrose no ventrículo direito (VD), septo interventricular (septo) e ventrículo esquerdo (VE) no coração. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+O3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a porcentagem das áreas analisadas obtidas a partir de 5 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol e “c” quando comparado com o grupo tratado com DFZ. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.1.2.3 Músculo Bíceps Braquial

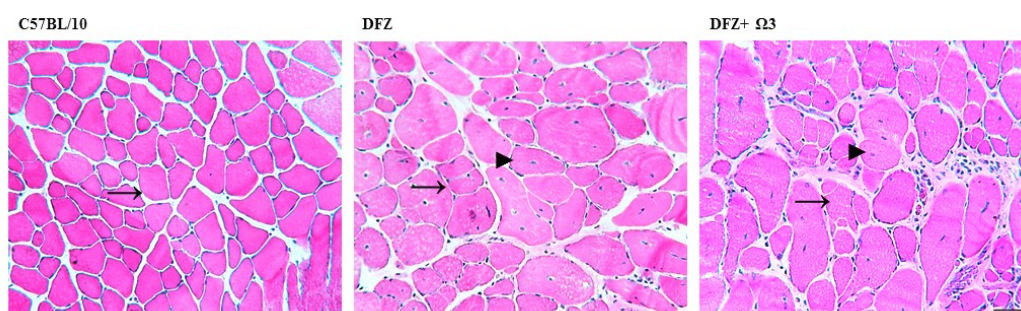
5.1.2.3.1 Análise Qualitativa

Nos cortes dos músculos bíceps braquiais do grupo C57BL/10 corados com Hematoxilina e Eosina foram observadas fibras em secções transversais majoritariamente com núcleo periférico, característica do músculo íntegro, ou seja, que não sofreu degeneração, enquanto que nos cortes dos grupos distróficos foi possível observar fibras com núcleo periférico e com núcleo central, característica de fibras normais e regeneradas, respectivamente (Figura 16). Diferentemente do músculo diafragma, não foi observada área com celularidade aumentada, característica de processo inflamatório.

5.1.2.3.2 Análise Quantitativa

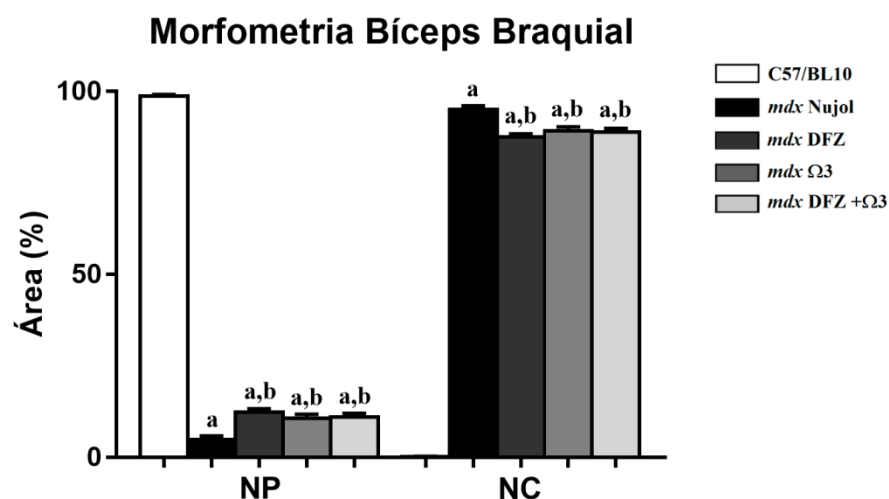
No músculo bíceps braquial distrófico foi observada uma redução de aproximadamente 95% da área ocupada por fibras com núcleo periférico quando comparado ao animal C57BL/10. Inversamente, no animal distrófico foi observada aproximadamente 95% de área ocupada por núcleo central, indicativo de regeneração muscular. Nos grupos tratados com $\Omega 3$ e DFZ, isolados ou em associação, houve uma redução significativa de aproximadamente 8% da área regenerada, não havendo uma diferença significativa entre os tratamentos (Figura 17).

Figura 16 - Cortes transversais de bíceps braquial corados com Hematoxilina e Eosina



Cortes transversais de músculo bíceps braquial corados com Hematoxilina e Eosina. Indicados: fibra com núcleo periférico (seta) e fibra com núcleo central (cabeça de seta). Aumento 20X. Escala 100 μ m

Figura 17- Dados morfométricos do músculo bíceps braquial



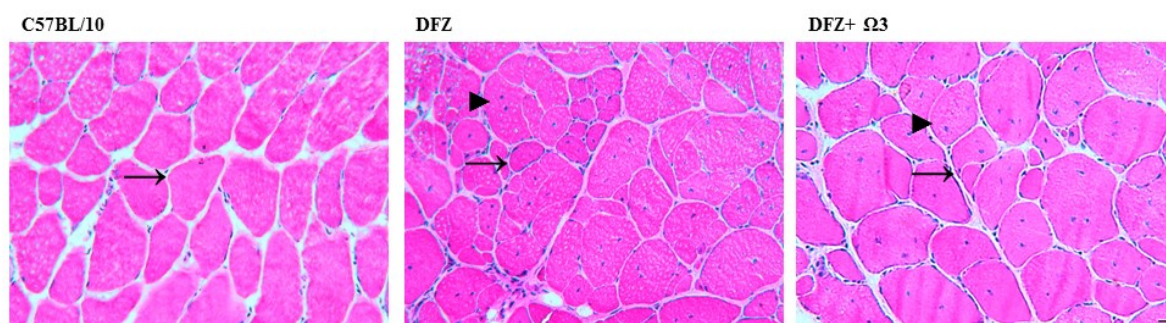
Porcentagem das áreas ocupadas por núcleo periférico (NP) e núcleo central (NC) no músculo bíceps braquial. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+ $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a porcentagem das áreas analisadas obtidas a partir de 5 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.1.2.4 Músculo Quadríceps Femoral

5.1.2.4.1 Análise Qualitativa

O músculo quadríceps do grupo C57BL10 apresentou fibras com núcleo periférico, característica histológica do músculo íntegro, enquanto que nos quadríceps dos animais distróficos foi notada predominância de fibras com núcleo central, de diâmetros variados, característica de fibras regeneradas (Figura 18). Não foi observada área de inflamação ou fibrose no músculo quadríceps.

Figura 18- Cortes transversais de quadríceps femoral corados com Hematoxilina e Eosina

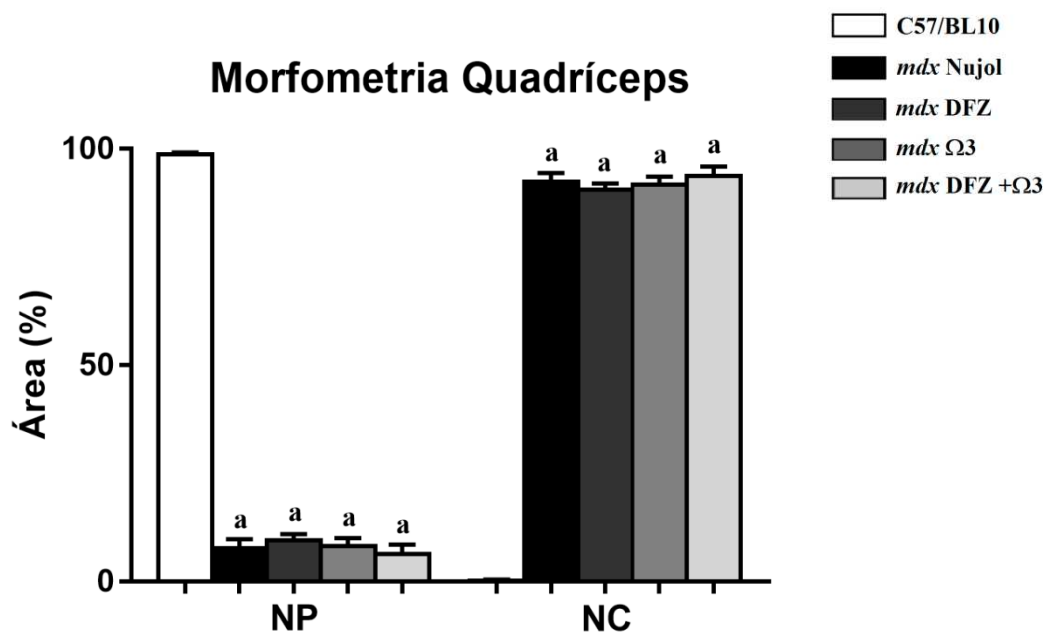


Cortes transversais de músculo quadríceps femoral corados com Hematoxilina e Eosina. Em A, músculo de camundongo C57BL10. Em B, músculo de camundongo *mdx* tratado com nujol. Em C, músculo de camundongo *mdx* tratado com DFZ. Em D, músculo de camundongo *mdx* tratado com Ω3. Em E, músculo de camundongo *mdx* tratado com DFZ+Ω3. Indicados: fibra com núcleo periférico (seta) e fibra com núcleo central (cabeça de seta). Aumento 20X. Escala 100μm

5.1.2.4.2 Análise Quantitativa

No músculo quadríceps femoral distrófico foi observada aproximadamente 95% de área ocupada por núcleo central, indicativo de regeneração muscular. Não havendo uma diferença significativa entre os grupos tratados com Ω3 e DFZ, isolados ou em associação (Figura 19).

Figura 19- Dados morfométricos do músculo quadríceps femoral



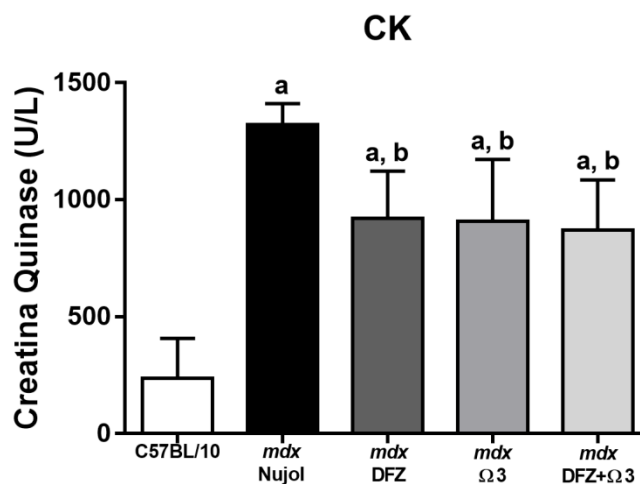
Porcentagem das áreas ocupadas por núcleo periférico (NP) e núcleo central (NC) no músculo quadríceps femoral. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a porcentagem das áreas analisadas obtidas a partir de 5 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.1.3 Análise bioquímica

5.1.3.1 Níveis séricos de Creatina Quinase (CK)

Como esperado, os camundongos *mdx* apresentaram elevação significativa (2,5 vezes de aumento) da CK em relação ao animal normal (C57BL/10). Os grupos tratados diminuíram aproximadamente 30% os níveis de CK quando comparados com o grupo distrófico tratado com nujol (Figura 20).

Figura 20- Creatina quinase

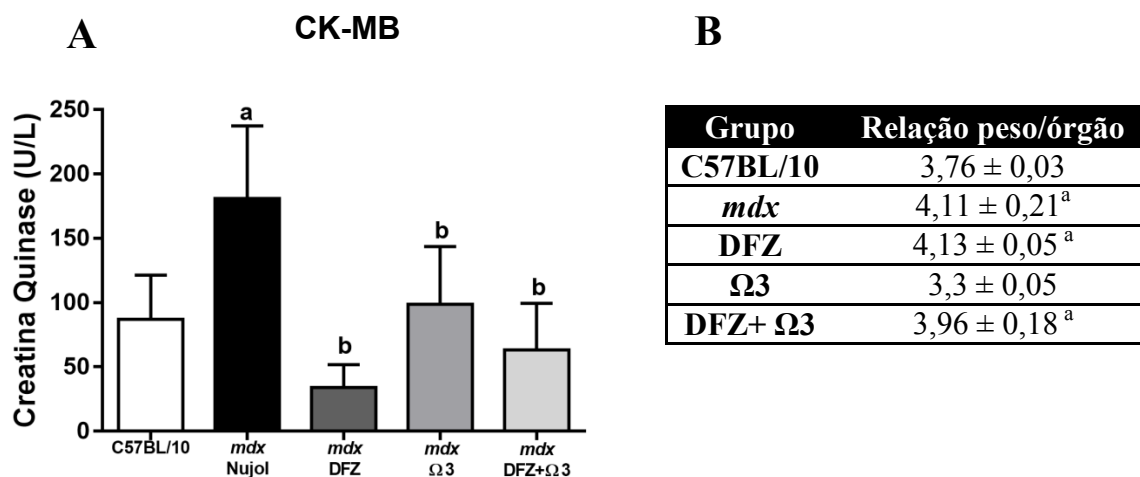


Níveis de CK obtidos após os tratamentos. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média dos níveis de CK obtidas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10. Nível de significância indicado pela letra “b” quando comparado com o grupo *mdx* ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.1.3.2 Níveis séricos de Creatina Quinase Cardíaca (CK-MB) e Peso Relativo do Coração

A creatina quinase cardíaca apresentou elevação significativa (duas vezes) em camundongos *mdx* em relação ao animal normal (C57BL/10). Quando comparado com o grupo distrófico tratado com nujol, observamos uma redução de 81% no grupo tratado com deflazacorte, 46% no grupo tratado com ômega 3 e de 65% no grupo tratado com associação dos fármacos (Figura 21A). Quanto ao peso relativo do coração, foi observado aumento significativo do peso do órgão dos grupos *mdx* nujol (9,3%), *mdx* tratado com DFZ (9,8%) e *mdx* tratado com a combinação dos fármacos (5,3%) (Figura 21 B).

Figura 21- CK-MB e peso relativo do coração



Níveis de CK-MB (A) obtidos após os tratamentos e relação peso/ órgão do coração (B). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+O3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média dos níveis de CKMB obtidas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL/10. Nível de significância indicado pela letra “b” quando comparado com o grupo *mdx*. ($P < 0,05$). A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

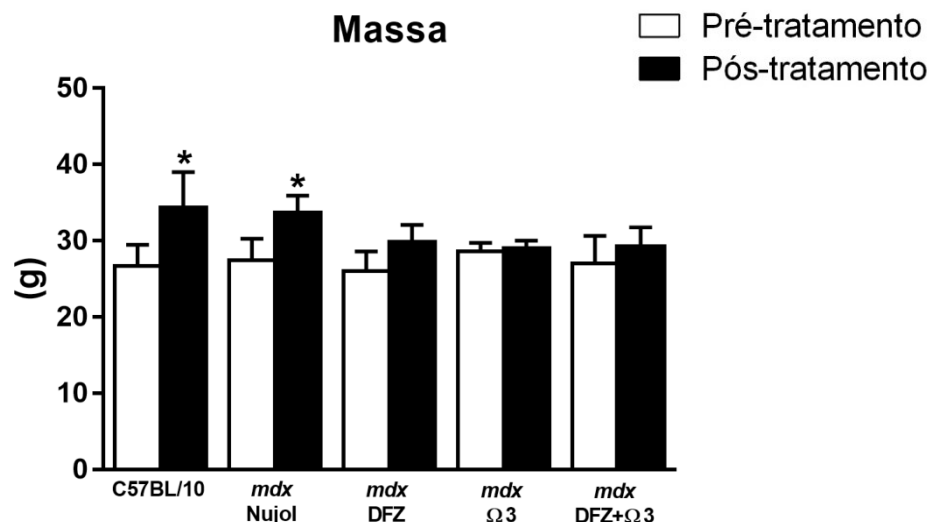
5.1.4 Análise toxicológica

5.1.4.1 Massa corporal

Para avaliar o crescimento somático dos animais foi realizada comparação de suas massas corporais antes do início e após o final do tratamento (Figura 22). Foi observada diferença significativa na média da massa corporal entre o início e o final do tratamento nos grupos controle e *mdx* nujol. O tratamento com DFZ, Ω3 e a combinação

de ambas, não diferiram estatisticamente na massa após o tratamento, o que, neste caso, como era esperado o crescimento do animal, aparentemente interferiram no crescimento dos animais.

Figura 22- Média das massas corporais

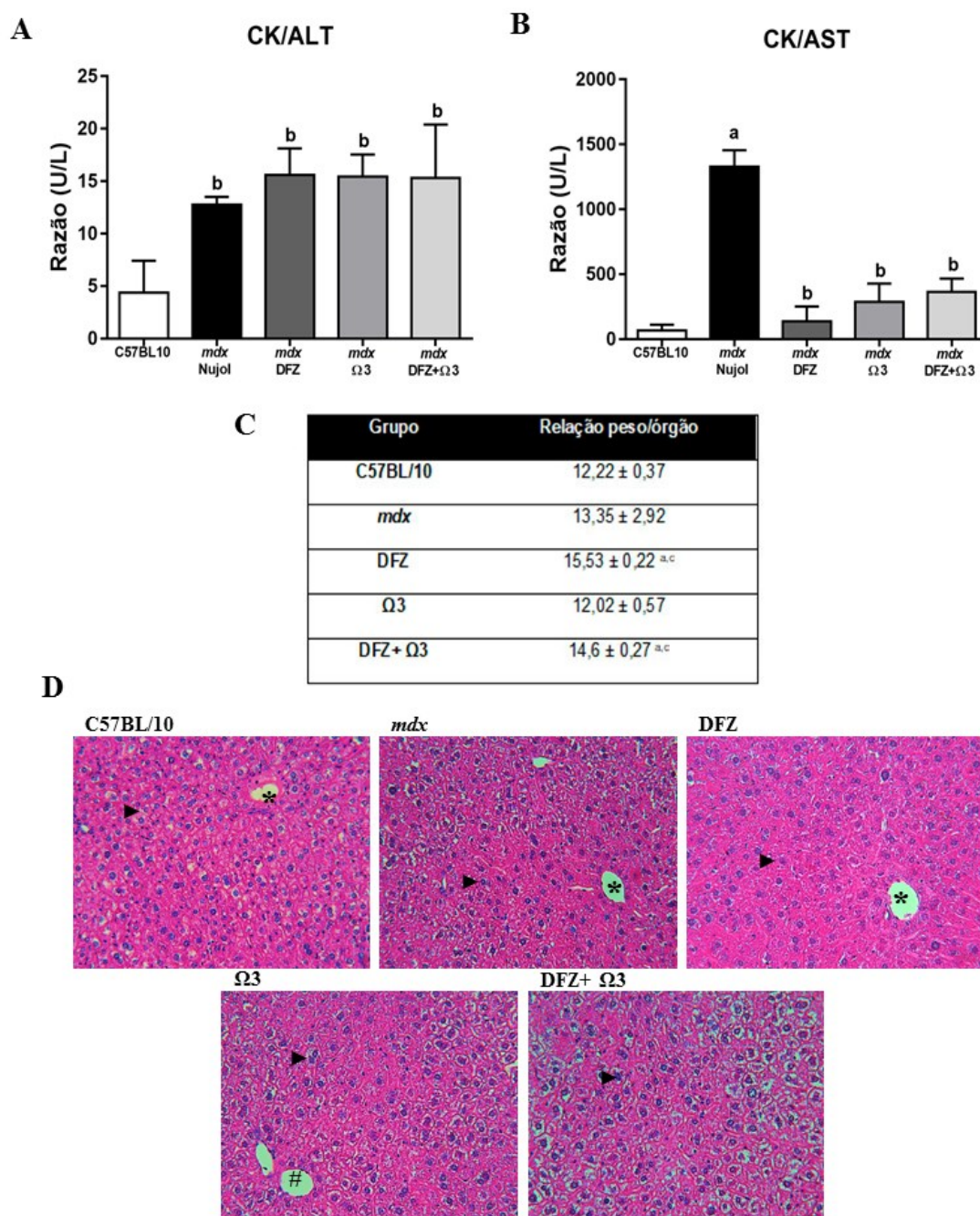


Médias das massas corporais anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos propostos em cada grupo. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Cada coluna representa a média das massas corporais mensuradas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por asterisco (*) quando comparado com o início do tratamento. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.1.4.2 Estudo das enzimas hepáticas e histologia do fígado

Os animais distróficos apresentaram elevados níveis da razão CK/ALT (1,6 vezes) e CK/AST (13 vezes) em comparação aos animais controles. Os tratamentos não alteraram a razão CK/ALT, mas reduziram significativamente a CK/AST. O peso relativo do fígado, foi alterado nos grupos *mdx* DFZ (aumento de 27%) e *mdx* DFZ+Ω3 (aumento de 19%) em comparação aos C57BL10 e *mdx* tratado com ômega-3 (29% e 21%, respectivamente) (Figura 23).

Figura 23- Enzimas hepáticas, peso relativo e histologia do fígado



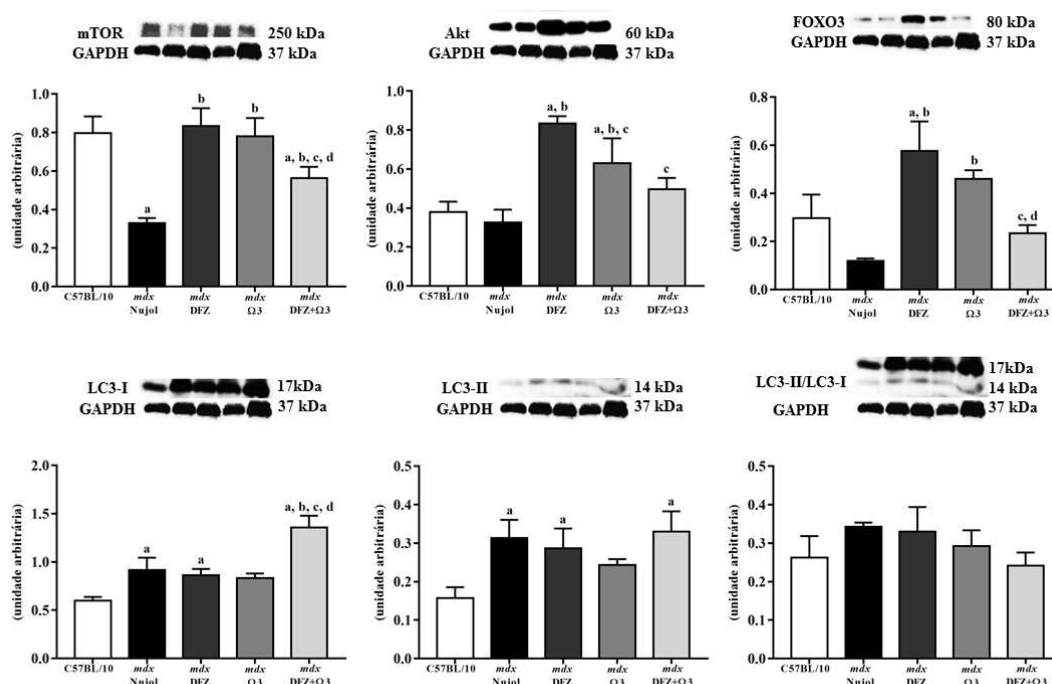
Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+O3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3) com 8 meses de idade, término do tratamento. As colunas representam média (n=10animais por grupo) e desvio padrão das razões CK/ALT (A) e CK/AST (B). Peso relativo do fígado (C). Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10; “c” quando comparado com o grupo Ω3 ($P<0,05$). A significância estatística foi determinada por ANOVA. D: Análise histológica do fígado. Secções transversais coradas com HeE (n= 5 animais por grupo). Cabeça de seta(►): núcleo dos hepatócitos. Asterisco (*): veia centro-lobular. Cerquilha (#): espaço porta. Aumento 20X. Escala:100µm.

5.1.5 Marcadores de autofagia (*Western Blot*)

5.1.5.1 Músculo Diafragma

No músculo diafragma observou-se menores níveis de mTOR nos animais distróficos tratados com Nujol, em comparação aos animais do grupo controle, C57BL/10. Ambos tratamentos, isolados ou em associação, apresentaram maiores níveis de mTOR e Akt, a terapia combinada foi menos efetiva que as terapias isoladas, neste efeito (Figura 24).

Figura 24- Marcadores da autofagia no diafragma

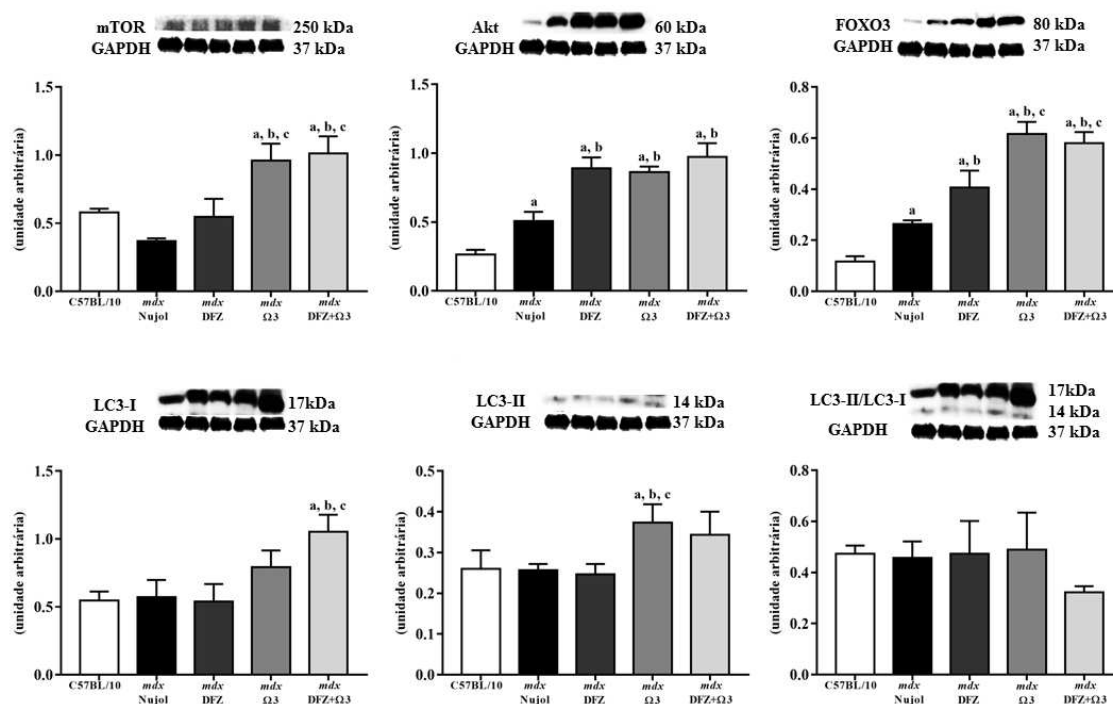


Marcadores da autofagia no músculo diafragma (*western blot*). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+ Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Gráfico representando os níveis de mTOR, FOX03a, Akt e LC 3 normalizados pelo GAPDH. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol, “c” quando comparado com o grupo DFZ, “d” quando comparado com o grupo Ω3. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.1.5.2 Coração

No músculo cardíaco de animais distróficos foram observados maiores níveis de Akt e FOX03a, enquanto que os níveis de mTOR e LC-3 não diferiram quando comparados com o grupo C57BL/10. O tratamento com $\Omega 3$, isolado ou combinado com DFZ, aumentou os níveis de mTOR, e Akt (Figura 25).

Figura 25- Marcadores da autofagia no coração

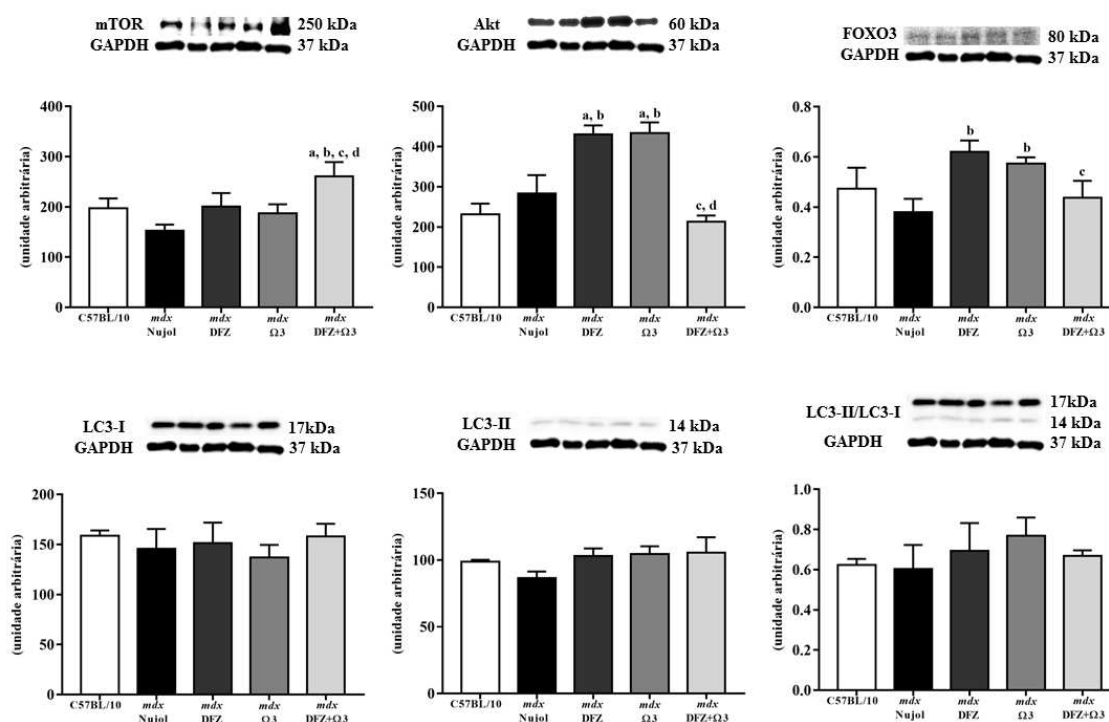


Marcadores da autofagia no músculo cardíaco (*western blot*). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+ $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Gráfico representando os níveis de mTOR, FOX03a, Akt e LC 3 normalizados pelo GAPDH. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol, “c” quando comparado com o grupo DFZ, “d” quando comparado com o grupo $\Omega 3$. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.1.5.3 Músculo Bíceps Braquial

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos C57BL/10 e distrófico no músculo bíceps braquial. As terapias elevaram os níveis de Akt quando administradas isoladamente, os níveis de mTOR aumentaram significativamente com a associação dos fármacos (Figura 26).

Figura 26- Marcadores da autofagia no músculo bíceps braquial

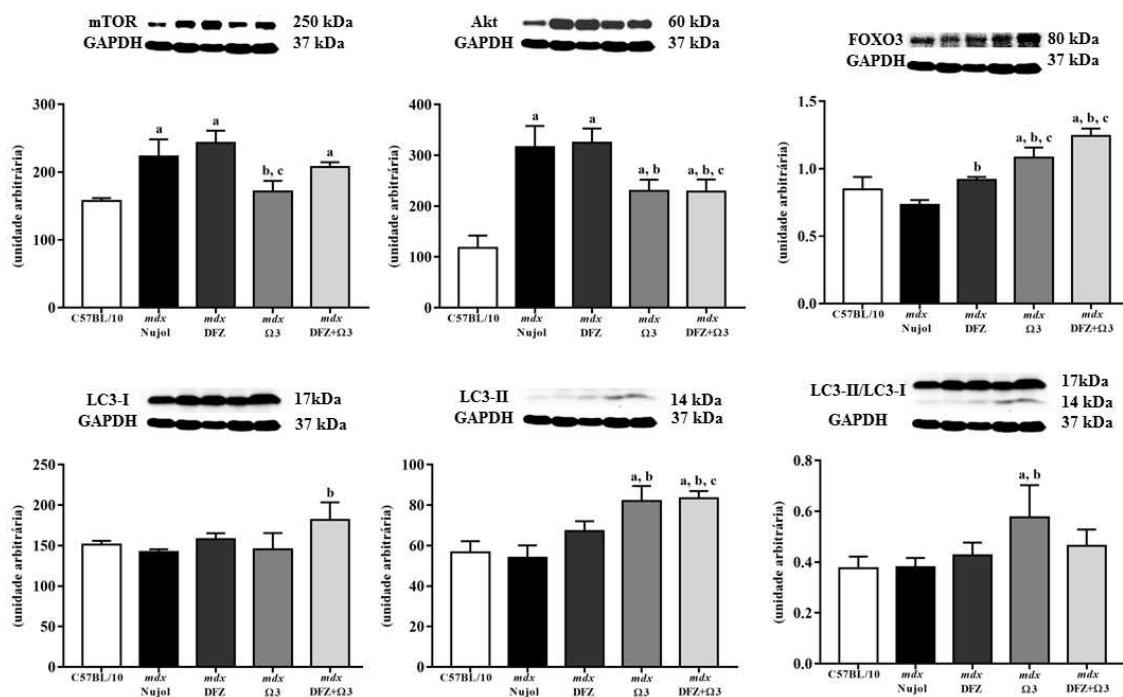


Marcadores da autofagia no músculo bíceps braquial (*western blot*). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+ Ω3 (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Gráfico representando os níveis de mTOR, FOXO3a, Akt e LC 3 normalizados pelo GAPDH. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol, “c” quando comparado com o grupo DFZ, “d” quando comparado com o grupo Ω3. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.1.5.4 Músculo Quadríceps Femoral

O músculo quadríceps femoral dos animais *mdx* apresentou maiores níveis de Akt e mTOR. O $\Omega 3$ aumentou a razão LC 3II/LC 3I (Figura 27).

Figura 27- Marcadores da autofagia no músculo quadríceps femoral



Marcadores da autofagia no músculo quadríceps femoral (*western blot*). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol), *mdx* DFZ (camundongos *mdx* tratados com deflazacorte), *mdx* $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3) e *mdx* DFZ+ $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com a associação de deflazacorte com Ômega 3). Gráfico representando os níveis de mTOR, FOXO3a, Akt e LC 3 normalizados pelo GAPDH. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol, “c” quando comparado com o grupo DFZ, “d” quando comparado com o grupo $\Omega 3$. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Em suma, quando comparamos o animal C57BL/10 com o *mdx*, não percebemos relação entre os níveis dos reguladores negativos (mTOR e Akt) e positivos (FOXO3a e LC3) da autofagia com o fenótipo distrófico dos músculos analisados, conforme ilustra a tabela 3. Ao avaliar o efeito das terapias nos níveis dos marcadores autofágicos, notamos que as terapias, isoladas ou em associação, aumentaram FOXO3a, regulador positivo da autofagia, em todos os músculos analisados. A terapia com $\Omega 3$ foi eficaz na diminuição de mTOR e Akt e no aumento de FOXO3a e razão LC3-II/LC3-I no músculo quadríceps, conforme ilustra a tabela 4

Tabela 3: Comparação entre os animais C57BL10 e *mdx* dos marcadores de autofagia nos músculos estudados. ↑: aumento do marcador no *mdx* comparado ao C57BL/10; ↓: diminuição do marcador no *mdx* comparado ao C57BL/10; = não houve diferença do marcador entre o *mdx* e o C57BL/10.

C57BL/10 x <i>mdx</i>				
Marcadores	Músculos			
	DIA	COR	BB	QDR
mTOR	↓	=	=	↑
Akt	=	↑	=	↑
FOXO3a	=	↑	=	=
LC3	=	=	=	=

Tabela 4: Efeito das terapias nos níveis de marcadores de autofagia (comparação *mdx* não tratado x *mdx* tratado). Terapias indicadas: DFZ/ $\Omega 3$ (terapias isoladas), DFZ+ $\Omega 3$ (terapia combinada). ↑: aumento do marcador pelas terapias; ↓: diminuição do marcador; = não houve efeito das terapias.

TERAPIAS								
Marcadores	Músculos							
	DIA		COR		BB		QDR	
mTOR	↑	DFZ/ $\Omega 3$ DFZ+ $\Omega 3$	↑	$\Omega 3$ DFZ+ $\Omega 3$	↑	DFZ+ $\Omega 3$	↓	$\Omega 3$
Akt	↑	DFZ/ $\Omega 3$	↑	DFZ/ $\Omega 3$ DFZ+ $\Omega 3$	↑	DFZ/ $\Omega 3$	↓	$\Omega 3$ DFZ+ $\Omega 3$
FOXO3a	↑	DFZ/ $\Omega 3$	↑	DFZ/ $\Omega 3$ DFZ+ $\Omega 3$	↑	DFZ/ $\Omega 3$	↑	DFZ/ $\Omega 3$ DFZ+ $\Omega 3$
LC3	=		=		=		↑	$\Omega 3$

5.2 RESULTADOS REFERENTES AO MECANISMO DE AÇÃO DO OMEGA-3

5.2.1 Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação (*western blot*)

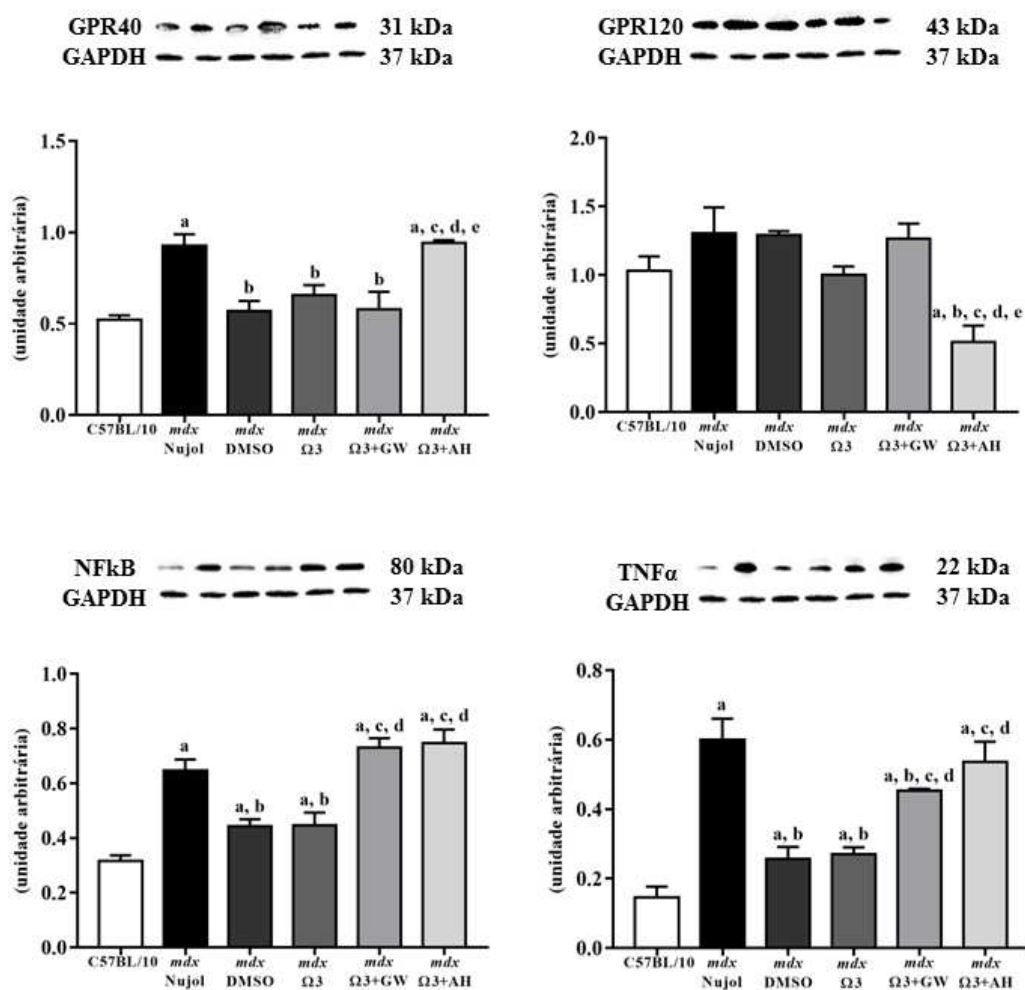
5.2.1.1 Músculo Diafragma

No músculo diafragma foi observado aumento (38,8%) dos níveis do receptor GPR40 no grupo distrófico quando comparado com o grupo C57BL/10. O grupo Ω 3+GW (que recebeu bloqueador específico para o GPR40) apresentou diminuição significativa dos níveis deste receptor, bem como os grupos tratados com DMSO e Ω 3, quando comparados ao grupo distrófico tratado com Nujol (Figura 28).

Não foi observada diferença significativa nos níveis do receptor GPR120 entre os grupos analisados, com exceção do grupo Ω 3+GW, que recebeu bloqueador específico para o GPR120 e apresentou redução significativa quando comparado com os demais grupos (Figura 28).

Quanto aos marcadores da inflamação, observamos aumentos dos níveis de NF-kB (2x) e TNF- α (3,7x) no grupo *mdx* Nujol quando comparados com o grupo C57BL/10 (Figura 28). Os grupos tratados com DMSO e Ω 3 reduziram igualmente os níveis de NF-kB (26%) e TNF- α (50%) quando comparados ao grupo *mdx*. Foi observado aumento significativo dos níveis dos marcadores da inflamação nos grupos que receberam GW e AH associados ao Ω 3, quando comparados aos grupos que receberam DMSO e Ω 3 (Figura 28).

Figura 28- Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação no diafragma



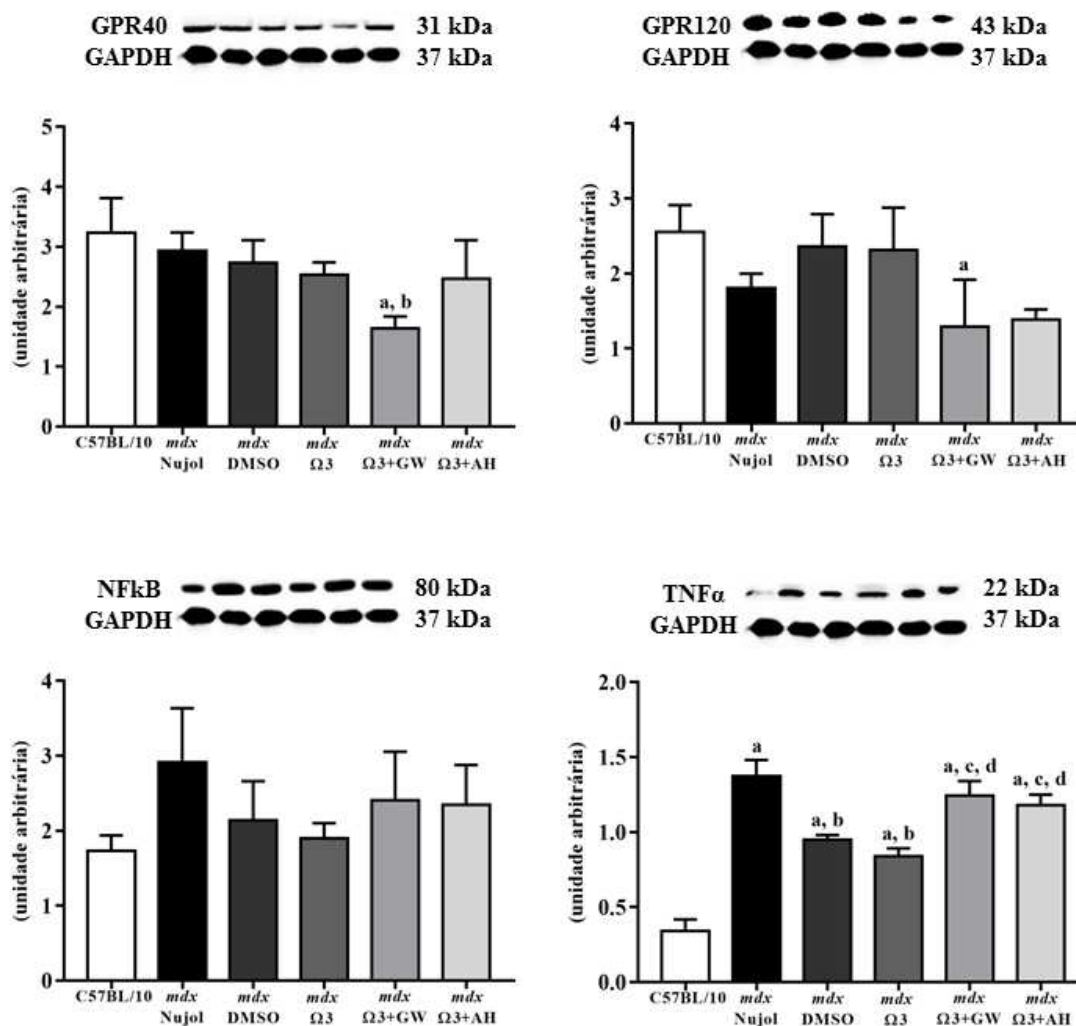
Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação no músculo diafragma (*western blot*). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* Ω3+GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* Ω3+AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Gráfico representando os níveis de GPR40, GPR120, NF-κB e TNF-α normalizados pelo GAPDH. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol, “c” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com DMSO, “d” quando comparado com o grupo Ω3 e “e” quando comparado com o grupo Ω3+GW. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.2.1.2 Coração

No músculo cardíaco não foi observada diferença significativa nos níveis dos receptores GPR40 e GPR120 entre os animais C57BL/10 e *mdx* (Figura 29). O grupo Ω3+GW, que recebeu bloqueador específico para o GPR40, apresentou diminuição significativa deste receptor quando comparado com os grupos controle (43,5%) e distrófico (34,6%) (Figura 11). Este mesmo grupo também apresentou diminuição (50%) dos níveis de GPR120 quando comparado com o grupo C57BL/10 (Figura 29).

Quanto aos marcadores da inflamação, observamos aumentos dos níveis de TNF- α (4,6x) no grupo *mdx* Nujol quando comparados com o grupo C57BL/10. Os níveis de TNF- α reduziram nos grupos tratados com DMSO (37%) e Ω 3 (44%) quando comparados ao grupo *mdx*. Foi observado aumento significativo dos níveis de TNF- α nos grupos Ω 3+GW e Ω 3+AH, quando comparados aos grupos que receberam DMSO e Ω 3 (Figura 29).

Figura 29- Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação no coração



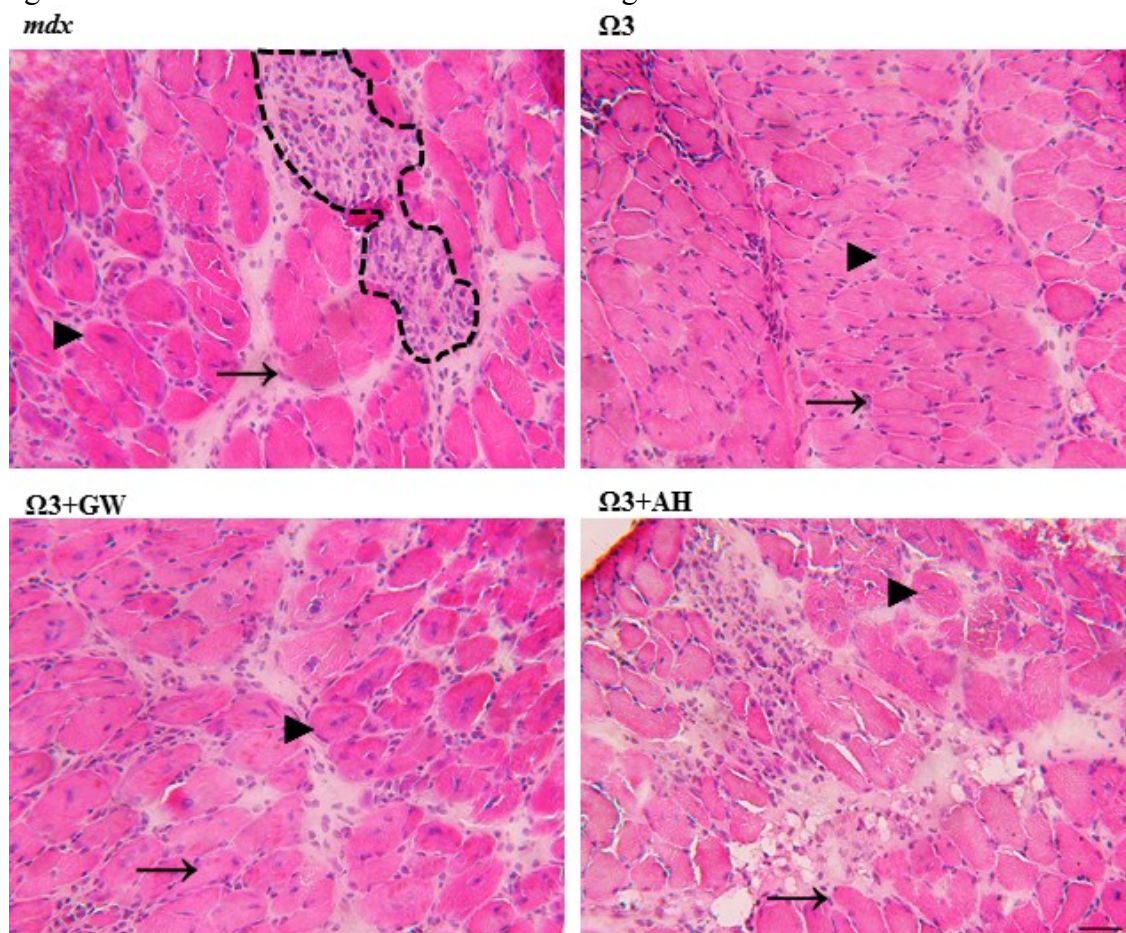
Receptores de ácidos graxos e marcadores da inflamação no coração (*western blot*). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* Ω 3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* Ω 3+GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* Ω 3+AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Gráfico representando os níveis de GPR40, GPR120, NF-kB e TNF- α normalizados pelo GAPDH. Nível de significância indicado pela letra “a” quando comparado com o grupo C57BL10, “b” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com Nujol, “c” quando comparado com o grupo *mdx* tratado com DMSO, “d” quando comparado com o grupo Ω 3 e “e” quando comparado com o grupo Ω 3+GW. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.2.2 Análise morfológica

5.2.2.1 Músculo Diafragma

No músculo diafragma dos grupos distróficos foi possível observar fibras com núcleo periférico e com núcleo central, característica de fibras normais e regeneradas, respectivamente (Figura 30). No grupo *mdx* tratado com Nujol foram observadas área com a celularidade aumentada, indicativo de inflamação (Figura 30). No grupo $\Omega 3$ as fibras musculares apresentaram-se justapostas, enquanto que nos grupos *mdx*, $\Omega 3$ +GW e $\Omega 3$ +AH foi observado um espessamento do perimísio, o que pode indicar o início da deposição de tecido fibroso no músculo diafragma.

Figura 30- Cortes transversais do músculo diafragma

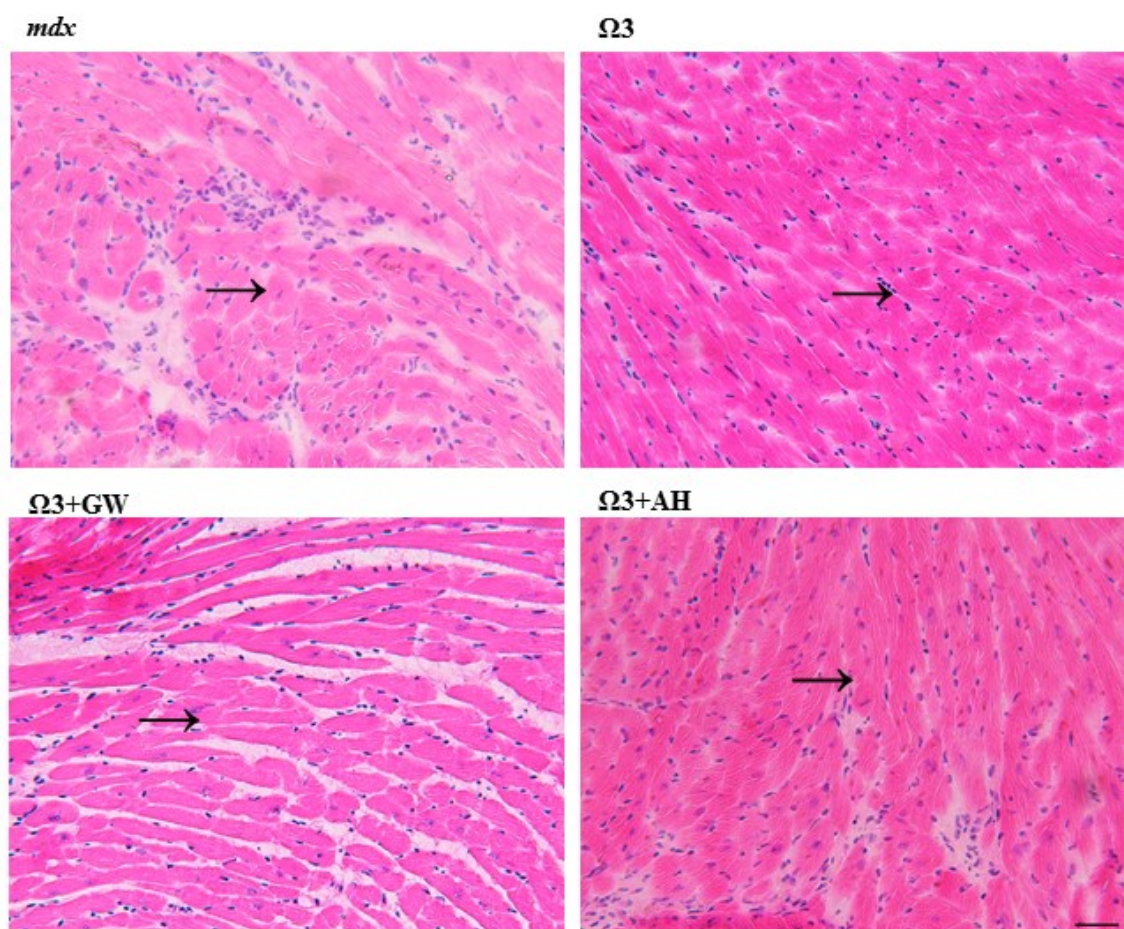


Cortes transversais de músculo diafragma corados com Hematoxilina e Eosina. Indicados: inflamação (área circundada por traços), fibra com núcleo periférico (seta) e fibra com núcleo central (cabeça de seta). Aumento 20X. Escala 100 μ m.

5.2.2.2 Coração

Foram observados cardiomiócitos seccionados transversal e longitudinalmente, característica histológica deste órgão que possui camadas de fibras musculares com essas disposições (Figura 31). Nos grupos *mdx*, $\Omega 3$ +GW e $\Omega 3$ +AH foi observado discreto espaço entre os cardiomiócitos, já no grupo $\Omega 3$ as fibras cardíacas apresentam-se justapostas.

Figura 31- Cortes transversais do coração



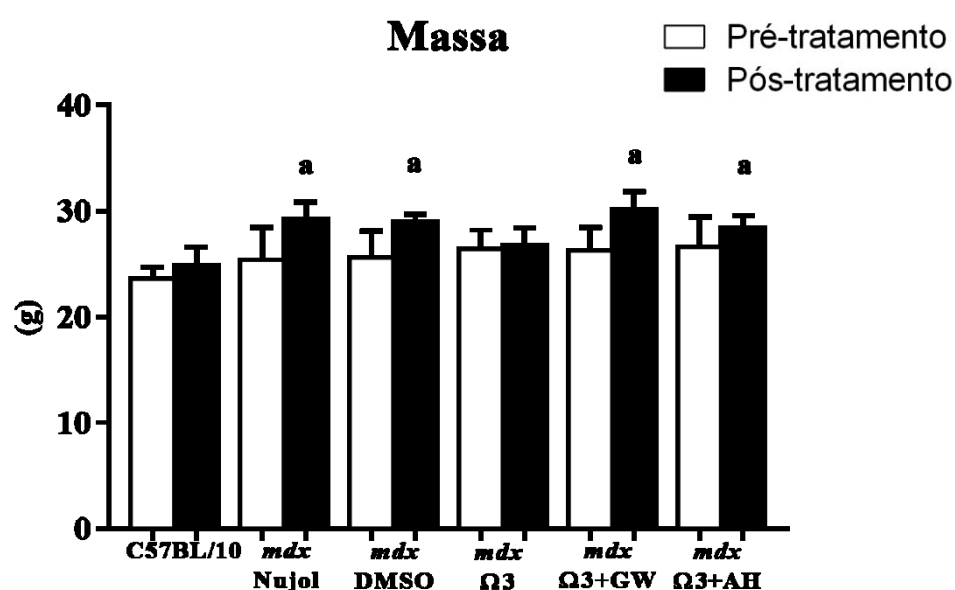
Cortes transversais de corações corados com Hematoxilina e Eosina. Indicados: cardiomiócito (seta). Aumento 20X. Escala 100 μ m.

5.2.3 Resultados complementares ao estudo do mecanismo de ação do ômega 3

5.2.3.1 Massa corporal

Para avaliar o crescimento somático dos animais foi realizada comparação de suas massas corporais antes do início e após o final dos tratamentos (Figura 32). Foi observado aumento significativo da massa nos grupos distróficos tratados com Nujol, DMSO, $\Omega 3$ +GW e $\Omega 3$ +AH quando comparados ao grupo C57BL/10. O grupo distrófico tratado com $\Omega 3$ foi o único que não apresentou ganho significativo de massa.

Figura 32- Média das massas corporais

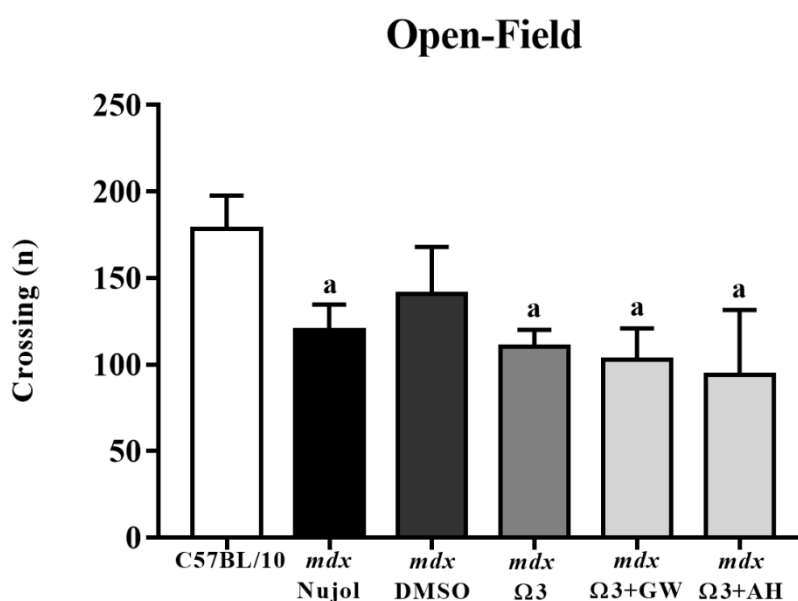


Médias das massas corporais anterior (pré-tratamento) e posteriormente (pós-tratamento) aos tratamentos propostos em cada grupo. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* $\Omega 3$ (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* $\Omega 3$ +GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* $\Omega 3$ +AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Cada coluna representa a média das massas corporais mensuradas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por “a” quando comparado com o grupo controle. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak.

5.2.3.2 Atividade locomotora espontânea

Analisando o número de *crossings* obtidos ao término do tratamento, notou-se que o animal distrófico apresentou redução significativa (32,5%) da atividade quando comparado ao animal C57BL/10. As terapias e os bloqueadores não modificaram esse resultado (Figura 33).

Figura 33- Open Field

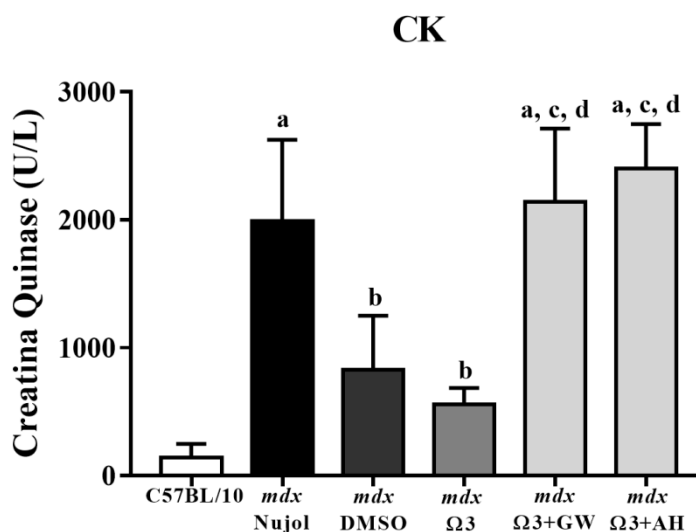


Médias do número de *crossings*. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* Ω3+GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* Ω3+AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Cada coluna representa a média das massas corporais mensuradas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por “a” quando comparado com o grupo controle. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.3.3 Creatina Quinase

Os camundongos *mdx* apresentaram elevação significativa (13,9 vezes de aumento) da CK em relação ao animal normal (C57BL/10). Os grupos tratados com DMSO e Ω3 tiveram uma diminuição significativa de 58,6% e 72,1%, respectivamente, dos níveis de CK quando comparados com o grupo distrófico tratado com nujol. Os grupos foram tratados com os antagonistas, aumentaram em aproximadamente 4 vezes nos níveis de CK, quando comparados ao grupo que recebeu apenas Ω3 (Figura 34).

Figura 34- Creatina Quinase

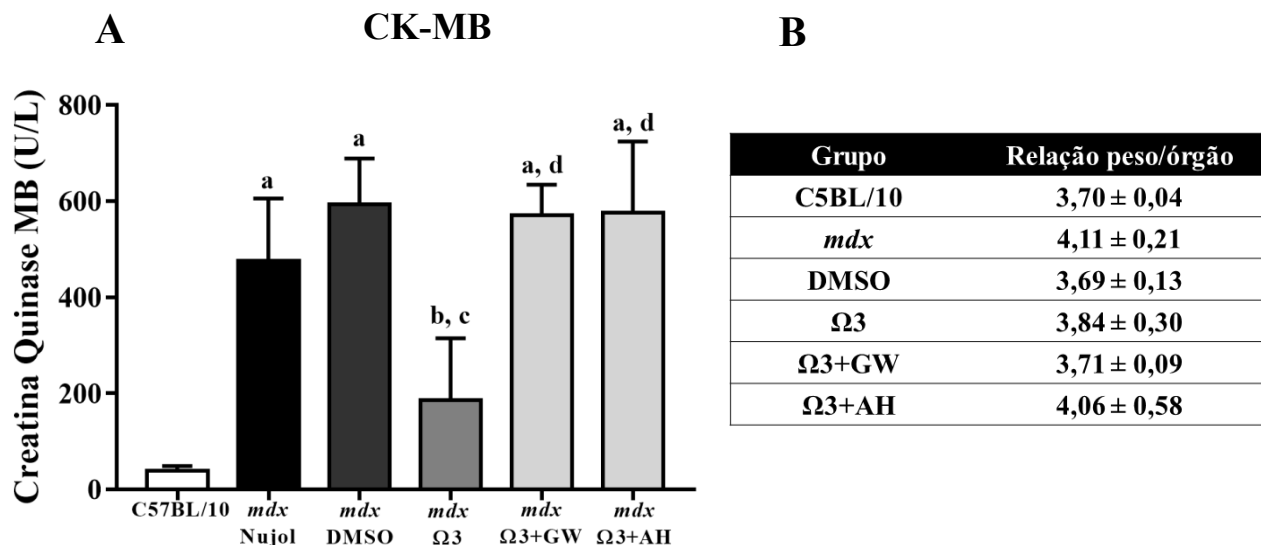


Médias da creatina quinase. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* Ω3+GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* Ω3+AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Cada coluna representa a média das massas corporais mensuradas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por “a” quando comparado com o grupo C57BL/10 e “b” quando comparado com o grupo *mdx*, “c” quando comparado com o grupo DMSO e “d” quando comparado com o grupo Ω3. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.3.4 Creatina quinase cardíaca (CK-MB) e peso relativo do coração

Os camundongos *mdx* apresentaram elevação significativa (12,5 vezes de aumento) da CK-MB em relação ao animal C57BL/10. O Ω3 reduziu de forma significativa (61%) os níveis de CK-MB quando comparados com o grupo distrófico tratado com nujol; este efeito do Ω3 foi inibido pelos bloqueadores de receptores de ácidos graxos (Figura 35A). Não houve diferença significativa no peso relativo do coração entre os grupos (Figura 35B).

Figura 35- Creatina quinase cardíaca e peso relativo do coração

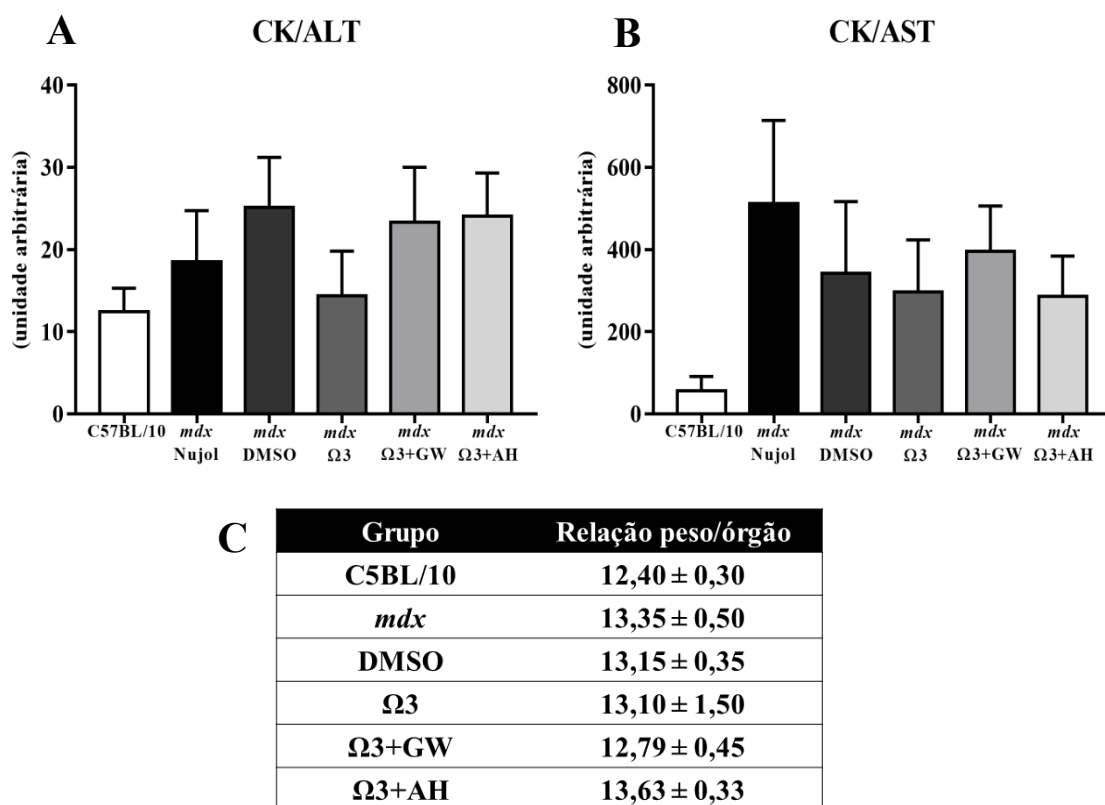


Níveis de CK-MB (A) obtidos após o tratamento e peso relativo do coração (B). Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* Ω3+GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* Ω3+AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Cada coluna representa a média e desvio-padrão das massas corporais mensuradas a partir de 10 animais. Nível de significância indicado por “a” quando comparado com o grupo controle, “b” quando comparado com o grupo *mdx*, “c” quando comparado com o grupo DMSO e “d” quando comparado com o grupo Ω3. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.3.5 Estudos das enzimas hepáticas (Relação CK/ALT e CK/AST)

Os animais distróficos apresentaram discreto aumento, não significativo, da razão CK/ALT e CK/AST em comparação aos animais controles. Os tratamentos, associados ou não aos bloqueadores não alteraram as razões CK/ALT e CK/AST (Figura 36A, B). Não houve diferença significativa no peso relativo do fígado entre os grupos (Figura 36 C).

Figura 36- Enzimas hepáticas e peso relativo do fígado.



Médias das razões CK/ALT e CK/AST e peso relativo do fígado. Grupos: C57BL/10, *mdx* Nujol (camundongos *mdx* tratados com Nujol e salina), *mdx* DMSO (camundongos *mdx* tratados com DMSO e salina), *mdx* Ω3 (camundongos *mdx* tratados com Ômega 3 e salina), *mdx* Ω3+GW (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e GW110) e *mdx* Ω3+AH (camundongos *mdx* tratados com a associação de Ômega 3 e AH7614). Cada coluna representa a média das razões CK/ALT (A) e CK/AST (B) obtidas a partir de 10 animais. Peso relativo do fígado (C). A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

6.1 AUTOFAGIA

A autofagia desempenha papel fundamental na homeostase do tecido muscular. Em níveis elevados contribui para o catabolismo muscular e em níveis baixos provoca degeneração muscular devido ao acúmulo de ERMOS que culminam no aumento do estresse oxidativo (DE PALMA et al., 2014).

Na distrofia muscular, proteínas relacionadas à autofagia, como a LC 3 e Akt, apresentam-se alteradas em músculos de camundongos mdx e de pacientes com DMD (PETER e CROSBIE, 2006; DE PALMA et al., 2012).

A questão inicial deste trabalho foi verificar se músculos distróficos que são afetados em diferentes intensidades pela falta de distrofina apresentariam níveis diferenciados dos marcadores de autofagia, o que poderia explicar, pelo menos em parte, os diferentes fenótipos distróficos.

Quanto a intensidade da distrofinopatia, as análises histopatológicas indicaram que o diafragma, seguido pelo coração, estavam mais afetados do que os músculos apendiculares. O diafragma exibiu intensa fibrose (45% de fibrose) e inflamação discreta. O coração apresentou área de inflamação discreta ou até mesmo inexistente, o que está de acordo com o fato de que alterações morfológicas mais expressivas são observadas tardiamente no músculo cardíaco (KAMDAR e GARY, 2016). Entretanto, os níveis sérios de CK-MB, enzima liberada na corrente sanguínea após a mionecrose de músculo estriado cardíaco, estavam elevados, tal como observado anteriormente (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2016), sugerindo necrose do miocárdio; isto também pode explicar o aumento do peso do coração dos animais distróficos em relação aos controles, aumento este que pode significar fibrose no músculo cardíaco, tal como observado na análise morfológica.

Já os músculos apendiculares, quadríceps e bíceps, estavam morfolologicamente menos afetados que o diafragma e coração, apresentando nesta fase da doença 95% de fibras regeneradas, sem áreas de infiltrado inflamatório ou fibrose. Não obstante, os níveis sérios de CK estavam elevados no *mdx*, sugerindo presença de mionecrose, de acordo com a literatura clássica do mdx (PASTORET e SEBILLE, 1995; SEIXAS et al., 1997; GROUNDS, 2008).

No que tange os marcadores de autofagia, o músculo bíceps braquial distrófico apresentou todos os marcadores estudados em níveis semelhantes aos do animal

controle. Isto sugere que a autofagia se processava normalmente neste músculo, o que pode ser coerente com o fato deste músculo ser o menos afetado neste momento e provavelmente ter atingido um estado de equilíbrio quanto a distrofinopatia. No quadríceps distrófico, que também estava totalmente regenerado, dois marcadores, Akt e mTOR, estavam aumentados em relação ao normal, no momento analisado, de acordo com outros trabalhos, em relação a mTOR (DE PALMA et al., 2012). Estes marcadores são considerados reguladores negativos da autofagia. Já no coração distrófico, Akt e FOXO3a estavam aumentados, sendo FOXO3a um indicador de autofagia ativa. A proteína Akt, inibidora do processo autofágico, apresentou níveis elevados tanto em camundongos mdx durante os picos de inflamação e mionecrose, quanto em pacientes com DMD (PETER e CROSBIE, 2006). Peter e Crosbie (2006) demonstraram que camundongos com distrofia muscular deficiente em sarcoglicanas apresentaram fenótipo com degeneração mais exacerbada e exibiram sinalização de Akt elevada. No entanto, os níveis mais altos de ativação de Akt foram encontrados em camundongos deficientes de distrofina e utrofina, com distrofinopatia muito avançada. Os autores sugerem que a Akt possa servir como um biomarcador precoce da doença (PETER e CROSBIE, 2006). Nossos resultados sugerem que aumentos ou reduções destes marcadores (mTOR, Akt e FOXO3a) nem sempre se correlacionam com melhora ou piora do fenótipo distrófico.

No diafragma distrófico, a maioria dos marcadores autofágicos estudados estava em níveis semelhantes aos dos animais controle: dos quatro marcadores estudados, apenas mTOR estava diminuído. Isto pode sugerir autofagia normal no diafragma distrófico. Entretanto, considerando que o diafragma foi o músculo mais afetado pela distrofia, seria razoável esperar alterações na maioria dos marcadores em relação ao controle; entretanto, apenas mTOR, regulador negativo, estava alterado. Seria possível especular que o diafragma distrófico tenha menor habilidade para adaptar a autofagia à sua condição distrófica, possivelmente devido ao aumento de cálcio neste músculo. A relação do cálcio com a autofagia foi demonstrada recentemente na fibra distrófica: a inibição de receptores IP3, que regulam o influxo de cálcio, normalizou a autofagia em fibras distróficas (VALLADARES et al., 2018). Comparado com os músculos apendiculares, o diafragma tem maiores níveis de canais de cálcio ativados por estiramento (MATSUMURA et al., 2011), tornando-o mais afetado possivelmente por maior influxo de cálcio, em relação aos músculos apendiculares. O presente trabalho permite supor que o maior acometimento do diafragma também pode estar relacionado,

pelo menos em parte, a menor habilidade deste músculo em regular positivamente a autofagia.

Outra forma de avaliar a ativação da autofagia é através da razão entre as proteínas LC 3-II e LC 3-I. Durante a formação do autofagossomo a proteína LC 3-I é clivada e conjugada pela fosfatidiletanolamina transformando-se em LC 3-II. Portanto, o aumento da razão LC-3II/LC-3I indica aumento na formação de vesículas autofágicas (ZHAO et al., 2007). No presente estudo, a razão LC3 não se modificou em nenhum dos músculos distróficos estudados; visto que LC3 sugere autofagia ativa, este resultado sugere que, neste momento da doença a formação de vesículas autofágicas está em níveis semelhantes ao normal.

Em conclusão, reguladores negativos (mTOR e Akt) e positivo (FOXO3a no coração) da autofagia parecem ser mais afetados nesta fase da doença, principalmente no quadríceps e no coração. Na fase estudada, nenhum dos músculos apresentou autofagia ativa, o que seria demonstrado por aumento da LC3. Não foi possível estabelecer uma correlação direta do grau de distrofinopatia com o nível de marcadores autofágicos: o diafragma, músculo mais afetado neste momento, exibiu padrão de marcadores semelhante ao do bíceps, o músculo menos afetado. Isto sugere que outros fatores, tais como regulação do influxo de cálcio, estão envolvidos na modulação da autofagia em diferentes músculos distróficos.

6.2 EFEITOS DAS TERAPIAS NA AUTOFAGIA

De maneira geral, o deflazacorte, o ômega-3 e a associação aumentaram os níveis dos marcadores autofágicos (principalmente mTOR, Akt e FOXO3a), com melhores efeitos do ômega-3 isolado, em todos os músculos estudados. Por exemplo, no quadríceps, o ômega-3 isolado pareceu ativar a autofagia, visto o aumento dos marcadores de autofagia ativa (LC3 e FOXO3a) e a diminuição dos reguladores negativos (mTOR e Akt). Concomitante a estas alterações nos marcadores autofágicos, as terapias promoveram melhoras da distrofinopatia, como verificamos pela redução da CK, de acordo com nossos resultados anteriores (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013; APOLINÁRIO 2015; MARANHÃO et al., 2015), além de melhoras funcionais, redução da inflamação e da mionecrose. Portanto, sugere-se que os efeitos benéficos dos antiinflamatórios também sejam devidos a capacidade destes fármacos em regular a autofagia. O corticoide pode atuar indiretamente, ao diminuir a inflamação. Ressalta-se que há relatos de aumento do fluxo autofágico promovido por corticóides em outros

tecidos, como ossos (SHI et al., 2015; WANG et al, 2015) e cartilagens (LIU et al., 2014).

Já o ômega-3 pode atuar diretamente nas vias autofágicas, uma vez que foi demonstrada relação entre receptores de ácidos graxos livres (GPR120, estudados na segunda parte deste projeto) e a via Akt (MONIRI, 2016). Adicionalmente, demonstrou-se que o EPA restaurou a fosforilação de Akt ativada por peróxido de hidrogênio e induziu a fosforilação da AMPK em cardiomiócitos in vitro, atenuando o estresse oxidativo e ativando um sistema autofágico adaptativo, reforçando a ação direta do $\Omega 3$ no fluxo autofágico (Hsu e colaboradores (2014). O DHA presente no $\Omega 3$ pode incorporar-se ao sarcolema (HISHIKAWA et al, 2017) e garantir a estabilidade ao CDG, o que parece ser importante para a autofagia, uma vez que alterações na interação das distroglicanas e laminina afetam a sinalização de Akt (LANGENBACH e RANDO, 2002).

Desta forma, o ômega-3 pode afetar as vias de autofagia quer pela diminuição da inflamação (CALDER et al., 2008; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013) ou pela incorporação do DHA na membrana, promovendo a estabilidade do sarcolema (HISHIKAWA et al, 2017).

Em conclusão, verificamos que o deflazacorte e o ômega-3, isolado ou em associação ao corticoide, afetam a via autofágica principalmente no que se refere a mTOR e Akt, pelo menos nesta fase da doença e de forma semelhante nos músculos apendiculares, no diafragma e no coração. A regulação da autofagia pelas terapias foi acompanhada de melhoras no fenótipo distrófico, sugerindo que o mecanismo de ação destas terapias também pode envolver as vias autofágicas.

6.3 QUANTO AO ESTUDO DOS RECEPTORES DE ÁCIDOS GRAXOS

Os receptores de ácidos graxos GPR40 e GPR120 bem como ligantes vêm sendo extensamente estudados, principalmente como tratamento para doenças metabólicas, como obesidade, *diabetes mellitus* tipo II e doenças cardiovasculares (CORNALL et al., 2013; BRISCOE et al., 2016; DRAGANO et al., 2017). Uma vez que são receptores específicos para ácidos graxos livres, os ácidos graxos da família do $\Omega 3$ representam agonistas potentes para este receptor (HIRASAWA et al., 2005; OH et al., 2010)

Nossa primeira questão foi verificar os níveis de GPR 40 e GPR 120 no coração e diafragma dos animais C57BL/10 e *mdx*, uma vez que a maioria dos trabalhos encontrados estudam estes receptores no hipotálamo (DRAGANO et al., 2017),

intestino (CHESHMEHKANI et al., 2015; HIDALGO et al., 2017; KATO et al., 2019, MOONWIRIYAKIT et al., 2019) e em adipócitos (EKBERG et al., 2016; MUNKARAH et al., 2016), sendo escassos os estudos no tecido muscular.

Nosso estudo revelou que ambos receptores estão presentes no músculo diafragma e no coração dos animais C57BL/10 e *mdx*. O GPR 40 apresentou níveis mais elevados no diafragma do animal distrófico quando comparado com o animal controle. Já com relação aos níveis do GPR120, não observamos diferenças entre as linhagens. A ação anti-inflamatória bem como o aumento dos níveis de receptores de ácidos graxos mediante tratamento com agonistas específicos já foi demonstrado previamente em outros tecidos, como a próstata (LIU et al., 2015) e o intestino (CHESHMEHKANI et al., 2015). Demonstramos, de forma inédita, que o aumento dos receptores acoplados à proteína G mediante tratamento com agonista ($\Omega 3$) também acontece no músculo distrófico.

Com o objetivo de avaliar a participação destes receptores no mecanismo anti-inflamatório do $\Omega 3$ na distrofia muscular do camundongo *mdx* (MACHADO et al., 2011; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013; CARVALHO et al., 2013; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2016) administramos os antagonistas GW1100 e AH7614, que são bloqueadores específicos do GPR40 e GPR120, respectivamente, concomitante ao tratamento com $\Omega 3$. Foi observada uma diminuição dos níveis de GPR120 no músculo diafragma mediante o bloqueio com AH7614, quando comparado com o grupo que recebeu apenas o agonista ($\Omega 3$). Não observamos alterações nos níveis de GPR40 no diafragma e de ambos receptores no músculo cardíaco mediante o bloqueio.

A preparação de GW1100 e AH7614 envolveu a diluição destes bloqueadores em dimetilsulfóxido (DMSO), conforme indicado pelo fabricante (*Cayman Chemical*). O DMSO é um subproduto da indústria de celulose de madeira e foi usado para uma infinidade de distúrbios médicos com base em uma ampla gama de propriedades farmacológicas pouco estudadas, inicialmente (SOMA et al., 2018). Os efeitos do DMSO são baseados em suas propriedades físico-químicas como baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta solubilidade em soluções aquosas (LOVELOCK e BISHOP, 1959). O uso de DMSO em sistemas biológicos foi explorado em 1964 para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, (ROSENBAUM, HERSCHLER e JACOB, 1965). Não obstante, na atualidade ainda não há consenso acerca do uso do DMSO em tratamentos em que necessitamos de veículo com alta solubilidade, sendo que alguns

autores reforçam cautela para seu uso devido sua toxicidade (PETERSON et al., 2011) e efeito anti-inflamatório (SOMA et al., 2018).

No presente trabalho observamos diminuição da inflamação mediante tratamento com DMSO, representada pela diminuição de NF- κ B no músculo diafragma e de TNF- α em ambos músculos, em comparação com o grupo distrófico, o que vai de encontro com os achados da literatura (SOMA et al., 2018). Todavia, o aumento da inflamação observado nos grupos que receberam GW1100 e AH7614 nos mostra que o DMSO utilizado como veículo para diluição destes bloqueadores, não interferiu na ação destes antagonistas, de forma que o efeito bloqueador se sobrepôs ao efeito anti-inflamatório do DMSO, sugerindo que a dose de DMSO utilizada foi eficaz para a diluição desejada, sem apresentar toxicidade (Figuras 32, 33 e 36).

Nosso grupo já apresentou o efeito anti-inflamatório do Ω 3 através do tratamento com EPA purificado (MACHADO et al., 2011) e com óleo retirado das capsulas de Ω 3, contendo EPA e DHA em animais com 30 dias de vida (CARVALHO et al., 2013; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013), fase onde acontece o primeiro pico de inflamação, e em animais idosos (13 meses de vida) (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2016). O mesmo efeito foi observado no presente trabalho com animais tratados do terceiro ao quarto mês de vida. Até então, a literatura sugere que os mecanismos pelos quais o ômega-3 protege contra a mionecrose sejam decorrentes da ação anti-inflamatória do EPA (CALDER et al., 2008; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013) e da incorporação do DHA na membrana, promovendo a estabilidade do sarcolema (HISHIKAWA et al., 2017). Sabe-se também que o EPA atua na geração de eicosanoides da série ímpar através da via de oxidação COX do AA, que são anti-inflamatórios (CALDER et al., 2008). Todavia ainda não está descrito na literatura de que forma o EPA atua na produção de eicosanoides e prostaglandinas de ação anti-inflamatória e qual o papel dos receptores acoplados à proteína-G neste efeito.

Nossos resultados revelam que os músculos diafragma e coração dos animais *mdx* estão afetados e exibem diferença significativa nos marcadores de inflamação (Figuras 28 e 29) quando comparados aos animais C57BL/10, dados que corroboram com os achados histológicos (Figuras 30 e 31), com a avaliação dos níveis de CK (Figura 34) e CK-MB (Figura 35) e com a literatura (STEDMAN et al., 1991; GROUNDS et al., 2008). Os animais que foram tratados com Ω 3+GW e Ω 3+AH também apresentaram aumento significativo dos níveis de marcadores inflamatórios, quando comparados com os grupos tratados com DMSO e Ω 3, o que nos sugere que os

antagonistas empregados foram eficazes no bloqueio dos receptores GPR40 e GPR120, impedindo a ligação do $\Omega 3$ e, consequentemente, bloqueando o efeito anti-inflamatório.

Embora não tenha sido observado aumento dos níveis dos receptores em todos os tecidos analisados mediante tratamento com agonista, conforme a literatura sugere (CHESHMEHKANI et al., 2015; LIU et al., 2015; KATO et al., 2019, MOONWIRIYAKIT et al., 2019), observamos efeito anti-inflamatório na presença de agonistas, e efeito pró-inflamatório na presença de antagonistas, o que sugere que a presença de agonistas nem sempre promove aumento do número de receptores, da mesma forma que o bloqueio não implica em diminuição dos receptores.

Foi sugerido que a ativação de GPR120 causa a inibição de NF- κ B, através de três principais vias: recrutamento de TAK 1 (TGF- β ativado por quinase 1) via β -arrestina-2; inibição da sinalização de AKT; e síntese de PGE2 dependente de ERK 1/2 inibindo os efeitos inflamatórios modulados por NF- κ B conforme ilustra a Figura 5. Nossos resultados concordam e ilustram o mecanismo descrito por esses autores (MONIRI, 2016). Acreditamos que a ativação de GPR40 atue na inibição de NF- κ B através de mecanismos semelhantes ao da ativação de GPR120, conforme descrito acima (MONIRI, 2016), sendo necessária a investigação de outras vias para confirmação dessa hipótese.

Conforme supracitado, os GPRs atuam na inibição do NF- κ B através de vários mecanismos, dentre eles, a partir na inibição da sinalização de Akt (MONIRI, 2016). Desta forma, sugerimos que, possivelmente, a ativação da autofagia observada nos grupos tratados com $\Omega 3$, na primeira parte do presente trabalho, possa estar relacionada com a ativação dos receptores GPR40 e GPR120, uma vez que a inibição do Akt, além de inibir o NF- κ B (MONIRI, 2016), ativa a autofagia (DE PALMA et al., 2014).

O resultado encontrado após bloqueio do GPR120 foi semelhante ao encontrado após bloqueio do GPR40. Isto sugere que ambos receptores participam igualmente na ação do $\Omega 3$ na fibra muscular distrófica e que fármacos que atuem nos dois receptores podem ser potencialmente úteis para a terapia da distrofia muscular.

6.4 QUANTO AOS EFEITOS DAS TERAPIAS NA PROGRESSÃO DA DOENÇA

6.4.1 Massa corporal e medida de força

Conforme o esperado, os resultados parciais revelam que tanto o grupo C57BL/10 como o grupo *mdx* apresentaram aumento significativo da massa corporal, uma vez que a medida basal foi realizada com 3 meses de idade e a medida final aos 8 meses, período o qual o animal desenvolve-se e atinge a maturidade, apresentando maior massa corpórea. Nos animais tratados, não se observou tal aumento de peso do início do tratamento para o final. Não obstante, o peso final não foi diferente entre os grupos, sugerindo que os animais atingiram peso compatível com sua idade, o que está de acordo com nossos estudos anteriores, em que o tratamento com cápsulas de ômega-3 (FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2013) ou EPA purificado (MACHADO et al., 2011; DE CARVALHO et al., 2013) ou deflazacorte (APOLINÁRIO et al., 2015) não interferiu no peso dos animais distróficos. Desta forma, sugere-se que o tratamento por 5 meses com DFZ, ômega-3 e a combinação não interfere no peso dos animais distróficos (3º-8º meses de vida).

A avaliação da força dos membros anteriores realizado com o aparelho de medida de força horizontal (*Gripstrength*) revelou que o camundongo distrófico apresentou diminuição significativa da força em ambas as idades quando comparado com o grupo C57BL/10. Não foi observada diminuição significativa da força do animal distrófico durante o período de tratamento, dados que concordam com estudos prévios apresentado pelo grupo (APOLINÁRIO et al., 2015; FOGAGNOLO MAURÍCIO et al., 2016) que mostram que a força é menor em animais distróficos quando comparados com animais controle. A perda da força muscular na DMD é causada pela perda progressiva da capacidade regenerativa das fibras musculares, com substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo fibroso, que não possui função contrátil (PASTORET e SEBILLE, 1995; RADLEY e GROUNDS, 2006). Foi observado uma tendência ao aumento da força nos membros anteriores ao final do tratamento em todos os grupos analisados, porém, não foram significativos. Ao final do tratamento, o grupo tratado com ômega-3, embora não tenha apresentado diferença quando comparado ao início do tratamento, não foi diferente estatisticamente do grupo C57BL/10, o que pode sugerir uma melhora da força. Já foi relatado que a suplementação com óleo de peixe contendo EPA melhora a força muscular em humanos (RODAKCI et al., 2012).

6.4.2 Motricidade e coordenação motora

Outros dois testes de força e função muscular revelaram resultados congruentes à medida de força dos membros anteriores. O animal *mdx* apresentou diminuição significativa do impulso antes do início e após o final do tratamento quando comparado com o animal C57BL/10 nos testes de retenção de quatro membros e suspensão em fio metálico. Neste último, o animal distrófico apresentou também diminuição significativa ao final do tratamento quando comparado ao impulso aos 3 meses de vida. Tais resultados concordam com os achados de Aartsma-Rus e van Putten (2014). Devemos considerar que os resultados de cada um desses testes são gerados pela ativação de grupos musculares diferentes ou parcialmente sobrepostos, ao invés de um músculo individual (AARTSMA-RUS e PUTTEN, 2014). Portanto, usando uma combinação de vários testes conseguimos ter uma avaliação funcional muscular ampla.

O teste do campo aberto (*Open Field Test*) é amplamente utilizado para verificação comportamental ao efeito de drogas. Foi observada uma diminuição significativa na atividade locomotora espontânea dos animais distróficos quando comparados com os animais C57BL/10, dados que concordam com resultados já apresentados na literatura com o mesmo modelo experimental (MANNING et al., 2014; SONG et al., 2017). Esses resultados podem ser associados ao comportamento pouco exploratório do camundongo *mdx* mediante novos ambientes, chamado de “freeze”, ou seja, o “congelamento” do sentido de se manter estático, sem atividade exploratória (YAMAMOTO et al., 2010). Não sabemos exatamente o motivo deste padrão comportamental do camundongo distrófico, entretanto, como a distrofina está presente no tecido nervoso (ANDERSON et al., 2002), acreditamos que sua ausência na distrofinopatia possa alterar o comportamento do camundongo através de mecanismo que precisam ser elucidados. A monoterapia com ômega-3 e a associação dos fármacos melhorou significativamente a atividade exploratória dos camundongos distróficos. Isto pode ser devido a preservação da função muscular. Um estudo demonstrou que o camundongo *mdx*: utr-Tg, que expressa utrofina, se comporta tão bem quanto os animais do tipo selvagem, indicando que melhoras comportamentais nos camundongos *mdx* podem ser devidas a melhora na função muscular (GIBBS e CROSBIE-WATSON, 2017).

Diferentemente dos testes supracitados que avaliam respectivamente, força e função musculares e comportamento, o teste de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod test*) avalia principalmente coordenação motora. De acordo com Pinto e Ko

(2012) as quedas mais rápidas com tempo de latência menor se associam a alterações no equilíbrio e coordenação motora e não a fadiga muscular (BROOKS e DUNNETT, 2009; PINTO e KO, 2012). Os nossos resultados não mostraram alterações significativas entre os grupos nas idades avaliadas, o que reflete não comprometimento da coordenação motora dos animais. Todavia, foi notório o aumento da latência de queda no grupo tratado com DFZ+Ω3, ao final do tratamento, o que pode sugerir que a associação dos fármacos apresentou um efeito sinérgico que resultou no aumento da coordenação motora.

Padrões de resultados “positivos” ou “negativos” em um teste funcional (por exemplo, teste de retenção em quatro patas, que avalia a função muscular) não necessariamente têm que ocorrer com melhorias em outro teste (medida de força dos membros anteriores, que avalia a força muscular de um grupo muscular específico). Em camundongos *mdx*, melhorias na função muscular podem ser distinguidas mais cedo do que na força muscular (AARTSMA-RUS e PUTTEN, 2014).

6.4.3 Função cardiorrespiratória

O consumo de oxigênio (VO₂) é a capacidade do aparelho cardiorrespiratório de fornecer O₂ ao músculo em atividade e a capacidade do músculo em usar O₂ durante a locomoção ou exercício (POOLE e JONES, 2017). O VO₂ é um importante parâmetro de saúde por estar relacionado com doenças cardiovasculares (BLAIR et al., 1989; WEI et al., 1999). Rocco e colaboradores (2014) demonstraram que o camundongo *mdx* exercitado em esteira apresentou diminuição significativa no VO₂ e VCO₂ quando comparados com animais C57BL/10 (ROCCO et al., 2014). Nossos resultados demonstram que os animais distróficos com oito meses de idade, embora não apresentem diferença dos animais controle da mesma idade, apresentam diminuição significativa no consumo máximo de oxigênio e dióxido de carbono quando comparados ao período pré-tratamento (3 meses), o que pode sugerir um início de comprometimento cardiorrespiratório neste período, medido por meio dos referidos parâmetros, dados que corroboram com a análise histológica do diafragma, principal músculo da respiração, onde abundante quadro fibrótico foi observado.

O início do acometimento do músculo cardíaco nos camundongos *mdx* ocorre por volta dos sete meses de idade (QUINLAN et al., 2004; TANIGUTI et al., 2011), sendo caracterizado pela presença de tecido fibroadiposo. O acúmulo de fibrose é progressivo, sendo que o ápice da formação do colágeno no coração de camundongos

mdx se dá aos 15 meses (VAN ERP et al., 2010). Aos 8 meses de idade os animais distróficos apresentaram fibrose cardíaca significativa, entretanto, neste período, não foi observada alteração significativa do VO₂ e VCO₂ e, conseqüentemente, a razão entre estes parâmetros (QR) também não foi alterada. Acreditamos que alterações significativas no VO₂ e VCO₂ comparadas ao grupo controle provavelmente seriam detectados mais tardiamente, com a progressão da doença.

6.4.4 Estudo das enzimas hepáticas

As enzimas ALT (Alanina Transaminase) e AST (Aspartato Transaminase) estão relacionadas com lesão de hepatócito e do músculo (GIANNINI et al., 2005; ARAGON et al., 2010; MCMILLAN et al., 2011). A ALT, mais conhecida clinicamente como transaminase glutâmico pirúvica (TGP) como é encontrada em músculo esquelético, embora sua atividade neste tecido seja de apenas um décimo do que a relacionada com os hepatócitos, portanto é fortemente utilizada como biomarcador hepático (WROBLEWSKI, 1959). A AST sérica, conhecida também como transaminase glutâmico oxalacética (TGO) é um indicador menos específico de lesão hepática (KANG et al., 2013), sendo encontrada nos músculos cardíaco e esquelético, rim, cérebro, pâncreas, pulmão, leucócitos e eritrócitos (PRATT et al., 2000).

Como biomarcador para lesão hepática, a correlação entre CK e aminotransferases é a mais utilizada em camundongos distróficos e pacientes com distrofinopatia (MCMILLAN et al., 2011; MATHUR et al., 2014; WANG et al., 2018).

Wang e colaboradores (2018) mostraram que a proporção de CK/ALT e CK/AST é elevada em animais distróficos (WANG et al., 2018), assim como observado nos anim presente estudo. Adicionalmente, sabe-se que em camundongos *mdx* com lesão hepática (*mdx* D-GalN) a razão entre CK/ALT é significativamente reduzida, enquanto que para CK/AST esta redução é moderada (WANG et al., 2018). Os autores apontam ainda que a razão CK/AST não apresenta relação específica com dano hepático, sendo mais utlizada para análise de lesão muscular, enquanto que a razão CK/ALT é a mais indicada para avaliação hepática. Portanto, os animais distróficos com 8 meses de idade apresentam lesão muscular, mas não hepática.

Em relação aos tratamentos, a razão CK/ALT não foi alterada, ou seja, as terapias não interferiram nos hepatócitos. A razão CK/AST, mais estudada nos músculos cardíaco e esquelético (PRATT et al., 2000), chegou a valores semelhantes

aos dos animais controles. Assim, os tratamentos não têm relação com a lesão hepática (CK/ALT) e foram eficientes em reduzir a lesão muscular (CK/AST).

7 CONCLUSÕES

7.1 AUTOFAGIA

Não observamos relação do grau de distrofinopatia com o nível de marcadores autofágicos: o diafragma, músculo mais afetado neste momento, exibiu padrão de marcadores semelhante ao do bíceps, o músculo menos afetado. Isto sugere que outros fatores, tais como regulação do influxo de cálcio, estão envolvidos na modulação da autofagia em diferentes músculos distróficos.

O deflazacorte e o ômega-3, isolado ou em associação ao corticoide, regularam a via autofágica principalmente no que se refere ao mTOR e Akt, pelo menos nesta fase da doença e de forma semelhante nos músculos apendiculares, no diafragma e no coração.

A modulação da autofagia pelas terapias foi acompanhada de melhoras no fenótipo distrófico, sugerindo que o mecanismo de ação destas terapias também pode envolver as vias autofágicas.

7.2 MECANISMO DE AÇÃO DO ÔMEGA-3

Verificamos que a falta de distrofina não afetou os níveis dos receptores de ácidos graxos, sugerindo que estes receptores não fazem parte direta do CDG, tanto no músculo diafragma quanto no coração distrófico.

De maneira geral, a terapia com ômega-3 não afetou os níveis dos receptores de ácidos graxos. O uso de bloqueadores específicos destes receptores impediu os efeitos anti-inflamatórios do ômega-3, sugerindo que o ômega-3, na fibra muscular distrófica, exerce seus efeitos através destes receptores.

Estes resultados permitem sugerir que fármacos sintéticos que atuam sobre os receptores GPR40 e GPR120, atualmente em testes clínicos para doenças metabólicas humanas, podem ser relevantes como terapia alternativa potencial à DMD, merecendo estudos pré-clínicos e clínicos.

7.3 COMPLEMENTARES

Utilizando protocolos pré-clínicos padronizados para análise funcional (standard operating procedures), demonstramos benefícios das terapias apenas com os testes de *open field* (todas terapias) e *rotarod* (apenas com a terapia combinada), concomitante com benefícios morfológicos e moleculares (diminuição da CK). Isto sugere que estes

testes são os mais sensíveis para detectar efeitos de terapias, nesta fase da doença, em camundongos que não foram submetidos a exercício físico para intensificar a distrofinopatia.

A análise toxicológica inicial, considerando dados qualitativos do fígado e das enzimas hepáticas, reforça o potencial clínico do ômega-3, bem como de sua combinação com o corticoide deflazacorte, na terapia da distrofia muscular, ressaltando-se que dados experimentais tenham que ser utilizados com cuidado na transposição para estudos em humanos com Distrofia Muscular de Duchenne.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTSMA-RUS, A., e VAN PUTTEN, M. Assessing functional performance in the mdx mouse model. **J Vis Exp.** v. 85, 2014.
- ABUTALEB, A.R.A., MCNALLY, E.M., KHAN, S.S., ANDERSON, A.S., CARR, J.C., WILCOX, J.E. Myocarditis in Duchenne Muscular Dystrophy After Changing Steroids. **JAMA Cardiol.**, v. 3, p. 1006-1010, 2018.
- ADKIN, C.F.; MELONI, P.L.; FLETCHER, S.; ADAMS, A.M.; MUNTONI, F.; WONG, B.; WILTON, S.D. Multiple exon skipping strategies to by-pass dystrophin mutations. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, p. 297–305, 2012.
- ANDERSON, J.L.; HEAD, S.I.; RAE, C.; MORLEY, J.W. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. **Brain**. v.125, p. 4-13, 2002.
- ANGELINI, C.; PEGORARO, E.; TURELLA, E.; INTINO, M.T.; PINI, A.; COSTA, C. Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. **Muscle e Nerve**, v. 17, n. 4, p. 386-391, 1994.
- ANGELINI, C.; PETERLE, E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v.31, n. 1, p. 9-15, 2012.
- ARAGON G. AND.YOUNOSSI Z. M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 77: 195– 204, 2010.
- ARCHER, J.D.; VARGAS, C.C.; ANDERSON, J.E. Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. **FASEB Journal**, v. 20, n. 6, p. 738-740, 2006.
- APOLINÁRIO, L.M.; CARVALHO, S.C.; SANTO-NETO, H.; MARQUES, M.J. Long-Term Therapy With Omega-3 Ameliorates Myonecrosis and Benefits Skeletal Muscle Regeneration in Mdx Mice. The **Anatomical Record**, v. 298, p. 1589–1596, 2015.
- AWAN, M. U.; DENG, Y. Role of autophagy and its significance in cellular homeostasis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 5319–5328, 2014.
- BABCOCK T.A.; HELTON W. S; HONG D. AND JOSEPH ESPAT N. Omega-3 Fatty Acid Lipid Emulsion Reduces LPS-Stimulated Macrophage TNF-alpha Production. **Mary Ann Liebert, Inc**, v. 3, n. 2, 2002.
- BABCOCK, T.; HELTON, W. S.; JOSEPH, E. N. Eicosapentaenoic Acid (EPA): An Antiinflammatory Omega-3 Fat With Potential Clinical Applications. **Nutrition**, v.16, p.1116-1118, 2000.
- BARROS-MARANHÃO, J.; DE OLIVEIRA MOREIRA, D.; FOGAGNOLO-MAURÍCIO, A.; CARVALHO, S.C.; FERRETTI, R.; PEREIRA, J.A.; SANTO-NETO, H.; MARQUES, M.J. Changes in calsequestrin, TNF- α , TGF- β and MyoD levels during the progression of skeletal muscle dystrophy in mdx mice: a comparative analysis of the quadriceps, diaphragm and intrinsic laryngeal muscles. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 96, n.5, p.285-293, 2015.
- BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERI, P.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MORANDI, L.; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor- β 1

in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 1137-1144, 1995.

BEYTÍA, M. L.; VRY, J.; KIRSCHNER, J. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. **Acta Myologica**, v. 31, n. 1, p.4-8, 2012.

BIGGAR, W.D.; GINGRAS, M.; FEHLINGS, D.L.; HARRIS, V.A.; STEELE, C.A. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pediatrics**, v. 38, p. 45–50, 2001.

BLAU, H.M.; WEBSTER, C.; PAVLATH, G.K. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 80, p. 4856–4860, 1983.

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**, v. 82, n. 2, p.102-115, 2004.

BONIFATI, D.M.; RUZZA, G. BONOMETTO, P. A multicenter double-blind randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle e Nerve**, v. 23, p. 1344-1347, 2000.

BRADFORD, M. M.A rapid and sensitive method for quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analls of Biochemistry**, v.7, n.72, p.248-54, 1976

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J. P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 675–682, 2004.

BRISCOE, C.P.; PEAT, A.J.; MCKEOWN, S.C.; CORBETT, D.F.; GOETZ, A.S.; LITTLETON, T.R.; MCCOY, D.C.; KENAKIN, T.P.; ANDREWS, J.L.; AMMALA, C.; FORNWALD, J.A.; IGNAR, D.M.; JENKINSON, S. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 619–628, 2006.

BROOKS, S.P.; DUNNETT, S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 7, p.519-29, 2009.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K. X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Molecular Nutrition e Food Research**, v. 52, p. 885–897, 2008.

CAMPBELL, K.P.; KAHL, S.D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. **Nature**, v. 338, p. 259–262, 1989.

CARVALHO, S.C.; APOLINÁRIO, L.M.; MATHEUS, S.M.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. EPA protects against muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by promoting a shift from the M1 to M2 macrophage phenotype. **Journal of Neuroimmunology**, n.15, v. 264, p. 41-47. 2013.

CHEN, Y.W.; NAGARAJU, K.; BAKAY, M.; MCINTYRE, O.; RAWAT, R.; SHI, R.; HOFFMAN, E.P. Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, p. 826-834, 2005.

CHESHMEHKANI, A.; SENATOROV, I.S.; KANDI, P.; SINGH, M.; BRITT, A.; HAYSLETT, R.; MONIRI, N.H. Fish oil and flax seed oil supplemented diets increase FFAR4 expression in the rat colon. **Inflammation Research**. v. 64, p.809–815, 2015.

CONTRERAS, O.; REBOLLEDO, D.L.; OYARZÚN, J.E.; OLGUÍN, H.C.; BRANDAN, E. Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. **Cell and Tissue Research**. v. 364, p.647–660, 2016.

CORNALL, L.M.; MATHAI, M.L.; HRYCIW, D.H.; MCAINCH, A.J. GPR120 agonism as a countermeasure against metabolic diseases. **Drug Discovery Today**. v. 19, n. 5, 2013.

DE PALMA, C.; MORISI, F.; CHELI, S.; PAMBIANCO, S.; CAPPELLO, V.; VEZZOLI, M.; QUERINI, R.; MOGGIO, M.; RIPOLONE, M.; FRANCOLINI, M.; SANDRI, M.; CLEMENTI, E. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. **Cell Death and Disease**. v. 3, e. 418, 2012.

DE PALMA, C.; PERROTTA, C.; PELLEGRINO, P.; CLEMENTI, E.; CERVIA, D. Skeletal muscle homeostasis in Duchenne muscular dystrophy: modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, article 188, 2014.

DRACHMAN, D.B.; TOYKA, K.V.; MYER, E. Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **The Lancet**, v. 14, n. 2, p. 1409-1412, 1974.

DRAGANO, N. R. V.; SOLON, C.; RAMALHO, A. F.; DE MOURA, R. F.; RAZOLLI, D. S.; CHRISTIANSEN, E.; VELLOSO, L. A. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, p. 1-16, 2017.

EKBERG, J.H.; HAUGE, M.; KRISTENSEN, L.V.; et al. GPR119, a Major Enteroendocrine Sensor of Dietary Triglyceride Metabolites Coacting in Synergy With FFA1 (GPR40). **Endocrinology**, v. 157, p. 4561-4569, 2016.

ENGEL, A. G. Muscular Dystrophies. In: Engel A. G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology: basic and clinical**. Ed. 3, v.2, p.961-1012, 2004.

FERRETTI, R.; PERTILLE, A.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J. Age-related changes in dystrophin-glycoprotein complex and in utrophin are not correlated with intrinsic laryngeal muscles protection in mdx mouse. **Muscle & Nerve**, v. 44, p. 978-980, 2011.

FOGAGNOLO MAURÍCIO, A.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 636-642, 2013.

FOGAGNOLO MAURICIO A, PEREIRA JA, SANTO NETO H, MARQUES MJ. Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice hearts at later stages of dystrophy. **Nutrition**, v.32, p. 855-862, 2016.

FREITAS, R.D.S.; CAMPOS, M.M. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. **Nutrients**, v.11, 2019.

FINSTERER J, CRIPE L. Treatment of dystrophin cardiomyopathies. **Nat. Ver. Cardiol.**, v. 11, p. 168–79, 2014.

GANLEY, I. G.; LAMDU, H.; WANG, J.; DING, X.; CHEN, S.; JIANG, X. ULK1. ATG13. FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol.Chem.* 284, 12297–12305, 2009.

GIANNINI E. G., R. TESTA, AND V. SAVARINO, Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, 172:367–379, 2005.

GIBBS, E. M., CROSBIE-WATSON, R. H. A Simple and Low-cost Assay for Measuring Ambulation in Mouse Models of Muscular Dystrophy. *J Vis Exp*, v 29, 2017.

GIORGIO, S. Autofagia celular em processos patológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. Londrina, v. 35, n. 1, p. 125-136, 2014.

GROUND M.; RADLEY H.; LYNCH G.; NAGARAJU K.; LUCA A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease*, v. 19, 2008.

GOSSELIN, L.E., WILLIAMS, J.E., PERSONIUS, K., FARKAS, G.A. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (mdx) mice: impact of pirfenidone. *Muscle Nerve*. 35:208 –216, 2007.

GURA, K.M., CALKINS, K.L., PUDER, M. Use of Fish Oil Intravenous Lipid Emulsions as Monotherapy in the Pediatric Intestinal Failure Patient: Beyond the Package Insert. *Nutr Clin Pract*, 2019.

HARPER, C.R., EDWARDS,M.J., DEFILIPIS, A.P., JACOBSON, T.A. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 83–87, 2006.

HIDALGO, J.; TEUBER, S.; MORERA, F.J.; et al. Delphinidin Reduces Glucose Uptake in Mice Jejunal Tissue and Human Intestinal Cells Lines through FFA1/GPR40. *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, 2017.

HINDI, S. M.; SATO, S.; CHOI, Y.; KUMAR, A. Distinct roles of TRAF6 at early and late stages of muscle pathology in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, v. 23, p. 1492–1505, 2014.

HIRASAWA, A; TSUMAYA, K.; AWAJI, T.; KATSUMA, S.; ADACHI, T.; YAMADA, M.; SUGIMOTO, Y.; MIYAZAKI, S.; TSUJIMOTO, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*. v.11, p. 90–94, 2005.

HISHIKAWA, D.; VALENTINE, W.J.; HISHIKAWA, Y. I.; SHINDOU, H.; SHIMIZU, T. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Letters*. v. 591, p. 2730–2744, 2017.

HOFFMAN E.P.; BROWN R.H.; KUNKEL L.M.Dystrophin: The protein product of Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, v. 51, 1987.

HOFFMAN E.P. Pharmacotherapy of Duchenne Muscular Dystrophy. **Handb. Exp. Pharmacol.** 2019

HOLLINGER, K.; GARDAN-SALMON, D.; SANTANA, C.; RICE, D.; SNELLA, E.; SELSBY, J. T. Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 alpha involves restored expression of dystrophin-

associated protein complex components and satellite cell signaling. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 305, 2013.

HOSOKAWA, N.; HARA, T.; KAIZUKA, T. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-ATG13- FIP200 complex required for autophagy. **Mol. Biol. Cell**, v. 20, p. 1981–1991, 2009.

HOUE, S.; FILIATRAULT, M.; FOURNIER, A.; DUBÉ, J.; D'ARCY, S.; BÉRUBÉ, D., BROUSSEAU, Y.; LAPIERRE, G.; VANASSE, M. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. **Pediatric Neurology**, v.38, n. 3, p. 200-206, 2008.

HSU, H.C.; CHEN, C.Y.; CHIANG, C.H.; CHEN, M.F. Eicosapentaenoic acid attenuated oxidative stress-induced cardiomyoblast apoptosis by activating adaptive autophagy. **European Journal of Nutrition**, v. 53, p. 541–547, 2014.

HUANG, J.; MANNING, B. D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. **Biochem.Soc.Trans**, v. 37, p. 217–222, 2009.

HURLEY, J. H.; SCHULMAN, B. A. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. **Cell**, v. 157, p. 300–311, 2014.

ICHIM, T.E., ALEXANDRESCU, D.T., SOLANO, F., LARA, F., CAMPION, R. DE N, PARIS, E., WOODS, E.J., MURPHY, M.P., DASANU, C.A., PATEL, A.N., MARLEAU, A.M., LEAL, A., RIORDAN, N. H. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cell Immunol**, v. 260, p. 75-82, 2010.

ITAKURA, E.; KISHI, C.; INOUE, K.; MIZUSHIMA, N. Beclin1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian ATG14 and UVRAG. **Mol.Biol.Cell**, 19, 5360–5372, 2008.

JAMES, M.J., GIBSON, R.A., CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 343–348, 2000.

JUDÈ, S.; ROGER, S.; MARTEL, E.; BESSON, P.; RICHARD, S.; BOUGNOUX, P. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. **Progress in Biophysics e Molecular Biology**, v. 90, p. 299-325, 2006.

JUNG, C. H.; RO, S. H.; CAO, J.; OTTO, N. M.; KIM, D. H. mTOR regulation of autophagy. **FEBS Lett**, v. 584, p.1287–1295, 2010.

KABEYA, Y.; MIZUSHIMA, N.; UENO, T. et al. LC 3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J**, v.19, p.5720–5728, 2000.

KAMDAR, F.; GARY, D.J. Dystrophin-deficient cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, p. 2533- 2546, 2016.

KATO, S.; UTSUMI, D.; MATSUMOTO, K. G protein-coupled receptor 40 activation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via the upregulation of glucagon-like peptide-2. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 140, p., 144-152, 2019.

KERKIS, I., AMBROSIO, C.E., KERKIS, A., MARTINS, D.S., ZUCCONI, E., FONSECA, S.A., CABRAL, R.M., MARANDUBA, C.M., GAIAD, T.P., MORINI, A.C., VIEIRA, N.M., BROLIO, M.P., SANT'ANNA, O.A., MIGLINO, M.A., ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp

stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, v. 3, 2008.

KH, J.K., KH, S.K., AFSHARI, A., REZAYI, M., GHAYOUR-MOBARHAN, M. Dietary fatty acids-effects on cardiovascular disease. **Mini Rev Med Chem**. 2019.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat. Cell. Biol**, v. 13, p. 132–141, 2011.

KOENIG, M.; HOFMANN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MONACO, A.P.; FEENER, C.; KUNKEL, L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**. v. 50, p. 509–517, 1987.

KOSKELA, A.; REINISALO, M.; PETROVSKI, G.; SINHA, D.; OLMIERE, C.; KARJALAINEN, R.; KAARNIRANTA, K. Nutraceutical with Resveratrol and Omega-3 Fatty Acids Induces Autophagy in ARPE-19 Cells. **Nutrients**. v. 8, p. 284, 2016.

KYSELOVA, V.; PEKNICOVA, J.; BUCKIOVA, D.; BOUBELIK, M. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. **Reprod Biol Endocrinol**. v. 1, 2003.

LANGENBACH, K. J., RANDO, T. A. Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. **Muscle Nerve**. v. 26, p. 644–653, 2002.

LEFAUCHER J.P.; PASTORET C.; SEBILLE A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **The Anatomical Record**, v.242, p. 70 –76, 1995.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**. v.132, p.27–42, 2008.

LIU, N.; WANG, W.; ZHAO, Z.; ZHANG, T.; SONG, Y. Autophagy in human articular chondrocytes is cytoprotective following glucocorticoid stimulation. **Molecular medicine reports**. v.9, p. 2166-2172, 2014.

LIU, Z.; HOPKINS, M.M.; ZHANG, Z.; QUISENBERRY, C.B.; FIX, L.C.; GALVAN, B.M.; MEIER, K.E. Omega-3 Fatty Acids and Other FFA4 Agonists Inhibit Growth Factor Signaling in Human Prostate Cancer Cells. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**. v. 352, p.380–394, 2015.

LONG, X.; LIN, Y.; ORTIZ-VEGA, S.; YONEZAWA, K.; AVRUCH, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Curr.Biol**, v. 15, p.702–713, 2005.

LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, v. 183, p. 1394–1395, 1959.

MA, Z.Y.; ZHONG, Z.G.; QIU, M.Y.; ZHONG, Y.H.; ZHANG, W.X. TGF- β 1 activates the canonical NF- κ B signaling to promote cell survival and proliferation in dystrophic muscle fibroblasts in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 471, n. 576-581, 2016.

MACHADO, R.V.; MAURÍCIO, A.F.; TANIGUTI, A.P.; FERRETTI, R.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Eicosapentaenoic acid decreases TNF- α and protects dystrophic muscle of mdx mice from regeneration. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, p. 145-150, 2011.

MAGEE P.; PEARSON S.; ALLEN J. The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumor necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation. **Lipids in health and disease**, v. 7, n. 24, 2008.

MALIK, V., RODINO-KLAPAC, L.R., VIOLETT, L., WALL, C., KING, W., AL-DAHAK, R., et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. **Ann Neurol**, v. 67, p.771-80. 2010

MAMMUCARI, C.; MILAN, G.; ROMANELLO, V.; MASIERO, E.; RUDOLF, R.; DEL PICCOLO, P. et al. FOXO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. **Cell Metab.**, v. 6, p. 458–471, 2007.

MANNING, J.; KULBIDA, R.; RAI, P.; JENSEN, L.; BOUMA, J.; SINGH, S.P.; O'MALLEY, D.; YILMAZER-HANKE, D. Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Experimental Physiology**. v. 99, n.10, p. 1370–1386, 2014.

MARIOL, M.C.; SÉGALAT, L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. **Current Biology**, v. 30, n. 11, p. 1691-1694, 2001.

MARQUES M. J. Structural Biology of the dystrophin – deficient muscle fiber. **Braz. Journal of Morphological Science**, v. 21, p. 145-152, 2004.

MARQUES, M.J.; OGGIAM, D.S.; BARBIN, I.C.; FERRETTI, R.; SANTO NETO, H. Long-term therapy with deflazacort decreases myocardial fibrosis in mdx mice. **Muscle e Nerve**, v.40, n. 3, p. 466-468, 2009.

MATHUR. T.; MANADAN, A. M.; THIAGARAJAN, S.; HOTA, B.; BLOCK, J.A. Serum transaminases are frequently elevated at time of diagnosis of idiopathic inflammatory myopathy and normalize with creatine kinase. **J Clin Rheumatol.** , v. 20, p. 130-132, 2014.

MATSUMURA, C. Y.; TANIGUTI, A. P. T.; PERTILLE, A.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J. Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.00, 2011.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 493–495, 1961.

MCADAM, L.C.; MAYO, A.L.; ALMAN, B.A.; BIGGAR, W.D. The Canadian experience with long-term deflazacort treatment in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 31, n. 1, p. 16-20, 2012.

MEHRPOUR, M.; ESCLATINE, A.; BEAU, I.; CODOGNO, P. Over view of macroautophagy regulation in mammalian cells. **Cell Res.**, v. 20, p. 748–762, 2010.

MENDELL, J.R.; SHILLING, C.; LESLIE, N.D.; FLANIGAN, K.M.; AL-DAHAK, R.; GASTIER-FOSTER, J.; KNEILE, K.; DUNN, D.M.; DUVAL, B.; AOYAGI, A.; HAMIL, C.; MAHMOUD, M.; ROUSH, K.; BIRD, L.; RANKIN, C.; LILLY, H.; STREET, N.; CHANDRASEKAR, R.; WEISS, R.B. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. **Annals of Neurology**. V. 71, n. 3, p.304-313, 2012.

MENDELL, J.R., GOEMANS, N., LOWES, L.P., ALFANO, L.N., BERRY, K., SHAO, J., et al.; Eteplirsen Study Group and Telethon Foundation DMD Italian Network. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. **Ann Neurol**, v. 79, p. 257-71, 2019.

MESSINA, S.; BITTO, A.; AGUENNOUZ, M.; MAZZEO, A.; MIGLIORATO, A.; POLIYOF.; IRRERA, N.; ALTAVILLA, D.; VATA, G.L.; RUSSO, M.; NARO, A.; DE PASQUALEM, G.; RIZZUTO, E.; MUSARÒ, A.; SQUADRITO, F.; VITA, G. Flavocoxid counteracts muscle necrosis and improves functional properties in mdx mice: a comparison study with methylprednisolone. **Experimental Neurology**, v. 220, n. 2, p. 349-58, 2009

MCDONALD, C.M., CAMPBELL, C., TORRICELLI, R.E., FINKEL, R.S., FLANIGAN, K.M., GOEMANS, N., et al.; Clinical Evaluator Training Group; ACT DMD Study Group. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**. v. 390, p. 1489-98, 2017.

MCMILLAN HJ, GREGAS M, DARRAS BT, KANG PB. Serum transaminase levels in boys with Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Pediatrics**. v. 127, p. 132-6, 2011.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nat.Cell.Biol.**, v. 13, p. 1016–1023, 2011.

MIZUSHIMA, N.; SUGITA, H.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. A new protein conjugation system in human. The counter part of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 33889–33892, 1998.

MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B.; CUERVO, A.M.; KLIONSKY, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**. v. 451, p. 1069–1075, 2008.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. **Cell**, v. 3, p. 313–326, 2010.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC 3 immunoblotting. **Autophagy**, v. 21, p. 145 – 152, 2004.

MONIRI, M.H. Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): Cellular and molecular function and its role in metabolic disorders. **Biochem Pharmacol**, v. 110, p. 1-15, 2016.

MOONWIRIYAKIT, A.; KOVAL, M.; MUANPRASAT, C. Pharmacological stimulation of G-protein coupled receptor 40 alleviates cytokine-induced epithelial barrier disruption in airway epithelial Calu-3 cells. **International Immunopharmacology**. v. 73, p. 353-361, 2019.

MOREIRA, D. O.; PEREIRA, J.A.; TANIGUTI, A.P.; MATSUMURA, C.Y.; RAMOS, L.A.; AREAS, M.A.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Suramin attenuates dystrophin-deficient cardiomyopathy in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 48, n. 6, p. 911-91, 2013.

MOXLEY, R.T.; ASHWAL, S.; PANDYA, S.; CONNOLLY, A.; FLORENCE, J.; MATHEWS, K.; BAUMBACH, L.; MCDONALD, C.; SUSSMAN, M.; WADE, C. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 64, n. 1, p. 13-20, 2005.

MRAK, R.E. Muscle membranes in diseases of muscle. Boca Raton, **FF: CRC Press**, p. 24-52, 1985.

MUNKARAH, A.; MERT, I.; CHHINA, J.; et al. Targeting of free fatty acid receptor 1 in EOC: A novel strategy to restrict the adipocyte-EOC dependence. **Gynecologic Oncology**, v. 141, p. 72-79, 2016.

- NEEL, B. A.; LIN, Y.; PESSIN, J. E. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 24, p. 635–643, 2013.
- OH, D.Y.; TALUKDAR, S.; BAE, E.J.; IMAMURA, T.; MORINAGA, H.; FAN, W.Q.; LI, P.; LU, W.J.; WATKINS, S.M.; OLEFSKY, J.M. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, v. 142, p. 687–698, 2010.
- OMRANI, S., TAHERI, M., OMRANI, M.D., ARSANG-JANG, S., GHAFOURI-FARD, S. The effect of omega-3 fatty acids on clinical and paraclinical features of intractable epileptic patients: a triple blind randomized clinical trial. **Clin Transl Med**, v. 8, 2019.
- PASTORET, C.; SEBILLE, A. Mdx mice show weakness and muscle deterioration with age. **Journal of Neural Science**, v. 129, p.97-105, 1995.
- PEREIRA, J.A.; MAURICIO, A.F.; MARQUES, M.J.; NETO, H.S. Dual therapy deflazacort/doxycycline is better than deflazacort monotherapy to alleviate cardiomyopathy in dystrophin-deficient mdx mice. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**. v. 22, p. 458-466, 2017.
- PERTILLE, A. TONIZZA, C. D.; MARQUES, M. J.; SANTO NETO, H.; MATSUMURA, C. Y. Calcium-binding proteins in skeletal muscles of mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne Muscular Dystrophy. **International Journal of Experimental Pathology**, v.91, p. 63-71, 2010.
- PETER, A.K.; CROSBIE, R.H. Hypertrophic response of Duchenne and limb girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. **Exp Cell Res**. v. 312, p. 2580–2591, 2006.
- PETERSON, J. M.; KLINE, W.; CANAN, B.D.; et al. Peptide-Based Inhibition of NF-kappa B Rescues Diaphragm Muscle Contractile Dysfunction in a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **Molecular Medicine**, v. 17 , p.: 508-515, 2011.
- POOLE, D.C., JONES, A.M. Measurement of the maximum oxygen uptake $\dot{V}O_2$ max: $\dot{V}O_2$ peak is no longer acceptable. **J Appl Physiol**, v.122, p. 997-1002, 2017.
- PRATT DS, KAPLAN MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **N Engl J Med**. 2000;342(17): 1266 –1271.
- PROIKAS-CEZANNE, T.; WADDELL, S.; GAUGEL, A.; FRICKEY, T.; LUPAS, A.; NORDHEIM, A. WIPI-1 alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. **Oncogene**, v. 23, p. 9314–9325, 2004.
- QUINLAN, J.G., HAHN, H.S. WONG, B.L. LORENZ, J.N. WENISCH, A.S., LEVIN, L. S. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. **Neuromuscul Disord**, v.14, p. 491-6, 2004.
- RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- RADLEY, H.G.; GROUNDS, M.D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiology of Disease**, v. 23, p. 387–397, 2006.
- RAHIMOV, F.; KUNKEL, L.M. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. **Journal of Cell Biology**. v. 201, p. 499–510, 2013.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.

- RESENDE-PINTO, W. B. V.; KO, G. M. Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.2, p. 202-212, 2012.
- ROCCO, A. B., LEVALLEY, J. C., ELDRIDGE, J. A., MARSH, S. A., e RODGERS, B. D. A novel protocol for assessing exercise performance and dystrophophysiology in the mdx mouse. **Muscle Nerve**, v. 50, p. 541-548, 2014.
- RODACKI, C.L.; RODACKI, A.L.; PEREIRA, G.; NALIWAICO, K.; COELHO, I.; PEQUITO, D.; FERNANDES, L.C. Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. **Am J Clin Nutr**. 95(2): 428-36, 2012.
- ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal of American Medical Association**, v. 192, p. 309–313, 1965.
- RUBINSZTEIN, D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. **Nature**, v.443, p.780–786, 2006.
- SACCO, A.; MOURKIOTI, F.; TRAN, R. et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. **Cell**, v. 143, p. 1059–1071, 2010.
- SANDRI, M.; COLETTI, L.; GRUMATI, P.; BONALDO, P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. **J. Cell. Sci.**, v. 126, p. 5325–5333, 2013.
- SCHLANGER, S., SHINITZKY, M., YAM, D. Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. **Epilepsy**, v. 43, p. 103–104, 2002.
- SEIXAS, S.L.; LAGROTA-CÂNDIDO, J.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. The importance of mdx mouse in the physiopathology of Duchenne's muscular dystrophy. **Arq Neuropsiquiatria**, p.610-617, 1997.
- SHI, J.; WANG, J.; ZHANG, H.; JIE, Q.; LI, X.; SHI, Q.; HUANG, Q.; GAO, B.; HAN, Y.; GUO, K.; LIU, L.; YANG, L.; LUO, Z. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. **Bone** . v.79, p. 222–232, 2015.
- SIDDIQUI, N., SONENBERG, N. Proposing a mechanism of action for ataluren. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 113, p.12353-5, 2016
- SIMONETTO, M., INFANTE, M., SACCO, R.L., RUNDEK, T., DELLA-MORTE, D. A Novel Anti-Inflammatory Role of Omega-3 PUFAs in Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Vascular Cognitive Impairment and Dementia, **Nutrients**, v.11, 2019.
- SKRABEK, R.Q.; ANDERSON, J.E. Metabolic shifts and myocyte hypertrophy in deflazacort treatment of mdx mouse cardiomyopathy. **Muscle e Nerve**, v. 24, n. 2, p. 192-202, 2001.
- SOMA, L. R.; ROBINSON, M. A.; YOU, Y.; et al. Pharmacokinetics, disposition, and plasma concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the horse following topical, oral, and intravenous administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, p. 384-392, 2018.
- SONG, Y.; ROSENBLUM, S. T., STEDMAN, H. H. Suite of clinically relevant functional assays to address therapeutic efficacy and disease mechanism in the dystrophic mdx mouse. **Journal of Applied Physiology**, v. 122 p. 593-602, 2017.

SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin deficient myopathies? **Neuromuscular Disorders**, v. 11, p. 556- 564, 2001.

SPURNEY CF. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. **Muscle e Nerve**, v. 44, p. 8-19, 2011.

TANIGUTI, A.P.; PERTILLE, A.; MATSUMURA, C.Y.; SANTO-NETO, H.; MARQUES, M.J. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF-beta1 blocker. **Muscle e Nerve**, v. 43, n. 1, p. 82-87, 2011.

TUAZON, M.A.; HENDERSON, G.C. Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipid is altered in mdx mice and predictive of disease markers. **Metabolism**, v. 61, p. 801-811, 2012.

VALLADARES, D.; UTRERAS-MENDOZA, Y.; CAMPOS, C. et al. IP3 receptor blockade restores autophagy and mitochondrial function in skeletal muscle fibers of dystrophic mice. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis Of Disease**, v. 1864, p. 3685-3695, 2018.

VAN ERP, C., LOCH, D., LAWS, N., TREBBIN, A., HOEY, A. J. Timeline of cardiac dystrophy in 3-18-month-old MDX mice. **Muscle Nerve**, v. 42, p. 504-13, 2010.

VERGNE, I.; ROBERTS, E.; ELMAOUED, R. A.; TOSCH, V.; DELGADO, M. A.; PROIKAS-CEZANNE, T., et al. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3- phosphatase Jumpy. **EMBO J**, v. 28, p. 2244–2258, 2009.

WALDROP, M.A. FLANIGAN, K.M. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Curr. Opin. Neurol**, v. 32, p. 722-727, 2019.

WANG, L.; FAN, J.; LIN2, Y.S.; GUO, Y.S.; GAO, B.; SHI, Q.Y.; WEI, B.Y.; CHEN, L.; YANG, L.; LIU, J.; LUO, Z.J. Glucocorticoids induce autophagy in rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, p. 2711-2716, 2015.

WANG L, CHEN M, XU M, LI J, FENG P, HE R, ZHU Y, LI H, LIN J, ZHANG C. Ratio of creatine kinase to Alanine Aminotransferase as a biomarker of acute liver injury in dystrophinopathy. **Dis Markers**. v. 19, 2018.

WERNECK, L. C., LORENZONI, P. J., DUCCI, R. D.-P., FUSTES, O. H., KAY, C. S. K., SCOLA, R. H. Duchenne muscular dystrophy: an historical treatment review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 77, p. 579–589, 2019.

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 e Physiology**, v. 33, p. 657-662, 2006.

WILLIAMS-BEY, Y.; BOULARAN, C.; VURAL, A.; HUANG, N.N.; HWANG, I.Y.; SHI, C.S.; KEHRL, J.H. Omega-3 Free Fatty Acids Suppress Macrophage Inflammasome Activation by Inhibiting NF-kB Activation and Enhancing Autophagy. **Plos One**, v.9, 2014.

WONG, P. M.; PUENTE, C.; GANLEY, I. G.; JIANG, X. TheULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. **Autophagy**, v. 9, p. 124–137. 2013

WOOD, C.L., STRAUB, V., GUGLIERI, M., BUSHBY, K., CHEETHAM, T. Short stature and pubertal delay in Duchenne muscular dystrophy. **Arch Dis Child**, p.101-106, 2016.

WROBLEWSKI F. The clinical significance of transaminase activities of serum. **Am J Med**, v. 27, p. 911–923, 1959

YAMAMOTO, K.; YAMADA D.; KABUTA ,T.; TAKAHASHI, A.; WADA K.; SEKIGUCHI, M. Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. **Neuromuscul Disord**, v. 20, p.505-511, 2010

ZHAO, J.; BRAULT, J.J.; SCHILD, A.; CAO, P.; SANDRI, M.; SCHIAFFINO,S., et al. FOXO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. **Cell Metab.**, v. 6, p. 472–483, 2007.

ZHAO, Y.; ZUO, Y.; HUO, H.J.; XIAO, L.; YANG,X.J.; XIN, D.Q. Glucocorticoid induced autophagy in N1511 chondrocyte cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v.18, p. 3573-3579, 2014.

ANEXO A



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Autofagia e receptores de ácidos graxos ligados a proteína-G: mecanismo de ação do EPA e deflazacorte na distrofia muscular, registrada com o nº 4585-1/2017, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Julia Marques e Marcos Maciel Junior, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 08 de junho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2017-01/03/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	08/06/2017-01/03/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10ScCr/PasUnib
No. de animais:	10
Peso / Idade:	14 dias / 6g
Sexo:	05 machos / 05 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	40
Peso / Idade:	14 dias / 6g
Sexo:	20 machos / 20 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10ScCr/PasUnib
No. de animais:	10
Peso / Idade:	03 meses / 30g
Sexo:	05 machos / 05 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	40
Peso / Idade:	03 meses / 30g
Sexo:	20 machos / 20 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 08 de junho de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO B



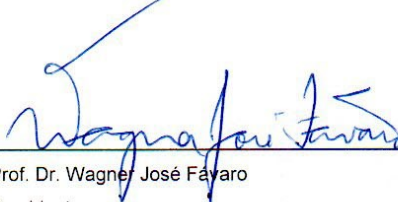
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Receptores acoplados a proteína G e autofagia: potenciais alvos do ômega-3 e deflazacorte na terapia farmacológica da DMD, registrada com o nº 5282-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Maria Julia Marques e Marcos Maciel Junior, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 13/06/2019.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2019 a 01/03/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/06/2019 a 01/03/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10ScCr/PasUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	5 Machos 5 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	50
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	25 Machos 25 Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Anatomia, Área de Anatomia, DBEF, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 27 de junho de 2019.


Prof. Dr. Wagner José Favaro
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

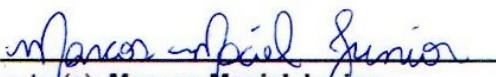
IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO C

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Autofagia e receptores de ácidos graxos ligados a proteína-G: mecanismo de ação do EPA e deflazacorte na distrofia muscular**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de Novembro de 2019.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Marcos Maciel Junior**
RG n.º 48.649.597-8

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Maria Julia Marques**
RG n.º 13939051