GABRIEL NASRI MARZUCA NASSR

VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE
PROTEÍNAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
APÓS ATROFIA POR DESUSO

MODULAÇÃO POR ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

GABRIEL NASRI MARZUCA NASSR

VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE
PROTEÍNAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
APÓS ATROFIA POR DESUSO

MODULAÇÃO POR ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marzuca Nassr, Gabriel Nasri
/ Gabriel Nasri Marzuca Nassr; orientador Prof.
Dr. Rui Curi . -- São Paulo, 2016.
143 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Atrofia muscular. 2. Suspensão das patas
traseiras. 3. Óleo de peixe. 4. EPA; DHA. 5. FAT-1.
I. , Prof. Dr. Rui Curi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriel Nasri Marzuca Nassr

Título da Tese: Vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético após atrofia por desuso: modulação por ácidos graxos ômega-3

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **024** nas fls. **04** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Rui Curi**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeitos da suplementação com uma mistura ergogênica de ácidos graxos na atrofia muscular por desuso em ratos"* do qual participam o(s) aluno(s) **Gabriel Nasri Marzuca Nassr**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **21.05.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 27 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP Telefone (55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.138/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 24/13/CEUA, aprovado em 21.05.13 e por solicitação do Prof. Dr. **Rui Curi**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de camundongos (linhagens C-57 e FAT-1) ao Projeto de Pesquisa *"Efeitos da suplementação com uma mistura ergogênica de ácidos graxos na atrofia muscular por desuso em ratos"* uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 17 dezembro de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

*À minha filha, meu maior tesouro;
À minha esposa, minha melhor companheira;
À minha mãe, minha melhor lembrança.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rui Curi, aos funcionários Dr. Gilson Masahiro Murata, Dra. Tatiana Alba Loureiro, José Roberto (Bob) Mendonça e aos colegas Prof. Sandro, Kaio, Carlos, Mit, Guga, Takeo, Marco, Amanda M, Amanda C, Carol F, Mari, Laure, Diogo, Phablo, Lucas, Patricia, Sandra, Carol Y, Catia e Alcione do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular, do ICB1, da USP no Brasil.

Ao Professor Luc van Loon, aos funcionários Joan, Desiree, Cleo, Antoine, Jos, Joy, Janneau, Rachel e aos colegas Prof. Lex, Prof. Tim, Joey, Marlou, Evelien, Cas, Tyler, Imre, Philippe, Jean, Jorn, Andy, Michelle, Kristin, Cindy, Maarten, Kevin, Astrid, Milou, Tanya, Graham e Stefan do *Department of Human Movement Sciences of FHML at Maastricht University, The Netherlands*.

Ao Professor José Luis Márquez pelo primeiro contato que início todo este sonho.

Aos professores, que cederam seus laboratórios para o desenvolvimento de algum procedimento para nossa tese: Luiz Britto (e Adilson), Jorge Mancini (e Rosângela), Alice Rodrigues, Carla Carvalho, Maria Teresa Nunes, Angelo Carpinelli e Silvana Bordin.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Humana: José María e Paloma da Secretária da Pós-graduação e Cleo, Renata, Víctor, Nair e Claudio do Biotério.

À minha esposa e filha, pela paciência e sacrifícios nestes anos.

À meus pais e irmãos; sogros e cunhados; nossas famílias do Brasil e no mundo, obrigado pelo apoio.

À Becas Chile (CONICYT), CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro.

À empresa Naturalis®, pelo fornecimento dos óleos de peixe.

Aos meus amigos antigos e os que formei nestes 4 anos. Todos dispersos pelo mundo. Não é necessário nomear a cada um, prefiro estar aí nos momentos que precisarem de mim. Muito obrigado pelo seu apoio e amizade incondicional. Espero retribuir da mesma forma.

RESUMO

Marzuca G. Vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético após atrofia por desuso: modulação por ácidos graxos ômega-3 [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Avaliamos no presente estudo: 1) os efeitos do desuso das patas traseiras de ratos por duas semanas sobre as vias de sinalização de síntese e degradação de proteínas no músculo sóleo e a administração de óleos de peixe ricos em eicosapentaenóico (EPA) ou docosaexaenóico (DHA) e 2) as alterações induzidas pelo desuso no músculo sóleo em camundongos FAT-1. Ratos Wistar machos adultos foram mantidos em gaiolas individuais por três dias para adaptação e em seguida iniciou-se a suplementação (0,3 mL/100 gramas de massa corporal) com óleo mineral ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA. Após duas semanas de suplementação, as patas traseiras foram suspensas por igual período para induzir atrofia muscular mantendo-se a administração dos óleos. Camundongos machos wild-type e transgênicos FAT-1 (produzem endogenamente ácidos graxos ômega-3 a partir de ômega-6 da dieta) foram mantidos por três dias em gaiolas individuais para adaptação antes do início do período de suspensão por duas semanas. A suspensão diminuiu a massa dos músculos das patas traseiras (a atrofia foi mais pronunciada nos músculos ricos em fibras oxidativas/contração lenta/tipo I), a área de seção transversa do músculo e da fibra muscular do sóleo. O desuso do músculo diminuiu os conteúdos dos sinalizadores da via de síntese de proteínas (p-Akt, p70S6K total, p-S6, S6 total, razão p-S6/S6 total, p-GSK3-beta, GSK3-beta total, p-ERK1, ERK1 total, p-ERK2, ERK 2 total e p38 total) e aumentou as razões p-p70S6K/p70S6K total e p-JNK2/JNK2 total, os conteúdos de p-4EBP1, atrogina-1/MAFbx, MuRF1 e caspase 3. Ambos os óleos de peixe diminuíram a razão dos ácidos graxos ômega-6/ômega-3 e a área de seção transversa da fibra muscular do sóleo em relação ao óleo mineral. Os efeitos do óleo de peixe rico em EPA sobre as vias de sinalização foram mais pronunciados que os do rico em DHA. O óleo de peixe rico em EPA atenuou as alterações causadas pela suspensão sobre p-Akt, p70S6K total, p-4EBP1, p-GSK3-beta, p-ERK1, ERK1 total, p-ERK2 e ERK2 total. O óleo rico em DHA fez o mesmo efeito em p-4EBP1 e ERK1 total. Nos camundongos FAT-1, observou-se razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3 menor e aumento do conteúdo de proteínas totais no músculo sóleo. As alterações induzidas pela suspensão na diminuição da massa dos músculos sóleo e plantar, na força isotônica absoluta máxima, na área de seção transversa do músculo sóleo e no conteúdo de MuRF1 e aumento da razão p-GSK3-beta/GSK3-beta total foram menos acentuadas nos camundongos FAT-1. Concluímos que, apesar da variação pequena na razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3, efeitos significativos da oferta aumentada de ácidos graxos ômega-3 foram observados na área de seção transversa e vias de sinalização relacionadas à síntese e degradação de proteínas no músculo sóleo nos dois protocolos.

Palavras-chave: Atrofia muscular. Suspensão das patas traseiras. Óleo de peixe. EPA. DHA. FAT-1.

ABSTRACT

Marzuca G. Protein synthesis and degradation signaling in skeletal muscle after muscle disuse atrophy: modulation by omega-3 fatty acids. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

We investigated herein: 1) the effects skeletal muscle disuse atrophy induced by two-week hind limb suspension (HS) on protein synthesis and degradation signaling in soleus muscle and the administration of either eicosapentaenoic (EPA) or docosahexaenoic (DHA)-rich fish oil supplementation, and 2) the changes induced by hind limb disuse on soleus muscle of Fat-1 transgenic mice. During the first three days of the experimental period, Wistar male rats were left to adapt to individual cages and daily oral supplementations (0.3 mL/100 g b.w.) with mineral oil (MO) or high EPA or high DHA fish oil were then performed. After two weeks, the rats were submitted to HS for another 2 week period. The treatments with fish oils were maintained concomitantly with HS. C57BL/6 wild type and FAT-1 transgenic (that produce omega-3 fatty acids from dietary omega-6 fatty acids) mice were left to adapt to individual cages for three days. Afterwards, the animals the hind limb suspended for two weeks. HS decreased hind limb skeletal muscle mass (muscle atrophy was more pronounced in muscles containing mainly oxidative/slow twitch/type I fibers) and cross-sectional areas (CSA) of soleus muscle and soleus muscle fibers. The disuse decreased the contents of p-Akt, total p70S6K, p-S6, total S6, p-S6/total S6 ratio, p-GSK3-beta, total GSK3-beta, p-ERK1, total ERK1, p-ERK2, total ERK 2 and total p38 and increased p-p70S6K/total p70S6K and p-JNK2/total JNK2 ratios, and the contents of p-4EBP1, atrogen-1/MAFbx, MuRF1, caspase 3 in skeletal muscle. Either fish oil decreased omega-6/omega-3 fatty acid ratio and CSA of soleus muscle fibers when compared with the mineral oil group. The effects of EPA-rich fish oil on protein synthesis signaling were more pronounced when compared with DHA-rich fish oil. EPA-rich fish oil attenuated the changes induced by HS on p-Akt, total p70S6K, p-4EBP1, p-GSK3-beta, p-ERK1, total ERK1, p-ERK2 and total ERK2. DHA-rich fish oil did the same effect on p-EBP1 and total ERK1 levels. FAT-1 transgenic mice had a decrease in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio and an increase in total protein content in the soleus muscle. FAT-1 mice had lower HS effect on soleus and plantar muscle weight loss, absolute isotonic maximal force decrease, the decrease of CSA of the soleus muscle and MuRF1 protein content and the increase in p-GSK3-beta/total GSK3-beta ratio. We concluded that, in spite of the small variation in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio, significant effects of the increased omega-3 fatty acid levels were observed on the CSA and signaling pathways associated with soleus muscle protein synthesis and degradation in both experimental protocols.

Keywords: Muscle atrophy. Hindlimb suspension. Fish oil. EPA. DHA. FAT-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas do músculo esquelético	25
Figura 2 - Representação esquemática do Protocolo Experimental 1 (PE1)	34
Figura 3 - Representação esquemática do Protocolo Experimental 2 (PE2)	35
Figura 4 - Desuso muscular por suspensão das patas traseiras	36
Figura 5 - (A) Variação do consumo hídrico durante as quatro semanas de experimentação e (B) Variação do consumo alimentar durante as quatro semanas de experimentação	45
Figura 6 - Variação da massa corporal durante as quatro semanas de experimentação	46
Figura 7 - Comprimento final do rato após quatro semanas de experimentação	47
Figura 8 - (A) Massa seca do músculo sóleo pelo comprimento da tíbia e (B) Massa seca do músculo EDL pelo comprimento da tíbia	49
Figura 9 - Conteúdo de glicogénio (em mg por g de tecido fresco) nos músculos (A) sóleo e (B) EDL	54
Figura 10 - Conteúdos de citocinas no músculo sóleo: (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-6 e (D) IL-10	55
Figura 11 - Área de secção transversa do músculo sóleo	56
Figura 12 - Imagens histológicas representativas da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo corada com hematoxilina e eosina: (A) aumento de 10x e (B) aumento de 20x	58
Figura 13 - Área de secção transversa da fibra do músculo sóleo	60
Figura 14 - Atividades de (A) catepsina L e (B) proteassoma 26S no músculo sóleo	61
Figura 15 - Conteúdos de proteínas totais (mg/g de tecido fresco) nos músculos (A) sóleo e (B) EDL	62
Figura 16 - (A) Conteúdo de proteínas carboniladas e (B) Imagens representativas das bandas obtidas por ensaio de <i>western blotting</i> das proteínas carboniladas	63

Figura 17 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-Akt, (B) Akt total, (C) p-Akt/Akt total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	64
Figura 18 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-mTOR, (B) mTOR total, (C) p-mTOR/mTOR total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	65
Figura 19 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-p70S6K, (B) p70S6K total, (C) p-p70S6K/p70S6K total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	66
Figura 20 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-S6K e (B) S6 total, (C) razão p-S6/S6 total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	67
Figura 21 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-4EBP1, (B) 4EBP1 total, (C) p-4EBP1/4EBP1 total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	68
Figura 22 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-GSK3-beta, (B) GSK3-beta total, (C) p-GSK3-beta/GSK3-beta total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	69
Figura 23 - Conteúdos das proteínas no músculo sóleo: (A) MuRF1, (B) atrogina-1/MAFbx, (C) caspase 3 e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	70
Figura 24 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-ERK 1, (B) p-ERK 2, (C) ERK 1 total, (D) ERK 2 total, (E) p-ERK 1/ERK 1 total, (F) p-ERK 2/ERK 2 total e (G) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	71
Figura 25 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-JNK 1, (B) p-JNK 2, (C) JNK 1 total, (D) JNK 2 total, (E) p-JNK 1/JNK 1 total, (F) p-JNK 2/JNK 2 total e (G) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	73
Figura 26 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-p38, (B) p38 total, (C) p-p38/p38 total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	75
Figura 27 - (A) Variação do consumo hídrico durante as duas semanas de suspensão e (B) Variação do consumo alimentar durante as duas semanas de suspensão.....	77
Figura 28 - Variação de massa corporal durante as duas semanas de experimentação.....	78

Figura 29 - Comprimento final do camundongo após duas semanas de suspensão.....	78
Figura 30 - Força isotônica absoluta e específica do músculo sóleo.....	82
Figura 31 - Força tetânica absoluta e específica do músculo sóleo.....	83
Figura 32 - Propriedades contráteis do músculo sóleo: (A) tempo de contração muscular, caracterizado pelo parâmetro TTP, (B) parâmetro HRT, associado ao tempo de relaxamento muscular e (C) tempo de relaxamento tardio, caracterizado pelo parâmetro LRT.....	84
Figura 33 - Fadiga do músculo sóleo: (A) Redução da força durante 10 contrações tetânicas sucessivas, (B) Índice de fadiga (área sob a curva “força versus no de contrações”) e (C) Índice de fadiga (inclinação da curva “força versus 6 até 10 contrações”).....	85
Figura 34 - Área de secção transversa do músculo sóleo.....	89
Figura 35 - Imagens histológicas representativas da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo corada com hematoxilina e eosina: (A) aumento de 10x e (B) aumento de 20x.....	90
Figura 36 - Área de secção transversa da fibra do músculo sóleo.....	92
Figura 37 - Atividades de (A) catepsina L e (B) proteassoma 26S no músculo gastrocnêmio.....	92
Figura 38 - Proteínas totais do músculo sóleo (mg/g de tecido fresco).....	93
Figura 39 - (A) Conteúdo de proteínas carboniladas e (B) Imagens representativas das bandas obtidas por ensaio de <i>western blotting</i> das proteínas carboniladas.....	94
Figura 40 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-Akt, (B) Akt total, (C) p-Akt/Akt total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	95
Figura 41 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-S6K e (B) S6 total, (C) razão p-S6/S6 total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	96
Figura 42 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-4EBP1, (B) 4EBP1 total, (C) p-4EBP1/4EBP1 total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	97

Figura 43 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-GSK3-beta, (B) GSK3-beta total, (C) p-GSK3-beta/GSK3-beta total e (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	98
Figura 44 - Conteúdos das proteínas no músculo sóleo: (A) MuRF1, (B) atroquina-1/MAFbx e (C) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	99
Figura 45 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: (A) p-ERK 1/2, (B) ERK 1/2 total, (C) p-ERK 1/2/ERK 1/2 total , (D) Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de <i>western blotting</i>	100
Figura 46 - Representação do comportamento das vias de sínteses e degradação de proteínas no período de atrofia muscular esquelética induzida por suspensão das patas traseiras.....	116
Figura 47 - Diagrama de Venn das alterações causadas pelos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na condição controle e/ou de suspensão das patas traseiras dos ratos.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela geral dos resultados das massas corporal total, muscular e dos depósitos de gordura no protocolo experimental 1 (PE1).....	48
Tabela 2 - Composição de ácidos graxos expressos em g/100g do peso úmido do músculo gastrocnêmio fresco no PE1.....	52
Tabela 3 - Determinação das atividades enzimáticas (SCD-1 e elongase) e da lipogênese <i>de novo</i> (DNL) no músculo gastrocnêmio.....	53
Tabela 4 - Tabela geral dos resultados das massas corporal total, muscular e dos depósitos de gordura no protocolo experimental 2 (PE2).....	80
Tabela 5 - Composição de ácidos graxos expressos em g/100g do peso úmido do músculo gastrocnêmio no PE2.....	87
Tabela 6 - Determinação das atividades enzimáticas (SCD-1 e elongase) e da lipogênese <i>de novo</i> (DNL) no músculo gastrocnêmio.....	88
Tabela 7 - Resumo das alterações causadas pela suspensão das patas traseiras no músculo sóleo de ratos no PE1.....	101
Tabela 8 - Resumo das alterações causadas pela suspensão das patas traseiras sobre o músculo sóleo de camundongos <i>wild-type</i> e FAT-1 no PE2.....	104
Tabela 9 - Resumo das diferenças observadas na via de síntese/degradação entre os tratamentos (óleo mineral e óleos de peixe rico em EPA ou DHA) sobre as alterações causadas pela suspensão no PE1.....	119
Tabela 10 - Resumo das principais diferenças observadas no camundongo FAT-1 sobre as alterações causadas pela suspensão.....	120

ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding protein 1</i>
AFC	amino-4-trifluorometil cumarina
Akt	<i>protein kinase B</i>
AMC	amido-4-metilcumarina
ASTM	área de secção transversa muscular
ASTFM	área de secção transversa da fibra muscular
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	controle
CDHA	controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico
CEPA	controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico
COM	controle óleo mineral
DHA	ácido docosaexaenoico
DNL	lipogênese <i>de novo</i>
EDL	extensor digital longo
EDTA	ácido diaminoetanotetraacético
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eIF2b	<i>eukaryotic initiation factor 2B</i>
EPA	ácido eicosapentaenóico
ERK 1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinases 1/2</i>
FoxO	<i>forkhead box O</i>
GSK3-beta	<i>glycogen synthase kinase3-beta</i>
Hes-1	<i>hairy and enhancer of split-1</i>
HRT	<i>half relaxation time</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-I</i>
IKK	<i>I kappa B kinase</i>
IL-10	interleucina-10
IL-1β	interleucina-1β
IL-6	interleucina-6
ISSDP	Índice de sinalização de síntese e degradação proteica
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
LRT	<i>late relaxation time</i>
MAFbx	<i>muscle atrophy F-box protein</i>
MAPKs	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MuRF1	<i>muscle RING finger 1</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
OCT	<i>optimal cutting temperature</i>
OM	óleo mineral
p70S6K	<i>ribosomal protein 70-kDa S6 kinase</i>
PI3K	<i>fosfatidilinositol 3 kinase</i>
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
RPM	rotações por minuto
S	suspensão
S6	<i>ribosomal protein S6</i>

SCD-1	estearoil-CoA dessaturase-1
SDHA	suspenso suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SERCA	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase</i>
SEPA	suspenso suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico
SOM	suspenso suplementado com óleo mineral
TA	tibial anterior
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TTP	<i>time to peak</i>
UFR	unidades de fluorescência relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Fisiologia Muscular	22
2.1.1 Estrutura do sarcômero	22
2.1.2 Contração muscular	23
2.2 Atrofia muscular	24
2.2.1 Vias de sinalização da atrofia muscular	24
2.2.2 Sistema proteolítico na atrofia muscular	25
2.3 Modelo animal de atrofia muscular por desuso	26
2.4 Efeitos ergogênicos dos ácidos graxos	26
3 OBJETIVOS DO ESTUDO	28
3.1 Estratégias experimentais	28
4 JUSTIFICATIVAS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Animais	32
5.2 Desenho experimental do estudo	32
5.3 Desuso dos músculos por suspensão das patas traseiras	35
5.4 Análise gravimétrica do músculo esquelético	36
5.5 Estimulação elétrica <i>in situ</i> realizada no PE2	37
5.6 Análise da força muscular máxima, propriedades contráteis e fadiga no PE2	37
5.7 Extração lipídica e determinação da composição de ácidos graxos no óleo de peixe e no músculo gastrocnêmio por cromatografia gasosa	38
5.8 Determinação das atividades da esteroil-CoA dessaturase (SCD-1) e elongase e da via de lipogênese <i>de novo</i> (DNL) no músculo gastrocnêmio	39
5.9 Determinação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA no soro e no músculo sóleo no PE1	39
5.10 Conteúdo de glicogênio muscular no PE1	39
5.11 Análise histológica	40
5.12 Atividade da catepsina L	41
5.13 Atividade do proteossoma 26S	41

5.14 Conteúdo das proteínas carboniladas.....	42
5.15 Determinação das proteínas Akt, mTOR, p70S6K, S6, 4EBP1, atrogina-1/MAFbx, MuRF1, caspase 3, GSK3-BETA, ERK 1, ERK 2, JNK 1, JNK 2 e p38 por <i>western blotting</i>	43
5.16 Avaliação do Índice de Sinalização de Síntese e Degradação de Proteínas (ISSDP).....	44
5.17 Análise estatística.....	44
6 RESULTADOS	45
A. Protocolo Experimental 1 (PE1)	45
6.1 Consumos hídrico e alimentar e variação da massa corporal.....	45
6.2 Massas corporal, muscular e dos depósitos de gordura.....	47
6.3 Composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio no PE1.....	50
6.4 Atividades das enzimas SCD-1 e elongase e lipogênese <i>de novo</i> (DNL) no músculo gastrocnêmio.....	53
6.5 Conteúdo de glicogênio muscular.....	54
6.6 Conteúdos de citocinas no músculo sóleo.....	55
6.7 Avaliação da área transversa do músculo e da fibra muscular no sóleo.....	56
6.8 Avaliação das atividades da catepsina L e proteassoma 26S.....	61
6.9 Avaliação das proteínas totais.....	62
6.10 Conteúdos das proteínas carboniladas.....	63
6.11 Avaliação das proteínas envolvidas na síntese de proteínas musculares: Akt, mTOR, p70S6K, S6, 4EBP1 e GSK3-beta por <i>western blotting</i>	64
6.12 Avaliação das proteínas envolvidas na degradação de proteínas musculares: MuRF1, atrogina-1/MAFbx e caspase 3 por <i>western Blotting</i>	70
6.13 Avaliação das proteínas envolvidas na via das MAPKs: ERK1, ERK2, JNK1, JNK2 e p38 por <i>western blotting</i>	71
6.14 Avaliação do Índice de sinalização de síntese e degradação proteica (ISSDP) no PE1.....	76
B. Procolo Experimental 2 (PE2)	77
6.15 Consumos hídrico e alimentar e variação da massa corporal.....	77
6.16 Massas corporal, muscular e dos depósitos gordura.....	79

6.17 Função contrátil muscular	82
6.17.1 Força isotônica	82
6.17.2 Força tetânica	83
6.17.3 Propriedades contráteis	83
6.17.4 Fadiga	84
6.18 Composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio	86
6.19 Atividades das enzimas (SCD-1 e elongase) e da via lipogênese <i>de novo</i> (DNL) no músculo gastrocnêmio	88
6.20 Avaliação da área transversa do músculo e da fibra muscular no sóleo	88
6.21 Avaliação das atividades da catepsina L e do proteassoma 26S	92
6.22 Avaliação das proteínas totais	93
6.23 Conteúdos das proteínas carboniladas	94
6.24 Avaliação das proteínas envolvidas na sinalização da via de síntese de proteínas musculares Akt, S6, 4EBP1 e GSK3-beta por <i>western blotting</i>	95
6.25 Avaliação das proteínas envolvidas na degradação de proteínas musculares: MuRF1 e atrogina-1/MAFbx por <i>western Blotting</i>	99
6.26 Avaliação das proteínas envolvidas na via das MAPKs: ERK1 e ERK2 por <i>western blotting</i>	100
6.27 Avaliação do Índice de sinalização de síntese e degradação proteica (ISSDP) no PE2	101
6.28 Resumo das alterações causadas no PE1 e no PE2	101
7 DISCUSSÃO	106
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
9 CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS	123
APÊNDICES	139
A – Composição dos óleos de peixe (ricos em EPA ou DHA)	139
B – Exemplo de genotipagem para camundongos transgênicos FAT-1	140
C – Exemplo do <i>Ponceau S</i> utilizado	141
D – Artigos publicados em periódicos durante o período de doutoramento	142
E – Indicações em congressos durante o período de doutoramento	143

1 INTRODUÇÃO

A perda de massa muscular esquelética ocorre em resposta ao desuso (como, por exemplo, imobilização ou falta de carga mecânica), inanição, envelhecimento, e em estados catabólicos intensos (como, por exemplo, caquexia no câncer). A atrofia muscular esquelética é associada com diminuição da via de síntese de proteínas e/ou aumento da via de degradação. Os dois processos são altamente regulados e inter-relacionados (Jackman, Kandarian, 2004; Bonaldo, Sandri, 2013). Vários sistemas proteolíticos participam da degradação de proteínas musculares. As proteases que contribuem para a atrofia do músculo esquelético são classificadas como: proteases lisossomais (catepsina); proteases ativadas por cálcio (ex: calpaínas), proteases do sistema de proteassoma (ubiquitina-ligases) e caspases, em especial a caspase 3 (Bodine, 2013; Du et al., 2004; McClung et al., 2007). Devido à complexidade de se investigar os mecanismos responsáveis pela atrofia muscular em seres humanos, modelos experimentais com animais foram desenvolvidos (Powers et al., 2007). Um dos modelos mais utilizados na indução de atrofia por desuso em animais é a suspensão das patas traseiras (*hindlimb suspension*) (Bruusgaard et al., 2012; Feng et al., 2016; Guo et al., 2012; Hutchins-Wiese et al., 2012; Jackson et al., 2012; Maki et al., 2012; Marzuca, 2012; Pierno et al., 2012; Tanaka et al., 2013; Xu et al., 2012). A atrofia muscular é tratada com o emprego de exercício físico (por exemplo, corrida em esteira, recarga mecânica) e eletroestimulação (Boonyarom et al., 2009; Dirks et al., 2014, 2015; Fujino et al., 2009; Liu et al., 2014; Morimoto et al., 2013), drogas (tais como: olesoxime, isoflavonas) (Cherry et al., 2014; Hirasaka et al., 2013) ou suplementação alimentar de leucina, creatina, L-carnitina ou ácidos graxos como EPA e DHA (D'Antona et al., 2014; Magne et al., 2013; Wall, van Loon, 2013).

O óleo de peixe, rico em EPA e DHA, dois ácidos graxos ômega-3, apresenta efeitos positivos na prevenção e tratamento de doenças crônicas tais como diabetes. Contudo, os ácidos graxos ômega-3 também podem regular o crescimento do músculo esquelético. A suplementação da dieta com EPA atenua a atrofia do músculo sóleo no modelo de imobilização (You et al., 2010b). Em vista do exposto, é importante investigar os efeitos dos ácidos graxos ômega-3, por suplementação de óleos de peixe (ricos em EPA ou DHA) ou usando camundongos transgênicos FAT-1 (que produzem endogenamente ácidos graxos ômega-3 a partir

dos ácidos graxos ômega-6 consumidos na dieta), sobre as vias de sinalização de síntese e degradação de proteínas em modelo de desuso do músculo esquelético, que mimetiza a perda de massa muscular causada por internação hospitalar ou voo espacial em humanos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fisiologia do músculo esquelético

2.1.1 *Estrutura do sarcômero*

O músculo esquelético é fundamentalmente composto de estrutura contrátil mas também de vasos sanguíneos, nervos e tecido conectivo que influenciam fortemente a função muscular (Gillies, Lieber, 2011). O tecido conectivo do músculo esquelético (matriz extracelular) é subdividido em endomísio (em torno de uma célula muscular), perimísio (em torno de grupos de células musculares) e epimísio (em torno de todo o músculo) (Gillies, Lieber, 2011). A célula muscular esquelética é multinucleada e apresenta mitocôndrias em quantidades variáveis (maior número nas fibras oxidativas/contração lenta/tipo I que nas fibras glicolíticas/contração rápida/tipo II). A unidade básica do músculo esquelético é o sarcômero que tem forma estriada quando observado ao microscópio óptico. O sarcômero estende-se entre os discos Z, apresentando zonas características: banda A (segue o comprimento da miosina e não se modifica na contração muscular), banda I (desde o término da miosina até o começo da seguinte e diminui com a contração), banda H (estende-se do fim da actina até o início da seguinte e diminui com a contração) e linha M (na metade das proteínas miosinas e divide o sarcômero em dois) (Luther, 2009; Sparrow, Schöck, 2009; Tskhovrebova, Trinick, 2003). Observam-se também filamentos grossos, como a miosina e a titina e filamentos delgados tais como actina, complexo troponina-tropomiosina e nebulina, além de filamentos intermediários como desmina, vimentina e plectina (Sparrow, Schöck, 2009).

As principais proteínas contráteis são miosina e actina. A miosina é formada por duas cadeias pesadas e quatro leves enquanto que a actina é composta por duas cadeias globulares entrelaçadas entre si (Craig, Woodhead, 2006; Gordon et al., 2000; Luther, 2009). O complexo troponina-tropomiosina é composto pela proteína troponina com três subunidades: troponina C (cálcio), troponina I (inibitória) e troponina T (tropomiosina) unidas à proteína tropomiosina (Farah, Reinach, 1995; Gordon et al., 2000). Os filamentos grossos ancoram-se à proteína gigante titina, estendendo-se ao longo da linha M e disco Z (Vikhlyantsev, Podlubnaya, 2012). A titina possui várias funções: ajuda na centralização dos filamentos grossos no

sarcômero, contribui para a organização e montagem do sarcômero, participa da sinalização mecano-química e tem a função de proporcionar uma tensão mecânica passiva ao se estender em seu comprimento diante de uma força externa e voltar a seu tamanho original em seguida (Linke, Hamdani, 2014; Tskhovrebova, Trinick, 2003). A nebulina mantém os filamentos delgados na estrutura do músculo esquelético sendo importante na regulação destes filamentos e da contração muscular. Ela estende-se desde os discos Z até a ponta dos filamentos finos (Ottenheijm, Granzier, 2010). Também, ocorre união entre os filamentos finos e os discos Z (como exemplo, α -actinina), entre os discos Z e entre os discos Z e a membrana, núcleos e mitocôndrias por meio da desmina (Bär et al., 2004; Luther, 2009). A nebulina pode ser afetada por caspases e calpaínas na atrofia muscular, liberando os filamentos miofibrilares que podem ser degradados posteriormente pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Este sistema não degrada os componentes do sarcômero quando estes estão unidos (Du et al., 2004; Tidball, Spencer, 2002).

2.1.2 Contração muscular

A contração muscular ocorre quando o impulso nervoso chega à junção neuromuscular. O motoneurônio abre os canais de cálcio dependentes de voltagem permitindo a entrada desse íon no citoplasma. As vesículas do motoneurônio secretam então acetilcolina (Estrella, Naya, 2014). Esta liga-se a receptores nicotínicos na placa motora que se abrem na vigência do estímulo. Com isso, ocorre entrada do íon sódio e saída do íon potássio no sarcoplasma. Consequentemente, o interior da célula se torna mais positivo, despolarizando a fibra muscular e propagando o potencial elétrico. A acetilcolina, por meio da acetilcolinesterase, é logo degradada em acetil e colina, sendo recaptada pelo motoneurônio. A corrente elétrica estende-se até os túbulos T, que são invaginações da membrana sarcoplasmática. Nesta região, a despolarização da membrana estimula o receptor diidropiridina sensível à voltagem, o qual induz alteração conformacional no receptor de rianodina, fazendo com que este se abra e promova o extravasamento de cálcio do retículo sarcoplasmático ao citossol (Hopkins, 2006; Sipido et al., 2013). O cálcio liga-se à subunidade C (cálcio) do complexo troponina, acarretando no deslocamento da subunidade I (inibitória) que bloqueava o complexo. Este é unido à tropomiosina por meio da subunidade T (tropomiosina). A tropomiosina gira

deixando livre o sítio da actina no qual se liga a cabeça da miosina, permitindo a contração muscular (Bekyarova et al., 2008; Gokhin, Fowler, 2011; Gordon et al., 2000; Marzuca, 2012) que é dependente de ATP (Gordon et al., 2000; Holmes, Geeves, 2000; Shiroguchi et al., 2011). Realizada a contração, a bomba SERCA (do inglês, *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) realiza a recaptação do cálcio ao retículo sarcoplasmático (Hopkins, 2006).

2.2 Atrofia muscular

2.2.1 Vias de sinalização da atrofia muscular

A via Akt/mTOR/S6 está bastante envolvida na atrofia muscular pelo desuso (Bodine, 2013; Cannavino et al., 2014; Lloyd et al., 2014) (Figura 1). A via é estimulada quando o IGF1 (*insulin-like growth factor-I*) por meio da PI3K (*fosfatidilinositol 3 kinase*) ativa a Akt (*protein kinase B*). A Akt fosforila mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e este fosforila a p70S6K (*ribossomal protein 70-kDa S6 kinase*). Logo, p70S6K fosforila a proteína S6 (*ribosomal protein S6*) e esta regula o aumento do tamanho da fibra muscular. Na mesma via de sinalização, a Akt inibe a fosforilação de GSK3-beta (*glycogen synthase kinase 3-beta*) que deixa de inibir a eIF2b (*eukaryotic initiation factor 2B*) favorecendo também a síntese de proteínas no músculo esquelético. Na via de degradação de proteínas, FoxO (*forkhead box O*) ativa atrogina-1/MAFbx (*muscle atrophy F-box protein* [MAFbx]) e MuRF1 (*muscle RING finger 1*). A MuRF1 também pode ser ativada por NFκB (*nuclear factor kappa B*) resultando na degradação de proteínas do músculo esquelético e diminuição do tamanho da fibra muscular (Bonaldi, Sandri, 2013; Glass, 2005; Kandarian, Jackman, 2006; Marzuca, 2012; Poortmans, Carpentier, 2009; Sandri, 2008).

Figura 1 – Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas do músculo esquelético.

IGF1: insulin-like growth factor-I; **PI3K:** fosfatidilinositol 3 kinase; **Akt:** protein kinase B; **mTOR:** mammalian target of rapamycin; **p70S6K:** ribossomal protein 70-kDa S6 kinase; **S6:** ribossomal protein S6; **FoxO:** forkhead box O; **Atrogina-1/MAFbx:** muscle atrophy F-box protein [MAFbx]; **MuRF1:** muscle RING finger 1; **NFkB:** nuclear factor kB; **GSK3-beta:** glycogen synthase kinase 3-beta; **eIF2b:** eukaryotic initiation factor 2B.

2.2.2 Sistema proteolítico na atrofia muscular esquelética

Durante a atrofia por desuso, as calpaínas e o sistema proteassoma apresentam função importante na degradação das proteínas musculares (Furuno, Goldberg, 1986; Ikemoto et al., 2001; Purintrapiban et al., 2003), sendo o sistema proteassoma o principal mecanismo envolvido (Baehr et al., 2014; Goll et al., 2003; Tidball, Spencer, 2002). Uma vez que o sistema proteassoma não pode degradar o complexo actina-miosina quando unido (Tidball, Spencer, 2002), ele é primeiramente desestruturado do sarcômero pelas calpaínas e a via da caspase 3 (Du et al., 2004). Outro ativador da via das caspases e que leva à apoptose é o

TNF- α . Este também pode ativar MuRF pela via IKK (*I kappa B kinase*)/NF- κ B (Bonaldo, Sandri, 2013; Powers et al., 2007; Primeau et al., 2002; Sandri, 2002).

2.3 Modelo animal de atrofia muscular por desuso

O modelo de suspensão das patas traseiras (do inglês, *hindlimb suspension*) foi utilizado em vários estudos tais como: Bruusgaard et al., (2012); Feng et al., (2016); Guo et al., (2012); Hutchins-Wiese et al., (2012); Jackson et al., (2012); Maki et al., (2012); Pierno et al., (2012); Tanaka et al., (2013); Xu et al., (2012) e Yokoyama et al., (2016). A cauda do animal é presa a um dispositivo no teto da gaiola para produzir ausência de contato das patas traseiras com o solo, afetando os músculos daqueles membros pela ausência de carga mecânica. Trata-se de um modelo de atrofia muscular não inflamatório que mimetiza o desuso, por exemplo, por internação hospitalar ou voo espacial. Foi utilizado em roedores de diferentes idades, desde jovens a idosos (Adams et al., 2003; Alway et al., 2001; Marzuca, 2012; Nakamura et al., 2013; Siu et al., 2005; Thomason, Booth, 1990; Thomason et al., 1987). O emprego deste modelo teve início na década de 1970 (Morey-Holton, Globus, 2002) e continua até o momento (Cannavino et al., 2014; Ellman et al., 2013; Feng et al., 2016; Ito et al., 2013; Jang et al., 2015; Lawler et al., 2014; Wang et al., 2013). Há outros modelos para estudar atrofia muscular em animais tais como: denervação, imobilização e diabetes. Contudo, para simular situações de internação hospitalar, o modelo de suspensão é o mais apropriado. Os outros modelos mencionados apresentam limitações. A denervação causa atrofia, mas priva o músculo da sinalização nervosa, o que não ocorre na suspensão. A imobilização pode causar inchaço ou ulcerações do membro sem que estes possam ser prontamente observados pelo experimentador (Coutinho et al., 2002). No modelo de diabetes, ocorrem alterações sistêmicas que interferem nos resultados e a etiologia da atrofia é de causa específica.

2.4 Efeitos ergogênicos dos ácidos graxos

D'Antona et al., (2014), Turcotte e Abbott (2012) e Zhang et al., (2010) discutiram em revisões como o consumo de ácidos graxos e sua oxidação podem influenciar a resistência à insulina nos músculos esquelético e cardíaco e as

possível respostas positivas na atrofia muscular. Em estudos *in vivo* realizados em bovinos (Gingras et al., 2007), novilhos (Fortin et al., 2010), camundongos (Parra et al., 2012; Rahman et al., 2009a; Tuazon, Henderson, 2012), ratos (Kamolrat et al., 2013; You et al., 2010a,b), seres humanos jovens e idosos (Smith et al., 2011a,b, 2015; Thrush et al., 2007) e *in vitro* em células musculares C2C12 (Kamolrat, Gray, 2013; Lee et al., 2009; Lim et al., 2013a; Peng et al., 2012;) e L6 (Mohankumar et al., 2013), foi observado que os ácidos graxos (ômega-3, ômega-6, ácido linoleico conjugado e ácido oleico) modulam marcadores inflamatórios e a via de síntese ou degradação de proteínas do músculo esquelético, podendo diminuir a atrofia muscular. O tratamento com ácido graxo ômega-3 *in vivo* aumenta o conteúdo de proteínas de sinalização das vias associadas à síntese de proteínas musculares (Akt, mTOR, p70S6K) (Gingras et al., 2007; Kamolrat et al., 2013; Smith et al., 2011a,b; You et al., 2010a,b), diminui as de degradação (Atrogina-1/MAFbx e MuRF1) (You et al., 2010b) e regula marcadores relacionados à inflamação (IL-2 e TNF- α) (Malekshahi et al., 2012). Peng et al., (2012) mostraram, em mioblastos C2C12, que os ácidos docosaexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) diminuem a proliferação celular por meio de mecanismo envolvendo MAPK-ERK. Nosso grupo demonstrou que células musculares tratadas com ácido graxos ômega-3 (25, 50, 75 e 100 μ M) *in vitro* não apresentam mudanças significativas na proliferação e diferenciação (Pinheiro, 2012a). Em estudo não publicado, nosso grupo observou que o tratamento da cultura primária de células musculares com ácido oleico diminui a expressão de Hes-1, principal alvo da sinalização Notch, reduzindo a proliferação celular. Esse efeito envolve a ativação de p70S6K e a inibição da GSK3-beta e consequentemente maior estabilização da beta-catenina. Uma das funções da beta-catenina é aumentar a atividade transcricional dos fatores reguladores da miogênese e inibir a expressão de Hes-1 induzida pela ativação do Notch que inibe a expressão de MyoD (von Maltzahn et al., 2012). O tratamento de camundongos *mdx* distróficos com ácido linoleico por 20 dias melhora a força muscular sugerindo possível efeito trófico. Este pode envolver a ativação de células-tronco musculares e fusão destas com fibras musculares adultas, diferenciação em novas fibras musculares e possível aumento da síntese e/ou diminuição da degradação de proteínas no músculo esquelético.

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

1) Avaliar os efeitos do desuso das patas traseiras por duas semanas sobre as vias de sinalização de síntese e degradação de proteínas do músculo sóleo de ratos e determinar os efeitos da administração de óleos de peixe (ricos em EPA ou DHA) e 2) determinar as alterações induzidas pelo desuso por duas semanas nas vias de sinalização e degradação de proteínas no músculo sóleo de camundongos FAT-1.

3.1 Estratégias experimentais

1) Avaliar os efeitos da suspensão e da suplementação com óleos de peixe (ricos em EPA ou DHA) sobre os seguintes parâmetros em ratos (Protocolo Experimental 1 – PE1):

- variação da massa corporal, consumo alimentar e hídrico, comprimento do animal, massa muscular e dos depósitos de gordura;
- conteúdos de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) e das proteínas das vias de sinalização das MAPKs (ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, p38) no músculo sóleo;
- área transversa do músculo sóleo e da fibra muscular;
- massa seca e conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL);
- composição de ácidos graxos nos óleos de peixe e no músculo gastrocnêmio;
- atividades da catepsina L e proteassoma 26S e conteúdo das proteínas carboniladas no músculo sóleo;
- expressão das moléculas sinalizadoras das vias de síntese (Akt, mTOR, p70S6K, S6, 4EBP1, GSK3-beta) e degradação (atrofina-1/MAFbx, MuRF1, caspase 3) de proteínas no músculo sóleo.

2) Estudar a atrofia do músculo sóleo induzida por suspensão em camundongos *wild-type* e FAT-1 (Protocolo Experimental 2 – PE2):

- variação da massa corpórea, consumo alimentar e hídrico, comprimento do animal, massa muscular e massas dos depósitos de gordura;
- área transversa do músculo sóleo e da fibra muscular;
- massa seca e função contrátil: forças isotônica e isométrica (tetânica), velocidade de contração e relaxamento muscular e manutenção da força durante 10 contrações tetânicas sucessivas;
- composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio;
- atividades da catepsina L e proteassoma 26S e conteúdo das proteínas carboniladas no músculo sóleo;
- expressão de moléculas sinalizadoras envolvidas na síntese (Akt, S6, 4E-BP1, ERK1/2) e degradação (atrofina-1/MAFbx, MuRF1) de proteínas no músculo sóleo.

4 JUSTIFICATIVAS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO

Quando se utiliza o modelo animal de suspensão visando a investigar os músculos dos membros inferiores, observa-se diminuição da massa muscular e da área da fibra muscular nas extremidades traseiras, em maior proporção no sóleo que é um músculo antigravitatório. Verifica-se também diminuição da expressão de proteínas envolvidas na síntese proteica e aumento daquelas que participam da degradação de proteínas, resultando em atrofia do músculo esquelético. Essas alterações ocorrem principalmente em indivíduos que perdem carga mecânica em suas extremidades, como, por exemplo, pacientes acamados ou astronautas em voos espaciais. Várias estratégias estão sendo pesquisadas para diminuir a condição de atrofia mas ainda sem resultados satisfatórios. A importância clínica pode ser apreciada observando a quantidade de pacientes que sofrem atrofia muscular nas extremidades, principalmente inferiores, devido a alguma doença ou quando submetidos a uma intervenção cirúrgica. A perda de massa muscular que acompanha essas condições prolonga o período de tempo de internação hospitalar, causa dependência física e aumento dos custos de tratamento. Assim, há a necessidade de se estabelecer alternativas terapêuticas para reduzir a atrofia muscular causada pelo desuso.

Os ácidos graxos ômega-3 apresentam efeitos positivos na prevenção e tratamento de doenças crônicas tais como diabetes e doenças autoimunes. Resultados favoráveis da suplementação com óleo de peixe foram também relatados na atenuação da atrofia muscular por imobilização (You et al., 2010b). Apesar dessas observações, não foram realizados estudos para investigar os efeitos comparativos dos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a perda de massa muscular no modelo de suspensão e revisões sobre estratégias nutricionais para atenuar a atrofia muscular expõem esta falta de conhecimento (D'Antona et al., 2014; Magne et al., 2013; Wall, van Loon, 2013). A descoberta de suplementos nutricionais que podem reduzir a perda de massa muscular é de enorme aplicação clínica.

A maneira mais frequente de investigar o efeito do óleo de peixe é por meio da sua incorporação na dieta ou por suplementação oral. Contudo, em 2004, foi desenvolvida pelo grupo do Prof. Dr. Jiang X. Kang, uma linhagem de camundongos transgênicos (FAT-1) que produzem endogenamente ácidos graxos ômega-3 a partir

dos ácidos graxos ômega-6 consumidos na dieta. Utilizando técnica de manipulação genética, esses animais passaram a expressar a enzima delta 3 dessaturase obtida do *Caenorhabditis elegans*, que converte ácidos graxos ômega-6 em ômega-3 (Kang et al., 2004). Cromatografia gasosa da composição de ácidos graxos realizada nos tecidos desses camundongos indica aumento do conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3: ácido linolênico (18:3 n-3); ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3); ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5 n-3) e ácido docosaexaenóico (DHA, 22:6 n-3) em relação aos *wild-type* (Kang et al., 2004; Kang, 2007). A relação ácidos graxos ômega-6/ômega-3 foi determinada no músculo esquelético, coração, fígado, baço e cérebro, sendo consideravelmente baixa nos camundongos FAT-1 em relação aos *wild-type*. A razão entre os ácidos graxos ômega 6/ômega 3 nos *wild-type* é de ~20-30:1 e nos FAT-1 de 1:1 (Kang et al., 2001; Kang et al., 2004; Kang, 2007; Rahman et al., 2009b) quando ambos são suplementados com óleo de milho que é rico ácidos graxos ômega-6. O grupo do professor Kang descreveu que o músculo esquelético dos camundongos FAT-1 apresenta conteúdo mais elevado de EPA enquanto nós verificamos que o ácido graxo ômega-3 mais abundante é o DHA. Por outro lado, em outros tecidos, tais como pulmão e ósseo, o DHA é o ácido graxo ômega-3 mais abundante em camundongos FAT-1 conforme verificado por nós e outros pesquisadores (Bilal et al., 2011; Kang et al., 2004; Lau et al., 2009). Os animais FAT-1 foram utilizados em estudos sobre os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 em diversas condições experimentais tais como envelhecimento (Romanatto et al., 2014), diabetes (White et al., 2010; Bellenger et al., 2011), colite (Hudert et al., 2006), aterosclerose (Wan et al., 2010), hepatite (Schmöcker et al., 2007), pancreatite (Weylandt et al., 2008), câncer (Weylandt et al., 2011), tuberculose (Bonilla et al., 2010), osteoporose (Banu et al., 2010), lesão medular (Lim et al., 2013b) e lesão nervosa periférica (Gladman et al., 2012). Entretanto, a atrofia muscular induzida por suspensão ainda não foi avaliada nesses animais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

No Protocolo Experimental 1 (PE1) foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar e no Protocolo Experimental 2 (PE2) camundongos *wild type* C57BL/6 e transgênicos FAT-1. Os ratos foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e os camundongos do biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro/escuro de 12 horas cada, alimentação e água *ad libitum* (consumo registrado). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (24/13/CEUA).

5.2 Desenho experimental

No PE1, os ratos foram tratados a partir de 8 semanas de idade (Figura 2). Nos primeiros 3 dias, os animais foram colocados em gaiolas individuais para adaptação. Em seguida, procedeu-se a divisão dos grupos, sendo estes: grupo controle + suplementação com óleo mineral (COM; n=12); grupo controle + suplementação com óleo de peixe rico em EPA (CEPA; n=12); grupo controle + suplementação com óleo de peixe rico em DHA (CDHA; n=12); grupo suspensão + óleo mineral (SOM; n=12); grupo suspensão + óleo de peixe rico em EPA (SEPA; n=12); e grupo de suspensão + suplementação com óleo de peixe rico em DHA (SDHA; n=12). A suplementação com óleo mineral ou óleos de peixe foi realizada diariamente por gavagem na dose de 0,3 mL/100 gramas de massa corporal. O óleo mineral foi usado como controle uma vez que mimetiza a consistência do óleo de peixe e não apresenta toxicidade em baixas doses. A sua utilização como controle para a administração de óleos vegetais em animais foi recomendada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2013a) e pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (EFSA, 2009). Já foi utilizado como controle em estudos com células (Olaitan et al., 2011), ratos (Nunes et al., 2014; Xu et al., 1992), cachorros (FDA, 2013b) e humanos (Saneian et al., 2013). Os óleos de peixe usados, ricos em EPA (68% de EPA e 16% de DHA; razão EPA/DHA de 4,3:1) ou DHA (61% de DHA e

11% de EPA; razão EPA/DHA de 1:5,7) foram obtidos da empresa Naturalis® (Apêndice A). Considerando-se uma densidade do óleo de peixe de $0,92 \text{ g/cm}^3$, as doses em gramas foram: 1,88 mg de EPA e 0,44 mg de DHA por grama de massa corporal no óleo de peixe rico em EPA e 0,30 mg de EPA e 1,68 mg de DHA por grama de massa corporal no óleo de peixe rico em DHA. Os animais foram submetidos à suspensão a partir da terceira semana de suplementação. A suspensão foi mantida por duas semanas juntamente com a suplementação dos óleos. Ao final de quatro semanas, os animais foram anestesiados utilizando ketamina (90 mg/kg de massa corporal) e xilazina (10 mg/kg de massa corporal) via administração intraperitoneal. Os animais foram pesados e, em seguida, os músculos sóleos foram retirados e armazenados para avaliação histológica e molecular. Também foram retirados os músculos EDL, tibial anterior e gastrocnêmio, além dos depósitos de gordura (subcutâneo, epididimal, retroperitoneal e mesentérico) e sangue. Por fim, os ratos foram sacrificados por exsanguinação.

Figura 2 - Representação esquemática do Protocolo Experimental 1 (PE1).

C: controle; **S:** suspensão; **OM:** óleo mineral; **EPA:** ácido eicosapentaenóico; **DHA:** ácido docosaexaenóico; **COM:** controle suplementado com óleo mineral; **CEPA:** controle suplementado com óleo de peixe rico em EPA; **CDHA:** controle suplementado com óleo de peixe rico em EPA; **SOM:** grupo em suspensão suplementado com óleo mineral; **SEPA:** grupo em suspensão suplementado com óleo de peixe rico em EPA; **SDHA:** grupo em suspensão suplementado com óleo de peixe rico em DHA.

No Protocolo Experimental 2 (PE2), os camundongos foram avaliados por genotipagem a partir de 21 dias de idade (Apêndice B) para confirmar a linhagem C57BL/6 ou FAT-1. O experimento foi iniciado quando os animais tinham 8 semanas de idade (Figura 3). Nos primeiros 3 dias, os animais foram colocados em gaiolas individuais para adaptação. Em seguida, procedeu-se a divisão dos grupos, sendo estes: grupo C57BL/6 (C57BL/6; n=12); grupo C57BL/6 em suspensão (C57BL/6 S; n=12); grupo FAT-1 (FAT-1; n=12) e grupo FAT-1 em suspensão (FAT-1 S; n=12). Os animais foram mantidos em suspensão por 14 dias. Ao final do período de experimentação, os animais foram colocados em câmara de CO₂. Em seguida, foram pesados e os músculos sóleos retirados e armazenados para avaliação

molecular. Também foram retirados os músculos EDL, tibial anterior, plantar e gastrocnêmio, além dos depósitos de gorduras (subcutâneo, epididimal, retroperitoneal e mesentérico) e sangue. Por fim, os camundongos foram sacrificados por exsanguinação.

Figura 3 - Representação esquemática do Protocolo Experimental 2 (PE2).

S: suspensão.

5.3 Desuso dos músculos por suspensão das patas traseiras

A suspensão das patas traseiras (do inglês, *hindlimb suspension*) é um modelo experimental bem estabelecido para induzir atrofia nos músculos (Morey-Holten, Globus, 2002). Gaiolas especiais foram construídas para a utilização deste protocolo. Os animais do grupo suspensão foram submetidos ao protocolo não invasivo de desuso que consiste em prender a cauda em ganchos conectados a

cabos colocados no alto da caixa dos animais. O gancho permite que só as patas dianteiras do animal toquem o piso da caixa (30° de suspensão entre o piso e o corpo do animal) (Figura 4). A estrutura permite que os animais suspensos tenham liberdade para caminhar usando as patas dianteiras, permitindo a locomoção e obtenção de água e alimento livremente (Morey-Holten, Globus, 2002; Thomason et al., 1987).

Foram determinados os consumos de água e alimento e a massa corporal. Avaliou-se por observação, duas vezes por dia, o cor da cauda, aspecto do pelo e olhos dos animais para detecção de estresse. Conforme alguns autores (Pierno et al., 2007), cerca de 10% dos animais em suspensão das patas traseiras apresentam leve escurecimento da cauda. Ao ser observado algum indicador de dor ou desconforto dos animais, a suspensão foi interrompida. Cinco ratos no PE1 e um camundongo no PE2 foram descartados.

Figura 4 - Desuso muscular por suspensão das patas traseiras.

5.4 Análise gravimétrica do músculo esquelético

Os músculos retirados (sóleo, EDL, tibial anterior, plantar e gastrocnêmio), após o período de experimentação, tiveram a massa úmida determinada em balança de precisão. No PE1, uma porção dos músculos sóleo e EDL foi digerida em solução aquosa de KOH 1M, em banho seco a 75-80 °C por 30 minutos, e em

seguida centrifugado a 7.000 rpm, a 4 °C, por 5 min. Posteriormente, uma quantidade conhecida de amostra (150 µL) foi deixada durante 3 dias, a 60 °C, para evaporação do conteúdo de água. Após esse período, o músculo teve a massa seca determinada em balança de precisão. No PE2, foi determinada a massa seca em balança de precisão, após 3 dias, a 60 °C.

5.5 Estimulação elétrica *in situ* realizada no PE2

O protocolo de estimulação elétrica foi adaptado de Silveira et al., (2007) e Wojtaszewski et al., (1996) e realizado conforme Fortes et al., (2015), Pinheiro et al., (2012b) e Vitzel (2013). Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (90 mg/Kg de massa corpórea) e xilazina (10 mg/Kg de massa corpórea). A pele dos membros posteriores foi removida. Os músculos que não eram alvo da avaliação foram tenotomizados. O nervo ciático foi acessado e os membros foram fixados em plataforma de acrílico. O membro a ser estimulado foi posicionado na plataforma com a articulação do quadril e a articulação do joelho foram estabilizadas mecanicamente em ângulo de 130° aproximadamente. Uma haste metálica foi colocada sob o tendão do músculo a ser estimulado, conectando-o ao transdutor de força (Grass Technologies, West Warwick, Rhode Island, EUA). As contrações musculares foram induzidas por estimulação elétrica do nervo ciático com auxílio de um eletrodo de platina. O comprimento do músculo em repouso (L0) foi ajustado para obtenção da tensão máxima sob eletroestimulação usando o MultiStim System D330 (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, Reino Unido). Avaliou-se a força máxima, propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) e fadiga do músculo sóleo de camundongos. Os dados foram analisados utilizando os softwares AqAnalysis e AqDados (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda., Brasil).

5.6 Análise da força muscular máxima, propriedades contráteis e fadiga no PE2

O estímulo para produção de contrações isotônicas consistiu de um pulso elétrico de 500 µs de duração e frequência de 1 Hz. A voltagem foi ajustada para induzir a produção de força máxima. Uma série de 6 contrações foi realizada e usada para determinar a força isotônica absoluta máxima, o tempo de contração

(TTP – time to peak – tempo entre o início do desenvolvimento de força até a tensão máxima durante a contração), tempo de relaxamento (HRT – half relaxation time – tempo entre a tensão máxima e a redução de 50% da força durante o relaxamento) e o tempo de relaxamento tardio (LRT – late relaxation time – tempo de relaxamento muscular entre 50% e 25% da tensão máxima) Pinheiro et al., (2012b) e Vitzel (2013).

O estímulo para produção de contrações tetânicas (isométricas) consistiu de um pulso de 500 μ s de duração e frequência de 100 Hz. A voltagem foi ajustada para induzir a produção de força máxima. Foi realizada uma série de 10 contrações tetânicas com uma duração de 1 segundo cada e foram realizadas em intervalos de 10 segundos entre elas. Estas contrações foram utilizadas para estimar a queda relativa de força em comparação à força tetânica máxima inicial. A área sob a curva do gráfico gerado pela força *versus* o número de contrações foi utilizada para o cálculo do índice de fadiga. As forças isotônica e tetânica específicas foram obtidas através da normalização da força absoluta pelo peso seco do músculo Pinheiro et al., (2012b) e Vitzel (2013).

5.7 Extração lipídica e determinação da composição de ácidos graxos no óleo de peixe e no músculo gastrocnêmio por cromatografia gasosa

Os métodos AOAC 996,06 (AOAC, 2005) e Ce 1j-07 (AOAC, 2007) com o ácido graxo C13:0 como padrão no lugar de C11:0 foram usados. A composição de ácidos graxos foi determinada no cromatógrafo à gás GC 2010 plus equipado com um injetor de amostra automatizado (AOC 20i), *flame ionization detector*, GC solution software (Shimadzu Co, Kyoto, Japan), e uma coluna cromatográfica de sílica fundida SP2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0,25 mm de diâmetro interno (Supelco Park, Bellefonte, PA, USA). A composição dos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA está expressa como porcentagem dos ácidos graxos totais de três determinações. A composição dos ácidos graxos no músculo gastrocnêmio foi expressa como g/100 g de tecido úmido (AOAC, 2005, 2007).

5.8 Determinação das atividades da estearoil-CoA dessaturase (SCD-1) e elongase e da via de lipogênese *de novo* (DNL) no músculo gastrocnêmio

As atividades das enzimas SCD-1 e elongase e da via de lipogênese *de novo* no músculo gastrocnêmio foram estimadas a partir da razão entre ácidos graxos: SCD-1 (16:1n-7/16:0 e 18:1n-9/18:0); elongase (18:0/16:0) e DNL (16:0/18:2n-6).

5.9 Determinação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA no soro e no músculo sóleo realizada no PE1

O sangue foi coletado sem anticoagulante e o soro obtido após centrifugação a 1.500 rpm por 40 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para determinação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. O músculo sóleo foi homogeneizado em solução tampão para extração de proteínas (1% SDS, 100 mM de Tris pH 7,4) contendo inibidores de proteases e fosfatases (100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 100 mM de ortovanadato de sódio e uma concentração final de 2 μ g/mL de aprotinina e leupeptina). O homogenato foi incubado a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado à 1.000 g, por 10 minutos, para remoção do material insolúvel. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para determinação das citocinas. As determinações de citocinas no soro e no homogenato do músculo sóleo foram realizadas por ELISA utilizando-se kits DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

5.10 Conteúdo de glicogênio muscular no PE1

O conteúdo de glicogênio foi determinado utilizando método descrito por Keppler e Decker (1974) e Hirabara et al., (2003). Os músculos sóleo e EDL foram retirados, colocados em tubos de ensaio contendo 1M de solução aquosa de KOH (1 mg de tecido para 20 μ L de solução de KOH) e mantidos em banho-maria a 75-80 °C por 30 minutos para a digestão do tecido. Em seguida, foram centrifugados a 7.000 rpm e 4 °C por 5 min. Alíquotas de 300 μ L de cada amostra foram pipetadas em tubos de 2 mL contendo solução aquosa de sulfato de sódio saturada (100 μ L de amostra para 40 μ L de sulfato) e etanol absoluto (100 μ L de amostra por 300 μ L de etanol), incubadas a 30 °C por 2 horas e centrifugadas a 2.000 rpm e 4 °C por 20

minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi deixado por 3 dias na estufa para a secagem completa. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de água destilada. Cem μ L de amostra foram transferidos para um novo tubo de 2 mL contendo 500 μ L do tampão acetato e amiloglicosidase (500-800 U/mL). Por fim, os tubos foram colocados em banho-maria, a 37 °C, por 2 horas e centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos. As concentrações de glicose foram determinadas utilizando-se o kit Glicose Liquiform (Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

5.11 Análise histológica

A preparação das lâminas foi realizada a partir de cortes seriados na porção central do músculo sóleo de acordo com Bodine e Baar (2012) e utilizada em estudo prévio do grupo (Abreu et al., 2016). Após a obtenção dos tecidos, os músculos foram emblocados em OCT (*Optimal Cutting Temperature* – OCT, 4583, Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, EUA) e mantidos em nitrogênio líquido. Os cortes foram realizados transversalmente ao músculo (10 μ m), utilizando criostato (Leica CM 3050, Wetzlar, Alemanha). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise da área transversa do músculo e das fibras musculares. Para a área transversa do músculo sóleo, fotografias foram obtidas, por quatro vezes, utilizando microscópio óptico (Nikon Eclipse E1000, Fukuoka, Japão) e uma câmera acoplada a este (Nixon DXM 1200, Japão). Em seguida, foram agrupadas utilizando o programa Adobe Photoshop CS (version 8.0.1, Adobe System, Inc., Seattle, EUA, 2003) e as imagens analisadas usando o programa AxionVision (version 4.8.1.0, Carl Zeiss Imaging Solutions). Para a determinação das áreas transversas das fibras musculares, fotografias foram obtidas em aumento de dez vezes utilizando o mesmo microscópio óptico e câmera acoplada. No PE1 foram obtidas cinco fotografias por músculo e as imagens foram analisadas utilizando o programa AxionVision. Foram mensuradas as áreas de 30 fibras musculares em cada fotografia, totalizando 150 fibras por músculo. No PE2, foram obtidas três fotografias e mensuradas 50 fibras musculares em cada uma, totalizando a mesma quantidade de fibras que no PE1 (150 fibras por músculo).

5.12 Atividade da catepsina L

A atividade da catepsina L foi avaliada utilizando o *Cathepsin L Activity Assay* Kit (ABCAM – ab65306), de acordo com as recomendações do fabricante e a metodologia descrita por Jannig et al., (2014). Utiliza-se o substrato preferencial de catepsina-L FR conjugado ao AFC (amino-4-trifluorometil cumarina). Células que apresentam atividade de catepsina L clivam o substrato FR-AFC, liberando AFC, cuja fluorescência é avaliada de acordo com as instruções do fabricante. O tampão utilizado no ensaio continha todos os reagentes para uma avaliação eficiente da atividade da catepsina L (D-manitol 210 mM; sacarose 70 mM; MOPS 5 mM e EDTA 1 mM, pH 7,4). Após 1-2 h de incubação a 37 °C, foi realizada a análise fluorimétrica baseada na detecção da clivagem do substrato FR-AFC. Quando o substrato é clivado pela catepsina L, ao ser excitado por um comprimento de onda de 400 nm, o AFC livre emite fluorescência verde-amarela em 505 nm que pode ser quantificada utilizando uma placa opaca de 96 poços e um fluorímetro (BioTek Synergy BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). As mudanças na atividade da catepsina L podem ser determinadas pela comparação dos resultados das amostras tratadas e o controle negativo (Cathepsin L inhibitor) sendo expressas como unidades relativas de fluorescência (UFR).

5.13 Atividade do proteassoma 26S

A atividade do proteassoma no sítio da quimiotripsina da porção 26S foi avaliada por ensaio fluorimétrico, utilizando o substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (LLVY-AMC, Enzo Life Sciences, item #P802-0005, Farmingdale, NY, EUA), conforme descrito por Cunha et al., (2012). O tampão utilizado no ensaio continha os seguintes reagentes: D-manitol 210 mM; sacarose 70 mM; MOPS 5 mM e EDTA 1 mM (pH 7,4). A atividade da peptidase foi determinada pela liberação do grupo AMC (amido-4-metilcumarina), após degradação detectada em fluorímetro (excitação à 350 nm e emissão à 440 nm) na ausência e presença de epoxomicina (20 mM), inibidor específico do proteassoma. A diferença entre os dois valores foi atribuída à atividade do proteassoma (Cunha et al., 2012).

5.14 Conteúdo de proteínas carboniladas

Amostras de músculos congelados foram homogeneizadas em tampão contendo 210 mM de D-manitol, 70 mM sacarose, 5 mM MOPS, 1 mM EDTA e 2% 2-mercaptoetanol, pH 7,4. Os grupos carbonilo nas cadeias laterais de proteínas foram derivatizados com 2,4-dinitrofenilidrazona (DNP-hidrazona) pela reação com 2,4- dinitrofenilidrazina (DNPH). Foi realizada centrifugação por 15 min a 10.000 rpm, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para determinação das proteínas citossólicas pelo método de Bradford (1976), usando curva padrão de albumina. Para cada amostra, 50 µg de proteína foram colocados em gel de poliacrilamida a 10%. As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, por 120 min a 100 V. Para confirmar a transferência das amostras nos *blots* das membranas foi utilizada solução de Ponceau S *staining* (Fortes et al., 2016; Gilda, Gomes, 2013; Romero-Calvo et al., 2010). As membranas foram incubadas em uma solução de bloqueio (contendo 5% de BSA, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, e 0,1% Tween 20, pH 7,6), por 2 horas, sendo incubadas por uma noite a 4 °C com anticorpos específicos para as proteínas carboniladas. As proteínas carboniladas foram analisadas pela determinação dos grupos carbonil utilizando o *OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit* (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit S7150, Milipore, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A ligação do anticorpo primário foi detectada com o uso do anticorpo secundário conjugado com peroxidase de coelho em solução basal contendo 1% de BSA à temperatura ambiente. A aquisição das imagens foi realizada pelo sistema de detecção Amersham Imager 600 (Amersham/GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA). As bandas foram quantificadas com auxílio do *software ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

5.15 Determinação das proteínas Akt, mTOR, p70S6K, S6, 4EBP1, atrogina 1/MAFbx, MuRF1, caspase 3, GSK3-BETA, ERK 1, ERK 2, JNK 1, JNK 2 e p38 por *western blotting*

Os músculos foram homogeneizados em solução tampão para extração de proteínas contendo ácido diaminoetanotetraacético (EDTA) a 10 mM, Tris-Base 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL. As amostras foram então sonicadas por 30 segundos, a 4 °C, tratadas com 1% de Triton-X100 e centrifugadas a 13.000 rpm, a 4 °C, por 20 minutos. O conteúdo total de proteínas do sobrenadante de cada amostra foi estimado pelo método de Bradford (1976). Quantidades iguais de proteínas das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com Shapiro et al., (1967). Em seguida, foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979) e tiveram os sítios de ligação inespecíficos bloqueados por 1 hora de incubação com leite em pó desnatado a 5% ou solução de BSA a 5%. A membrana foi então incubada com os anticorpos primários de interesse por 12 horas, a 4 °C, e posteriormente incubada por 1 hora a 4 °C com anticorpo secundário (IgG, *anti-mouse* ou *anti-rabbit*) conjugado com peroxidase (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, EUA). Após tratamento com o reagente de detecção ECL (Amersham/GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, EUA), as imagens foram captadas pelo sistema de detecção Mchembis (Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel) e quantificadas com auxílio do *software ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). Os resultados foram normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*Ponceau S*) (Apêndice C) (Fortes et al., 2016; Gilda, Gomes, 2013; Romero-Calvo et al., 2010), uma vez que as proteínas constitutivas (β -actina, α -tubulina, γ -tubulina, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e ciclo-oxigenase (COX) IV comumente utilizadas foram moduladas pela suspensão das patas traseiras. Os resultados foram expressos em valores relativos ao grupo COM. Um “*pool*”, composto por quantidades iguais de amostras de todos os grupos experimentais, foi usado para a normalização entre as diferentes membranas.

Os anticorpos primários utilizados no PE1 e no PE2 foram: p-Akt em Ser 473 (9271), Akt (9272), p-S6 em Ser 240/244 (5364), S6 (2217), p-4EBP1 em Thr 37/46 (2855), 4EBP1 (9644), p-GSK3-beta em Ser 9 (9323), GSK3-beta (9315), p-ERK em

Thr 202/Tyr 204(9101), ERK (4695), Caspase 3 (9662) da *Cell Signaling Technology* (Beverly, Massachusetts, EUA) e atrogina-1 (AP2041), MURF1 (MP3401) da *ECM Biosciences* (ECM Biosciences, Versailles, KY, EUA). Os anticorpos primários utilizados só no PE1 foram: p-mTOR em Ser 2448 (2971), mTOR (2983), p-p70S6K em Thr 389 (9205), p70S6K (2708), p-JNK (9251), JNK (9252), p-p38 em Thr 180/Tyr 182 (9216) e p38 (9212) da *Cell Signaling Technology* (Beverly, Massachusetts, EUA).

5.16 Avaliação do Índice de Sinalização de Síntese e Degradação de Proteínas (ISSDP)

O ISSDP foi calculado da seguinte forma: $[p\text{-Akt} + p\text{-S6} + p\text{-GSK3B} + p\text{-4EBP1}] / [\text{atrogin-1} + \text{MuRF1}]$.

5.17 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® (versão 4,01; El Camino Real, CA, EUA, 2007). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e por análise de variância (ANOVA *two way*) seguida pelo pós-teste de Bonferroni (para comparação entre três ou mais grupos). Os dados foram analisados e considerados *outliers* conforme *Grubbs' test-GraphPad Software* (graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm). As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS A. Protocolo Experimental 1 (PE1)

6.1 Consumos hídrico e alimentar e variação da massa corporal

Não houve diferença significativa nos consumos hídrico e alimentar avaliados semanalmente nos seis grupos de experimentação (Figura 5).

Figura 5 - (A) Variação do consumo hídrico durante as quatro semanas de experimentação e **(B)** Variação do consumo alimentar durante as quatro semanas de experimentação.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=9-12$). As comparações foram realizadas utilizando-se ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **COM**: controle óleo mineral; **SOM**: suspensão óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico.

A massa corporal foi determinada semanalmente nos seis grupos de experimentação no PE1, havendo diferenças significativas na primeira semana entre os grupos CDHA vs SDHA e CEPA vs CDHA ($p<0,05$), na terceira semana entre os grupos SOM vs SDHA ($p<0,05$); COM vs SOM, CDHA vs SDHA ($p<0,01$); CEPA vs SEPA ($p<0,001$) e na quarta semana entre SOM vs SDHA ($p<0,05$); COM vs CDHA ($p<0,01$) e entre COM vs SOM; CEPA vs SEPA; CDHA vs SDHA ($p<0,001$). Na análise feita entre o início e a primeira semana, houve diferença no grupo SDHA ($p<0,01$) e nos grupos COM; SOM; CEPA; SEPA ($p<0,001$) e entre o início e as semanas 2, 3 e 4 em todos os grupos estudados ($p<0,001$) (Figura 6).

Figura 6 – Variação de massa corporal durante as quatro semanas de experimentação.

SEMANA 1	
CDHA vs SDHA; CEPA vs CDHA	p<0,05
SEMANA 3	
SOM vs SDHA	p<0,05
COM vs SOM; CDHA vs SDHA	p<0,01
CEPA vs SEPA	p<0,001
SEMANA 4	
SOM vs SDHA	p<0,05
COM vs CDHA	p<0,01
COM vs SOM; CEPA vs SEPA; CDHA vs SDHA	p<0,001

INÍCIO vs SEMANA 1	
SDHA	p<0,01
COM; SOM; CEPA; SEPA	p<0,001
INÍCIO vs SEMANAS 2, 3, 4	
COM; SOM; CEPA; SEPA; CDHA; SDHA	p<0,001

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=10-12). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA two way com *post hoc* teste de Bonferroni. **COM**: controle óleo mineral; **SOM**: suspensão óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico.

O comprimento final dos animais apresentou diferença significativa entre os grupos em suspensão e seus respectivos controles ($p < 0,001$) (Figura 7).

Figura 7 - Comprimento final dos ratos após quatro semanas de experimentação.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=9-12$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico.

6.2 Massas corporal, muscular e dos depósitos de gordura

Os ratos tinham massa corporal inicial não significativamente diferente entre os grupos. A massa corporal final, após quatro semanas de experimentação, foi significativamente diferente entre os grupos submetidos à suspensão e os seus controles respectivos ($p < 0,001$). A diferença entre a massa corporal inicial e final foi significativamente modificada pelas condições experimentais estudadas. A porcentagem de ganho de massa corporal foi de 78,31% para o COM; 48,50% SOM; 67,43% para CEPA; 40,36% para SEPA; 61,16% para CDHA e 32,66% para SDHA (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela dos resultados das massas corporal total, muscular e dos depósitos de gordura no protocolo experimental 1 (PE1).

Protocolo Experimental 1	COM	SOM	CEPA	SEPA	CDHA	SDHA
Massa total						
Massa corporal inicial, g	198,7±4,5	202,9±6,3	201,4±10,3	199,7±6,6	200,8±5,7	207,3±4,0
Δ massa corporal, g	155,6±8,3	91,8±7,0 ^c	135,8±6,1	80,37±5,4 ^c	122,8±7,7 ^y	68,71±4,2 ^{cx}
% ganho de massa corporal	78,31	48,50	67,43	40,36	61,16	32,66
Músculo sóleo						
Massa úmida, mg	128,1±2,4	69,2±4,0	125,7±3,7	60,3±2,5	120,3±1,8	59,6±3,5
Sóleo (mg)/tibia (mm)	3,562±0,6	1,8±0,1 ^c	3,508±0,1	1,73±0,1 ^c	3,342±0,0	1,690±0,1 ^c
% diminuição		49,61		50,63		49,43
Músculo gastrocnêmio						
Massa úmida, mg	2081±50,3	1529±47,7	1984±51,9	1394±34,6	1915±59,2	1415±43,0
Gastrocnêmio (mg)/tibia (mm)	57,9±1,3	42,41±1,1 ^c	55,3±1,1	40,03±1,1 ^c	51,9±1,0 ^y	40±0,1 ^c
% diminuição		26,70		27,67		22,96
Músculo tibial anterior						
Massa úmida, mg	684,5±19,5	598,7±27,4	646,7±26,4	517,4±19,0	651,4±25,4	525,3±16,1
Tibial anterior (mg)/tibia (mm)	19,0±0,5	16,6±0,7 ^a	18,1±0,7	14,9±0,6 ^c	18,4±0,6	14,8±0,4 ^c
% diminuição		12,87		17,67		19,39
Músculo EDL						
Massa úmida, mg	152,7±3,6	127,9±2,4	141,6±4,7	118,6±2,9	143,6±3,8	114,8±4,5
EDL (mg)/tibia (mm)	4,2±0,1	3,5±0,1 ^c	3,951±0,1	3,4±0,1 ^b	4,0±0,1	3,3±0,1 ^c
% diminuição		18,82		13,79		18,46
Gordura subcutânea						
Massa úmida, g	4080±498,8	3202±281,4	4304±392,1	2831±379,3	3869±157,0	2850±439,1
Subcutânea (g)/CR (cm)	188,3±20,1	154,3±13,0	198,4±17,4	137,5±17,9	177±9,1	138,9±21,4
% diminuição		18,06		30,70		21,53
Gordura epididimal						
Massa úmida, g	2960±296,3	2940±221,2	2789±312,3	2240±147,9	2983±113,4	1974±272,6
Epididimal (g)/CR (cm)	125,4±4,231	141,5±9,6	130,0±14,70	108,9±6,7	136,3±5,7	93,1±15 ^{ay}
% diminuição		0		16,23		31,69
Gordura retroperitoneal						
Massa úmida, g	1970±358,3	1899±252,3	2433±300,2	1094±184,2	2075±247,9	1013±231,1
Retroperitoneal (g)/CR (cm)	90,8±15,3	91,3±11,6	112,1±13,6	53±8,8 ^{bx}	95,1±12,5	49,3±11,2 ^{ax}
% diminuição		0		52,63		48,20
Gordura mesentérica						
Massa úmida, g	3918±374,9	3346±297,2	4683±551,8	2865±315,5	3943±215,2	2732±261,9
Mesentérica (g)/CR (cm)	181,2±14,7	160,9±13,2	215,0±22,6	139,2±15 ^b	180,7±12,9	132,9±12,2
% diminuição		11,20		35,26		26,45

Os dados estão apresentados como média ± EPM (pelo menos 7 animais em cada grupo). A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA two way com post hoc teste de Bonferroni (sempre nos dados normalizados e não nos dados absolutos ou em porcentagem). **COM:** controle óleo mineral; **SOM:** suspensão óleo mineral; **CEPA:** controle eicosapentaenóico; **SEPA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **CDHA:** controle suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **SDHA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **CR:** comprimento rato. a p<0,05; b p<0,01; c p<0,001: diferenças significativas entre os grupos suspensão e seus respectivos controles. x p<0,05; y p<0,01; z p<0,001: diferenças significativas entre os grupos suplementados com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA *versus* o suplementado com óleo mineral. Δ: diferença entre valores final e inicial.

A massa úmida dos músculos sóleo, EDL, tibial anterior e gastrocnêmio foi reduzida após a suspensão (Tabela 1). A massa dos quatro músculos mencionados anteriormente foi normalizada pelo comprimento da tibia, observando-se diferenças significativas em todos os músculos estudados. A redução da massa do músculo sóleo induzida por suspensão foi de 49,61% para o grupo suplementado com OM, 50,63% para o grupo com suplementação de óleo de peixe rico em EPA e de

49,43% para a suplementação com óleo de peixe rico em DHA. Para o músculo gastrocnêmio, foi de 26,70% para o grupo suplementado com OM, 27,67% para o óleo de peixe rico em EPA e 22,96% para o óleo de peixe rico em DHA. Para o músculo tibial anterior, 12,87% para o suplementado com OM, 17,67% para o óleo de peixe rico em EPA e 19,39% para o óleo de peixe rico em DHA. Por último, para o músculo EDL, a redução de massa foi de 18,82% para o grupo suplementado com OM, 13,79% para o óleo de peixe rico em EPA e 18,46% para o óleo de peixe rico em DHA (Tabela 1).

A massa seca foi determinada nos músculos sóleo e EDL no PE1. No músculo sóleo, houve diferenças significativas nos grupos suspensão quando comparados a seus respectivos controles ($p < 0,001$) e entre os grupos CEPA vs CDHA ($p < 0,05$) (Figura 8A). No músculo EDL, houve diferença entre os grupos COM vs SOM e CEPA vs SEPA ($p < 0,05$); também entre CDHA e SDHA ($p < 0,001$) e COM vs CDHA ($p < 0,05$) (Figura 8B).

Figura 8 - (A) Massa seca do músculo sóleo pelo comprimento da tíbia e **(B)** Massa seca do músculo EDL pelo comprimento da tíbia.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (7-8). A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico. **EDL**: extensor digital longo.

As massas úmidas dos depósitos de gordura subcutâneo, epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram reduzidas após a suspensão, com exceção dos depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal nos grupos suplementados com óleo mineral (Tabela 1). A massa dos quatro depósitos de gordura mencionados anteriormente foi normalizada pelo comprimento do rato, observando-se diferenças significativas em alguns depósitos de gordura com o *post hoc* teste de Bonferroni. Embora não tenha sido observada diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indica diminuição significativa na gordura subcutânea ($p < 0,01$) em decorrência da suspensão. A porcentagem de redução por suspensão na massa de gordura subcutânea foi de 18,06% para o grupo suplementado com OM, 30,70% para o grupo com suplementação com óleo de peixe rico em EPA e de 21,53% para a suplementação com óleo de peixe rico em DHA. Para o depósito de gordura epididimal, não houve diminuição no grupo suplementado com OM, contudo, ocorreu diminuição de 16,23% para o óleo de peixe rico em EPA e de 31,69% naquele rico em DHA. Para a gordura retroperitoneal, não houve redução no suplementado com OM, mas ocorreu redução de 52,63% no suplementado com óleo de peixe rico em EPA e de 48,20% no óleo de peixe rico em DHA. Por último, para a gordura mesentérica, a diminuição foi de 11,20% para o grupo suplementado com OM, 35,26% para o grupo suplementado com óleo de peixe rico em EPA e 26,45% para o óleo de peixe rico em DHA (Tabela 1).

6.3 Composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio no PE1

A composição de ácidos graxos saturados (ácidos mirístico, palmítico, esteárico, eicosanóico e docosanóico) e ácidos graxos monoinsaturados (ácidos hexadecenóico, heptadecenóico, oleico, vacênico eicosenóico, nervônico) não variou significativamente (Tabela 2). A composição de ácidos graxos ômega-6 (ácidos linoleico, γ -linolênico, eicosatrienóico, araquidônico, docosapentaenóico) diminuiu (COM: 19,4%; SOM: 14,04%; CEPA: 10,92%; SEPA: 9,36%; CDHA: 10,73%; SDHA: 10,0%) e dos ácidos graxos ômega-3 (ácidos α -linolênico, eicosapentaenóico, docosapentaenóico, docosaexaenóico) aumentou (COM: 5,02%; SOM: 3,42%; CEPA: 7,46%; SEPA: 7,27%; CDHA: 7,84%; SDHA: 7,53%) nos grupos suplementados com óleo de peixe rico em EPA ou rico em DHA. A porcentagem de diminuição dos ácidos graxos ômega-6 (OM: 27,65%; EPA:

14,29%; DHA: 6,74%) e dos ácidos graxos ômega-3 (OM: 31,82%; EPA: 2,55%; DHA: 3,88%) induzida pela suspensão foi mais pronunciada nos grupos suplementados com os óleos de peixe. A composição de alguns ácidos graxos foi diferente entre os grupos: ácido esteárico (COM vs SOM; COM vs CEPA, $p<0,05$; COM vs CDHA, $p<0,01$), ácido vacênico (COM vs CEPA; COM vs CDHA, $p<0,05$), ácido araquidônico (COM vs SOM, $p<0,01$; COM vs CEPA, COM vs CDHA, SOM vs SEPA, SOM vs SDHA, $p<0,001$) e ácido docosaexaenóico (COM vs CEPA, $p<0,05$; SOM vs SEPA, $p<0,01$; COM vs CDHA; SOM vs SDHA, $p<0,001$). A razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3 foi também diferente entre os grupos: COM vs CEPA; COM vs CDHA; SOM vs SEPA and SOM vs SDHA, $p<0,001$).

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos expressos em g/100g do peso úmido do músculo gastrocnêmio fresco no PE1.

Fórmula	Nome	COM	SOM	CEPA	SEPA	CDHA	SDHA
14 : 0	Mirístico	—	—	—	—	—	—
16 : 0	Palmitico	0,241 ± 0,067	0,182 ± 0,041	0,187 ± 0,040	0,160 ± 0,008	0,179 ± 0,020	0,176 ± 0,028
16 : 1 (n-7)	Hexadecenóico	—	0,009 ± 0,006	0,007 ± 0,006	—	0,006 ± 0,005	0,008 ± 0,007
17 : 0	Margárico	—	—	0,004 ± 0,004	—	—	—
17 : 1 (n-7)	Heptadecenóico	—	—	—	—	—	—
18 : 0	Esteárico	0,158 ± 0,028	0,112 ± 0,008 ^a	0,114 ± 0,018 ^x	0,112 ± 0,011	0,105 ± 0,019 ^y	0,102 ± 0,009
18 : 1 (n-9)	Oleico	0,153 ± 0,082	0,108 ± 0,054	0,112 ± 0,027	0,080 ± 0,021	0,099 ± 0,014	0,097 ± 0,016
18 : 1 (n-7)	Vacênico	0,032 ± 0,007	0,024 ± 0,007	0,021 ± 0,005 ^x	0,020 ± 0,002	0,022 ± 0,001 ^x	0,021 ± 0,003
18 : 2 (n-6)	Linoleico	0,332 ± 0,142	0,220 ± 0,086	0,208 ± 0,067	0,160 ± 0,009	0,201 ± 0,039	0,183 ± 0,026
20 : 0	Eicosanóico	—	—	—	—	—	—
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	—	—	—	—	—	—
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	—	—	—	—	0,001 ± 0,000	—
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,040 ± 0,034	0,009 ± 0,005	0,006 ± 0,006	—	0,015 ± 0,012	0,005 ± 0,004
22 : 0	Docosanóico	0,025 ± 0,0024	—	—	—	—	—
20 : 2	Eicosadienóico	—	—	—	0,002 ± 0,002	—	—
20 : 3 (n-6)	Eicosatrienóico	—	—	—	—	—	—
20 : 4 (n-6)	Araquidênico	0,165 ± 0,015	0,136 ± 0,003 ^b	0,079 ± 0,009 ^z	0,081 ± 0,011 ^z	0,076 ± 0,008 ^z	0,074 ± 0,007 ^z
20 : 5 (n-3)	Eicosapentaenóico	—	—	—	0,022 ± 0,003	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,002
24 : 1 (n-9)	Nervônico	0,018 ± 0,013	0,002 ± 0,002	—	0,006 ± 0,002	0,007 ± 0,007	0,003 ± 0,003
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,014 ± 0,003	0,013 ± 0,001	—	0,003 ± 0,003	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	0,021 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,034 ± 0,006	0,031 ± 0,002	0,011 ± 0,002	0,010 ± 0,002
22 : 6 (n-3)	Docosahexaenóico	0,071 ± 0,010	0,064 ± 0,003	0,126 ± 0,018 ^x	0,138 ± 0,027 ^y	0,173 ± 0,034 ^z	0,176 ± 0,026 ^z
Total	Saturado	0,424 ± 0,111	0,295 ± 0,046	0,305 ± 0,056	0,277 ± 0,017	0,284 ± 0,034 ^x	0,279 ± 0,035
	Monoinsaturado	0,203 ± 0,099	0,143 ± 0,065	0,140 ± 0,037	0,107 ± 0,025	0,133 ± 0,011	0,129 ± 0,028
	Poliinsaturado	0,642 ± 0,188	0,459 ± 0,097	0,483 ± 0,113	0,437 ± 0,043	0,488 ± 0,081	0,461 ± 0,066
	Ômega-6	0,511 ± 0,152	0,369 ± 0,088	0,287 ± 0,076 ^x	0,247 ± 0,013	0,283 ± 0,044 ^x	0,263 ± 0,034
	Ômega-3	0,132 ± 0,038	0,090 ± 0,009	0,196 ± 0,037	0,191 ± 0,030 ^y	0,206 ± 0,042 ^x	0,198 ± 0,033 ^y
Ômega-6/Ômega-3		3,896 ± 0,380	4,054 ± 0,534	1,446 ± 0,122 ^z	1,306 ± 0,134 ^z	1,392 ± 0,176 ^z	1,336 ± 0,071 ^z
% gordura		1,360 ± 0,419	0,963 ± 0,223	0,991 ± 0,220	0,878 ± 0,047	0,969 ± 0,128	0,929 ± 0,131

A determinação de gordura foi calculada, a partir do triglicerídeo do ácido tridecanóico, que foi utilizado como padrão interno. Os dados estão apresentados como média ± DS, n=3 amostras por grupo. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA two way com post hoc teste de Bonferroni. **COM:** controle óleo mineral; **SOM:** suspensão óleo mineral; **CEPA:** controle eicosapentaenóico; **SEPA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **CDHA:** controle suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **SDHA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **n-3:** ômega-3; **n-6:** ômega-6; **n-7:** ômega-7; **n-9:** ômega-9; — : não detectado. a p<0,05; b p<0,01; c p<0,001: diferenças significativas entre os grupos suspensão e seus respectivos controles. x p<0,05; y p<0,01; z p<0,001: diferenças significativas entre os grupos suplementados com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA versus o suplementado com óleo mineral.

6.4 Atividades das enzimas SCD-1 e elongase e lipogênese *de novo* (DNL) no músculo gastrocnêmio

As atividades enzimáticas (SCD-1 e elongase) não variaram significativamente (Tabela 3). Na atividade de DNL, embora não ocorreu diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indicou aumento significativo ($p < 0,05$) em decorrência da suspensão (Tabela 3).

Tabela 3 - Determinação das atividades enzimáticas (SCD-1 e elongase) e da lipogênese *de novo* (DNL) no músculo gastrocnêmio.

Nome	COM	SOM	CEPA	SEPA	CDHA	SDHA
SCD-1 (16:1n-7/16:0)	—	0.05±0.01	0.03±0.02	—	0.03±0.02	0.04±0.02
SCD-1 (18:1n-9/18:0)	0.93±0.23	0.96±0.24	0.98±0.07	0.73±0.15	0.96±0.12	0.95±0.11
Elongase (18:0/16:0)	0.67±0.05	0.63±0.06	0.62±0.03	0.70±0.02	0.59±0.06	0.59±0.05
DNL (16:0/18:2n-6)	0.76±0.07	0.86±0.07	0.93±0.0	1.00±0.04	0.90±0.04	0.96±0.02

A determinação de gordura foi calculada, a partir do triglicerídeo do ácido tridecanóico, que foi utilizado como padrão interno. Os dados estão apresentados como média $\pm$ DS, n=3 amostras por grupo. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA two way com post hoc teste de Bonferroni. **COM:** controle óleo mineral; **SOM:** suspensão óleo mineral; **CEPA:** controle eicosapentaenóico; **SEPA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido eicosapentaenóico; **CDHA:** controle suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **SDHA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico ácido docosaexaenóico; **SCD-1:** esteroil-CoA dessaturase-1/palmitoil-CoA dessaturase; **DNL:** lipogênese *de novo*; — : não detectado.

6.5 Conteúdo de glicogênio muscular

O conteúdo de glicogênio foi determinado nos músculos sóleo e EDL. Foi observada uma diminuição significativa entre os grupos COM e SOM ($p < 0,001$) no músculo EDL (Figura 9).

Figura 9 - Conteúdo de glicogênio (em mg por g de tecido fresco) nos músculos **(A)** sóleo e **(B)** EDL.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-9$). As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico.

6.6 Conteúdos de citocinas no músculo sóleo

As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 ficaram abaixo do limite de detecção no soro. No músculo sóleo, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 10). Esses resultados confirmam que o modelo utilizado no estudo não está associado ao desenvolvimento de processo inflamatório.

Figura 10 - Conteúdos de citocinas no músculo sóleo: **(A)** TNF- α , **(B)** IL-1 β , **(C)** IL-6 e **(D)** IL-10.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=5-10$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico.

6.7 Avaliação da área transversa do músculo e da fibra muscular no sóleo

A redução da área de secção transversa muscular (ASTM) induzida pela suspensão foi de 57,03% para o grupo suplementado com óleo mineral; 51,41% para o grupo suplementado com óleo de peixe rico em EPA e 55,32% para o grupo suplementado com óleo de peixe rico em DHA (Figura 11).

Figura 11 - Área de secção transversa do músculo sóleo.

A)

B)

A): Imagens histológicas representativas com coloração de hematoxilina eosina da área transversa do músculo sóleo; **A:** controle suplementado com óleo mineral; **B:** suspensão suplementado com óleo mineral; **C:** controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **D:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **E:** controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **F:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico. A barra representa 100 μm .

B): Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=5-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **ASTM:** área de secção transversa muscular; **OM:** suplementado com óleo mineral; **EPA:** suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **DHA:** suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

A redução da área de secção transversa da fibra muscular (ASTFM) induzida por suspensão foi de 60,59% para o grupo suplementado com óleo mineral, 56,94% para o grupo suplementado com óleo de peixe rico em EPA e 57,51% para o grupo suplementado com óleo de peixe rico em DHA (Figuras 12 e 13). Este efeito, avaliado quantitativamente pelo intervalo de confiança de 95% da mediana (Figura 13B), foi confirmado pela análise qualitativa da proporção de fibras em diferentes intervalos da ASTFM (Figura 13C). A distribuição de freqüência (Figura 13C) foi calculada e expressa conforme também realizada por outros (Baehr et al., 2011; Callahan et al., 2014; Ge et al., 2011; Kulakowski et al., 2011; Pistilli et al., 2011; Watson et al., 2011). Esta é uma forma alternativa para ilustrar a tendência dos resultados individuais representados na Figura 14B. A suplementação com óleo de peixe aumenta o número de fibras no intervalo de 1000 μm^2 em 140% aproximadamente. Por outro lado, no intervalo de 800 μm^2 , a suplementação com ambos óleos de peixe após a suspensão resultou em redução no número de fibras de 25% aproximadamente quando comparado com o grupo suplementado com óleo mineral (Figura 13C).

Figura 12 – Imagens histológicas representativas da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo corada com hematoxilina e eosina: (A) aumento de 10x e (B) aumento de 20x.

A.

B.

(A): Imagens histológicas representativas com coloração de hematoxilina eosina da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo no PE1 obtidas com aumento de 10x; **a:** controle suplementado com óleo mineral; **b:** suspensão suplementado com óleo mineral; **c:** controle com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **d:** suspensão com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **e:** controle com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **f:** suspensão com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico. A barra representa 50 µm.

(B): Imagens histológicas representativas com coloração hematoxilina eosina da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo no PE1 obtidas com aumento de 20x; **a:** controle suplementado com óleo mineral; **b:** suspensão suplementado com óleo mineral; **c:** controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **d:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **e:** controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **f:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico. A barra representa 100 µm.

Figura 13 - Área de secção transversa da fibra do músculo sóleo.

(A) Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=750-1199$). (B) Os dados estão apresentados como histograma e mediana. (C) Distribuição das fibras musculares no sóleo de acordo com as variações das áreas das fibras musculares do dóleo: 0-2800 μm^2 . Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **ASTFM**: área de secção transversa da fibra muscular; **OM**: óleo mineral; **EPA**: eicosapentaenóico; **DHA**: docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: Suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico. Ω : diferença entre os grupos.

6.8 Avaliação da atividade da catepsina L e do proteassoma 26S

Não houve diferença significativa na atividade da catepsina L (Figura 14A). Na atividade do proteassoma 26S, embora não ocorreu diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indicou aumento significativo ($p < 0,05$) em decorrência da suspensão (Figura 14B).

Figura 14 - Atividades de **(A)** catepsina L e **(B)** proteassoma 26S no músculo sóleo.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral.

6.9 Avaliação das proteínas totais

A quantidade de proteína total nos músculos sóleo e EDL foi determinada e normalizada por grama de tecido fresco. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15).

Figura 15 – Conteúdos de proteínas totais (mg/g de tecido fresco) nos músculos **(A)** sóleo e **(B)** EDL.

Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=7-8). Foi utilizada para a análise estatística: ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **EDL**: extensor digital largo; **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenoico.

6.10 Conteúdos das proteínas carboniladas

Foram avaliados os conteúdos das proteínas carboniladas (Figura 16). Houve diferença significativa entre COM e SOM ($p<0,01$), COM e CEPA ($p<0,01$) e COM e CDHA ($p<0,01$), no pós-teste, e a análise por ANOVA *two-way* indicou diminuição significativa ($p<0,05$) em decorrência da suspensão (Figura 16A).

Figura 16 - (A) Conteúdo de proteínas carboniladas e **(B)** Imagens representativas das bandas obtidas por ensaio de *western blotting* das proteínas carboniladas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

6.11 Avaliação das proteínas envolvidas na síntese de proteínas musculares: Akt, mTOR, p70S6K, S6, 4EBP1 e GSK3-beta por *western blotting*

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-Akt, Akt total e a razão entre p-Akt/Akt total (Figura 17). Houve diferença significativa no conteúdo da proteína p-Akt entre COM e SOM ($p<0,01$) e entre CDHA e SDHA ($p<0,01$) (Figura 17A).

Figura 17 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-Akt, **(B)** Akt total, **(C)** p-Akt/Akt total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Também foram avaliados os conteúdos da proteína p-mTOR e mTOR total e a razão entre p-mTOR/mTOR total, não havendo diferença significativa (Figura 18).

Figura 18 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-mTOR, **(B)** mTOR total, **(C)** p-mTOR/mTOR total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=7-8). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Os conteúdos das proteínas p70S6K fosforilada e total e a razão entre elas foram avaliados (Figura 19). Houve diferença significativa no conteúdo da proteína p70S6K total entre COM e SOM ($p<0,01$) e entre CDHA e SDHA ($p<0,001$) (Figura 19A). Na relação p-p70S6K/p70S6K total, houve diferença entre COM e SOM ($p<0,05$) e entre CDHA e SDHA ($p<0,01$) (Figura 19C).

Figura 19 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-p70S6K, **(B)** p70S6K total, **(C)** p-p70S6K/p70S6K total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Em relação aos conteúdos das proteínas p-S6 e S6 total e a razão entre p-S6/S6 total (Figura 20), observou-se diferença significativa no conteúdo de proteína p-S6 entre COM vs SOM ($p<0,01$); entre CEPA vs SEPA ($p<0,05$) e entre CDHA vs SDHA ($p<0,01$) (Figura 20A). Embora não haja diferença no pós-teste, a análise por *two-way* ANOVA indica diminuição significativa no conteúdo de S6 total e a razão p-S6/S6 total ($p<0,01$) em decorrência da suspensão (Figuras 20B e 20C).

Figura 20 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-S6K, **(B)** S6 total, **(C)** razão p-S6/S6 total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-4EBP1 e 4EBP1 total e a razão entre p-4EBP1/4EBP1 total (Figura 21), existindo diferença significativa no conteúdo da proteína p-4EBP1 entre COM vs SOM ($p < 0,05$) (Figura 21A).

Figura 21 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-4EBP1, **(B)** 4EBP1 total, **(C)** p-4EBP1/4EBP1 total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-GSK3-beta e GSK3-beta total e a razão entre p-GSK3-beta/GSK3-beta total (Figura 22). Houve diferença significativa no conteúdo da proteína p-GSK3-beta entre CDHA vs SDHA ($p < 0,05$) (Figura 22A) e no conteúdo GSK3-beta total entre os grupos suspensão e seus respectivos controles ($p < 0,05$) (Figura 22B).

Figura 22 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-GSK3-beta, **(B)** GSK3-beta total, **(C)** p-GSK3-beta/GSK3-beta total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

6.12 Avaliação das proteínas envolvidas na degradação de proteínas musculares: MuRF1, atrogina-1/MAFbx e caspase 3 por *western Blotting*

Foram avaliados os conteúdos das proteínas MuRF1, atrogina-1/MAFbx e caspase 3 (Figura 23). Embora não tenha havido diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indica aumento significativo no conteúdo de MuRF1 ($p<0,05$), atrogina-1/MAFbx ($p<0,01$) e caspase 3 ($p<0,01$) em decorrência da suspensão (Figura 23).

Figura 23 - Conteúdos das proteínas no músculo sóleo: **(A)** MuRF1, **(B)** atrogina-1/MAFbx e **(C)** caspase 3 e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

6.13 Avaliação das proteínas envolvidas na via das MAPKs: ERK1, ERK2, JNK1, JNK2 e p38 por *western blotting*

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-ERK1, p-ERK2, ERK1 total, ERK2 total, razão entre p-ERK1/ERK1 total e p-ERK 2/ERK 2 (Figura 24), existindo diferença significativa nos conteúdos das proteínas p-ERK 1 entre CDHA vs SDHA ($p<0,05$) (Figura 24A); p-ERK 2 entre COM vs SOM e CDHA vs SDHA ($p<0,05$) (Figura 24B); ERK 1 total entre COM vs SOM ($p<0,05$) (Figura 24C); ERK 2 total entre COM vs SOM e CDHA vs SDHA ($p<0,05$) (Figura 24D).

Figura 24 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-ERK 1, **(B)** p-ERK 2, **(C)** ERK 1 total, **(D)** ERK 2 total, **(E)** p-ERK 1/ERK 1 total, e **(F)** p-ERK 2/ERK 2 total e **(G)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como media $\pm$ EPM (n=7-8). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Os conteúdos das proteínas p-JNK 1, p-JNK 2, JNK1 total, JNK 2 total, razão entre p-JNK 1/JNK 1 total e p-JNK 2/JNK 2 foram determinados (Figura 25). Embora não tenha sido observada diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indica aumento significativo na razão p-JNK 2/JNK 2 total ($p < 0,05$) em decorrência da suspensão (Figura 25F).

Figura 25 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-JNK 1, **(B)** p-JNK 2, **(C)** JNK 1 total, **(D)** JNK 2 total, **(E)** p-JNK 1/JNK 1 total e **(F)** p-JNK 2/JNK 2 total e **(G)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como media $\pm$ EPM (n=6-8). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-p38 e p38 total e a razão entre p-p38/p38 total (Figura 26). Embora não haja diferença no pós-teste, a análise por *two-way* ANOVA indica uma diminuição significativa no conteúdo da p38 total ($p < 0,05$) em decorrência da suspensão (Figura 26B).

Figura 26 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-p38, **(B)** p38 total e **(C)** p-p38/p38 total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM**: óleo mineral; **EPA**: ácido eicosapentaenóico; **DHA**: ácido docosaexaenóico; **COM**: controle suplementado com óleo mineral; **SOM**: suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA**: controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA**: suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico.

6.14 Avaliação do Índice de sinalização de síntese e degradação proteica (ISSDP) no PE1

O ISSDP foi calculado da seguinte forma: $[p\text{-Akt} + p\text{-S6} + p\text{-GSK3B} + p\text{-4EBP1}] / [\text{atrogin-1} + \text{MuRF1}]$. Os valores foram: $1,59 \pm 0,19$ no COM; $0,86 \pm 0,10$ no SOM; $1,67 \pm 0,16$ no CEPA; $0,96 \pm 0,12$ no SEPA; $1,78 \pm 0,25$ no CDHA; $1,04 \pm 0,12$ no SDHA. HS diminuiu o ISSDP em aproximadamente 46% no OM ($p < 0,05$), 43% no óleo de peixe rico em EPA ($p < 0,05$) e 42% no óleo de peixe rico em DHA ($p < 0,01$).

B. Protocolo Experimental 2 (PE2)

6.15 Consumos hídrico e alimentar e variação da massa corporal

Foram avaliados os consumos hídrico e alimentar nos três dias antes do início do período de experimentação e após 4, 7, 11 e 14 dias de suspensão. Houve diferença no consumo hídrico nos dias 4 (C57BL/6 vs C57BL/6 S; $p < 0,01$ e FAT-1 vs FAT-1 S; $p < 0,001$) e 7 (FAT-1 vs FAT-1 S; $p < 0,05$) nos grupos em suspensão *versus* seus respectivos controles. No consumo alimentar, houve diferença significativa somente no dia 4 (C57BL/6 vs C57BL/6 S; $p < 0,01$ e FAT-1 vs FAT-1 S; $p < 0,001$) na mesma condição descrita anteriormente (Figura 27).

Figura 27 - (A) Variação do consumo hídrico durante as duas semanas de suspensão e **(B)** Variação do consumo alimentar durante as duas semanas de suspensão.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. S: suspensão. *: diferenças significativas.

A massa corporal foi determinada nos dias -3, 0, 4, 7, 11, 14 do período em suspensão, existindo diferença significativa no dia 11 entre os grupos C67BL/6 e C67BL/6 S ($p < 0,05$) (Figura 28).

Figura 28 - Variação de massa corporal durante as duas semanas de experimentação.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão. * $p < 0,05$ (C67BL/6 vs C67BL/6 S).

O comprimento final dos animais não apresentou diferença significativa (Figura 29).

Figura 29 - Comprimento final do camundongo após duas semanas de suspensão.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni.

6.16 Massas corporal, muscular e dos depósitos de gordura

Os animais apresentaram massa corporal inicial não significativamente diferente entre os grupos. A massa corporal final, após duas semanas de experimentação, foi significativamente diferente entre os grupos C57BL/6 e C57BL/6 S. A diferença entre as massas corporais inicial e final foi modificada nas condições experimentais estudadas. A porcentagem de ganho de massa corporal foi de 6,86% para o C57BL/6 e 5,67% para FAT-1 (Tabela 4). Na vigência da suspensão ocorreu perda de massa corporal nos dois grupos; -3,17% no C57BL/6 S e -7,04% para FAT-1 S.

Tabela 4 - Tabela dos resultados das massas corporal total, muscular e dos depósitos de gordura no protocolo experimental 2 (PE2).

Protocolo Experimental 2	C57BL/6	C57BL/6 S	FAT-1	FAT-1 S
Massa total				
Massa corporal inicial, g	22,9±0,6	23±0,5	22,4±0,4	24±0,7
Δ massa corporal, g	1,6±0,3	-0,7±0,3 ^b	1,3±0,4	-1,7±0,8 ^c
% ganho de massa corporal	6,86	-3,17	5,67	-7,04
Músculo sóleo				
Massa úmida, mg	8±0,3	4,6±0,2	7,9±0,3	5,6±0,4
Sóleo úmido (mg)/tibia (mm)	0,5±0,02	0,3± 0,01 ^c	0,4± 0,01	0,3± 0,02 ^{cx}
% diminuição		42,85		29,11
Massa seca, mg	2,6±0,2	1,9±0,2	2,7±0,3	2,4±0,2
Sóleo seco (mg)/tibia (mm)	0,1±0,01	0,1±0,01 ^a	0,2±0,02	0,1±0,01
% diminuição		25,66		10,19
Músculo gastrocnêmio				
Massa úmida, mg	120,1±2,5	93±2,6	117,8±4,2	94,4±3,9
Gastrocnêmio úmido (mg)/tibia (mm)	6,9±0,2	5,3±0,1 ^c	6,6±0,2	5,5±0,2 ^c
% diminuição		23,26		17,18
Massa seca, mg	29,3±0,9	22,6±0,8	29,2±1,3	23,6±1,6
Gastrocnêmio seco (mg)/tibia (mm)	1,7±0,04	1,3±0,05 ^c	1,6±0,06	1,4±0,06 ^b
% diminuição		22,66		19,04
Músculo plantar				
Massa úmida, mg	16,0±0,5	12,2±0,6	16,1±0,4	14,2±0,6
Plantar úmido (mg)/tibia (mm)	0,9±0,03	0,7±0,03 ^c	0,9±0,03	0,8±0,03 ^{cy}
% diminuição		22,26		14,27
Massa seca, mg	3,8±0,1	3±0,1	4,1±0,2	3,3±0,2
Plantar seco (mg)/tibia (mm)	0,22±0,01	0,17±0,01 ^b	0,23±0,01	0,19±0,01 ^b
% diminuição		22,86		20,56
Músculo tibial anterior				
Massa úmida, mg	39,3±1,2	32,4±1,1	41,8±1,7	34,3±1,3
Tibial anterior úmida (mg)/tibia (mm)	2,2±0,1	1,9±0,1 ^c	2,4±0,1	1,9±0,1 ^b
% diminuição		17,81		17,75
Massa seca, mg	11±0,2	9,7±0,4	11,4±0,6	9,3±0,4
Tibial anterior seco (mg)/tibia (mm)	0,6±0,01	0,5±0,02	0,6±0,03	0,5±0,02 ^a
% diminuição		12,24		18,16
Músculo EDL				
Massa úmida, mg	8,4±0,4	7,6±0,4	9,6±0,3	8,3±0,3
EDL úmido (mg)/tibia (mm)	0,47±0,02	0,43±0,02	0,54±0,02 ^x	0,46± 0,02 ^a
% diminuição		8,85		9,05
Massa seca, mg	2,5±0,2	2,1±0,1	2,4±0,1	2,2±0,1
EDL seco (mg)/tibia (mm)	0,14±0,01	0,12±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01
% diminuição		14,7		7,7
Gordura subcutânea				
Massa úmida, g	0,217±0,02	0,218±0,03	0,201±0,01	0,178±0,02
Subcutânea (g)/CC (cm)	0,022±0,002	0,023±0,002	0,021±0,001	0,019±0,002
% diminuição		0		11,98
Gordura epididimal				
Massa úmida, g	0,253±0,01	0,149±0,008	0,190±0,01	0,107±0,01
Epididimal (g)/CC (cm)	0,026±0,001	0,015±0,00 ^c	0,020±0,001 ^y	0,01± 0,001 ^c
% diminuição		41,40		43,69
Gordura retroperitoneal				
Massa úmida, g	0,066±0,008	0,072±0,007	0,064±0,004	0,044±0,005
Retroperitoneal (g)/CC (cm)	0,007±0,001	0,007±0,001	0,007±0,000	0,005±0,001 ^x
% diminuição		0		32,21
Gordura mesentérica				
Massa úmida, g	0,167±0,03	0,13±0,02	0,15±0,03	0,125±0,03
Mesentérica (g)/CC (cm)	0,017±0,002	0,013±0,002	0,015±0,003	0,013±0,003
% diminuição		22,43		16,67

Os dados estão apresentados como média ± EPM (pelo menos 7 animais em cada grupo). A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA two way com post hoc teste de Bonferroni (sempre nos dados normalizados e não nos dados absolutos ou em porcentagem). **S**: suspensão; **CC**: comprimento do camundongo. a p<0,05; b p<0,01; c p<0,001: diferenças significativas entre os grupos em suspensão e seus respectivos controles; x p<0,05; y p<0,01: diferenças entre FAT-1 *versus* seu respectivo controle C57BL/6. Δ: diferença entre valores final e inicial.

A massa úmida dos músculos sóleo, gastrocnêmio, plantar, tibial anterior e EDL foram diminuídas após a suspensão (Tabela 4). A massa úmida dos cinco músculos mencionados anteriormente foi normalizada pelo comprimento da tibia, observando-se diferenças significativas em alguns músculos com o *post hoc* teste de Bonferroni. Embora sem diferença no pós-teste, a análise por *two-way* ANOVA indica diminuição significativa nos músculos tibial anterior e EDL ($p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente) em decorrência da suspensão. A porcentagem de redução induzida por suspensão no músculo sóleo foi de 39% para o grupo C57BL/6S e de 38% para o grupo FAT-1S; para o músculo gastrocnêmio foi de 18% para C57BL/6S e de 21% para FAT-1S; no músculo plantar foi de 12% para C57BL/6S e de 15% para FAT-1S e para o músculo tibial anterior foi de 10% para C57BL/6S e de 9% para FAT-1S. Por último, para o músculo EDL, foi de 9% para ambos C57BL/6S e FAT-1S (Tabela 2). A massa seca dos cinco músculos mencionados anteriormente também foi avaliada e normalizada pelo comprimento da tibia, observando-se diferenças significativas em alguns músculos com o *post hoc* teste de Bonferroni (Tabela 2). A porcentagem de redução por suspensão no músculo sóleo foi de 26% para o grupo C57BL/6S e de 10% para o grupo FAT-1S; para o músculo gastrocnêmio foi de 23% para C57BL/6S e de 19% para FAT-1S; no músculo plantar foi de 23% para C57BL/6S e de 21% para FAT-1S e para o músculo tibial anterior foi de 12% para C57BL/6S e de 18% para FAT-1S. Por último, para o músculo EDL, foi de 15% para C57BL/6S e de 8% para FAT-1S (Tabela 4).

A massa dos depósitos de gordura subcutânea, epididimal, retroperitoneal e mesentérico foi reduzida após a suspensão em alguns casos (Tabela 4). A massa dos quatro depósitos de gordura mencionados anteriormente foi normalizada pelo comprimento do camundongo. Observou-se diferenças significativas em alguns depósitos de gorduras com o *post hoc* teste de Bonferroni. Embora sem diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indicou diminuição significativa na gordura mesentérica ($p < 0,05$) em decorrência da suspensão. A porcentagem de redução por suspensão na gordura subcutânea não foi significativamente diferente para o grupo C57BL/6S mas foi de 12% para o grupo FAT-1S. Para a gordura epididimal foi de 41% para C57BL/6S e de 44% para FAT-1S. Para a gordura retroperitoneal foi significativamente diferente só para o grupo FAT-1S (32% de diminuição). Por último, para a gordura mesentérica, foi de 22% para C57BL/6S e de 17% para FAT-1S (Tabela 4).

6.17 Função contrátil muscular

Não houve diferença significativa entre os grupos antes da suspensão em todos os parâmetros avaliados.

6.17.1 Força isotônica

A redução da força isotônica absoluta induzida pela suspensão foi de 29% para o grupo C57BL/6 e de 17% para o grupo FAT-1. Houve alteração significativa na força absoluta específica pela suspensão no grupo C57BL/6 ($p<0,01$) (Figura 30A). Na força isotônica específica do músculo sóleo não houve diferença significativa entre os grupos e do efeito da suspensão (Figura 30B).

Figura 30 – Força isotônica absoluta e específica do músculo sóleo.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-10$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni.

6.17.2 Força tetânica

A redução da força tetânica absoluta induzida pela suspensão foi de 18% para o grupo C57BL/6 e 21% para o grupo FAT-1. Embora não tenha sido observada diferença no pós-teste, a análise por ANOVA *two-way* indica diminuição significativa na força tetânica absoluta ($p < 0,01$) em decorrência da suspensão (Figura 31A). Na força tetânica específica do músculo sóleo não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 31B).

Figura 31 – Força tetânica absoluta e específica do músculo sóleo.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-10$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni.

6.17.3 Propriedades contráteis

O músculo sóleo dos grupos estudados não apresentou alteração no tempo de contração (caracterizado por TTP) (Figura 32A), no HRT (associado ao tempo de relaxamento muscular) (Figura 32B) e no tempo de relaxamento tardio (caracterizado por LRT) (Figura 32C).

Figura 32 – Propriedades contráteis do músculo sóleo: **(A)** tempo de contração muscular, caracterizado pelo parâmetro TTP, **(B)** parâmetro HRT, associado ao tempo de relaxamento muscular e **(C)** tempo de relaxamento tardio, caracterizado pelo parâmetro LRT.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-10$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **TTP**: *time to peak*; **HRT**: *half relaxation time*; **LRT**: *late relaxation time*.

6.17.4 Fadiga

Os camundongos do grupo FAT-1S apresentaram maior resistência à fadiga quando observamos a diminuição da força no tempo (não houve diferença estatística) (Figura 33A). Não houve diferença significativa no índice de fadiga do músculo sóleo, estimado pela área sob a curva do gráfico “força *versus* nº de contrações” (Figura 33B). Ao comparar a inclinação da curva de fadiga entre a contração 6 e 10, os camundongos FAT-1 apresentaram maior resistência à fadiga em relação aos C57BL/6. Os valores foram: $-1,13 \pm 0,21$ para C57BL/6; $-1,04 \pm 0,24$ para C57BL/6 HS; $-0,44 \pm 0,35$ para Fat-1; $-0,65 \pm 0,28$ para Fat-1 HS (Figura 33C).

Figura 33 – Fadiga do músculo sóleo: **(A)** Redução da força durante 10 contrações tetânicas sucessivas, **(B)** Índice de fadiga (área sob a curva “força *versus* no de contrações”) e **(C)** Índice de fadiga (inclinação da curva “força *versus* 6 até 10 contrações”)

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=6-10). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

6.18 Composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio

A composição de ácidos graxos saturados (ácidos mirístico, palmítico, esteárico, eicosanóico e docosanóico) e monoinsaturados (ácidos hexadecenóico, oleico, vacênico, eicosenóico, nervônico) não variou ao comparar os camundongos C57BL/6 vs FAT-1 (Tabela 5). A composição de ácidos graxos ômega-6 (ácidos linoleico, γ -linolênico, eicosadienóico, araquidônico, docosadienóico, docosapentaenóico) diminuíram significativamente nos camundongos FAT-1 quando comparados aos C57BL/6 e dos ácidos graxos ômega-3 (ácidos α -linolênico, eicosapentaenóico, docosatetraenóico, docosapentaenóico, docosaexaenóico) aumentaram no camundongo FAT-1 quando comparado ao C57BL/6 e foi significativamente mais elevado no grupo FAT-1S. A composição de alguns ácidos graxos foi diferente entre os grupos: ácido hexadecenóico (FAT-1 vs FAT-1S, $p < 0,001$), ácido araquidônico (C57BL/6 vs FAT-1, $p < 0,001$; C57BL/6 S vs FAT-1 S, $p < 0,0001$) e o ácido docosapentaenóico (C57BL/6 vs FAT-1, $p < 0,001$; C57BL/6 S vs FAT-1 S, $p < 0,0001$). A razão ômega-6/ômega-3 diminuiu significativamente nos camundongos FAT-1 quando comparados aos C57BL/6.

Tabela 5 - Composição de ácidos graxos expressos em g/100g do peso úmido do músculo gastrocnêmio no PE2.

Fórmula	Nome	C57BL/6	C57BL/6S	FAT-1	FAT-1S
14 : 0	Mirístico	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
16 : 0	Palmítico	0,29 ± 0,04	0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,10	0,30 ± 0,03
16 : 1 (n-7)	Hexadecenóico	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01 ^c
17 : 0	Margárico	—	—	—	—
18 : 0	Estearíco	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,05	0,13 ± 0,01
18 : 1 (n-9)	Oleico	0,18 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,07	0,18 ± 0,04
18 : 1 (n-11)	Vacênico	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00
18 : 2 (n-6)	Linoleico	0,25 ± 0,07	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,09	0,24 ± 0,04
20 : 0	Eicosanóico	—	—	—	—
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	—	—	—	—
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	—	—	—	—
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
22 : 0	Docosanóico	—	—	—	—
20 : 2 (n-6)	Eicosadienóico	0,01 ± 0,00	—	—	—
20 : 3 (n-9)	Eicosatrienóico	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	—	—
20 : 4 (n-6)	Araquidônico	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,01 ^z	0,01 ± 0,00 ^z
22 : 2 (n-6)	Docosadienóico	—	—	—	—
20 : 5 (n-3)	Eicosapentaenóico	—	—	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01
22 : 4 (n-3)	Docosatetraenóico	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	—	—
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	—	—
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,02 ^z	0,06 ± 0,01 ^z
22 : 6 (n-3)	Docosahexaenóico	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,07	0,21 ± 0,03
Totais	Saturados	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,03	0,35 ± 0,16	0,44 ± 0,04
	Monoinsaturados	0,25 ± 0,08	0,23 ± 0,06	0,18 ± 0,09	0,27 ± 0,06
	Polinsaturados	0,59 ± 0,11	0,57 ± 0,08	0,45 ± 0,20	0,56 ± 0,06
	ômega-3	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,10	0,31 ± 0,04 ^{ay}
	ômega-6	0,42 ± 0,08	0,39 ± 0,04	0,23 ± 0,10 ^z	0,25 ± 0,04 ^y
	ômega-6/ ômega-3	2,62 ± 0,39	2,11 ± 0,27 ^b	1,14 ± 0,27 ^z	0,79 ± 0,11 ^z
% gordura		1,37 ± 0,25	1,32 ± 0,17	1,25 ± 0,10	1,37 ± 0,16

A determinação de gordura foi calculada, a partir do triglicerídeo do ácido tridecanóico, que foi utilizado como padrão interno. Os dados estão apresentados como média ± EPM, n=6-7 por grupo. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA two way com post hoc teste de Bonferroni. **S**: suspensão; **n-3**: ômega-3; **n-6**: ômega-6; **n-7**: ômega-7; **n-9**: ômega-9; **n-11**: ômega-11; — : não detectado. a p<0,05; b p<0,01; c p<0,001: diferenças significativas entre os grupos suspensão e seus respectivos controles. x p<0,05; y p<0,01; z p<0,001: diferenças significativas entre os grupos utilizando camundongos FAT-1 *versus* os grupos utilizando camundongos *wild type* (C57BL/6).

6.19 Atividades das enzimas (SCD-1 e elongase) e da via lipogênese *de novo* (DNL) no músculo gastrocnêmio.

Houve aumento significativo induzido pela suspensão nos camundongos FAT-1 das atividades de SCD-1 (16:1n-7/16:0) e DNL ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) e redução significativa da atividade da elongase ($p<0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação das atividades das enzimas (SCD-1 e elongase) e da via lipogênese *de novo* (DNL) no músculo gastrocnêmio.

Name	C57BL/6	C57BL/6S	Fat-1	Fat-1S
SCD-1 (16:1n-7/16:0)	0.12±0.03	0.15±0.04	0.09±0.04	0.16±0.02 ^b
SCD-1 (18:1n-9/18:0)	1.12±0.19	1.14±0.30	1.23±0.41	1.40±0.12
Elongase (18:0/16:0)	0.52±0.13	0.50±0.03	0.51±0.04	0.44±0.03 ^a
DNL (16:0/18:2n-6)	1.20±0.22	1.42±0.13	1.13±0.11	1.30±0.12 ^a

A determinação de gordura foi calculada, a partir do triglicerídeo do ácido tridecanóico, que foi utilizado como padrão interno. Os dados estão apresentados como média ± DS, n=3 amostras por grupo. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. a $p<0,05$; b $p<0,01$: diferenças significativas entre os grupos suspensão e seus respectivos controles. **HS**: suspensão das patas traseiras; **SCD-1**: *stearoyl-CoA desaturase-1/palmitoyl-CoA desaturase*; **DNL**: *de novo* lipogenesis.

6.20 Avaliação da área transversa do músculo e da fibra muscular no sóleo

A redução da área de secção transversa muscular (ASTM) induzida pela suspensão foi de 36% para o grupo C57BL/6S ($p<0,05$) e 28% para o grupo FAT-1S (Figura 34). Houve diminuição significativa na ASTM do músculo sóleo pela suspensão no grupo C57BL/6 ($p<0,05$) (Figura 34B).

Figura 34 - Área de secção transversa do músculo sóleo.

A)

B)

A): Imagens histológicas representativas com coloração de hematoxilina eosina da área transversa do músculo sóleo no PE2; **a:** camundongo C57BL/6 controle; **b:** camundongo C57BL/6 suspensão; **c:** camundongo FAT-1 controle; **d:** camundongo FAT-1 suspensão. A barra representa 200 µm.

B): Os dados estão apresentados como média ± EPM (n=7-9). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA two way com *post hoc* teste de Bonferroni. **ASTM:** área de secção transversa muscular; **S:** suspensão.

A redução da área de secção transversa da fibra muscular (ASTFM) induzida por suspensão foi de 45% para o grupo C57BL/6 ($p<0,001$) e 37% para o grupo FAT-1 ($p<0,01$) (Figuras 35 e 36).

Figura 35 – Imagens histológicas representativas da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo corada com hematoxilina e eosina: (A) aumento de 10x e (B) aumento de 20x.

A.

B.

(A): Imagens histológicas representativas com coloração de hematoxilina eosina da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo no PE2 obtidas com aumento de 10x; **a:** camundongo C57BL/6 controle; **b:** camundongo C57BL/6 suspensão; **c:** camundongo FAT-1 controle; **d:** camundongo FAT-1 suspensão. A barra representa 50 µm.

(B): Imagens histológicas representativas com coloração hematoxilina eosina da área de secção transversa da fibra do músculo sóleo no PE1 obtidas com aumento de 20x; **a:** camundongo C57BL/6 controle; **b:** camundongo C57BL/6 suspensão; **c:** camundongo FAT-1 controle; **d:** camundongo FAT-1 suspensão. A barra representa 100 µm.

Figura 36 - Área de secção transversa da fibra do músculo sóleo.

(A) Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=6-8). (B) Os dados estão apresentados como histograma e mediana. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **ASTFM**: área de secção transversa da fibra muscular; **S**: suspensão. Ω : diferença entre os grupos.

6.21 Avaliação das atividades da catepsina L e do proteassoma 26S

Foram avaliadas as atividades da catepsina L e proteassoma 26S (Figura 37). No caso da atividade da catepsina L, houve diminuição significativa no grupo FAT-1 quando comparado ao grupo C57BL/6 ($p<0,05$) (Figura 37A). Na atividade do proteassoma 26S, não houve diferença significativa (Figura 37B).

Figura 37 - Atividades de (A) catepsina L e (B) proteassoma 26S no músculo gastrocnêmio.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=7-8). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni.

6.22 Avaliação das proteínas totais

A quantidade de proteína total normalizada por grama de tecido fresco foi determinada no músculo sóleo. Houve diferença significativa entre os grupos C57BL/6 e FAT-1 ($p < 0,01$) (Figura 38).

Figura 38 – Proteínas totais do músculo sóleo (mg/g de tecido fresco).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni.

6.23 Conteúdos das proteínas carboniladas

Foram avaliados os conteúdos das proteínas carboniladas (Figura 39). Não houve diferença significativa (Figura 39A).

Figura 39 - (A) Conteúdo de proteínas carboniladas e **(B)** Imagens representativas das bandas obtidas por ensaio de *western blotting* das proteínas carboniladas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=7-8$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

6.24 Avaliação das proteínas envolvidas na sinalização da via de síntese de proteínas musculares Akt, S6, 4EBP1 e GSK3-beta por *western blotting*

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-Akt, Akt total e a razão entre p-Akt/Akt total (Figura 40). Não houve diferença significativa entre os dois grupos com e sem suspensão (Figura 40A).

Figura 40 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-Akt, **(B)** Akt total, **(C)** p-Akt/Akt total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=5-6). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

Em relação aos conteúdos das proteínas p-S6 e S6 total e a razão entre p-S6/S6 total (Figura 41), não se observou diferença significativa entre os dois grupos com e sem suspensão (Figura 41).

Figura 41 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-S6K, **(B)** S6 total, **(C)** razão p-S6/S6 total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=5-6$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-4EBP1 e 4EBP1 total e a razão entre p-4EBP1/4EBP1 total (Figura 42), não houve diferença significativa entre os dois grupos com e sem suspensão (Figura 42A).

Figura 42 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-4EBP1, **(B)** 4EBP1 total, **(C)** p-4EBP1/4EBP1 total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como media $\pm$ EPM (n=5-6). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-GSK3-beta e GSK3-beta total e a razão entre p-GSK3-beta/GSK3-beta total (Figura 43). Houve diferença significativa na razão entre p-GSK3-beta/GSK3-beta total entre FAT-1 vs FAT-1 S ($p<0,05$) avaliado pelo pós-teste (Figura 43C). A análise por ANOVA *two-way* indicou aumento significativo ($p<0,01$) em decorrência da suspensão (Figura 43B).

Figura 43 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-GSK3-beta, **(B)** GSK3-beta total, **(C)** p-GSK3-beta/GSK3-beta total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=5-6$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

6.25 Avaliação das proteínas envolvidas na degradação de proteínas musculares: MuRF1 e atrogina-1/MAFbx por *western Blotting*

Foram avaliados os conteúdos das proteínas MuRF1 e atrogina-1/MAFbx (Figura 44). Houve diferença significativa no conteúdo da proteína MuRF1 entre FAT-1 e FAT-1 S ($p<0,05$) avaliado pelo pós-teste (Figura 44A). O conteúdo da proteína atrogina-1/MAFbx não variou de forma significativa (Figura 44B).

Figura 44 - Conteúdos das proteínas no músculo sóleo: **(A)** MuRF1, **(B)** atrogina-1/MAFbx e **(C)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM ($n=5-6$). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

6.26 Avaliação das proteínas envolvidas na via das MAPKs: ERK1 e ERK2 por *western blotting*

Foram avaliados os conteúdos das proteínas p-ERK1/2, ERK1/2 total e a razão entre elas (Figura 45), não existindo diferença significativa entre os dois grupos com e sem suspensão (Figura 45).

Figura 45 - Conteúdos e razão das proteínas no músculo sóleo: **(A)** p-ERK 1/2, **(B)** ERK 1/2 total, **(C)** p-ERK 1/2/ERK 1/2 total e **(D)** Imagens representativas das bandas obtidas pelo ensaio de *western blotting*.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=5-6). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **S**: suspensão.

6.27 Avaliação do Índice de sinalização de síntese e degradação proteica (ISSDP) no PE2

O ISSDP foi calculado com a seguinte fórmula: $[p\text{-Akt} + p\text{-S6} + p\text{-GSK3B} + p\text{-4EBP1}] / [\text{atrogin-1} + \text{MuRF1}]$. Os valores foram: $1,88 \pm 0,27$ no C57BL/6; $1,48 \pm 0,19$ no C57BL/6 S; $2,06 \pm 0,63$ no Fat-1; $1,56 \pm 0,25$ no Fat-1 S. HS diminuiu o ISSDP em 21% no C57BL/6 e em 24% no FAT-1.

6.28 Resumo das alterações causadas no PE1 e no PE2

Os resultados obtidos dos efeitos da suspensão no PE1 sobre os parâmetros avaliados estão resumidos na Tabela 7 e dos obtidos no PE2 estão na Tabela 8.

Tabela 7 – Resumo das alterações causadas pela suspensão das patas traseiras no músculo sóleo de ratos no PE1.

PARÂMETROS AVALIADOS NO PE1	COM vs SOM
Consumo hídrico/alimentar
Comprimento final do rato
Massa corporal inicial
Massa corporal final
Δ Massa corporal
Massa sóleo/comprimento tibia
Massa gastrocnêmio pelo comprimento tibia
Massa tibial anterior pelo comprimento tibia
Massa EDL pelo comprimento tibia
Massa seca sóleo pelo comprimento tibia
Massa seca EDL pelo comprimento tibia
Massa da gordura subcutânea pelo comprimento do rato
Massa da gordura epididimal pelo comprimento do rato
Massa da gordura retroperitoneal pelo comprimento do rato
Massa da gordura mesentérica pelo comprimento do rato
Conteúdo de glicogênio no músculo sóleo

Conteúdo de glicogênio no músculo EDL	↓
Conteúdo de citocinas no soro e músculo (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10)	↔
Área de secção transversa do músculo sóleo	↓
Área de secção transversa da fibra muscular do sóleo	↓
Atividade de catepsina L	↔
Atividade do proteassoma 26S	↑
Proteínas carboniladas	↓
Proteínas totais do músculo sóleo/g tecido fresco	↔
Proteínas totais do músculo EDL/g tecido fresco	↔
p-Akt	↓
Akt total	↔
p-Akt/Akt total	↔
p-mTOR	↔
mTOR total	↔
p-mTOR/mTOR total	↔
p-p70S6K	↔
p70S6K total	↓
p-p70S6K/p70S6K total	↑
p-S6	↓
S6 total	↓
p-S6/S6 total	↓
p-4EBP1	↑
4EBP1 total	↔
p-4EBP1/4EBP1 total	↔
p-GSK3-beta	↓
GSK3-beta total	↓
p-GSK3-beta/GSK3-beta total	↔
Atrogina-1/MAFbx	↑
MuRF1	↑
Caspase 3	↑
p-ERK1	↓
ERK1 total	↓
p-ERK1/ERK1 total	↔
p-ERK2	↓
ERK2 total	↓
p-ERK2/ERK2 total	↔
p-JNK1	↔
JNK1 total	↔
p-JNK1/JNK1 total	↔

PE1: protocolo experimental 1. **EDL:** extensor digital longo; **COM:** controle óleo mineral; **SOM:** suspensão óleo mineral. **COM vs SOM:** efeito da suspensão.

Tabela 8 – Resumo das alterações causadas sobre o músculo sóleo de camundongos *wild type* e FAT-1 no PE2.

PARÂMETROS AVALIADOS NO PE2	C57BL/6 vs C57BL/6 S	FAT-1 vs FAT-1 S	C57BL/6 vs FAT-1	C57BL/6 S vs FAT-1 S
Consumo hídrico/alimentar	↓	↓	↔	↔
Comprimento final do camundongo	↔	↔	↔	↔
Massa corporal inicial	↔	↔	↔	↔
Massa corporal final	↓	↔	↔	↔
Δ Massa corporal	↓	↓	↔	↔
Massa sóleo pelo comprimento tibia	↓	↓	↔	↑
Massa gastrocnêmio pelo comprimento tibia	↓	↓	↔	↔
Massa plantar pelo comprimento tibia	↓	↓	↔	↑
Massa tibial anterior pelo comprimento tibia	↓	↓	↔	↔
Massa EDL pelo comprimento tibia	↔	↓	↑	↔
Massa da gordura subcutânea pelo comprimento do camundongo	↔	↔	↔	↔
Massa da gordura epididimal pelo comprimento do camundongo	↓	↓	↓	↔
Massa da gordura retroperitoneal pelo comprimento do camundongo	↔	↔	↔	↓
Massa da gordura mesentérica pelo comprimento do camundongo	↔	↓	↔	↔
Força isotônica absoluta máxima	↓	↔	↔	↔
Força isotônica específica máxima	↔	↔	↔	↔
Força tetânica absoluta	↓	↓	↔	↔
Força tetânica específica	↔	↔	↔	↔
Propriedades contráteis (TTP, HRT, LRT)	↔	↔	↔	↔
Fadiga	↔	↔	↔	↔
Razão ômega-6/ ômega-3	↓	↔	↓	↓
SCD-1 (16:1n-7/16:0)	↔	↓	↔	↔
SCD-1 (18:1n-9/18:0)	↔	↔	↔	↔
Elongase (18:0/16:0)	↔	↓	↔	↔
DNL (16:0/18:2n-6)	↔	↓	↔	↔
Área de secção transversa do músculo sóleo	↓	↔	↔	↔
Área de secção transversa da fibra muscular do sóleo	↓	↓	↔	↔

Atividade de catepsina L	↔	↔	↓	↔
Atividade do proteassoma 26S	↔	↔	↔	↔
Proteínas carboniladas	↔	↔	↔	↔
Proteínas totais do músculo sóleo/g tecido fresco	↔	↔	↑	↔
p-Akt	↔	↔	↔	↔
Akt total	↔	↔	↔	↔
p-Akt/Akt total	↔	↔	↔	↔
p-S6	↔	↔	↔	↔
S6 total	↔	↔	↔	↔
p-S6/S6 total	↔	↔	↔	↔
p-4EBP1	↔	↔	↔	↔
4EBP1 total	↔	↔	↔	↔
p-4EBP1/4EBP1 total	↔	↔	↔	↔
p-GSK3-beta	↔	↔	↔	↔
GSK3-beta total	↓	↓	↔	↔
p-GSK3-beta/GSK3-beta total	↔	↑	↔	↔
MuRF1	↔	↓	↔	↔
Atrogina-1/MAFbx	↔	↔	↔	↔
p-ERK1/2	↔	↔	↔	↔
ERK1/2 total	↔	↔	↔	↔
p-ERK1_2/ERK1_2 total	↔	↔	↔	↔

↔ = sem alteração, ↑ = aumento, ↓ = redução.
(ANOVA two way com post hoc teste de Bonferroni)

↔ = sem alteração, ↑ = aumento, ↓ = redução.
(ANOVA two way)

PE2: protocolo experimental 2. **EDL:**extensor digital longo; **S:** suspensão. **C57BL/6 vs C57BL/6 S:** efeito da suspensão no controle; **FAT-1 vs FAT-1 S:** efeito da suspensão no FAT-1; **C57BL/6 vs FAT-1:** efeito dos ômega-3 no controle; **C57BL/6 S vs FAT-1 S:** efeito dos ômega-3 na suspensão.

7 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi o de determinar os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 (EPA ou DHA) na via de sinalização da síntese e degradação de proteínas musculares durante a atrofia induzida por desuso. Realizou-se protocolo experimental (PE1) em ratos suplementados com óleos de peixe (ricos EPA ou DHA) e protocolo experimental 2 (PE2) utilizando uma linhagem de camundongos transgênicos (FAT-1) que produzem endogenamente ácidos graxos ômega-3 a partir dos ácidos graxos ômega-6 consumidos na dieta. Nos dois modelos, avaliou-se o músculo sóleo, o qual é composto majoritariamente por fibras oxidativas/contração lenta/tipo I (Soukup et al., 2002) e que tem ação antigravitatória, sofrendo maior atrofia no modelo de suspensão (Bodine, 2013).

Foram avaliados os consumos hídrico e alimentar e a variação da massa corporal nos dois protocolos experimentais. Observou-se diminuição significativa dos consumos hídrico e alimentar nos grupos em suspensão em relação aos controles nos primeiros dias de suspensão no PE2. É escassa a informação na literatura sobre a ingestão alimentar nos modelos de atrofia por redução da carga mecânica (Sun et al., 2010; Wade et al., 2002), sendo importante para a compreensão dos resultados obtidos.

Em relação ao comportamento da massa corporal e massas corpóreas finais dos animais, posterior ao período de desuso, observou-se, ao comparar os animais em suspensão com seus respectivos controles, que ocorreu menor ganho de massa de forma semelhante aos dados obtidos por Hirose et al., (2007) em ratos Wistar após 14 dias de suspensão; Maki et al., (2012) em ratos Sprague-Dawley após o mesmo período de suspensão e Lloyd et al., (2014) em camundongos C57BL/6 submetidos à atrofia por suspensão durante 7, 14 e 21 dias. Apenas a suplementação com óleo de peixe rico em DHA influenciou no ganho de massa corporal após quatro semanas. Sobre isso, deve-se mencionar que o animal submetido à suspensão apresenta inicialmente indícios de estresse pelo fato de ter sido retirado de seu ambiente coletivo para uma gaiola individual (Hanson et al., 2013; Morey-Holton, Globus, 2002). Dessa forma, há críticas aos trabalhos em que não foi realizada adaptação em gaiola individual para o animal e aos que não acompanharam o comportamento desses durante o período de suspensão. No presente trabalho seguimos as recomendações de Morey-Holton e Globus (2002)

em relação as considerações do modelo experimental, tais como: o ângulo de suspensão (30°), período de adaptação em gaiola individual, observação da aparência dos animais, os consumos hídrico e alimentar, mobilidade, bem como o aspecto da cauda.

As massas dos músculos das patas traseiras (sóleo, gastrocnêmio, plantar, EDL e tibial anterior) apresentaram resultados de atrofia similares aos observados previamente (Bodine, 2013; Maki et al., 2012; Thomason, Booth, 1990). Com relação a isso, o modelo de suspensão, independente do protocolo experimental utilizado, promove atrofia dos músculos esqueléticos dependendo dos tipos de fibras que é composto. Por isso, os músculos com predominância de fibras oxidativas/contração lenta/tipo I, por serem mecanicamente antigravitatórios, são mais afetados em modelos nos quais se retira a força da gravidade, como no caso da suspensão (Atherton et al., 2016; Bederman et al., 2013; Bodine, 2013; Ciciliot et al., 2013; Fitts et al., 2000). Os músculos com predominância de fibras glicolíticas/contração rápida/tipo II são menos afetados. Porém, ao observar-se a composição de alguns músculos de ratos: plantar 7% de fibras tipo I, 52% tipo IIa, 41% tipo IIb; tibial anterior 3% tipo I, 61% tipo IIa, 36% tipo IIb e sóleo 83% tipo I, 17% tipo IIa, 0% tipo IIb (Parkington et al., 2003) e EDL, com média de 5,7% tipo I; 36,9% tipo IIa e 56,9% tipo IIb (Soukup et al., 2002), constata-se, de forma geral, que a atrofia é mais intensa quanto maior a quantidade de fibras oxidativas no músculo. Em nosso estudo, os músculos que sofreram mais atrofia foram nesta ordem: sóleo, gastrocnêmio, plantar, tibial anterior e EDL. Esses achados são semelhantes aos reportados por outros autores (Bodine, 2013; Thomason, Booth, 1990). Sabe-se que no modelo de suspensão há tendência de mudança de fibras oxidativas/contração lenta/tipo I para as fibras glicolíticas/contração rápida/tipo II, que ocorre majoritariamente no músculo sóleo (Baldwin et al., 2013; Caiozzo et al., 1997; Harrison et al., 2003). De forma similar, verificou-se diminuição da massa seca nos músculos submetidos à suspensão em relação aos respectivos controles no PE1 e PE2. No músculo sóleo do PE1, a suplementação com óleo de peixe rico em DHA aumentou a massa seca em comparação ao óleo de peixe rico em EPA e no EDL quando comparado com o rato suplementado com óleo mineral. No músculo sóleo do PE2, a diminuição da massa seca causada pela suspensão foi atenuada no grupo FAT-1. Andrianjafiniony et al., (2010), realizando suspensão por 14 dias em ratos Wistar, constataram diminuição de 41% na massa do músculo sóleo em

comparação com seus respectivos controles, similar aos dados obtidos em nosso trabalho (49%). Por outro lado, Hanson et al., (2013) observaram diminuição (25%) da massa do sóleo após 14 dias de suspensão em camundongos, similar aos nossos achados (26%).

Com relação ao tecido adiposo, verificou-se que, de forma geral, a suspensão diminui a massa dos depósitos adiposos nos dois protocolos em concordância com estudos prévios (Hutchins-Wiese et al., 2012; Lloyd et al., 2014). No PE1, as massas dos depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal não diminuíram no controle, mas sofreram redução com a suplementação dos óleos de peixe. No PE2, a massa do depósito de gordura epididimal diminuiu nos camundongos FAT-1 controles e o retroperitoneal nos animais FAT-1 em suspensão em relação ao controle. Hutchins-Wiese et al., (2012) verificaram que a suspensão das patas traseiras por duas semanas em camundongos diminui a massa de gordura epididimal de forma similar ao observado no PE2. Eles não observaram diferenças na gordura epididimal nas distintas dietas utilizadas (controle, ômega-3 moderado e alto), contrariamente aos efeitos descritos sobre os ácidos graxos ômega-3 na diminuição das gorduras em animais (Baillie et al., 1999; Belzung et al., 1993; Buckley, Howe, 2009; Pérez-Matute et al., 2007) e humanos (Bender et al., 2014; Buckley, Howe, 2009; Moosheer et al., 2014; Parra et al., 2008).

A função contrátil muscular (força isotônica, tetânica, propriedades contráteis e fadiga) foi avaliada no PE2. As forças isotônica e tetânica absolutas diminuíram com a suspensão nos dois grupos (Feng et al., 2016; Hanson et al., 2013; Ohira et al., 2015). A força isotônica absoluta do músculo sóleo diminuiu significativamente no grupo C57BL/6 e não no grupo FAT-1 após período de 14 dias de suspensão das patas traseiras. Na fadiga (em 10 contrações sucessivas), os camundongos FAT-1 apresentaram queda menos acentuada da força muscular ao comparar a inclinação da curva de fadiga entre a contração 6 e 10 com os camundongos C57BL/6 (Figura 34C). Em humanos, os ácidos graxos ômega-3 melhoram a função muscular esquelética em condições de atrofia (Murphy et al., 2011; Rodacki et al., 2012; Smith et al., 2015). É possível que os ácidos graxos ômega-3 melhoram a função contrátil devido ao aumento da biogênese mitocondrial (Johnson et al., 2015; Smith et al., 2015;) e/ou ao fato dos ácidos graxos ômega-3 melhorarem a ressíntese de ATP durante a contração muscular (Herbst et al., 2014) favorecendo a atividade da SERCA.

A suplementação oral dos óleos de peixe rico em EPA ou rico em DHA causou mudanças marcantes na composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio no PE1. Foram encontrados diminuição dos ácidos graxos ômega-6, aumento dos ácidos graxos ômega-3 e a consequente redução da razão ômega-6/ômega-3. A suplementação com os ácidos graxos ômega-3 aumentou a incorporação deste na célula e modificou a composição dos ácidos graxos nos tecidos. Outros pesquisadores reportaram achados similares (Hutchins-Wiese et al., 2012). No PE2, no qual no nosso caso não houve suplementação com óleo de milho que é rico em ômega-6, o músculo gastrocnêmio apresentou conteúdos diminuído dos ácidos graxos ômega-6, aumentado de ácidos graxos ômega-3 e menor valor da razão ômega-6/ômega-3 nos camundongos FAT-1 quando comparados aos *wild type*. Outros estudos reportam achados similares (Kang et al., 2004; Kang, 2007). Calculamos as atividades enzimáticas de SCD-1 e elongase e de lipogênese *de novo* (DNL) no músculo gastrocnêmio. No PE1, houve aumento da DNL após suspensão nos três grupos. No PE2, alterações significativas foram observadas nos camundongos FAT-1 após o período de suspensão. O aumento da DNL e da atividade de síntese de ácidos graxos provavelmente eleva a reserva de ácidos graxos a serem utilizados para a produção de energia no músculo esquelético.

O conteúdo de glicogênio foi avaliado nos músculos sóleo (oxidativo/contração lenta/tipo I) e EDL (glicolítico/contração rápida/tipo II) no PE1, havendo redução somente neste último. A suplementação com óleos de peixe (ricos em EPA ou DHA) atenuou a diminuição do conteúdo de glicogênio causada pela atrofia por suspensão.

Alguns autores observaram aumento de marcadores inflamatórios durante a atrofia muscular por suspensão. Andrianjafiniony et al., (2010) e Hirose et al., (2007) verificaram, em ratos Wistar após suspensão por 14 dias, aumento de TNF- α (Hirose et al., 2007) e de IL-1 β e IL-6 (Andrianjafiniony et al., 2010). Contudo, no presente trabalho, não houve alteração nos conteúdos de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no soro e músculo sóleo de ratos em suspensão por duas semanas. Powers et al., (2007) reportam que o aumento de TNF- α na atrofia por desuso pode levar à ativação da degradação de proteínas, desencadeando a liberação dos miofilamentos pela caspase 3 para serem degradados posteriormente pelo sistema de proteassoma. Bonaldo e Sandri (2013) descreveram que o TNF- α ativa IKK, que leva à estimulação de NF κ B, estimulando MuRF1 e a degradação proteica pelo

sistema proteossoma. Por outro lado, algumas interleucinas, como IL-4 e IL-6, estimulam a proliferação e fusão de células satélites favorecendo a hipertrofia muscular (Schiaffino et al., 2013). Em camundongos *knockout* (KO) para IL-6, verificou-se que a expressão de IL-6 no músculo esquelético parece ser importante para a resposta de crescimento inicial durante a recuperação após desuso (Washington et al., 2011). Por outro lado, não foi detectada alteração na expressão do mRNA de IL-6 em camundongos após 10 dias de suspensão. Portanto, a IL-6 não parece ser determinante na atrofia induzida por suspensão, uma vez que camundongos KO para IL-6 apresentam atrofia similar aos respectivos animais *wild type* (Washington et al., 2011).

No PE1, a área transversa do músculo diminuiu mais de 50% com a suspensão de duas semanas nos controles e nos suplementados, similar aos dados de Derbre et al., (2012), que avaliaram o músculo sóleo de ratos Wistar também após 14 dias de suspensão. A área transversa da fibra muscular também diminuiu com a suspensão, em concordância com trabalhos anteriores (Liu et al., 2014; Maki et al., 2012). A suplementação com os óleos de peixe (ricos em EPA ou DHA) atenuou a redução da área transversa da fibra muscular após suspensão. Andrianjafiniony et al., (2010), realizando suspensão por 14 dias em ratos Wistar, também observaram diminuição da área da fibra muscular no sóleo. Conforme já mencionado, não existem estudos publicados em relação à suplementação com óleo de peixe na suspensão das patas traseiras e avaliação da atrofia muscular esquelética. Já no PE2, a área transversa diminuiu significativamente nos camundongos C57BL/6 após 14 dias de suspensão das patas traseiras sendo menos pronunciada nos camundongos FAT-1 (~36% vs ~28%, respectivamente). A área transversa da fibra muscular diminuiu significativamente nos dois grupos: C57BL/6 e FAT-1 (~45% vs 37%, respectivamente). Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por outros pesquisadores (Feng et al., 2016; Liu et al., 2014; Maki et al., 2012).

A atividade da catepsina L, indicativa de proteólise lisossomal, aumenta na atrofia muscular por desuso (Bechet et al., 2005). No trabalho de Taillandier et al., (1996) sobre suspensão por nove dias em ratos Wistar, observou-se aumento da atividade da catepsina L. Nossos resultados, provavelmente por terem sido obtidos no 14º dia de atrofia, já não apresentavam diferenças significativas na atividade de catepsina L. Há poucos estudos sobre o incremento nas porções 20S e/ou 26S do

sistema ubiquitina-proteassoma na suspensão (Bodine, 2013). Em nosso caso, a atividade do proteassoma 26S se comportou de forma similar ao conteúdo das proteínas ubiquitina-ligases atrogina-1/MAFbx e MuRF1, com aumento no 14º dia de suspensão no PE1. Quanto às proteínas carboniladas, constatou-se no PE1 redução no estado de suspensão no grupo controle, que diferiu do trabalho de Derbre et al., (2012), no qual, após suspensão por 14 dias em ratos Wistar, houve aumento dessas proteínas. Em nosso trabalho, a suplementação com os óleos de peixe, independente da suspensão, diminuiu a quantidade de proteínas carboniladas, não havendo redução adicional na associação entre suspensão e esta suplementação. No PE2, não houve variação na atividade do proteassoma 26S e no conteúdo das proteínas carboniladas.

A diminuição na síntese de proteínas musculares ao longo do período de suspensão foi descrita por vários autores (Atherton et al., 2016; Bodine et al., 2001b; Bodine, 2013; Lloyd et al., 2014). Avaliamos as principais proteínas envolvidas nesta via: Akt, mTOR, p70S6K, S6, 4EBP1 e GSK3-beta. Observou-se redução nos conteúdos da maioria das proteínas estudadas como consequência da suspensão. A diminuição nos conteúdos das proteínas p-Akt e p70S6K total pela suspensão é parcialmente revertida pela suplementação com óleo de peixe rico em EPA no PE1. A suspensão por 3 e 7 dias diminui progressivamente as proteínas Akt e S6 (Cannavino et al., 2014), enquanto que em 7, 14 e 21 dias de suspensão, ocorre diminuição da síntese total de proteínas e dos conteúdos de S6 e 4EBP1 (Lloyd et al., 2014) no músculo esquelético.

Contrariamente à via de síntese, a de degradação muscular é ativada pela suspensão (Atherton et al., 2016; Bodine et al., 2001a; Bodine, 2013; Derbre et al., 2012; Liu et al., 2014; Maki et al., 2012), o que foi confirmado em nosso trabalho com aumento dos conteúdos das proteínas atrogina-1/MAFbx, MuRF1 e caspase 3 no período de suspensão no PE1. Desde a descoberta das proteínas ubiquitina-ligases, atrogina-1/MAFbx e MuRF1 (Bodine et al., 2001a; Gomes et al., 2001), ênfase vem sendo dada na avaliação destas, já que controlam a degradação de proteínas em vários modelos de atrofia muscular esquelética (Bodine, Baehr, 2014). Ocorre aumento acentuado na expressão destas proteínas nos primeiros dias de desuso (Bodine et al., 2001a; Cannavino et al., 2014; Hanson et al., 2013) retornando aos valores basais depois de 14 a 21 dias de suspensão (Bodine et al., 2001a; Hanson et al., 2013; Lloyd et al., 2014).

Sobre as MAPKs, sabe-se que a fosforilação de JNK 1/2 e p38 leva a um aumento dos fatores de transcrição associados à apoptose (AP1, p53, c-MYC, NFkappaB). A fosforilação de ERK 1/2 causa inibição destes fatores e a possível ativação da via de síntese. Os ácidos graxos controlam a proliferação e diferenciação de células musculares por modulação da atividade das MAPKs (Lee et al., 2009). Apesar dessas informações, há pouca evidência sobre a associação da ativação de ERK 1/2 com a atrofia muscular por desuso (Powers et al., 2007). Portanto, no caso da atrofia por suspensão, postula-se que haveria ativação de JNK 1/2 e p38 e inibição de ERK 1/2. Isto ocorreu parcialmente em nosso estudo e a suplementação com óleo de peixe rico em EPA atenuou a diminuição de ERK 1/2 fosforilada e total induzida por suspensão no PE1. Com relação a isso, podemos citar o trabalho de Derbre et al., (2012) no qual observaram ativação de p38 após 14 dias de suspensão e o de Liu et al., (2014) no qual verificou-se aumento da razão p-p38/p38, conteúdo de p-ERK1 e da razão p-ERK2/ERK2 em ratos com tres semanas de suspensão.

Propusemos o ISSDP com o propósito de avaliar a atividade das vias de sinalização da síntese e da degradação de proteínas em seu conjunto. Valores mais elevados deste índice favoreceria a via de sinalização da síntese de proteínas com aumento no tamanho da fibra muscular esquelética e valores baixos representariam o oposto. No PE1, ao comparar o efeito da suplementação dos óleos de peixe sem à suspensão, houve aumento (não significativo) de 5% nos ratos suplementados com óleo de peixe rico em EPA e de 13% nos ratos suplementados com óleo de peixe rico em DHA quando comparados com o controle. No PE2, na mesma comparação anterior, o grupo FAT-1 apresentou aumento de 9% quando comparado ao camundongo C57BL/6. Logo, após o período de suspensão, observou-se diminuição do ISSDP no PE1 de 46% no grupo controle, 43% nos ratos suplementados com óleo de peixe rico em EPA e de 42% nos ratos suplementados com óleo de peixe rico em DHA e no PE2 de 21% nos camundongos C57BL/6 e de 24% nos FAT-1. As diferenças observadas entre a suplementação com óleo de peixe rico em EPA e em camundongos FAT-1 podem ser associadas a diversos mecanismos relatados para o efeito dos ácidos graxos ômega-3. Estes promovem anabolismo por aumento da sensibilidade à insulina e ativação da sinalização da Akt-mTOR-S6 (Gingras et al., 2007). Esses ácidos graxos também melhoram a

biogênese mitocondrial (Johnson et al., 2015; Smith et al., 2015) e modificam a composição de ácidos graxos da membrana da mitocôndria (Herbst et al., 2014).

Há divergências nos resultados obtidos por diferentes autores quanto aos efeitos dos ômega-3 na atrofia muscular. You et al., (2010b) incorporaram óleo de peixe (*cod liver oil*) na dieta de ratos Sprague-Dawley por duas semanas antes de induzir atrofia muscular por 10 dias de imobilização e constataram que, após este período, ocorre aumento em atrogina-1/MAFbx e MuRF1 e diminuição nas razões entre p-Akt/Akt total e p-p70S6k/p70S6k total no grupo com dieta controle, enquanto que no grupo da dieta com óleo de peixe ocorreu atenuação da atrofia, com aumento da massa do músculo sóleo. O grupo também utilizou o mesmo protocolo, acrescentando recarga durante 3 e 13 dias na extremidade imobilizada. Concluíram que o óleo de peixe inibe o estado inicial de recuperação após atrofia muscular por desuso por supressão da ativação da via Akt-p70S6k e PGF2 α (You et al., 2010a). Fappi et al., (2014) concluíram que a suplementação oral com óleo de peixe (rico em EPA) na atrofia muscular induzida por dexametasona não tem efeitos positivos. Pelo contrário, o óleo de peixe aumentou a expressão dos atrogenes e reduziu a de miogenina. Há evidências de que os ácidos graxos ômega-3 estimulam a síntese de proteínas musculares em experimentos realizados *in vitro* em miotubos C2C12 (Kamolrat, Gray, 2013). O mesmo foi observado *in vivo* em jovens e adultos de meia idade (Smith et al., 2011b), em ratos envelhecidos com 16 meses de idade (Kamolrat et al., 2013) e em idosos saudáveis (Smith et al., 2011a). No último estudo citado, observou-se que a suplementação com óleo de peixe aumenta p-p70S6k, mas não causa alteração no estado inflamatório (TNF- α e IL-6) e no conteúdo de triacilgliceróis, sugerindo um efeito anabólico independente dos já conhecidos efeitos antiinflamatórios do óleo de peixe. Em modelos animais (*in vivo* e *ex vivo*), observou-se que o ácido graxo ômega-3 diminui os marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6) (D'Antona et al., 2014). Em seres humanos, foram obtidos resultados conflitantes indicando que a suplementação da dieta com óleos de peixe resulta em diminuição da produção de IL-1, IL-6, TNF- α e IL-2 ou de que não produz mudança (D'Antona et al., 2014).

Foi proposto que os ácidos graxos ômega-3 promovem anabolismo por aumento da sensibilidade à insulina e concomitantemente maior ativação da via de sinalização deste hormônio: Akt-mTOR-S6 (Gingras et al., 2007). Além disso, a melhora do metabolismo de glicose pelo óleo de peixe parece ser dose-dependente

(Fortin et al., 2010). O presente trabalho reforça tais observações, pois a suspensão reduziu a atividade da via de sinalização à insulina enquanto que a administração do óleo de peixe rico EPA e a utilização de camundongos FAT-1 indicaram redução parcial deste efeito.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com nosso conhecimento, havia na literatura somente um estudo em que foi avaliado o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o sistema endocanabinóide no modelo de suspensão das patas traseiras em camundongos (Hutchins-Wiese et al., 2012) e não existiam estudos utilizando camundongos FAT-1 neste modelo experimental. Músculos predominantemente oxidativos sofreram atrofia mais pronunciada, enquanto que aqueles predominantemente glicolíticos atrofiaram menos. Portanto, avaliamos o sóleo, que é um músculo antigravitatório, com maioria de fibras oxidativas/contração lenta/tipo I, e que sofreu atrofia mais pronunciada por desuso. O presente trabalho é o primeiro a estudar os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 na atrofia por suspensão das patas traseiras sobre as vias de sinalização de síntese e degradação de proteínas musculares, seja por meio de suplementação do óleo de peixe ou uso de camundongos transgênicos FAT-1. Além disso, foi o único a comparar os efeitos dos óleos de peixe ricos em EPA e DHA .

Na Figura 46 estão apresentadas as variações nas atividades das vias de sinalização de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético em atrofia por suspensão. Pode-se observar a relação de equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas musculares ao longo do período de suspensão. Portanto, em situação controle, o animal recebe carga mecânica nas patas traseiras e com isto ativa-se a via de síntese de proteínas, contribuindo para a manutenção da massa muscular não permitindo aumento da atividade das vias de degradação. Quando se inicia o período de atrofia por suspensão das patas traseiras, retira-se a carga mecânica do animal, e, então, sem este estímulo, a via da síntese torna-se menos ativa. Concomitantemente, a atividade da via de degradação intensifica-se também devido à menor inibição da via de síntese. Isto ocorre pois a Akt inibe FoxO, o que pode levar a um aumento da atividade da via de degradação por ativação de atrogina-1/MAFbx e MuRF1, causando atrofia do músculo esquelético (Figura 1).

Figura 46 – Representação do comportamento das vias de síntese e degradação de proteínas no período de atrofia muscular esquelética induzida por suspensão das patas traseiras.

Observa-se a relação de equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas musculares ao longo do período de suspensão. Com relação à via da síntese (verde), uma vez retirada a carga mecânica e consequente perda do estímulo, esta torna-se menos ativa na medida que transcorrem os dias de suspensão. Contrariamente, a atividade da via de degradação (vermelho) intensifica-se nos primeiros dias de suspensão, também devido à menor inibição, causando atrofia do músculo esquelético. Após o período inicial de suspensão, a atividade da via de degradação começa a diminuir por motivos ainda não elucidados. No fim do período de 14 dias de suspensão, observa-se que a atividade da via de degradação diminui, restabelecendo o equilíbrio entre as duas vias, mas mantendo o músculo em estado de atrofia.

Após o período inicial de suspensão, a atividade da via de degradação começa a diminuir, por motivos ainda não elucidados. No fim do período de 14 dias de suspensão, observa-se que a atividade da via de degradação diminui, restabelecendo o equilíbrio entre as duas vias, mas mantendo o músculo em estado de atrofia. Com relação à ação dos ácidos graxos ômega-3, por meio da suplementação (Figura 47 e Tabela 9) ou pelo uso dos camunsongos FAT-1 (Tabela 10), verificou-se que este atenuam certas alterações que ocorrem na atrofia por suspensão de 14 dias. Observou-se também que, independentemente da suspensão, os ácidos graxos ômega-3 causam modificações específicas em alguns dos parâmetros avaliados. Não houve aumento detectável do estado inflamatório

durante a suspensão, aspecto no qual os ácidos graxos ômega-3 poderiam ter efeito importante. Contudo, os ácidos graxos ômega-3 provoveram leve redução, após o período de atrofia muscular, de algumas proteínas sinalizadoras da via de síntese proteica (Tabela 9 e 10), que pode ter contribuído para atenuar a diminuição da área transversa da fibra muscular do músculo sóleo durante a suspensão. Presumivelmente, a atrofia muscular muito pronunciada induzida pelo protocolo experimental utilizado pode ter dificultado a detecção de outros efeitos positivos mais evidentes dos ácidos graxos ômega-3. Dentre as limitações do modelo de suspensão utilizado no presente estudo, podemos mencionar o estresse de alguns animais durante a suspensão, tempo variável de adaptação do animal à gaiola e alteração do estado da cauda.

Figura 47 – Diagrama de Venn das alterações gerais causadas pelos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na condição controle e/ou de suspensão das patas traseiras dos ratos.

CEPA: controle eicosapentaenóico, efeitos do óleo de peixe rico em EPA no estado controle quando é comparado com o controle óleo mineral; **SEPA:** suspensão eicosapentaenóico, efeitos do óleo de peixe rico em EPA no estado suspensão quando é comparado com a suspensão óleo mineral; **CDHA:** controle docosaexaenóico, efeitos do óleo de peixe rico em DHA no estado controle quando é comparado com o controle óleo mineral **SDHA:** suspensão docosaexaenóico, efeitos do óleo de peixe rico em DHA no estado suspensão quando é comparado com a suspensão óleo mineral **EDL:** extensor digital longo; **ASTFM:** área da secção transversa da fibra muscular; Δ Massa corporal: diferença entre valores final e inicial do massa corporal; ↓: redução; ↑: aumento.

Tabela 9 – Resumo das diferenças observadas na via de síntese/degradação entre os tratamentos (óleo mineral e óleos de peixe rico em EPA ou DHA) sobre as alterações causadas pela suspensão no PE1.

PARÂMETROS AVALIADOS NO PE1	EFEITOS DA SUSPENSÃO	ÓLEO DE PEIXE RICO EM EPA	ÓLEO DE PEIXE RICO EM DHA
p-Akt	↓	↔	↓
p70S6K total	↓	↔	↓
p-4EBP1	↑	↔	↔
p-GSK3-beta	↔	↔	↓
p-ERK1	↔	↔	↓
ERK1 total	↓	↔	↔
p-ERK2	↓	↔	↓
ERK2 total	↓	↔	↓

↔ = sem alteração, ↑ = aumento, ↓ = redução.
(ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni)

Tabela 10 – Resumo das principais diferenças observadas nos camundongos FAT-1 sobre as alterações causadas pela suspensão.

PARÂMETROS AVALIADOS NO PE2	EFEITOS DA SUSPENSÃO	EFEITOS DOS OMEGA-3 NO FAT-1
Massa corporal final	↓	↔
Massa seca do músculo sóleo pelo comprimento da tibia	↓	↔
Massa da gordura mesentérica pelo comprimento do camundongo	↔	↓
Força isotônica absoluta máxima	↓	↔
Conteúdo de ômega-6	↔	↓
Conteúdo de ômega-3	↔	↑
Atividade das enzimas SCD-1 e DNL	↔	↑
Atividade da enzima elongase	↔	↓
Área de secção transversa do músculo sóleo	↓	↔
Proteínas totais no músculo sóleo	↔	↑
Atividade da catepsina L	↔	↓
p-GSK3-beta/GSK3-beta total	↔	↑
MuRF1	↔	↓

= sem alteração, = aumento, = redução.
 (ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni)

= sem alteração, = aumento, = redução.
 (ANOVA *two way*)

9 CONCLUSÃO

A atrofia muscular esquelética induzida por desuso, de forma mais pronunciada no músculo sóleo, alterou a atividade das vias de sinalização da síntese e da degradação de proteínas. No PE1, a suspensão das patas traseiras causou: diminuição do comprimento final do rato, da massa corporal final, das massas dos músculos sóleo, gastrocnêmio, tibial anterior e EDL; conteúdo de glicogênio no músculo EDL, das áreas de secção transversa do músculo e das fibras musculares do sóleo; conteúdos das proteínas carboniladas, p-Akt, p70S6K total, p-S6, S6 total, razão p-S6/S6 total, p-GSK3-beta, GSK3-beta total, p-ERK1, ERK1 total, p-ERK2, ERK 2 total e p38 total e aumento da atividade do proteassoma 26S, da razão p-p70S6K/p70S6K total e p-JNK2/JNK2 total, dos conteúdos das proteínas p-4EBP1, atrogina-1/MAFbx, MuRF1, caspase 3 e da lipogênese *de novo* (DNL) (Figura 47 e Tabela 9). No PE2, a suspensão causou: diminuição da massa corporal final, das massas dos músculos sóleo, gastrocnêmio, plantar, tibial anterior, da massa da gordura epididimal, das forças isotônica e tetânica absoluta, da resistência à fadiga, das áreas de secção transversa do músculo e das fibras musculares do sóleo, da razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3 e do conteúdo de GSK3-beta total (Tabela 10).

Os ácidos graxos ômega-3, administrados na suplementação de óleo de peixe ou com o uso dos camundongos FAT-1, produziu mudanças pouco acentuadas no quadro de atrofia severa induzida por desuso do músculo sóleo no presente estudo (Figura 47, Tabela 9 e 10).

Os animais suplementados com óleo de peixe rico em DHA, independentemente da suspensão, apresentaram redução do ganho de peso corpóreo após 4 semanas, da massa do músculo gastrocnêmio, aumento da massa seca do músculo EDL, redução da razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3 e do conteúdo das proteínas carboniladas. Por outro lado, a suplementação com EPA causou redução da razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3 e do conteúdo das proteínas carboniladas. Após o período de suspensão, o óleo de peixe rico em DHA provocou diminuição das gorduras epididimal e retroperitoneal e atenuou as alterações na área de seção transversa da fibra muscular no sóleo e nos conteúdos de p-4EBP1 e ERK1 total. O óleo de peixe rico em EPA promoveu diminuição das gorduras retroperitoneal e mesentérica e atenuou as alterações induzidas pela

suspensão no proteassoma 26S, área de seção transversa da fibra muscular no sóleo, e os conteúdos de p-Akt, p70S6K total, razão p-p70S6K/ p70S6K total, p-4EBP1, p-GSK3-beta, p-ERK1, p-ERK2, ERK1 total, e ERK2 total (Figura 47 e Tabela 9).

No PE2, os camundongos FAT-1, independente da suspensão, apresentaram valores mais elevados da massa úmida do músculo EDL normalizada pela tibia e do conteúdo de proteínas totais no músculo sóleo e diminuição da massa da gordura epididimal normalizada pelo comprimento do camundongo e da atividade da catepsina L. Após o período de suspensão das patas traseiras, os camundongos FAT-1 apresentaram atenuação das alterações induzidas pela atrofia muscular na diminuição da massa corporal final, na massa dos músculos sóleo e plantar normalizada pela tibia, no depósito da gordura retroperitoneal, na força isotônica absoluta máxima, na área de seção transversa do músculo sóleo e no conteúdo da proteína MuRF1 e aumento da razão p-GSK3-beta/GSK3-beta total. Além disso, apresentaram diminuição na atividade estimada da elongase e aumento da SCD-1 e da DNL e redução da razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3 (Tabela 10).

A suplementação com óleo de peixe rico em EPA ou rico em DHA e o uso de camundongos transgênicos FAT-1, não reduziu de modo marcante o quadro de atrofia muscular severa induzida pelo desuso das patas traseiras. Concluímos que, apesar da variação pequena na razão ácidos graxos ômega-6/ômega-3, efeitos significativos da oferta aumentada de ácidos graxos ômega-3 foram observados na área de seção transversa e vias de sinalização relacionadas à síntese e degradação de proteínas no músculo sóleo nos dois protocolos.

REFERÊNCIAS¹

Abreu P, Pinheiro CH, Vitzel KF, Vasconcelos DA, Torres RP, Fortes MS, Marzuca-Nassr GN, Mancini-Filho J, Hirabara SM, Curi R. Contractile function recovery in severely injured gastrocnemius muscle of rats treated with either oleic or linoleic acid. *Exp Physiol*. 2016 Nov 1;101(11):1392-1405.

Adams G, Caiozzo V, Baldwin K. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Dec;95(6):2185-201.

Alway S, Lowe D, Chen K. The effects of age and hindlimb suspension on the levels of expression of the myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in rat fast and slow skeletal muscles. *Exp Physiol*. 2001 Jul;86(4):509-17.

Andrianjafiniony T, Dupré-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, Desplanches D. Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Aug;299(2):C307-15.

Association of official analytical chemists. Official method 996.06 Official methods analysis of AOAC International. 18. ed. Gaithersburg, MD.: AOAC; 2005.

Association of official analytical chemists. Official method Ce Ij-07. Official methods and recommended practice of the AOCS. 6. ed. Champaign, IL.: AOCS; 2007.

Atherton PJ, Greenhaff PL, Phillips SM, Bodine SC, Adams CM, Lang CH. Control of Skeletal Muscle Atrophy in Response to Disuse: Clinical/Preclinical Contentions and Fallacies of Evidence. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016 Sep 1;311(3):E594-604.

Baehr LM, Furlow JD, Bodine SC. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J Physiol*. 2011 Oct 1;589(Pt 19):4759-76.

Baehr LM, Tunzi M, Bodine SC. Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. *Front Physiol*. 2014 Feb 21;5:69.

Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999 May-Jun;60(5-6):351-6.

Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol*. 2013 Oct 11;4:284.

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Banu J, Bhattacharya A, Rahman M, Kang JX, Fernandes G. (Banu, Bhattacharya et al. 2010). *J Bone Miner Metab.* 2010 Nov;28(6):617-26.

Bär H, Strelkov SV, Sjöberg G, Aebi U, Herrmann H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?. *J Struct Biol.* 2004 Nov;148(2):137-52.

Bederman IR, Chandramouli V, Sandlers Y, Henderson L, Cabrera ME. Time course of hepatic gluconeogenesis during hindlimb suspension unloading. *Exp Physiol.* 2013 Jan;98(1):278-89.

Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct;37(10):2098-114.

Bekyarova TI, Reedy MC, Baumann BA, Tregear RT, Ward A, Krzic U, Prince KM, Perz-Edwards RJ, Reconditi M, Gore D, Irving TC, Reedy MK. Reverse actin sliding triggers strong myosin binding that moves tropomyosin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 29;105(30):10372-7.

Belzung F, Raclot T, Groscolas R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am J Physiol.* 1993; Jun;264(6 Pt 2):R1111-8.

Bellenger J, Bellenger S, Bataille A, Massey KA, Nicolaou A, Rialland M, Tessier C, Kang JX, Narce M. High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition. *Diabetes.* 2011 Apr;60(4):1090-9.

Bender N, Portmann M, Heg Z, Hofmann K, Zwahlen M, Egger M. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2014 Aug;15(8):657-65.

Bilal S, Haworth O, Wu L, Weylandt KH, Levy BD, Kang JX. Fat-1 transgenic mice with elevated omega-3 fatty acids are protected from allergic airway responses. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Sep;1812(9):1164-9.

Bodine SC, Baar K. Analysis of skeletal muscle hypertrophy in models of increased loading. *Methods Mol Biol.* 2012;798:213-29.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001a Nov 23;294(5547):1704-8.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001b Nov;3(11):1014-9.

Bodine SC. Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Oct;45(10):2200-8.

Bodine SC, Baehr LM. Skeletal Muscle Atrophy and the E3 Ubiquitin Ligases, MuRF1 and MAFbx/Atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep 15;307(6):E469-84.

Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*. 2013 Jan;6(1):25-39.

Bonilla DL, Fan YY, Chapkin RS, McMurray DN. Transgenic mice enriched in omega-3 fatty acids are more susceptible to pulmonary tuberculosis: impaired resistance to tuberculosis in fat-1 mice. *J Infect Dis*. 2010 Feb 1;201(3):399-408.

Boonyarom O, Kozuka N, Matsuyama K, Murakami S. Effect of Electrical Stimulation to Prevent Muscle Atrophy on Morphologic and Histologic Properties of Hindlimb Suspended Rat Hindlimb Muscles. *Am J Phys Med Rehabil*. 2009 Sep;88(9):719-26.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, Dupre-Aucouturier S, Desplanches D, Gundersen K. No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *J Appl Physiol (1985)*. 2012 Jul;113(2):290-6.

Buckley JD, Howe PR. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obes Rev*. 2009 Nov;10(6):648-59.

Caiozzo VJ, Baker MJ, McCue SA, Baldwin KM. harrison. *Am J Physiol*. 1997 Sep;273(3 Pt 1):C944-52.

Callahan DM, Bedrin NG, Subramanian M, Berking J, Ades PA, Toth MJ, Miller MS. Age-related structural alterations in human skeletal muscle fibers and mitochondria are sex specific: relationship to single-fiber function. *J Appl Physiol (1985)*. 2014 Jun 15;116(12):1582-92.

Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA. PGC1-alpha over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb un loaded mice. *J Physiol*. 2014 Oct 15;592(Pt 20):4575-89.

Cherry JJ, Kobayashi DT, Lynes MM, Naryshkin NN, Tiziano FD, Zaworski PG, Rubin LL, Jarecki J. Assays for the identification and prioritization of drug candidates for spinal muscular atrophy. *Assay Drug Dev Technol*. 2014 Aug;12(6):315-41.

Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2191-9.

Coutinho E, Gomes A, Oishi J, Salvini T. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Dec;37(12):1853-61.

Craig R, Woodhead JL. Structure and function of myosin filaments. *Curr Opin Struct Biol*. 2006 Apr;16(2):204-12.

Cunha TF, Bacurau AV, Moreira JB, Paixão NA, Campos JC, Ferreira JC, Leal ML, Negrão CE, Moriscot AS, Wisløff U, Brum PC. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One*. 2012;7(8):e41701.

D' Antona G, Nabavi SM, Micheletti P, Di Lorenzo A, Aquilani R, Nisoli E, Rondanelli M, Daglia M. Creatine, L-Carnitine, and ω 3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation from Healthy to Diseased Skeletal Muscle. *Biomed Res Int*. 2014;2014:613890.

Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Olaso-Gonzalez G, Diaz A, Gratas-Delamarche A, Cerda M, Viña J. Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS One*. 2012;7(10):e46668.

Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CL, Verdijk LB, van Loon LJ. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014; 210:628-41.

Dirks ML, Hansen D, Van Assche A, Dendale P, Van Loon LJ. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle wasting in critically ill comatose patients. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 128:357-65.

Du J, Wang X, Miereles C, Bailey J, Debigare R, Zheng B, Price S, Mitch W. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*. 2004 Jan;113(1):115-23.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific Opinion on the use of high viscosity white mineral oils as a food additive. *EFSA Journal* 2009;7(11):1387,1-39.

Ellman R, Spatz J, Cloutier A, Palme R, Christiansen BA, Bouxsein ML. Partial reductions in mechanical loading yield proportional changes in bone density, bone architecture, and muscle mass. *J Bone Miner Res*. 2013 Apr;28(4):875-85.

Estrella NL, Naya FJ. Transcriptional networks regulating the costamere, sarcomere, and other cytoskeletal structures in striated muscle. *Cell Mol Life Sci*. 2014 May;71(9):1641-56.

Fappi A, Godoy TS, Maximino JR, Rizzato VR, Neves Jde C, Chadi G, Zanoteli E. The effects of omega-3 fatty acid supplementation on dexamethasone-induced muscle atrophy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:961438.

Farah CS, Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J*. 1995 Jun;9(9):755-67.

FDA. FDA Briefing Document. Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee Meeting. October 16, 2013a.

FDA. Freedom of information summary supplemental new animal drug application. NADA 141-251. October 24, 2013b.

Feng HZ, Chen X, Malek MH, Jin JP. Slow recovery of the impaired fatigue resistance in postunloading mouse soleus muscle corresponding to decreased mitochondrial function and a compensatory increase in type I slow fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016 Jan 1;310(1):C27-40.

Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Aug;89(2):823-39.

Fortes MA, Marzuca-Nassr GN, Vitzel KF, da Justa Pinheiro CH, Newsholme P, Curi R. Housekeeping proteins: How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? *Anal Biochem*. 2016 Apr 6;504:38-40.

Fortes MA, Pinheiro CH, Guimarães-Ferreira L, Vitzel KF, Vasconcelos DA, Curi R. Overload-induced skeletal muscle hypertrophy is not impaired in STZ-diabetic rats. *Physiol Rep*. 2015 Jul;3(7). pii: e12457.

Fortin M, Julien P, Couture Y, Dubreuil P, Chouinard P, Latulippe C, Davis T, Thivierge M. Regulation of glucose and protein metabolism in growing steers by long-chain n-3 fatty acids in muscle membrane phospholipids is dose-dependent. *Animal*. 2010 Jan;4(1):89-101.

Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Yasuhara T, Kondo H, Mohri S, Takeda I, Roy RR. Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Sep;197(1):65-74.

Furuno K, Goldberg AL. The activation of protein degradation in muscle by Ca^{2+} or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *Biochem J*. 1986 Aug 1;237(3):859-64.

Ge X, McFarlane C, Vajjala A, Lokireddy S, Ng ZH, Tan CK, Tan NS, Wahli W, Sharma M, Kambadur R. Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts. *Cell Res*. 2011 Nov;21(11):1591-604.

Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Anal Biochem*. 2013 Sep 15;440(2):186-8.

Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve*. 2011 Sep;44(3):318-31.

Gingras A, White P, P. Chouinard Y, Julien P, Davis T, Dombrowski L, Couture Y, Dubreuil P, Myre A, Bergeron K, Marette A, Thivierge C. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt–mTOR–S6K1 pathway and insulin sensitivity. *J Physiol.* 2007 Feb 15;579(Pt 1):269-84.

Gladman SJ, Huang W, Lim SN, Dyall SC, Boddy S, Kang JX, Knight MM, Priestley JV, Michael-Titus AT. Improved outcome after peripheral nerve injury in mice with increased levels of endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci.* 2012 Jan 11;32(2):563-71.

Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct;37(10):1974-84.

Gokhin DS, Fowler VM. Tropomodulin capping of actin filaments in striated muscle development and physiology. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:103069.

Goll D, Thompson V, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 4;98(25):14440-5.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 2000 Apr;80(2):853-924.

Guo BS, Cheung KK, Yeung SS, Zhang BT, Yeung EW. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PLoS One.* 2012;7(1):e30348.

Hanson AM, Harrison BC, Young MH, Stodieck LS, Ferguson VL. Longitudinal characterization of functional, morphologic, and biochemical adaptations in mouse skeletal muscle with hindlimb suspension. *Muscle Nerve.* 2013 Sep;48(3):393-402.

Harrison BC, Allen DL, Girtlen B, Stodieck LS, Kostenuik PJ, Bateman TA, Morony S, Lacey D, Leinwand LA. Skeletal muscle adaptations to microgravity exposure in the mouse. *J Appl Physiol (1985).* 2003 Dec;95(6):2462-70.

Herbst EA, Paglialunga S, Gerling C, Whitfield J, Mukai K, Chabowski A, Heigenhauser GJ, Spriet LL, Holloway GP. Omega-3 supplementation alters mitochondrial membrane composition and respiration kinetics in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2014; 592:1341-52.

Hirabara SM, Carvalho C, Mendonca J, Haber E, Fernandes L, Curi R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). *FEBS Lett.* 2003 Apr 24;541(1-3):109-14.

- Hirasaka K, Maeda T, Ikeda C, Haruna M, Kohno S, Abe T, Ochi A, Mukai R, Oarada M, Eshima-Kondo S, Ohno A, Okumura Y, Terao J, Nikawa T. Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59(4):317-24.
- Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N. TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. *J Appl Physiol* 2008 Jan;104(1):170-7.
- Holmes KC, Geeves MA. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000 Apr 29;355(1396):419-31.
- Hopkins PM. Skeletal muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2006 Volume 6(1):1-6.
- Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, Serhan CN, Kang JX. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 25;103(30):11276-81.
- Hutchins-Wiese HL, Li Y, Hannon K, Watkins BA. Hind limb suspension and long-chain omega-3 PUFA increase mRNA endocannabinoid system levels in skeletal muscle. *J Nutr Biochem*. 2012 Aug;23(8):986-93.
- Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin K, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K, Kishi K. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*. 2001 May;15(7):1279-81.
- Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med*. 2013 Jan;19(1):101-6.
- Jackman R, Kandarian S. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Oct;287(4):C834-43.
- Jackson JR, Mula J, Kirby TJ, Fry CS, Lee JD, Ubele MF, Campbell KS, McCarthy JJ, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. Satellite cell depletion does not inhibit adult skeletal muscle regrowth following unloading-induced atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Oct 15;303(8):C854-61.
- Jang J, Yun HY, Park J, Lim K. Protective effect of branched chain amino acids on hindlimb suspension-induced muscle atrophy in growing rats. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2015 Sep;19(3):183-9.
- Jannig PR, Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Bacurau AV, Monteiro AW, Dourado PM, Wisløff U, Brum PC. Autophagy signaling in skeletal muscle of infarcted rats. *PLoS One*. 2014 Jan 10;9(1):e85820.

Johnson ML, Lalia AZ, Dasari S, Pallauf M, Fitch M, Hellerstein MK, Lanza IR. Eicosapentaenoic acid but not docosahexaenoic acid restores skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity in old mice. *Aging Cell*. 2015 Oct;14(5):734-43.

Kamolrat T, Gray S, Thivierge C. Fish oil positively regulates anabolic signalling alongside an increase in whole-body gluconeogenesis in ageing skeletal muscle. *Eur J Nutr*. 2013 Mar;52(2):647-57.

Kamolrat T, Gray SR. The effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on protein synthesis and breakdown in murine C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Mar 22;432(4):593-8.

Kandarian S, Jackman R. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006 Feb;33(2):155-65.

Kang ZB, Ge Y, Chen ZH, Brown J, Laposata M, Leaf A, Kang JX. Adenoviral gene transfer of *C. elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):4050-4.

Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB. Fat-1 transgenic mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*. 2004 Feb 5;427(6974):504.

Kang JX. Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007 Nov-Dec;77(5-6):263-7.

Keppler D, Decker K. Glycogen. Determination with Amyloglucosidase. In: Bergmeyer HU (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd edition. Academic Press, Inc. New York and London. Verlag Chemie Weinheim; 1974. vol. 3, p. 1127:1131.

Kulakowski SA, Parker SD, Personius KE. Reduced TrkB expression results in precocious age-like changes in neuromuscular structure, neurotransmission, and muscle function. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Sep;111(3):844-52.

Lau BY, Ward WE, Kang JX, Ma DW. Femur EPA and DHA are correlated with femur biomechanical strength in young fat-1 mice. *J Nutr Biochem*. 2009 Jun;20(6):453-61.

Lawler JM, Kunst M, Hord JM, Lee Y, Joshi K, Botchlett RE, Ramirez A, Martinez DA. EUK-134 ameliorates nNOS μ translocation and skeletal muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Apr 1;306(7):R470-82.

Lee JH, Tachibana H, Morinaga Y, Fujimura Y, Yamada K. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. *Life Sci*. 2009 Mar 27;84(13-14):415-20.

Lim J, Gerhart-Hines Z, Dominy J, Lee Y, Kim S, Tabata M, Xiang Y, Puigserver P. Oleic Acid Stimulates Complete Oxidation of Fatty Acids Through PKA-Dependent Activation of SIRT1/PGC1 Complex. *J Biol Chem*. 2013a Mar 8;288(10):7117-26.

Lim SN, Gladman SJ, Dyall SC, Patel U, Virani N, Kang JX, Priestley JV, Michael-Titus AT. Transgenic mice with high endogenous omega-3 fatty acids are protected from spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2013b Mar;51:104-12.

Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*. 2014 Mar 14;114(6):1052-68.

Liu J, Peng Y, Feng Z, Shi W, Qu L, Li Y, Liu J, Long J. Reloading functionally ameliorates disuse-induced muscle atrophy by reversing mitochondrial dysfunction, and similar benefits are gained by administering a combination of mitochondrial nutrients. *Free Radic Biol Med*. 2014 Apr;69:116-28.

Lloyd SA, Lang CH, Zhang Y, Paul EM, Laufenberg LJ, Lewis GS, Donahue HJ. Interdependence of muscle atrophy and bone loss induced by mechanical unloading. *J Bone Miner Res*. 2014 May;29(5):1118-30.

Luther PK. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil*. 2009;30(5-6):171-85.

Magne H, Savary-Auzeloux I, Rémond D, Dardevet D. Nutritional strategies to counteract muscle atrophy caused by disuse and to improve recovery. *Nutr Res Rev*. 2013 Dec;26(2):149-65.

Maki T, Yamamoto D, Nakanishi S, Iida K, Iguchi G, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogen-1 and MuRF1 in rats. *Nutr Res*. 2012 Sep;32(9):676-83.

Malekshahi Moghadam A, Saedisomeolia A, Djalali M, Djazayeri A, Pooya S, Sojoudi F. Efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on serum levels of tumour necrosis factor-alpha, C-reactive protein and interleukin-2 in type 2 diabetes mellitus patients. *Singapore Med J*. 2012 Sep;53(9):615-9.

Marzuca G. Efectos de la electroestimulación sobre la Morfohistología e Inmunohistoquímica de los músculos Sóleo, Tibial Anterior y Extensor Digital Largo de ratas viejas sometidas a disminución de uso (Tesis Mestrado). Escuela de Kinesiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Talca: Universidad Católica del Maule; 2012.

McClung J, Kavazis A, De Ruisseau K, Falk D, Deering M, Lee Y, Sugiura T, Powers S. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jan 15;175(2):150-9.

Mohankumar S, Taylor C, Siemens L, Zahradka P. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase, AMP-activated kinase and Akt substrate-160 kDa by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid mediates skeletal muscle glucose uptake. *J Nutr Biochem*. 2013 Feb;24(2):445-56.

Moosheer SM, Waldschütz W, Itariu BK, Brath H, Stulnig TM. A protein-enriched low glycemic index diet with omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation exerts beneficial effects on metabolic control in type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes*. 2014 Dec;8(4):308-14.

Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 2002 Apr;92(4):1367-77.

Morimoto A, Winaga H, Sakurai H, Ohmichi M, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Matsui T, Ushida T, Okada T, Sato J. Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. *Neurosci Lett*. 2013 Feb 8;534:295-300.

Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC. Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy. *Cancer*. 2011 Apr 15;117(8):1775-82.

Nakamura H, Aoki K, Masuda W, Alles N, Nagano K, Fukushima H, Osawa K, Yasuda H, Nakamura I, Mikuni-Takagaki Y, Ohya K, Maki K, Jimi E. Disruption of NF- κ B1 prevents bone loss caused by mechanical unloading. *J Bone Miner Res*. 2013 Jun;28(6):1457-67.

Nunes DO, Almenara CC, Broseghini-Filho GB, Silva MA, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids Health Dis*. 2014 Jul 3;13:107.

Ohira T, Kawano F, Ohira T, Goto K, Ohira Y. Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading. *J Physiol Sci*. 2015 Jul;65(4):293-310.

Olaitan PB, Chen IP, Norris JE, Feinn R, Oluwatosin OM, Reichenberger EJ. Inhibitory Activities of Omega-3 Fatty Acids and Traditional African Remedies on Keloid Fibroblasts. *Wounds*. 2011 Apr;23(4):97-106.

Ottenheijm CA, Granzier H. New insights into the structural roles of nebulin in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:968139.

Parkington J, Siebert A, LeBrasseur N, Fielding R. Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Nov;285(5):R1086-90.

Parra D, Ramel A, Bandarra N, Kiely M, Martínez JA, Thorsdottir I. A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. *Appetite*. 2008 Nov;51(3):676-80.

Parra P, Serra F, Palou A. Transcriptional analysis reveals a high impact of conjugated linoleic acid on stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 mRNA expression in mice gastrocnemius muscle. *Genes Nutr.* 2012 Oct;7(4):537-48.

Peng Y, Zheng Y, Zhang Y, Zhao J, Chang F, Lu T, Zhang R, Li Q, Hu X, Li N. Different effects of omega-3 fatty acids on the cell cycle in C2C12 myoblast proliferation. *Mol Cell Biochem.* 2012 Aug;367(1-2):165-73.

Pérez-Matute P, Pérez-Echarri N, Martínez JA, Martí A, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . *Br J Nutr.* 2007; Feb;97(2):389-98.

Pierno S, Liantonio A, Camerino GM, De Bellis M, Cannone M, Gramegna G, Scaramuzzi A, Simonetti S, Nicchia GP, Basco D, Svelto M, Desaphy JF, Camerino DC. Potential benefits of taurine in the prevention of skeletal muscle impairment induced by disuse in the hindlimb-unloaded rat. *Amino Acids.* 2012 Jul;43(1):431-45.

Pierno S, Desaphy JF, Liantonio A, De Luca A, Zarrilli A, Mastrofrancesco L, Procino G, Valenti G, Conte Camerino D. Disuse of rat muscle in vivo reduces protein kinase C activity controlling the sarcolemma chloride conductance. *J Physiol.* 2007 Nov 1;584(Pt 3):983-95.

Pinheiro CH. Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na regeneração do músculo esquelético: modulação por ácido oleico. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo: Universidades de São Paulo; 2012a.

Pinheiro CH, Vitzel KF, Curi R. Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. *Scand J Med Sci Sports.* 2012b;22: 24-33.

Pistilli EE, Bogdanovich S, Goncalves MD, Ahima RS, Lachey J, Seehra J, Khurana T. Targeting the activin type IIB receptor to improve muscle mass and function in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 2011 Mar;178(3):1287-97.

Poortmans J, Carpentier Y. Sarcopenia, ageing and exercise. *Science & Sports* 2009;24:74–78.

Powers S, Kavazis A, McClung J. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Jun;102(6):2389-97.

Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol.* 2002 Aug;27(4):349-95.

Purintrapiban J, Wang M, Forsberg N. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2003 Nov;136(3):393-401.

Rahman M, Halade G, Jamali A, Fernandes G. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents age-associated skeletal muscle loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009a Jun 12;383(4):513-8.

Rahman M, Bhattacharya A, Banu J, Kang JX, Fernandes G. Endogenous n-3 fatty acids protect ovariectomy induced bone loss by attenuating osteoclastogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009b Aug;13(8B):1833-44.

Rodacki CL, Rodacki AL, Pereira G, Naliwaiko K, Coelho I, Pequito D, Fernandes LC. Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 2012 Feb;95(2):428-36.

Romanatto T, Fiamoncini J, Wang B, Curi R, Kang JX. Elevated tissue omega-3 fatty acid status prevents age-related glucose intolerance in fat-1 transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1842(2):186-91.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 2010 Jun 15;401(2):318-20.

Sandri M. Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002 May;5(3):249-53.

Sandri M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008 Jun;23:160-70.

Saneian H, Tavakkol K, Adhamian P, Gholamrezaei A. Comparison of *Lactobacillus Sporogenes* plus mineral oil and mineral oil alone in the treatment of childhood functional constipation. *J Res Med Sci*. 2013 Feb;18(2):85-8.

Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):4294-314.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967 Sep 7;28(5):815-20.

Shiroguchi K, Chin HF, Hannemann DE, Muneyuki E, De La Cruz EM, Kinosita K Jr. Direct observation of the myosin Va recovery stroke that contributes to unidirectional stepping along actin. *PLoS Biol*. 2011 Apr;9(4):e1001031.

Schmöcker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):864-9.

Silveira L, Hirabara SM, Alberici LC, Lambertucci RH, Peres CM, Takahashi HK, Pettri A, Alba-Loureiro T, Luchessi AD, Cury-Boaventura MF, Vercesi AE, Curi R. Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):213-26.

Sipido KR, Acsai K, Antoons G, Bito V, Macquaide N. T-tubule remodelling and ryanodine receptor organization modulate sodium-calcium exchange. *Adv Exp Med Biol.* 2013;961:375-83.

Siu P, Pistilli E, Always S. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Oct;289(4):R1015-26.

Smith G, Atherton P, Reeds D, Mohammed S, Rankin D, Rennie M, Mittendorfer B. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2011a Feb;93(2):402-12.

Smith G, Atherton P, Reeds D, Mohammed S, Rankin D, Rennie M, Mittendorfer B. Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperinsulinaemia–hyperaminoacidaemia in healthy young and middle-aged men and women. *Clin Sci (Lond).* 2011b Sep;121(6):267-78.

Smith GI, Julliand S, Reeds DN, Sinacore DR, Klein S, Mittendorfer B. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. *Am J Clin Nutr.* 2015 Jul;102(1):115-22.

Sparrow JC, Schöck F. The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Apr;10(4):293-8.

Soukup T, Zacharová G, Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem.* 2002;104(4):399-405.

Sun G, Tou J, Liittschwager K, Herrera A, Hill E, Girten B, Reiss-Bubenheim D, Vasques M. Evaluation of the nutrient-upgraded rodent food bar for rodent spaceflight experiments. *Nutrition.* 2010 Nov-Dec;26(11-12):1163-9.

Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec CY, Schmid HP, Attaix D. Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J.* 1996 May 15;316 (Pt 1):65-72.

Tanaka Y, Nakano J, Hamaue Y, Sekino Y, Sakamoto J, Kataoka H, Okita M. Hindlimb suspension does not influence mechanical sensitivity, epidermal thickness, and peripheral nerve density in the glabrous skin of the rat hind paw. *Physiol Res.* 2013;62(1):119-23.

Thomason D e Booth F. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* (1985). 1990 Jan;68(1):1-12.

Thomason D, Herrick R, Surdyka D, Baldwin KM. Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J Appl Physiol* (1985). 1987 Jul;63(1):130-7.

Thrush AB, Chabowski A, Heigenhauser GJ, McBride BW, Or-Rashid M, Dyck DJ. Conjugated linoleic acid increases skeletal muscle ceramide content and decreases insulin sensitivity in overweight, non-diabetic humans. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007 Jun;32(3):372-82.

Tidball J, Spencer M. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J Physiol*. 2002 Dec 15;545(Pt 3):819-28.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Sep;4(9):679-89.

Tuazon M, Henderson G. Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipid is altered in mdx mice and is predictive of disease markers. *Metabolism*. 2012 Jun;61(6):801-11.

Turcotte L, Abbott M. Contraction-induced signaling: evidence of convergent cascades in the regulation of muscle fatty acid metabolism. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 Nov;90(11):1419-33.

Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc)*. 2012 Dec;77(13):1515-35.

Vitzel KF. Participação do estresse oxidativo na disfunção muscular esquelética em ratos diabéticos. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo: Universidades de São Paulo; 2013.

von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*. 2012 Nov;22(11):602-9.

Wade CE, Miller M, Baer LA, Moran M, Steele MK, Stein TP. Body Mass, Energy Intake, and Water Consumption of Rats and Humans During Space Flight. *Nutrition*. 2002 Oct;18(10):829-36.

Wall BT, van Loon LJ. Nutritional strategies to attenuate muscle disuse atrophy. *Nutr Rev*. 2013 Apr;71(4):195-208.

Wan JB, Huang LL, Rong R, Tan R, Wang J, Kang JX. Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2487-94.

Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med*. 2013 Jan;19(1):93-100.

Washington TA, White JP, Davis JM, Wilson LB, Lowe LL, Sato S, Carson JA. Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Aug;202(4):657-69.

Watson ML, Baehr LM, Reichardt HM, Tuckermann JP, Bodine SC, Furlow JD. A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 May 1;302(10):E1210-20.

Weylandt KH, Nadolny A, Kahlke L, Köhnke T, Schmöcker C, Wang J, Lauwers GY, Glickman JN, Kang JX. Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1782(11):634-41.

Weylandt KH, Krause LF, Gomolka B, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX. Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α . *Carcinogenesis*. 2011 Jun;32(6):897-903.

White PJ, Arita M, Taguchi R, Kang JX, Marette A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3066-73.

Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, Richter EA. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1996 Oct;81(4):1501-9.

Xu J, Hwang JC, Lees HA, Wohlgemuth SE, Knutson MD, Judge AR, Dupont-Versteegden EE, Marzetti E, Leeuwenburgh C. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. *Exp Gerontol*. 2012 Jan;47(1):100-8.

Xu GT, Zigler JS Jr, Lou MF. The possible mechanism of naphthalene cataract in rat and its prevention by an aldose reductase inhibitor (ALO1576). *Exp Eye Res*. 1992 Jan;54(1):63-72.

Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Yasuhara K, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Okita M, Origuchi T, Goto K. Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016 Aug;217(4):325-37.

You JS, Park MN, Lee YS. Dietary fish oil inhibits the early stage of recovery of atrophied soleus muscle in rats via Akt-p70s6k signaling and PGF2 α . *J Nutr Biochem*. 2010a Oct;21(10):929-34.

You JS, Park MN, Song W, Lee YS. Dietary fish oil alleviates soleus atrophy during immobilization in association with Akt signaling to p70s6k and E3 ubiquitin ligases in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010b Jun;35(3):310-8.

Zhang L, Keung W, Samokhvalov V, Wang V, Lopaschuk G. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1801(1):1-22.

APÊNDICE A – Composição dos óleos de peixe (rico em EPA e DHA)

Fórmula	Nome	Óleo de peixe rico em EPA	Óleo de peixe rico em DHA
14 : 0	Mirístico	—	—
16 : 0	Palmítico	—	1,603 ± 0,097
16 : 1 (n-7)	Hexadecenóico	0,558 ± 0,034	0,437 ± 0,379
17 : 0	Margárico	—	—
17 : 1 (n-7)	Heptadecenóico	—	—
18 : 0	Esteárico	—	1,613 ± 0,037
18 : 1 (n-9)	Oleico	0,887 ± 0,008	4,779 ± 0,006
18 : 1 (n-11)	Vacênico	—	1,189 ± 0,029
18 : 2 (n-6)	Linoleico	0,527 ± 0,047	1,707 ± 0,039
20 : 0	Eicosanóico	—	—
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	—	0,807 ± 0,005
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	—	—
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,040 ± 0,034	—
22 : 0	Docosanóico	0,025 ± 0,0024	—
20 : 2	Eicosadienóico	2,848 ± 0,053	0,800 ± 0,017
20 : 3 (n-6)	Eicosatrienóico	—	—
20 : 4 (n-6)	Araquidônico	2,678 ± 0,043	2,474 ± 0,015
20 : 5 (n-3)	Eicosapentaenóico	67,695 ± 0,125	10,705 ± 0,045
22 : 2 (n-6)	Docosadienóico	1,007 ± 0,004	0,780 ± 0,025
24 : 1 (n-9)	Nervônico	—	0,586 ± 0,008
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,702 ± 0,026	4,270 ± 0,105
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	3,657 ± 0,079	5,078 ± 0,339
22 : 6 (n-3)	Docosahexaenóico	15,793 ± 0,592	60,928 ± 0,310
Não identificados		3,647 ± 0,242	3,025 ± 0,421
Totais	Saturados	—	3,216 ± 0,128
	Monoinsaturados	1,445 ± 0,037	7,797 ± 0,401
	Polinsaturados	94,907 ± 0,279	85,961 ± 0,594
	ômega-6	(3,908 ± 0,064)	(8,451 ± 0,078)
	ômega-3	(87,145 ± 0,392)	(76,711 ± 0,572)
	ômega-6/ ômega-3	0,045	0,11

Os teores de ácidos graxos obtidos são apresentados em % de Área e representam a média de três determinações. **EPA:** ácido eicosapentaenóico; **DHA:** ácido docosahexaenóico; **n-3:** ômega-3; **n-6:** ômega-6; **n-7:** ômega-7; **n-9:** ômega-9; **n-11:** ômega-11.

APÊNDICE B – Exemplo de genotipagem de camundongos transgênicos FAT-1**FAT-1 (07/07/2014)**

Observa-se corrida de PCR em gel de agarose 3%. **C+**: controle positivo para FAT-1; **C-**: controle negativo para FAT-1; **animais 58 ao 61 e 68 ao 71**: C57BL/6; **animais 62 ao 67 e 72, 73**: FAT-1.

APÊNDICE C – Membranas coradas com *Ponceau S* utilizadas

A.

B.

Análise quantitativo das membranas do *Western Blotting* coradas com *Ponceau S*. **A:** Imagens das membranas do *Western Blotting* coradas com *Ponceaus S* usadas nesta tese. **B:** Média do análise quantitavo da tincão com *Ponceau S*. Não foram encontradas diferenças significativas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=6). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA *two way* com *post hoc* teste de Bonferroni. **OM:** óleo mineral; **EPA:** ácido eicosapentaenóico; **DHA:** ácido docosaexaenoico; **COM:** controle suplementado com óleo mineral; **SOM:** suspensão suplementado com óleo mineral; **CEPA:** controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **SEPA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico; **CDHA:** controle suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenóico; **SDHA:** suspensão suplementado com óleo de peixe rico em ácido docosaexaenoico; **P:** pool que contem uma mistura de partes iguais de todas as amostras-usado para normalizar os resultados quantitativos do *Ponceau S*.

APÊNDICE D – Artigos publicados em periódicos durante o período de doutoramento

1. **Marzuca-Nassr, GN**; Vitzel, KF; De Sousa, LG; Murata, G; Crisma, AR; Rodrigues Junior, CF; Abreu, P; Torres, RP; Mancini-Filho, J; Hirabara, SM; Newsholme, P; Curi, Rui. Effects of high EPA and high DHA fish oils on changes in signaling associated with protein metabolism induced by hindlimb suspension in rats. *Physiol Rep*. 2016 Sep;4(18). pii: e12958.
2. Abreu P, Pinheiro CH, Vitzel KF, Vasconcelos DA, Torres RP, Fortes MS, **Marzuca-Nassr GN**, Mancini-Filho J, Hirabara SM, Curi R. Contractile function recovery in severely injured gastrocnemius muscle of rats treated with either oleic or linoleic acid. *Exp Physiol*. 2016 Nov 1;101(11):1392-1405.
3. Fuentes P*, Jara N*, Bastías P*, Vitzel KF, **Marzuca-Nassr GN**. Heat transfer by three types of packs and its implication on the flexibility of the lower back: a randomized, controlled trial. *Fisioterapia e Pesquisa* 2016; 23(2):201-209.
4. Curi R*, Newsholme P*, **Marzuca-Nassr GN**, Takahashi HK, Hirabara SM, Cruzat V, Krause M, de Bittencourt PI Jr. Regulatory principles in metabolism-then and now. *Biochem J*. 2016 Jul 1;473(13):1845-57.
5. Fortes MA, **Marzuca-Nassr GN**, Vitzel KF, da Justa Pinheiro CH, Newsholme P, Curi R. Housekeeping proteins: How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? *Anal Biochem*. 2016 Jul 1;504:38-40.
6. Yeny Concha Cisternas*, **Gabriel Nasri Marzuca-Nassr***. Criterios de valoración geriátrica integral en adultos mayores autovalentes y en riesgo de dependencia en centros de atención primaria en Chile. *Reem*. 2016 Jul;3(1):31-4.
7. Muñoz Silva CA, Rojas Orellana PA, **Marzuca-Nassr GN**. Criterios de valoración geriátrica integral en adultos mayores con dependencia moderada y severa en Centros de Atención Primaria en Chile. *Rev Med Chil*. 2015 May;143(5):612-8.
8. Carolina Andrea Muñoz Silva, Pedro Antonio Rojas Orellana, **Gabriel Nasri Marzuca Nassr**. Valoración del estado funcional de adultos mayores con dependencia moderada y severa pertenecientes a un centro de salud familiar. *Fisioter Pesq*. 2015;22(1):76-83.

*Ambos autores contribuíram da mesma forma ao trabalho.

APÊNDICE E – Indicações em congressos durante o período de doutoramento

- **2015. 1º Lugar Comunicação Oral.** Pós-graduação. Área: Ciências Biológicas e da Saúde, 12ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, Brasil

Gabriel Nasri Marzuca-Nassr, Kaio Fernando Vitzel, Luis Gustavo Oliveira de Sousa, Gilson Masahiro Murata, Amanda Rabello Crisma, Carlos Flores Rodrigues Junior, Phablo Sávio Abreu Teixeira, Rosângela Pavan Torres, Jorge Mancini-Filho, Sandro Massao Hirabara, Rui Curi. Óleo de peixe rico em EPA o DHA modula vias de sinalização associada à atrofia muscular esquelética em ratos submetidos à *hindlimb suspension*.

- **2015. Selecionado para apresentação oral** no *16th International Biochemistry of Exercise Congress (IBEC)*, São Paulo, Brasil.

Marzuca-Nassr GN, Vitzel KF, de Sousa LG, Murata GM, Crisma AR, Rodrigues CF Jr, Abreu PST, Torres RP, Mancini-Filho J, Hirabara SM, Curi R. Treatment with High EPA or High DHA Fish Oils Attenuate Muscle Atrophy-induced by Hindlimb Suspension in Rats.