LEANDRO NUNES SANCHES

**Análise histológica e molecular do músculo diafragma após tratamento
com diferentes glicocorticoides e sob a associação do ácido graxo
ômega 3 e dexametasona em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Neurologia

Orientação: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2020

LEANDRO NUNES SANCHES

**Análise histológica e molecular do músculo diafragma após tratamento
com diferentes glicocorticoides e sob a associação do ácido graxo
ômega 3 e dexametasona em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Neurologia

Orientação: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sanches, Leandro Nunes

Análise histológica e molecular do músculo
diafragma após tratamento com diferentes
glicocorticoides e sob a associação do ácido graxo
ômega 3 e dexametasona em ratos / Leandro Nunes
Sanches. -- São Paulo, 2020.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Glicocorticoides 2.Dexametasona
3.Deflazacorte 4.Prednisolona 5.Atrofia muscular
6.Diafragma 7.Efeitos dos fármacos 8.Anti-
inflamatórios 9.Ácidos graxos ômega-3

USP/FM/DBD-245/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esse estudo, à minha família, amigos, aos que contribuíram e/ou fizeram parte de alguma forma e a todos que possam se beneficiar dos nossos resultados.

AGRADECIMENTOS

Não caberia em palavras o sentimento de gratidão às pessoas, por acreditarem que seria possível e a confiança que me foi dada. Foram ensinamentos técnicos e pessoais ímpares que me foram passados junto às fileiras do departamento de neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que sempre serão lembrados, assim, agradeço imensamente:

Deus e a toda minha Família

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Departamento de Neurologia da Universidade de São Paulo

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Laboratório de Investigação Médica – LIMs 15 e 45

Orientador Professor Dr. Edmar Zanoteli

Professor Dr. Gerson Chadi

Amigo, irmão e parceiro de pesquisa PhD. Alan Fappi, sem essa parceria, o caminho teria sido bem mais difícil.

Amigo e parceiro de pesquisa MSc. Rubens De Larina Neto

Alunos de iniciação científica, Guilherme, Pedro, Jardel, Luana, Felipe e Thayane.

Banca de admissão: Prof. Dr. Edmar Zanoteli, Prof. Dr. Fernando Kok e Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo.

Banca de qualificação: Prof. Dr. Pedro Caruso, Dra. Jéssica Ruivo Maximino e Dra. Roseli da Silva Soares.

Banca de defesa: Prof. Dr. Edmar Zanoteli- Neurologia FMUSP, Prof^a Titular Dr^a Umbertina R. Conti – Neurologia FMUSP, Prof. Dr. Pedro Caruso- Pneumologia-FMUSP, Prof. Dr. Marcondes Cavalcante França Jr – Neurologia UNICAMP, Prof Titular Dr. Anselmo Sigari Mariscot - ICB – Anatomia USP), Profa. Dra. Helga Cristina Almeida da Silva – Neurologia UNIFESP e Dra. Jéssica Ruivo Maximino Neurologia – FMUSP.

Colegas, funcionários da faculdade e laboratórios: Dra Jéssica Maximino, Sra. Thaís Figueira, Dra Juliana de C. Neves, Dra Joyce Meire Gilio, ao Doutorando Felipe Busser e mestrando Giane Jorge, Sra. Theresa Florence Dinucci, Ms. Eliene Dutra, Sra. Sara Gomes, Sra. Iolanda Oruê e Sr. Gilmar Marques Silva.

Revisores; Prof. Maurício Sanches, Prof^o Valderes Nunes Sanches, Prof. Paulo Mendes Monteiro, PhD. Vera Paoli Monteiro, PhD. Alan Fappi e;

Em especial minha esposa e guia, Dra. Fabíola Paoli Mendes Monteiro, Chandon Monteiro Sanches e Ginger Monteiro Sanches.

EPÍGRAFE

A corrente dos hábitos é leve demais ao ponto de não ser sentida, até que seja pesada demais para ser quebrada.

W. B.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Tecido muscular esquelético	4
2.2. O Músculo Diafragma.....	6
2.3. Atrofia muscular esquelética.....	7
2.4. Sistema Ubiquitina Proteassoma.....	8
2.5. Atrofia relacionada à via do IGF-1/PI -3K/AKT/mTOR	10
2.6. Glicocorticoides	13
2.7. Glicocorticoides e a atrofia muscular esquelética	14
2.8. Alvos potenciais no tratamento da atrofia muscular	3
2.9. Ácidos graxos poli-insaturados e sua atuação na atrofia muscular	4
3. Justificativa	21
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivos gerais.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5. METODOLOGIA	23
5.1. Animais do estudo e estruturação.....	23
5.2. Suplementação de N-3 associado a DX	23
5.3. Equipotência de drogas para análise comparativa.....	24
Figura 6. Esquema representativo do desenho experimental realizado.....	24
5.4. Coleta dos materiais	25
5.5. Reação histológica.....	25
5.6. Coloração metacromática de ATPase e cálculo de área de fibra.....	26
5.7. Eletroforese SDS-PAGE (<i>Western blotting</i>)	26
5.8. Extração de RNA e reação de transcriptase reversa.....	28
5.9. PCR em tempo real	28
5.10. Análise estatística.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1. Peso corporal.....	30

6.2.	Peso da glândula adrenal	32
6.3.	Análise da área de secção transversa e proporção de fibras musculares.....	32
6.4.	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	37
6.5.	<i>Western blotting</i>	38
7.	DISCUSSÃO.....	42
8.	CONCLUSÕES.....	55
9.	REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA** - Ácido araquidônico
- Akt** - *Protein kinase B*
- ALA** - ácido α -linoleico
- AMPK** - Proteína quinase ativada por AMP
- DC** - Deflazacorte
- DHA** - Ácido docosaheptaenoico
- DX** - Dexametasona
- EPA** - Ácido eicosapentaenoico
- FoxO3a** - *Forkhead box protein O3*
- GSK3 β** - *Glycogen sintetase quinase 3 beta*
- HDL** – Lipoproteína de alta densidade
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- MDX** – *Mouse X-linked muscular dystrophy*
- MP** - Metilprednisolona
- mTOR** - *Mammalian target of rapamycin*
- N-3** - Ômega-3
- N-6** - Ômega-6
- pFoxO3a** - *Phosphorylated Forkhead box O3*
- PGC1 α** – *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*
- PGF2 α** - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 2 alpha*
- pGSK3 β** - Glicogênio sintetase quinase-3 beta fosforilada
- PI3K** – *Fosfatidilinositol 3-quinase*
- PUFA**- Ácidos graxos poli-insaturados
- REDD-1** - Regulated in development and DNA damage responses 1 (DDIT4)
- REDD-2** – *Regulated in development and DNA damage responses 2 (DDIT4L)*
- RT-PCR** – Reação em cadeia da Polimerase em tempo real
- TRPC1** - *Transient receptor potential channel 1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica do sarcômero.	4
Figura 2. Proteínas associadas à distrofina.	6
Figura 3. Sistema ubiquitina proteassoma	9
Figura 4. Esquema representativo da sinalização envolvida na atrofia muscular induzida por glicocorticoide	11
Figura 5. Esquema básico da atrofia muscular induzida por glicocorticoides	16
Figura 6. Esquema representativo do desenho experimental realizado	24
Figura 7. Peso corporal durante os 40 dias de experimento e dados estatístico	31
Figura 8. Peso da glândula adrenal	32
Figura 9. Área de secção transversa das fibras musculares	33
Figura 10. Coloração metacromática de ATPase	35
Figura 11. Proporção de fibras do músculo diafragma	36
Figura 12. RT-PCR	38
Figura 13. Expressão de Akt e pAkt.	39
Figura 14: Expressão proteica de FoxO3a total e fosforilado (Ser253).	40
Figura 15: Expressão proteica de GSK3β total e fosforilado (Ser253).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recomendação para consumo diário de ácidos graxos Ômega-3.....	7
Tabela 2. Anticorpos primários utilizados no estudo.	28
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados no estudo. (p.b.= pares de base).....	29
Tabela 4. Porcentagem de redução da área de secção transversa vs CT.....	34
Tabela 5. Comparação entre grupos da proporção de fibras.....	36
Tabela 6. Porcentagem da proporção de fibras vs CT.....	37

RESUMO

Sanches LN. *Análise histológica e molecular do músculo diafragma após tratamento com diferentes glicocorticoides e sob a associação do ácido graxo ômega 3 e dexametasona em ratos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Atrofia muscular é uma resposta debilitante e que pode ocorrer em diversas condições, como por exemplo na inatividade, imobilização e corticoterapia. Corticoides estão entre os medicamentos mais prescritos na prática médica, sendo amplamente utilizados no tratamento de doenças neuromusculares. No entanto, seu uso pode levar a fraqueza e atrofia muscular, dependendo do tempo de uso, dosagem e tipo de musculatura afetada, podendo variar, de acordo com cada tipo de corticoide. Omega-3 (N-3) é um ácido graxo amplamente recomendado e consumido, principalmente pelos benefícios cardiovasculares, contudo, quando associado a dexametasona (DX) pode aumentar seus efeitos colaterais no músculo periférico. Não há, no entanto, estudo quanto ao efeito desta associação sobre a musculatura diafragmática. **Objetivos:** Avaliar o impacto da associação de DX+N-3 e de diferentes glicocorticoides em equipotência, sobre o músculo diafragma, através da histologia, expressão gênica e proteica. **Metodologia:** Sessenta ratos *Wistar* foram divididos em seis grupos. Vinte ratos foram suplementados com N-3 por 40 dias (EPA/DHA-100mg/kg/dia), dos quais, 10 foram submetidos à administração de DX (1,25mg/kg/dia) nos 10 dias finais. Quarenta animais receberam de forma equipotente, DX (1,25mg/kg/dia), metilprednisolona (MP) (6,7mg/kg/dia), deflazacort (DC) (10 mg/kg/dia) ou solução salina (CT) nos últimos 10 dias. Avaliamos a área de secção transversa e proporção das fibras musculares por coloração metacromática de ATPase, expressão de RNAm de atrogenes por PCR em tempo real e análise proteica por *Western Blotting*. **Resultados:** Houve aumento na proporção de fibras tipo 2B e diminuição do tipo 1 no grupo N-3. O DC aumentou a proporção de fibras tipo 1 e juntamente com os grupos DX, DX+N-3 e MP, diminuiu a proporção de fibras 2A. A DX atrofiou fibras 1, 2A e 2B, não sendo influenciada pelo N-3. De forma isolada, o N-3 atrofiou as fibras 2A e o DC atrofiou fibras 2A e 2B. Entre os glicocorticoides a DX causou maior atrofia muscular de fibras 2A. A DX causou maior atrofia de fibras 2B vs DC. Todos os glicocorticoides diminuíram a expressão proteica de pAkt (ativo), sendo a DC a mais branda e apenas o grupo MP diminuiu a expressão total de Akt. A MP e DX diminuíram a expressão de pFoxO3a (inativo). Houve diminuição importante da expressão total de FoxO3a no grupo MP. Todos os glicocorticoides mostraram diminuição importante da expressão de pGSK3β (inativo) e aumento da expressão total no MP e DC. Notamos diminuição da expressão proteica de PGC1α nos grupos DX e DC e tendência de queda na expressão proteica de pFoxO3a no grupo DX+N-3 vs DX. A expressão de *Atrogina-1*, *MuRF-1* e *REDD-2* foi aumentada no grupo DX. Houve menor expressão de *MuRF-1* e *REDD-2* no grupo DX+N-3 vs DX. A expressão de *Atrogina-1* foi aumentada em todos os grupos e com maior expressão no grupo MP. A expressão de *MuRF-1* foi aumentada nos grupos MP e DX, enquanto *REDD-2* foi aumentada nos grupos DC e DX. **Conclusões:** A administração de glicocorticoides por 10 dias em ratos mostrou ser lesiva ao tecido diafragmático, com efeitos mais brandos (tardios) no uso de DC comparados aos outros glicocorticoides. A associação de DX+N-3 parece ser favorável quanto a expressão proteica de PGC1α, pFoxO3a e RNAm de atrogenes.

Descritores: Glicocorticoides; Dexametasona; Deflazacorte; Prednisolona; Atrofia muscular; Diafragma; Efeitos dos fármacos; Anti-inflamatórios; Ácidos graxos ômega-3.

ABSTRACT

Sanches LN. *Histological and molecular analysis of the diaphragm muscle after treatment with different glucocorticoids and under the association of omega 3 fatty acid and dexamethasone in rats* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Muscle atrophy is a debilitating tissue response that can occur in diverse conditions such as immobilization, inactivity and corticotherapy. Corticosteroids are one of the most prescribed drugs in medical practice, widely used in the treatment of neuromuscular diseases. Although its use can lead to weakness and muscle atrophy, depending on the time of use, dosage and muscle type, with different impact levels depending on the corticoid type. Omega-3 (N-3) is a fatty acid widely recommended mainly for its beneficial cardiovascular effects, however, when associated with dexamethasone (DX) can increase the side effects in the peripheral muscle, with no description effect on diaphragmatic muscle. **Aim:** We aimed to evaluate the impact of the DX in association with N-3 and different glucocorticoids in equipotency, on the diaphragm muscle, through histology, gene and protein expression. **Methods:** The experimental study was carried out with sixty Wistar rats, divided into six groups. Twenty Wistar rats were supplemented with N-3 for 40 days (EPA / DHA-100mg / kg / day), of which 10 were submitted to DX administration (1.25mg / kg / day) in the final 10 days. 40 animals received equipotent form, DX (1.25mg / kg / day), methylprednisolone (MP) (6.7mg / kg / day), deflazacort (DC) (10 mg / kg / day) or saline solution (CT) in the last 10 days. We assessed the cross-sectional area and proportion of muscle fibers by ATPase metachromatic staining, atrogenes mRNA by real-time PCR and protein by Western Blotting technique. **Results:** There was an increase in the proportion of type 2B fibers and a decrease in type 1 in the N-3 group. The DC increased the proportion of fibers 1 and together with the groups DX, DX+N-3 and MP, decreased proportion of type 2A fibers. DX atrophied fibers 1, 2A and 2B, and was not influenced by N-3, which alone led to atrophy of 2A fibers. The DC atrophied fibers 2A and 2B. Among glucocorticoids, DX caused greater muscle atrophy in 2A and 2B fibers vs DC. All glucocorticoids decreased the protein expression of pAktT (active), with DC being the mildest; only the MP group decreased the total expression of Akt. DX decreased the expression of pFoxO3a (inactive), and in total expression (FoxO3a) there was an important decrease in the MP group. All glucocorticoids showed a significant decrease in the expression of pGSK3 β (inactive), when compared to CT, with an increase in total expression in the MP and DC. We noticed a decrease in PGC1 α protein expression in the DX and DC. In pFoxO3a protein expression, we noted a downward trend in the DX + N-3 vs DX. The DX increased all atrogenes expression. There was less expression of *MuRF-1* and *REDD-2* in the DX+N-3 vs DX group. *Atrogin-1* expression was increased in all groups and with greater expression in the MP. The expression of *MuRF-1* was increased in the MP and DX, and *REDD-2* was increased in the DC and DX. **Conclusions:** The glucocorticoids administration for 10 days in rats proved to be harmful to diaphragmatic tissue, with milder effects in the use of DC compared to other glucocorticoids. The association of DX+N-3 was favorable for protein expression of PGC1 α , pFoxO3a and reduction of mRNA atrogenes.

Descriptors: Glucocorticoids; Dexamethasone; Deflazacort; Prednisolone; Muscle atrophy; Diaphragm; Drug effects; Anti-Inflammatory agent; Fatty acids, omega-3.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A musculatura esquelética é o tecido mais abundante do corpo humano, sua contração ocorre pelo deslizamento entre estruturas internas do sarcômero, chamadas actina e miosina (**Agarkova & Perriard, 2005**). Existem três tipos básicos de fibra muscular, as fibras dos tipos 1, 2A e 2B (**Frontera & Ochala, 2015; Robbins, 1996**). Estão presentes em diferentes proporções, dependendo da musculatura e função.

O diafragma é um músculo estriado esquelético, principal e mais importante músculo da respiração (**Haddad & Sharma, 2020**), sendo responsável por até 70% do volume inspiratório (**Urmey *et al.*, 1988; Porto, 1997; Polkey, 2019**).

Pacientes com doenças neuromusculares graves, como a doença muscular de Duchenne, apresentam importante fraqueza, chegando a falência da musculatura respiratória, em estágios tardios da doença (**Stedman *et al.*, 1991**). Podendo ser necessário, suporte ventilatório invasivo prolongado, agravando essa musculatura (**Diaz *et al.*, 2014**). podendo cursar com falência respiratória, quando retirado o suporte ventilatório (**Supinski *et al.*, 2010**).

A atrofia muscular é descrita como perda da massa muscular, por redução de área de fibras musculares e/ou da quantidade de fibras, resultado do desequilíbrio entre a síntese e degradação proteica muscular (**Nader, 2005; Matsakas & Patel, 2009**). O sistema ubiquitina proteassoma (SUP) é responsável pela regulação de grande parte dessa proteólise celular, envolvendo a participação de pelo menos três enzimas primordiais, E1, E2 e E3 (**Nalepa *et al.*, 2006; Vilchez *et al.*, 2014; Livneh *et al.*, 2016**). As enzimas *MuRF1* (*Muscle ring finger 1*) e *Atrogina-1/MAFbx* (*Muscle atrophy F-box*), são as principais E3 relacionadas a atrofia (**Gomes *et al.*, 2001; Bodine *et al.*, 2001a**).

Na atrofia muscular por glicocorticoide, ocorre o aumento de expressão da miostatina, regulador negativo da via do IGF-1 e da cascata de fosforilação sobre o tecido muscular, causando degradação proteica, associado a diminuição de síntese proteica e atrofia (**Florini *et al.*, 1996; Schakman *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2013**).

Entre os mecanismos, está a desativação da proteína Akt ou proteína kinase B (PKB) (perda de fosforilação) (**Bodine *et al.*, 2001b**), ativando proteínas relacionadas a degradação e proteínas relacionadas com a inibição da síntese, como o GSK3- β (**Gundersen, 2011**) e os *Forkhead box* (FoxOs) (fatores de transcrição), aumentando

expressão de *Atrogin-1/MAFbx*, *MuRF-1* (**Hasselgren *et al.*, 2010**) e *REDD2*, um regulador negativo da via TOR e crescimento celular (**McFarlane *et al.*, 2006**).

Estudos mostram, potenciais componentes na atenuação da atrofia muscular, como o N-3, que vem se mostrando eficaz, em alguns modelos de atrofia. (**Whitehouse & Tisdale, 2001; Smith *et al.*, 2004; Tisdale, 2007; Khal & Tisdale, 2008**).

O N-3 é um ácido graxo poli-insaturado, encontrado principalmente em alimentos de origem marinha, e benéfico em diversas condições fisiológicas. Em grande parte, relacionado a melhora do sistema cardiovascular e nervoso central (**Surette, 2008**). Seu uso em atenuar a inflamação, também foi visto de forma benéfica em condições onde há um fundo de processo inflamatório, como artrites, atenuação da atrofia muscular decorrente da septicemia e câncer (**Simopoulos, 2002; Tisdale, 2007; Khal & Tisdale, 2008**).

No entanto, estudos recentes do nosso grupo, avaliando a musculatura apendicular, mostrou que a associação de N-3 com DX, potencializou a atrofia muscular causada pelo glicocorticoide. (**Fappi *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2019b**).

Assim, nosso objetivo foi aprofundar as pesquisas anteriores do grupo, estudando o músculo diafragma dos animais, com a mesma metodologia, avaliando o efeito do N-3 associado a DX e o efeito de três diferentes glicocorticoides em dosagem equipotentes, sobre a atrofia do músculo diafragma.

Revisão da Literatura

REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Tecido muscular esquelético

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo, possui a maior reserva de proteína, cerca de 50% a 75%, composto de aproximadamente 75% de água, 20% proteína e 5% de carboidratos, gordura e substâncias inorgânicas como sódio, potássio e outros minerais (Frontera & Ochala, 2015). Fonte de energia para diversos órgãos, incluindo o cérebro, fígado e coração, corresponde de 30 a 40% da massa corporal de um homem adulto. Sua principal função é converter energia química em mecânica, gerando força e energia para a manutenção da postura, movimentos envolvidos nas habilidades sociais e profissionais, contribuindo para a boa saúde física, mental e independência (Nader, 2005; Schiaffino & Reggiani, 2011; Bonaldo & Sandri, 2013; Nedergaard *et al.*, 2013; Frontera & Ochala, 2015).

É um tecido que facilmente se adapta a demandas funcionais, resultando em mudanças na morfologia celular, descrita como atrofia ou hipertrofia muscular (Guyton, 2002; Schiaffino *et al.*, 2013). O músculo esquelético é constituído por células multinucleadas poligonais, denominadas miócitos, ou fibras musculares e núcleos posicionados subjacentes à membrana plasmática (sarcolema). As fibras musculares são predominantemente preenchidas por miofilamentos chamados miofibrilas, organizados por unidades idênticas, chamadas sarcômeros (Figura 1), a unidade contrátil muscular. (Guyton, 2002; Charge & Rudnicki, 2004; Floeter, 2009; Robbins, 1996).

Figura 1: Estrutura básica do sarcômero. Os filamentos grossos bipolares centrais são compostos principalmente de miosina, o filamento grosso é rodeado por filamentos finos paralelos originados da linha Z, em ambas as extremidades do sarcômero (Imagem pelo próprio autor).

A contração muscular é o efeito do deslizamento entre estruturas internas do sarcômero chamados actina (filamentos finos) e miosina (filamentos grossos),

entrelaçados pela linha Z, dispostas perpendicularmente (principalmente α -actina), sendo o modo de organização miofibrilar, o que reflete ao músculo sua aparência estriada (Agarkova & Perriard, 2005).

O filamento fino contém α -actina de forma entrelaçada por tropomiosina e troponina, esta última, permite a ligação com o cálcio intracelular possibilitando a contração. O cálcio é liberado pelo sistema T (invaginação membranosa do sarcolema para o interior da célula), sendo ativado durante uma excitação da membrana, permitindo interação com a miosina, que é formada por uma cauda e uma cabeça globular. Entre as miofibrilas, há citoplasma (sarcoplasma), preenchendo 40% do volume da fibra, contendo mioglobulina, glicogênio, lisossomos, mitocôndrias e vacúolos lipídicos (Schiaffino & Reggiani, 2011; Robbins, 1996).

Existem três tipos básicos de miosina, que determinam o tipo de fibra e resposta da contração muscular. As fibras dos tipos 1, são ricas em mioglobulinas, enzimas oxidativas e mitocôndrias, conforme sua capacidade de contrações tônicas, lentas e mais resistentes a fadiga, possui coloração escuras para ATPase em pH 4,2 e clara em pH 9,4. As fibras do tipo 2A, são intermediárias, possuem mais enzimas glicolíticas sendo direcionada para tipo 1 ou 2B, de acordo com as exigências energéticas empregadas e as fibras do tipo 2B, ricas em enzimas glicolíticas e participa das contrações fásicas rápidas, baixa resistência, adquirindo coloração mais clara em ATPase com pH 4,2, escura em ATPase de pH 9,4 com bordas definidas (Frontera & Ochala, 2015; Robbins, 1996).

A organização da fibra muscular contrátil é complexa e a correta funcionalidade depende da organização e glicosilação (adição de açúcares) de diversas proteínas que fazem parte do complexo de proteínas, associada à distrofina (**Figura 2**), sendo que a ausência ou disfunção de qualquer proteína do complexo, pode acarretar em doenças musculares com importante impacto muscular e outros sistemas (Reed, 2009; Tarakci, 2016).

intra-abdominal, levando a uma pressão sub atmosférica e influxo de ar, ou aumento de volume inspiratório. A expiração é passiva, podendo ser forçada com uso da musculatura expiratória (Urmeý *et al.*, 1988; Porto, 1997; Polkey, 2019). Naturalmente evolui com perda de tamanho e função, com o envelhecimento natural (Greising *et al.*, 2015).

A evolução clínica de pacientes com doenças neuromusculares graves, tal como a doença muscular de Duchenne, culmina no desenvolvimento de fraqueza, podendo levar a falência da musculatura respiratória, principalmente do músculo diafragma (Stedman *et al.*, 1991). Na doença pulmonar obstrutiva crônica, foi observado importante diminuição da área de secção transversa desse músculo (Guerri *et al.*, 2010).

O diafragma é tido, como peça-chave dentro dos mecanismos fisiopatológicos que levam a maior dificuldade no desmame, quando em suporte ventilatório invasivo, podendo levar a maior fraqueza dessa musculatura, prolongar a internação, causando maiores riscos de infecção e custos (Diaz *et al.*, 2014). Podendo cursar com falência respiratória, quando retirado o suporte ventilatório (Supinski *et al.*, 2010). São frequentes os quadros descritos de infecções, seguido de aumento do estresse oxidativo, causa de maior ativação de vias de degradação muscular como caspases, SUP e calpaínas, levando a maior atrofia muscular (Supinski *et al.*, 2010; Demoule *et al.*, 2013; Supinski & Callahan, 2013).

1.3. Atrofia muscular esquelética

A atrofia muscular é descrita como perda da massa muscular, resultante da redução de área de fibra muscular e/ou da quantidade de fibras, devido ao desequilíbrio entre síntese e degradação proteica muscular (Nader, 2005; Matsakas & Patel, 2009). Pode levar ao encolhimento das miofibras pela perda da rede de proteínas, organelas e citoplasma (Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Boonyarom & Inui, 2006; Schiaffino *et al.*, 2013). Várias condições estão relacionadas à atrofia muscular, incluindo condições fisiológicas do organismo, como por exemplo o jejum prolongado, inatividade, envelhecimento (sarcopenia) (Kandarian & Jackman, 2006; Ding *et al.*, 2018) e condições patológicas, como por exemplo a septicemia (Voisin *et al.*, 1996), diabetes, caquexia, AIDS, câncer, lesão medular (Glass, 2003; Sandri *et al.*, 2006), doenças geneticamente herdadas como as miopatias e neuropatias (Boonyarom & Inui, 2006), doença pulmonar obstrutiva crônica (Doucet *et al.*, 2010), ventilação mecânica invasiva (Supinski & Callahan, 2013; Diaz *et al.*, 2014), além do uso de glicocorticoides (Pereira & Freire de Carvalho, 2011; Fappi *et al.*, 2014; Bodine & Furlow, 2015;

Sato *et al.*, 2017; Fappi *et al.*, 2019 a).

O músculo é um tecido sensível e altamente adaptativo, adultos com idade avançadas, a redução da deambulação entre 1 a 2 semanas, pode levar a perda de aproximadamente 5 a 10% de massa muscular e pacientes submetidos a 4 dias de imobilização, mostrou importante perda de função (**Breen *et al.*, 2013; Hvid *et al.*, 2013**). A atrofia muscular causada pelo desequilíbrio entre síntese e degradação proteica, pode levar a sarcopenia, definida como perda generalizada e progressiva de massa e força muscular (**Morley *et al.*, 2001; Cruz-Jentoft *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2018**). Afetando, de 10 a 30% dos idosos, na ausência de doenças graves (**Cruz-Jentoft *et al.*, 2014; Shafiee *et al.*, 2017**).

Pesquisas apontam, pelo menos cinco diferentes sistemas envolvidos no processo de atrofia muscular: o sistema lisossomal, da calpaína, caspases e apoptose, metaloproteinases e o SUP (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Kandarian & Jackman, 2006**). Dentre eles, um dos principais envolvidos na atrofia decorrente da administração de glicocorticoides é o SUP, descrito como ativo em praticamente todas as formas de atrofia (**Hershko & Ciechanover, 1998; Schiaffino *et al.*, 2013; Fappi *et al.*, 2019 a**).

1.4. Sistema Ubiquitina Proteassoma

O SUP, é responsável pela regulação de grande parte da proteólise celular, compreende o reconhecimento, ubiquitinação e marcação de proteínas específicas para degradação, atuando dentre outros, em resposta a mudanças na atividade muscular (**Nalepa *et al.*, 2006; Verhees *et al.*, 2011; Schiaffino *et al.*, 2013**).

Proteínas degradadas no SUP, necessariamente devem ser ligadas às cadeias de moléculas de ubiquitina (ubiquitinação), possibilitando sua identificação e degradação no proteassoma 26S, etapa final do sistema (**Figura 3**) (**Hershko & Ciechanover, 1998; Livneh *et al.*, 2016**). A formação do complexo ubiquitina-proteína envolve a participação de pelo menos três componentes primordiais: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e **enzima ligadora de ubiquitina (E3)**, sendo essa última, responsável pelo reconhecimento e marcação da proteínas ou substrato a ser degradado (**Nalepa *et al.*, 2006; Vilchez *et al.*, 2014; Livneh *et al.*, 2016**).

Figura 3. Sistema ubiquitina proteassoma. Essa via de degradação é altamente regulada, envolvendo muitos passos. (A) Inicialmente ocorre a ativação da ubiquitina pela enzima (E1 ativadora), (B) a ubiquitina então ativada é direcionada para uma segunda enzima (E2 conjugadora) que irá ligar a ubiquitina ativada a uma terceira enzima (C) (E3 ubiquitinadora) que já estará aderida ao substrato a ser degradado, esse processo se repete até a formação de uma cadeia de ubiquitina ligada a E3 e substrato, possibilitando assim o reconhecimento desse substrato pelo (D) proteassoma 26S (imagem produzida pelo autor).

A especificidade do substrato é mediada por pelo menos três grupos de enzimas ligadoras E3 ou atrogenes: enzimas homólogas ao domínio terminal carboxil E6AP (domínio HECT), enzimas *RING finger*, e proteínas Skp1–Cul1–F-box (SCF), sendo os dois últimos, os mais importantes e representativos no processo de degradação muscular (Jentsch *et al.*, 1991; Medina *et al.*, 1995; Nalepa *et al.*, 2006; Powell, 2006).

Grande avanço no conhecimento do SUP no processo de atrofia muscular, ocorreu com a identificação de dois genes ligadoras E3, que se expressam significativamente em diferentes modelos de atrofia muscular: *MuRF1* (*Muscle ring finger 1*) e a *Atrogin-1/MAFbx* (*Muscle atrophy F-box*) (Gomes *et al.*, 2001; Bodine *et al.*, 2001a). Estudos têm demonstrado a importância das enzimas ligadoras E3 na fisiologia muscular e não somente durante a atrofia, como por exemplo, no remodelamento do sarcômero, crescimento, regeneração e renovação da musculatura esquelética (McElhinny *et al.*, 2002; Fielitz *et al.*, 2007a; Delaunay *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2010; Kudryashova *et al.*, 2012) e na musculatura cardíaca (Li *et al.*, 2004; Fielitz *et al.*, 2007b).

1.5. Atrofia relacionada à via do IGF-1/PI-3K/AKT/mTOR

O IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) é um fator de crescimento relacionado ao eixo GH/IGF-1, produzido em sua maior parte no fígado (produção hepática) estimulando a síntese proteica muscular, além de diminuir os níveis de proteólise e apoptose neste tecido. Entretanto, o IGF1 também é produzido de forma extra-hepática, atuando de forma autócrina e parácrina no músculo esquelético (Perrini *et al.*, 2010; Kandalla *et al.*, 2011). No processo de atrofia muscular por glicocorticoides por exemplo, ocorre inibição do IGF-1, e da cascata de fosforilação sobre o tecido muscular, elevando os níveis de degradação proteica, associado a diminuição de síntese proteica, podendo conduzir a atrofia (Florini *et al.*, 1996; Schakman *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2013).

O processo fisiológico natural da sinalização da via do IGF-1, se inicia com a ligação de hormônio-receptor ativador da cascata proteica (modificadas por fosforilação) (Bodine *et al.*, 2001b). Substratos do receptor da insulina IRS1 e IRS2 conduz a ativação da proteína PI-3K, ativando Akt. Essa ativação leva a inibição de proteínas relacionadas a degradação proteica, ativando proteínas relacionadas a síntese e captação de glicose celular (GLUT4) (Beg *et al.*, 2017).

A proteína kinase Akt fosforilada (forma ativa), leva a ativação de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), relacionada com aumento da síntese proteica, inibindo proteínas envolvidas na degradação ou diminuição da síntese proteica muscular como o GSK3- β (*Glycogen synthase kinase 3- β*) e fatores de transcrição como os FoxOs, ambos mantidos inativos quando fosforilados, resultando em aumento da massa muscular e hipertrofia (Jefferson *et al.*, 1999; Bodine *et al.*, 2001b; Leger *et al.*, 2006; Gundersen, 2011).

Quando desfosforilado, ou inativo, como por exemplo pelo uso de glicocorticoides (Figura 4), a proteína Akt seria então desativada, não exercendo ação inibitória sobre o GSK3 β , (supressor natural do fator de iniciação eucariótico 2B e ativador de mTOR) e fatores de transcrição de E3 como os FoxOs, o que resultaria na diminuição da transcrição de RNAm, da capacidade de reciclagem dos ribossomos, síntese e degradação proteica (Dufner *et al.*, 1999; Clemmons, 2009; Verhees *et al.*, 2011). O GSK3 β , além de ser peça chave na regulação da síntese de glicogênio estimulada por insulina (Jope & Johnson, 2004), está envolvido com inúmeras vias de sinalização e quando desregulado, pode influenciar na degradação proteica (Fappi *et al.*, 2019 a), desenvolvimento de doenças como diabetes, Doença de Alzheimer, desordem bipolar e câncer (Doble & Woodgett, 2003).

Figura 4. Esquema representativo da sinalização envolvida na atrofia muscular induzida por glicocorticoide. A atrofia muscular por glicocorticoide está associada com alterações na produção de IGF-1 e miostatina, dois fatores de crescimento que exibem efeitos opostos sobre a massa muscular, conduzindo a inibição da síntese e aumento da degradação proteica. Adaptado e traduzido de (Bonaldi & Sandri, 2013).

Os Foxs (*Fork head Box*) são fatores de transcrição com diferentes funções celulares e quando ativos (perda da fosforilação), migram para o compartimento nuclear ligados ao DNA (Kaestner *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2015). São classificados em 23 subclasses, organizados por análise filogenética e determinadas por letras, que variam de FoxA à FoxS (Kaestner *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008). Diferentes funções e tecidos se relacionam cada um com uma subclasse de Fox, podendo variar desde o desenvolvimento neural e longevidade ao desenvolvimento de tumores e apoptose (Zhang *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015). Os membros da classe FoxO (FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6) estão diretamente relacionados com a sinalização do IGF-1/Insulina, e regulam genes da via proteolítica envolvidas no SUP, em particular os genes codificadores de E3 (*Atrogin-1/MAFbx* e *MuRF-1*), ligados a autofagia, reguladores negativos do crescimento (miostatina) e degradação celular, como as catepsinas (Sandri *et al.*, 2006; Mammucari *et al.*, 2007; Hasselgren *et al.*, 2010).

Os FoxOs-3a são responsáveis pela transcrição de atrogenes como *Atrogin-1/MAFbx* e *MuRF-1*, influenciando na degradação muscular pela maior ativação do SUP (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004; Schakman *et al.*, 2008). A inativação dos FoxOs

é dependente da proteína 14-3-3 de Akt, responsável por manter os FoxOs fosforilados ou seja, transcricionalmente inativos no citoplasma (**Birkenkamp & Coffey, 2003; Sandri et al., 2004**). Portanto, a inatividade de Akt permite a migração do FoxO-3a para o núcleo celular, ativando o processo de atrofia muscular pela transcrição de enzimas E3 ligases (**Van Der Heide et al., 2004; Schakman et al., 2008**).

Na ativação de mTOR (complexo TORC1) por Akt, a proteína de 70 kDa S6 kinase (P70^{S6k}) é ativada, importante para a transcrição proteica, inibindo 4EBP1 (*factor 4E binding protein 1*), proteína que inibe fatores da iniciação de transcrição, favorecendo a síntese proteica (**Bodine et al., 2001b; Clemmons, 2009**).

O *REDD2* (*regulated in development and DNA damage responses 2*), também chamado de RTP801L/DDIT4L, é um gene indutor de hipóxia, identificado em *Drosophila* como regulador negativo da via TOR e crescimento celular. É descrito como mecanismo dependente da sinalização do complexo de esclerose tuberosa-2 (TSC-2), predominante no músculo esquelético, regulando a sinalização da via mTOR no tecido muscular. Estudos sugerem que isso seria independente da via IGF-1/AKT/PI3K, incidindo diretamente sobre mTOR (**Inoki et al., 2002; Garami et al., 2003; Hornberger et al., 2004**). Estudos mostraram que o aumento de sua expressão, inibi a fosforilação de p70S6K1 e 4E-BP1 e quando silenciado, a inibição foi revertida. (**Brugarolas et al., 2004; Reiling & Hafen, 2004; Corradetti et al., 2005; Pisani DF, 2005; Miyazaki & Esser, 2009**). Em outro estudo, apontaram que REDD2, teria maior afinidade e atividade na musculatura onde predominam as fibras de contração rápida, ou seja, glicolíticas (**Kelleher et al., 2015; Tanner et al., 2015**).

A Miostatina, também conhecida como GDF-8 (*Growth differentiation factor-8*), membro da superfamília do fator de crescimento transformador- β . Secretada no sangue, sua ação é inibir o crescimento muscular esquelético. Importante regulador negativo da massa muscular, se expressando, predominantemente nas fibras do tipo 2 (**Nishi et al., 2002; Meloux et al., 2019**). Atua bloqueando a via IGF1/PI-3K/AKT/mTOR e ativando FoxOs (**McFarlane et al., 2006**).

Estudos têm demonstrado que a inibição da miostatina através da administração de follistatina, glutamina ou ainda por nocaute gênico em modelos experimentais, resulta em excessivo ganho de massa muscular devido a hipertrofia e/ou hiperplasia de fibras musculares, porém sem ganho de força proporcional (**Nishi et al., 2002; Grobet et al., 2003; Lokireddy et al., 2011; Kalista et al., 2012; Winbanks et al., 2012**). Acreditam

que isso seria devido a um desarranjo de fibras e alterações na contração muscular, uma vez que a miostatina, estimularia a síntese de enzimas E3 e auxiliariam no processo de reorganização e renovação de proteínas miofibrilares. (Qin *et al.*, 2013; Hammers *et al.*, 2020)

1.6. Glicocorticoides

Os hormônios corticosteroides são produzidos no córtex da glândula suprarrenal, incluindo os glicocorticoides, hormônios sexuais e mineralocorticoides, sendo os mais importantes para o organismo, o cortisol e a aldosterona. Tais hormônios regulam o metabolismo dos carboidratos, funções hemodinâmicas, celulares, moleculares e fisiológicas do organismo, essenciais para vida, atuando, sobretudo em situações de estresse (Nicolaidis *et al.*, 2014).

Glicocorticoides, em particular o cortisol, tem papel fundamental nas reações inflamatórias e imunológicas, agindo de forma nuclear (em ação com o receptor de glicocorticoide e elemento de resposta no DNA), ou extracelular realizando a supressão de fatores de transcrição inflamatórios e de regulação da glicose (Kovacs *et al.*, 2005). Glicocorticoides sintéticos estão entre os medicamentos mais prescritos, com efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios e imunossupressores (Nicolaidis *et al.*, 2010). Sua dosagem pode variar de acordo com o tipo e gravidade da doença, dentre os mais usados na prática clínica, a DX, MP e DC, que quando comparados a 20mg de cortisol, a equipotência seria 0,75mg de DX, 4mg de MP e 5mg de DC (RANG, 2001; Parente, 2017).

Usado como soluções tópicas, intramuscular, via oral entre outros, em muitos casos como em inflamação cutânea, reações alérgicas, doenças autoimunes ou casos mais graves como no tratamento de algumas doenças genéticas ou adquiridas, como por exemplo, nas miopatias inflamatórias e doença muscular de Duchenne (DMD) (Reed, 2002; Gutierrez & England, 2013; Matthews *et al.*, 2016; Bowden *et al.*, 2019).

A ação dos glicocorticoides e efeitos colaterais, depende do tipo de glicocorticoide, dose, prazo e intervalo de uso (Wilcox *et al.*, 1989; Bodine & Furlow, 2015). Até hoje, glicocorticoides são as principais drogas para o tratamento de pacientes com DMD, com uso contínuo ou intermitente, objetivando manter a marcha, função da musculatura cardíaca e respiratória (Moxley *et al.*, 2010; Connolly *et al.*, 2015; Matthews *et al.*, 2016).

O uso prolongado de glicocorticoides sintéticos pode levar a reações adversas, sendo

dose e tempo dependentes, podendo causar impacto em diversos sistemas orgânicos, como respiratório, gastrointestinal, dermatológico, neurológico, endocrinológico, oftalmológico, cardiovasculares e músculo esquelético (Liu *et al.*, 2013; Fappi *et al.*, 2014; Bowden *et al.*, 2019; Fappi *et al.*, 2019 a). Os principais efeitos adversos sobre o sistema músculo esquelético incluem: miopatia/atrofia muscular, osteoporose, necrose óssea (cabeça do fêmur e do úmero), fratura patológica dos ossos longos e ruptura de tendões (Schacke *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2018).

Buscas por estratégias e terapias mais eficientes com menores efeitos colaterais sempre foram os objetivos de muitos estudos relacionados a corticoterapia, como por exemplo no tratamento da doença muscular de Duchenne, com abordagens moleculares, incluindo terapias gênicas, *anti-sense-induced exon-skipping* e *stop codon read through*, buscando restaurar a produção funcional da distrofina (Finkel *et al.*, 2013; Voit *et al.*, 2014). A DMD é descrita como sendo a distrofia muscular mais comum, com incidência de 1:3500 à 1:5000 nascidos vivos (Mendell *et al.*, 2012), necessitando de cadeiras de rodas por volta dos 15 anos e indo a óbito por volta dos 30 anos de idade, principalmente por falência respiratória (Engel AG, 1994; Reed, 2002; Bodine & Furlow, 2015; Matthews *et al.*, 2016).

1.7. Glicocorticoides e a atrofia muscular esquelética

A miopatia por glicocorticoides foi descrito pela primeira vez por Harvey Cushing em 1932, dando origem a síndrome de Cushing, decorrente de doses excessivas de glicocorticoides (hipercortisolismo), gerando fraqueza e atrofia muscular proximal grave (Cushing, 1969). A miopatia por glicocorticoide exógenos é descrita como sendo a miopatia por droga mais comum, com incidência aproximada de 60% entre os usuários desse tipo de droga. (Pereira & Freire de Carvalho, 2011). Ela ocorre através de mecanismos diversos, incluindo a inibição da resposta tecidual à insulina e ao IGF-1, resultando em redução da síntese proteica, inibição da miogênese e aumento da atividade proteolítica mediada via SUP e lisossomal (Schakman *et al.*, 2009; Schiaffino & Reggiani, 2011) (Figura 5).

Na atrofia por glicocorticoides, as fibras musculares mais acometidas seriam as do tipo 2 (contração rápida), principalmente as fibras do tipo 2B, com pouco ou nenhum efeito sobre as fibras do tipo 1 e 2A (Kelly & Goldspink, 1982; Sandri *et al.*, 2006; Schiaffino & Reggiani, 2011; Fappi *et al.*, 2014). No entanto, em estudo com o músculo diafragma

de ratos, a atrofia mais importante teria acontecido nas fibras do tipo 1 (**Maes *et al.*, 2008**) acometendo outros tipos de fibras, dependendo da dosagem administrada (**Maes *et al.*, 2010; Maes *et al.*, 2011**).

As mitocôndrias desempenham um papel central na homeostase energética, metabolismo, sinalização, apoptose, sendo a disfunção mitocondrial um componente chave de muitas doenças agudas e crônicas (**Palikaras & Tavernarakis, 2014**). A ativação de PGC1 α (peroxisome proliferator activated receptor-g coactivator-1) seria o ponto central da biogênese mitocondrial e de sua função aprimorada e estaria diretamente relacionado a formação das fibras de contração lenta/oxidativa (tipo 1) (**Lin *et al.*, 2002**). Pesquisadores descrevem efeito protetor de PGC1- α , sobre a ação dos FoxOs no músculo esquelético durante a atrofia por glicocorticoides, principalmente em fibras do tipo 1 e 2A, o que justificaria a maior sensibilidade das fibras do tipo 2B nesse modelo de atrofia (**Sandri *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2010**) (vide Figura 4) e maior atividade de *REDD-2* nas fibras glicolíticas (**Kelleher *et al.*, 2015**) .

Embora escassas, as primeiras pesquisas sobre a ação de glicocorticoides no músculo diafragma datam de 1950 e vêm aumentando com o passar dos anos (**Leupin, 1950; Wool, 1960; Veldsema-Currie *et al.*, 1976; Drakontides, 1982; Wilcox *et al.*, 1989; Viires *et al.*, 1990; Petrof *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1996; Nava *et al.*, 1996; Fletcher *et al.*, 2000; Eason *et al.*, 2003; Mahzabin *et al.*, 2017; Mauricio *et al.*, 2017; Spaulding *et al.*, 2020**), porém, não compatível com sua importância clínica, uma vez que muitos pacientes em terapia com glicocorticoides são portadores de doenças neuromusculares degenerativas, indo a óbito, principalmente por falência do sistema respiratório (**Engel AG, 1994**).

Figura 5. Esquema básico da atrofia muscular induzida por glicocorticoides. A inibição da ação do IGF-I, juntamente com o aumento da expressão de miostatina induzida por glicocorticoides, inibe a ativação das células satélites, assim como a proliferação e diferenciação de mioblastos. Nas fibras musculares maduras, essas mudanças causam regulação negativa da síntese de proteínas e estimulação da degradação proteica (imagem produzida pelo autor).

1.8. Alvos potenciais no tratamento da atrofia muscular

Mecanismos diversos durante o processo de atrofia muscular culminam no desequilíbrio entre síntese e degradação proteica, com redução da área de secção transversa (**Schiaffino *et al.*, 2013**), havendo aumento da transcrição de atrogenes ligados aos FoxOs, da sinalização inflamatória ligados a via NF- κ B e seus derivados, bem como o desequilíbrio do cálcio intracelular (**Mauricio *et al.*, 2017**).

Uma das tentativas relacionada ao tratamento, poderia atuar na inibição direta de componentes da via do SUP, descrita como principal via envolvida na atrofia muscular causada por glicocorticoides (**Hershko & Ciechanover, 1998; Tisdale, 2006; Schiaffino *et al.*, 2013**). Estudo mostrou que a talidomida atuaria inibindo o TNF- α , aumentando a degradação do seu RNAm (**Gordon *et al.*, 2005**), outros estudos vêm demonstrado drogas capazes de atenuar a atrofia muscular, inibindo a atividade do NF- κ B na fraqueza muscular, dentre elas a HMB (metabólito da leucina), ibuprofeno e resveratrol (**Wyke *et al.*, 2004**).

A testosterona, mostrou ação preventiva, quanto a perda muscular induzida por glicocorticoide, através da inibição da atividade do REDD1 sobre o mTOR, regulação de FOXO1 e influência sobre PGC-1 α (**Qin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010**), com importante inibição de degradação e estimulando a síntese proteica pela via do IGF-1/PI-3K/AKT/mTOR (**Zhao *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2010**).

A suplementação alimentar com leucina, um aminoácido essencial, seria capaz de atenuar a degradação proteica, via redução da ativação do SUP e aumentar a síntese proteica (**Yoshizawa *et al.*, 1999; Combaret *et al.*, 2005**). Adicionalmente, a leucina também participaria da regulação do sistema lisossomal, já que a sua deficiência acarreta ativação da autofagia em cultura de células musculares (**Mordier *et al.*, 2000**). No entanto, a suplementação de leucina associada à DX, piorou a resposta à insulina e não preveniu a atrofia muscular em animais (**Nicastro *et al.*, 2012**).

Derivados da xantina, como a pentoxifilina e a torbafilina (HWA 448), inibiram a expressão do TNF- α , e tem se mostrado eficaz na prevenção da atrofia muscular induzidas pela caquexia (**Combaret *et al.*, 1999; Combaret *et al.*, 2002**), β -2 agonistas como clenbuterol (**Yimlamai *et al.*, 2005**), fenoterol (**Ryall *et al.*, 2004**) e formoterol (**Busquets *et al.*, 2004**), com efeitos potenciais na prevenção da atrofia muscular. Estas

drogas anabólicas, parecem influenciar quanto ao controle da ativação do SUP.

O exercício físico se mostrou uma potente estratégia, sendo eficaz no controle da atrofia muscular, reduzindo a ativação de atrogenes e aumentando a síntese de IGF-1 (Jones *et al.*, 2004). Ainda, quando associado ao N-3, elevou a síntese proteica e mitocondrial, diminuindo espécies reativas ao oxigênio e melhorando a resposta anabólica ao exercício físico (Lalia *et al.*, 2017).

1.9. Ácidos graxos poli-insaturados e sua atuação na atrofia muscular

Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) são gorduras de cadeias longas e seus efeitos benéficos são descritos em diversos processos fisiológicos, como na função cognitiva, ação anti-inflamatória e imunossupressora. Os principais representantes são os ácidos graxos ômega-3 (N-3) e ômega-6 (N-6) (Leonard *et al.*, 2004; Calder, 2010). Os principais componentes (N-3) são, o ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5), ácido docosaenoico (DHA) (C22:6) e o ácido α -linolênico (ALA) (C18:3), encontrados em sementes oleaginosas (canola, soja e linhaça), vegetais (algas, microalgas e fitoplanctons) e animais de origem marinha (peixes e crustáceos) (Kris-Etherton *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003).

O consumo regular de N-3 estaria relacionado com a diminuição de LDL (*Low Density Lipoproteins*) e maiores níveis de HDL (*high-density lipoprotein*), diminuição da pressão arterial, além da melhora nos níveis de triglicérides e fatores associados a riscos cardiovasculares (Calder, 1998; Kris-Etherton *et al.*, 2003; McDonnell *et al.*, 2019). Embora estudos longitudinais prospectivos, sugiram que a ação do N-3, sobre a proteção de eventos cardiovasculares, ainda seria incerta (Kromhout *et al.*, 2010; Risk *et al.*, 2013; Manson *et al.*, 2019).

Estudo em camundongos MDX (com disfunção da proteína distrofina), recebendo EPA e DHA, teria favorecido a diminuição da necrose, fibrose e inflamação muscular, prevenindo a perda de força, melhora da estabilidade do sarcolema, diminuindo a expressão de TNF α , 4HNE (4-hydroxynoneal) e fatores relacionado com o estresse oxidativo (Fogagnolo Mauricio *et al.*, 2013). Outros estudos têm mostrado importantes efeitos adicionais, vinculados a memória e sistema cardiovascular (Delgado-Lista *et al.*, 2012; Vannice & Rasmussen, 2014), atenuação da atrofia muscular decorrente de septicemia (Voisin *et al.*, 1996), da hiperglicemia (Vivan *et al.*, 2017), caquexia, AIDS, lesões da medula espinhal, miopatias, quadros inflamatórios (Simopoulos, 1991; 2002; 2009) distrofinopatias (Machado *et al.*, 2011; Fogagnolo Mauricio *et al.*, 2013),

neuropatias, melhoria do trânsito intestinal, redução de riscos no desenvolvimento da ansiedade e depressão (**Kiecolt-Glaser et al., 2011**), como coadjuvante no tratamento das comorbidades musculares relacionadas ao câncer (**Bassett et al., 2016**), asma, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, pós denervação (**Lecker et al., 1999**), artrite reumatoide (**Lanchais et al., 2020**) e no tratamento da obesidade (**Del-Rio-Navarro et al., 2019**).

Estudo mostrou que o consumo de N-3, pode melhorar a rigidez matinal com diminuição dos níveis de leucotrieno B₄ (LTB₄) em pacientes portadores de artrite reumatoide (**Kremer et al., 1985; Kremer et al., 1987**). Sendo desde então, recomendado como parte do tratamento e prevenção dessa doença (**Philippou & Nikiphorou, 2018; Chehade et al., 2019**).

A recomendação da quantidade de ingestão de EPA/DHA pode variar entre os diversos órgãos de saúde e pesquisa pelo mundo (**Tabela 1**). A maior dose recomendada (FDA – *Food and Drug administration – EUA*) é de 3g de EPA/DHA por dia, o que representaria 37,5 mg/kg/dia para uma pessoa pesando 80 kg, e a menor de 100 a 200 mg/dia pela *UK Committee on Medical Aspects of Food Policy*, o que representaria, no mesmo exemplo, 1,25 – 2,5 mg/kg/dia. Os ácidos graxos poli-insaturados também atuam como precursores de eicosanoides, reguladores de crescimento e hormônios, envolvidos em diversos processos fisiológicos como ação anti-inflamatória, imunossupressora e função cognitiva (**Leonard et al., 2004**).

O N-3, quando incorporado à membrana celular, modularia diferentes respostas celulares, tais como sinalização, expressão gênica e função estrutural das membranas, controle da expressão do NF- κ B e fatores de transcrição, participando do processo de crescimento e atrofia celular (**Magee et al., 2008; Surette, 2008**).

Estudos têm demonstrado importante papel do N-3 na atenuação da atrofia muscular, auxiliando na redução da atividade de componentes do SUP (**Whitehouse & Tisdale, 2001; Smith et al., 2004; Tisdale, 2007; Khal & Tisdale, 2008**), Caspases (**Magee et al., 2008**), mediadores inflamatórios (**Calder, 2010**) e ação antioxidante (**Kromann & Green, 1980; Simopoulos, 1991; Saito & Kubo, 2003**). Segundo estudos, o EPA e DHA derivado do óleo de peixe, reduziria ainda, tromboxanos A₂ (potente agregador plaquetário e vasoconstritor), formação de Leucotrienos B₄ (indutor de inflamação, poderoso indutor quimiotático e agregação leucocitária) (**Black et al., 1979; Dyerberg & Bang, 1979; Hirai et al., 1980; Kromann & Green, 1980**). Corroborando com outros estudos, sugerindo envolvimento na produção de eicosanoides ímpares, prostaglandinas-3 (PGG₃) e leucotrienos-5 (LT₅), de ação anti-inflamatória (**Calder,**

2006). Mais recente, foi descrito que a ação anti-inflamatória do N-3, seria principalmente pelo efeito inibitório sobre a via IKK/NF- κ B (**Singer *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013).**

O N-3 e N-6, são descritos, constituírem cerca de 30-35% do total de ácidos graxos encefálicos, sendo o DHA o ácido graxo mais abundante do sistema nervoso central, somando isso, a seus benefícios (**Youdim *et al.*, 2000).**

Tabela 1. Recomendação para consumo diário de ácidos graxos Ômega-3.

Fonte	Data	Recomendação diária	
		ALA	EPA + DHA
		g	mg
NATO workshop	1989	3	800
UK Committee on Medical Aspects of Food Policy	1994	—	100–200
ISSFAL workshop	1999	2.2	650
ANC (França)	2001	1.8	450 (DHA, 110–120)
Eurodiet	2000	2	200
Health Council of the Netherlands	2001	—	200
American Heart Association	2002	—	≈1 g/d
US National Academics of Science, Institute of Medicine	2002	1.4	≈140
European Society of Cardiology	2003	—	≈1 g/d
WHO FAO	2003	—	400–1000 (1–2 peixes/semana)
ISSFAL	2004	1.6	≥500
UK Scientific Advisory Committee on Nutrition	2004	—	Mínimo de 2 porções de peixe/semana (1 vegetal); considerar 450 mg
FDA	2004	—	Máx 3000/dia. Não mais que 2000/dia por suplementação

Legenda: ANC (Apports Nutritionnels Conseilles); FAO (Food and Agriculture Organization); ISSFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids); NATO (North Atlantic Treaty Organization); WHO (World Health Organization); FDA (U.S. Food and Drug administration), ALA (alpha-linolenic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), DHA (docosahexaenoic acid) adaptado de (Gebauer *et al.*, 2006).

A informação mais recente sobre doses usadas que encontramos, foi publicada em 2019 pelo departamento de saúde dos Estados Unidos da América, sendo recomendado o uso de 1.6 g/dia para homens e 1.1 g/dia para mulheres (U.S., 2019). Os possíveis efeitos anti-inflamatórios, decorrentes do uso do N-3, são bem discutidos e estudados na literatura. As pesquisas foram iniciadas por volta de 1980, a partir de estudos epidemiológicos que observaram menor incidência de doenças inflamatórias e

autoimunes na Groenlândia, entre os anos de 1950 e 1974, atribuindo isso a dieta rica em N-3, quando comparados à população da Dinamarca, onde observaram que o consumo de alimentos ricos em N-3 era menor. No entanto, efeitos negativos relacionados a essa suplementação no tecido muscular esquelético também tem sido descrito. Estudos mostrando que o ácido araquidônico, derivado do N-6, teria a capacidade de induzir maiores níveis de síntese proteica muscular, relacionado com a produção de prostaglandina F2 α (PGF2 α), e o uso do EPA/DHA em modelo animal reduziu a expressão de PGF2 α em 49% e 46%, respectivamente, sendo isso explicado pela competição de precursores de N-3, por enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides (Palmer & Wahle, 1987; McGlory *et al.*, 2019).

Em outro estudo foi demonstrado efeito similar com diminuição na produção de PGF2 α em aproximadamente 75% após suplementação com compostos de N-3, associado a menos 20% de síntese proteica muscular, sugerindo um possível impacto no crescimento e atrofia musculares (Sohal *et al.*, 1992).

Observou-se em outro estudo, 25% de redução do ácido araquidônico, associado a aumento nos níveis de ácido alfa-linoleico e EPA no músculo esquelético de hamsters, alimentados *ad libitum* com ração enriquecida com o ácido alfa-linoleico (Fiaccavento *et al.*, 2010). Estudos mais recente sugere, que o N-3 pode de fato, demonstrar respostas variáveis, dependendo da condição e tipo da população estudada (McGlory *et al.*, 2019)

Os primeiros estudos sobre atrofia muscular secundário ao uso de N-3, associado a um glicocorticoide, foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa. O objetivo foi estudar o possível efeito benéfico de prevenir ou atenuar a atrofia causada pela DX. Avaliamos assim, os efeitos do N-3 na atrofia do músculo apendicular, induzida pela DX em diferentes dosagens (Fappi *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2019b). Nesse estudo, grupos recebendo DX associados ao N-3 tiveram os níveis de ácido α -linoleico reduzidos em comparação com o grupo controle (42,12%), e de forma contrária ao esperado, foi observado maior prejuízo muscular em comparação com a DX, de forma isolada (atrofia de fibras tipo 1 e 2A), associado a maior expressão de atrogenes como *Atrogina-1*.

Em estudo mais recente do grupo, foi demonstrado aumento nos marcadores lisossomais de autofagia e diminuição da miogênese relacionados a essa associação (DX+N-3)(Fappi *et al.*, 2019b).

Justificativa & Objetivos

2. Justificativa

A ingestão de N-3 a partir de 1980 se tornou popular e mundialmente recomendada sendo de livre acesso a população, se mostrando benéfica na atenuação da atrofia muscular, relacionada ao câncer e septicemia, porém, seu uso prévio e concomitante com a DX, parece agravar a atrofia muscular induzida por esse tipo de medicamento (Fappi *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2019b).

Até o presente momento, não encontramos estudos avaliando os efeitos dessa interação no músculo diafragma (principal músculo da respiração), que responde de forma diferente de outros músculos esqueléticos às diversas terapias, conforme recentemente descrito (de Tonnac *et al.*, 2018).

Portanto, entendemos que avaliar o efeito da DX, associada ao N-3 no músculo diafragma, poderia contribuir de forma preventiva para possíveis reações adversas, resultantes da associação do N-3 a outras drogas, como por exemplo, os glicocorticoides. Seria uma tentativa, quanto a prevenção de maiores comprometimentos aos pacientes que fazem uso dessas drogas, quando associado a suplementação de PUFA's, uma vez que nossos estudos anteriores, tenham sugerido efeitos desfavoráveis sobre a musculatura apendicular, quanto essa associação (DX+N3).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Estudar os efeitos da administração do N-3 sobre o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) e via do IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR na atrofia muscular diafragmática, induzida pela DX e comparar os efeitos da atrofia muscular diafragmática, causada por diferentes glicocorticoides.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da suplementação do N-3 e DX, sobre: o peso corporal, área de secção transversa dos principais tipos de fibras musculares, proporção de fibras, expressão gênica de fatores de transcrição musculares e atrogenes relacionados ao SUP (*Atrogina-1*, *MuRF-1*, *REDD2* e adicionalmente *PGC1α*), e expressão proteica de componentes da via do IGF-1/Akt/mTOR, incluindo FoxO3a, GSK3β e adicionalmente *PGC1α*, na musculatura diafragmática de ratos. Avaliar os efeitos do DC, MP e da DX

em dosagens equipotentes sobre: o peso corporal, área de secção transversa dos principais tipos de fibras musculares, proporção de fibras, expressão gênica de fatores de transcrição musculares e atrogenes (RNAm), incluindo *Atrogina 1*, *MuRF-1*, *REDD-2* e adicionalmente *PGC1 α* , bem como sobre a expressão de proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica, AKT, mTOR, FOXO3a e GSK3 β e adicionalmente PGC1 α no músculo diafragma de ratos.

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. Animais do estudo e estruturação

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos, com idade entre 10 e 12 semanas, pesando entre 300 e 400 gramas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas que estabelecem os procedimentos para uso científico de animais no país (lei 11.794 de 8 de outubro de 2008) e realizados no Laboratório de Investigação Médica de Neurologia Translacional (LIM45) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob aprovação do Comitê de ética para uso de animais nº 028/2017.

Os animais foram mantidos em gaiolas, contendo no máximo 3 animais cada, ciclo de 12:12 horas claro/escuro em temperatura ambiente controlada de 25°C, com acesso a água e comida *ad libitum* (Nuvital, Nuvilab CR-1), conteúdo de proteína crua (min 22.0%), extrato etéreo (min 4.5%), mineral (max 1 d0.0%), fibrosa (max 8.0%), cálcio (max 1.4%), fósforo (min 0.8%), vitamina A 25,200.00 UI/kg, vitamina D3 2,100.00 UI/kg, vitamina E 60.00 mg/kg, vitamina K3 12.50 mg/kg, vitamina B1 14.40 mg/kg, vitamina B2 11.00 mg/kg, vitamina B6 12.00 mg/kg, vitamina B12 60.00 mcg/kg, niacina 60.00 mg/kg, ácido patogênico 112.00 mg/kg, ácido fólico 6.00 mg/kg, biotina 0.26 mg/kg, colin 1,100.00 mg/kg, ferro 50.00 mg/kg, zinco 60.00 mg/kg, cobre 10.00 mg/kg, iodo 2.00 mg/kg, manganês 60.00 mg/kg, selênio 0.05 mg/kg, cobalto 1.50 mg/kg, lisina 100.00 mg/kg, metionina 300.00 mg/kg, e antioxidante 100.00 mg/kg. O período experimental *in vivo* incluiu a administração de DX, DC, MP e N-3 aos animais, conforme apresentado na **Figura 6**, além da coleta de dados iniciais (peso corporal) e posterior coleta, pesagem e estocagem do material de estudo (músculo diafragma).

4.2. Suplementação de DX e N-3

Quarenta animais foram divididos em 4 grupos, 20 animais foram suplementados via gavagem com N-3 (extrato de ácidos graxos poli-insaturados, ácido eicosapentaenoico – ácido docosaexaenoico na proporção 50:10), marca Supra Ômega® (fabricante Global Nutrition, laudo de composição disponível em **Anexo 1**) na dosagem 100 mg/kg/dia diluídas em 0,5% de tween-20 e água ultrapura e vinte animais, apenas com solução veículo por mesma via/volume por 30 dias.

Após 30 dias de suplementação, 10 animais do grupo suplementado com N-3 e 10 animais do grupo de solução veículo receberam DX (Decadron injetável, 4mg/mL,

laboratório Aché) por 10 dias, via subcutânea, na dosagem de 1,25 mg/kg/dia sem suspender a suplementação de N-3 ou solução veículo, estabelecendo-se os grupos DX e DX+N-3.

Dez animais recebendo solução veículo até o 40º dia, recebeu nos último 10 dias, solução salina subcutânea, estabelecendo o grupo CT e dez animais restantes do grupo N3, continuou recebendo N-3 nos últimos dez dias, formando o Grupo N-3. (**Figura 6**).

4.3. Equipotência de drogas para análise comparativa

Para estabelecermos os grupos de comparação em equipotência dos glicocorticoides, 20 animais permaneceram sem intervenção por 30 dias sendo então iniciado o tratamento nos 10 dias finais com metilprednisolona (MP) e deflazacort (DC), nas dosagens estabelecidas de acordo com a dose de DX e ajustadas de acordo com a literatura disponível (**Meikleand Tyler, 1977; NayakandAcharjya, 2008**). Os demais glicocorticoides (DC e MP), foram estabelecidos nas seguintes dosagens e vias de acesso: DC (suspensão oral manufaturada em laboratório – Pharma Ramus laboratórios, Pinheiros - SP) na dosagem (10 mg/Kg/dia) via gavagem e MP (acetato de metilprednisolona, marca Depo-medrol®, solução injetável (Pfizer) na dosagem (6,7 mg/kg/dia) via intramuscular, totalizando 20 animais.

Figura 6. Esquema representativo do desenho experimental realizado. Linha pontilhada indicação momento da associação da droga com o suplemento ou solução veículo. Abreviação: MP = Metilprednisolona; DC = Deflazacorte; DX = Dexametasona; N-3 = Ômega-3; v.g = via gavagem; i.m. = intramuscular; s.c = subcutâneo.

Ao final do período experimental foram constituídos 6 grupos:

- **Grupo Metilprednisolona (MP)** (Metilprednisolona, 6,7 mg/kg/dia via intramuscular);
- **Grupo Deflazacorte (DC)** (Deflazacorte, 10mg/kg/dia via gavagem);
- **Grupo Dexametasona (DX)** (solução veículo via gavagem + Dexametasona, 1,25mg/kg/dia subcutânea);
- **Grupo Controle (CT)** (solução veículo via gavagem + solução salina subcutânea);
- **Grupo Dexametasona+Ômega-3 (DX+N-3)** (ômega-3 via gavagem + dexametasona 1,25mg/kg/dia via subcutânea).
- **Grupo Ômega-3 (N-3)** (ômega-3 via gavagem + solução salina subcutânea);

4.4. Coleta dos materiais

Ao final do período de 40 dias, os animais foram pesados e eutanasiados por administração de pentobarbital sódico (30mg/Kg) por via intraperitoneal, sendo o músculo diafragma e as glândulas adrenais coletados e pesados. Diafragmas esquerdos foram montados coronalmente em fragmento de cortiça com *TissueTek*® e congelados em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido para posterior análise histológica. Diafragmas direitos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para extração de RNA total e proteínas. As glândulas adrenais foram extraídas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

4.5. Reação histológica

Os músculos diafragmas foram seccionados coronalmente em Criostato (*Leica* CM3000) de forma sequencial, à temperatura de -23 a -30 °C, com secções de espessura de 8 micrômetros. As lâminas com os fragmentos musculares foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) para análise da posição do corte e da estrutura geral do tecido muscular, sendo em seguida realizada a coloração metacromática de ATPase.

4.6. Coloração metacromática de ATPase e cálculo de área de fibra.

Para avaliação e cálculo das áreas das fibras musculares de acordo com seus subtipos, foi utilizado o método de coloração metacromático de ATPase (mATPase) modificado (**Ogilvie & Feedback, 1990**). Esse estudo, avalia o grau de inibição da atividade da ATPase miofibrilar, permitindo a distinção dos 3 principais tipos de fibras musculares (1, 2A e 2B). Resumidamente, as lâminas com os cortes musculares congelados, foram secas e incubadas em solução de pré-incubação contendo acetato de potássio (49mM) e cloreto de cálcio (23,4mM) diluídos em H₂O com pH 4.3 por 2 minutos em temperatura ambiente e realizadas 3 lavagens de 2 minutos cada, com tampão de tris contendo trisma base (0,1M), cloreto de cálcio (23,4mM), diluídos em H₂O de pH 7.8.

Em seguida as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente por 25 minutos em tampão de incubação (cloreto de potássio (83mM), sal dissódico de ATP (4,59mM), cloreto de cálcio (0,18M), 1.5 M de 2-amino-2methyl-1-propanol (11%) diluídos em H₂O e pH 9.5. As lâminas foram lavadas sequencialmente, com submersões, em três diferentes recipientes de mesma solução, com cloreto de cálcio a 1% em água destilada, na sequência foram coradas em solução com 1% de azul de toluidina aquosa por 15 segundos, sendo imediatamente lavadas em água destilada, em sequência de três béqueres, para remover o excesso de corante.

As lâminas passaram por desidratação em bateria de álcoois (etanol 95% e absoluto), clareamento em xilol (5 minutos) e montadas para histologia com Entellan® (Merk Millipore, Alemanha). Após a realização da técnica, as fibras foram fotografadas a 20X em fotomicroscópio marca *Olympus® AX70 (Olympus Melville, NY, EUA)*. O cálculo da área de secção transversa das fibras foi realizado pelo programa *Photoshop CS6 extended®* para *Windows®* com ajuste de escala de pixels previamente obtido no *software Image J (NIH)*, a partir de régua histológica em mesma ampliação.

Após configuração inicial do *software*, as fibras musculares selecionadas por subtipos, tiveram o sarcolema tracejado em posição coronal para o cálculo da área transversa, disponível em μm^2 . Foram mensuradas entre 300 e 500 fibras musculares por lâmina do fragmento muscular de cada animal, sendo calculada a média das áreas obtidas de acordo com a classificação das fibras, em tipos 1, 2A e 2B.

4.7. Eletroforese SDS-PAGE (*Western blotting*)

Fragmentos do músculo diafragma de cada animal foram homogeneizados em

homogeneizador *Potter* em 10 X seu peso em volume utilizando tampão de lise RIPA (0,5% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, 1nM de EDTA, 1nM de EGTA, 1% Nonidet P40 em PBS 7,4), contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich; #P5726 e #A-1153) respectivamente, centrifugação a 13.000g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante reservado para uso. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina na realização de curva de diluição padrão. Quantidades iguais de proteínas (50 - 80 µg) foram acrescidas de tampão de eletroforese e DTT 0.1M, fervidas a 95°C por 5 minutos e mantidas no gelo por 5 minutos adicionais, aplicadas em gel SDS-PAGE (8-10% de acrilamida) e submetidas à eletroforese com voltagem de 100V por 1 hora, em aparato de eletroforese marca Bio-Rad® (CA, EUA).

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (voltagem de 100V por 1h) e incubadas em tampão de bloqueio TBS-T (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl e 0.1% Tween 20), contendo 5% de BSA (*bovine serum albumin*) por 1 hora em temperatura ambiente para bloquear sítios inespecíficos. As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio com anticorpo primário (**Tabela 2**) *overnight*, leve agitação e temperatura de 4° C. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio, contendo anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 - 2h em temperatura ambiente.

Após nova lavagem com TBS-T (3 vezes de 10 min. cada), a membrana foi revelada após incubação com reagente quimioluminescente (*Western Enhancing Chemiluminescence Reagent Plus®*, ECL kit, *Perkinelmer*, EUA) de 1 – 5 minutos em agitação manual e lidos em leitor quimioluminescente (*C-DIGIT® – LI-COR Biosciences*, U.S.A.).

Para normatizar a quantidade de proteínas do tecido muscular aplicadas ao gel e determinar os valores a serem analisados por razão de proteína alvo/ normatizador em cada amostra, foi utilizada análise de proteína total das membranas previamente coradas com corante *Ponceau Red* imediatamente após a transferência. Os anticorpos primários utilizados em todo o estudo estão apresentados na **tabela 2**. A análise densitométrica das bandas de proteínas marcadas nas membranas foi realizada pelo *software Image Studio Digtits® (LI-COR Biosciences)*.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados no estudo.

Antígeno	P.M.	Empresa/ código	Conc[]	Hosp.
AKTpan	60 kDa	<i>Cell Signaling / 4691</i>	1:2.000µl	Coelho
P-AKT (Ser473)	60 kDa	<i>Cell Signaling / 4060</i>	1:2.000µl	Coelho
GSK3β	46 kDa	<i>Cell Signaling / 9315</i>	1:1.000µl	Coelho
P-GSK3β (Ser9)	46 kDa	<i>Cell Signaling / 9322</i>	1:1.000µl	Coelho
FOXO3a	97 kDa	<i>Cell Signaling / 2497</i>	1:1.000µl	Coelho
P-FOXO3a (Ser253)	97 kDa	<i>Cell Signaling / 9466</i>	1:1.000µl	Coelho
PGC1α	92 kDa	Abcam / ab54481	1:1.000µl	Coelho

P.M= peso molecular; conc = concentração; Hosp= hospedeiro.

4.8. Extração de RNA e reação de transcriptase reversa

O RNA total dos fragmentos do músculo diafragma foi extraído usando kit de extração comercial *SV Total RNA Isolation System*®, Promega (código Z3105), seguindo as instruções do fabricante. A extração foi realizada em nitrogênio líquido e macerado com pistilo, seguido de agitação com rotor do pistilo e incubação no gelo por 20 minutos. Utilizamos 30 mg de amostra do diafragma para 175µl do tampão de extração. A integridade e a quantidade de RNA de cada amostra foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose e por medida espectrofotométrica em absorbâncias A₂₆₀:280 nm, no qual as amostras com razão A₂₆₀:A₂₈₀ menor que 1,8 foram descartadas. O RNA foi quantificado com o uso do espectrofotômetro *Nano Drop 1000*®.

O RNA foi tratado com DNase I (Promega® código Z358A), durante o processo de extração com o kit de isolamento de RNA total. Para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizamos o kit comercial Promega *GoScrip™ Reserve Transcription Mix, Random Prime* (código A2801), seguindo as instruções do kit, foi utilizado 0,5µl (500ng) de RNA por amostra em volume final de RNA, H₂O *nuclease free, random prime* e enzima de 20µl, sendo em seguida levadas ao termo ciclador Eppendorf® (*Vapo-protect master cycler pro*®, Alemanha) para realização da transcrição reversa em ciclagem pré determinada e imediatamente mantidas a -20°C até o uso.

4.9. PCR em tempo real

Objetivamos estudar a expressão dos genes *Atrogina-1/MAFbx*, *MuRF1*, *REDD-2* e adicionalmente *PGC1α* no músculo diafragma. A amplificação por PCR foi efetuada utilizando-se 37,5ng de cDNA adicionado a *Gotaq®qPCR Master Mix, 2X* (kit Promega código A6002) acrescidos de *primers* (senso e antisenso), em placas de 96 poços

ThermoScientific® (código SPL0961). O volume de solução final utilizada foi de 16µl em duplicata, analisadas no equipamento *Piko Real 96*® (Thermo Scientific). As condições da PCR em tempo real incluíram uma desnaturação inicial a 95° por dois minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e um minuto em 60°C para pareamento e extensão.

Os dados referentes ao mRNA do estudo, foram normalizados pela razão dos valores referentes ao GAPDH (gliceraldeído-3 fosfato-desidrogenase) da mesma amostra e comparados entre si por normalização logarítmica ($2^{-\Delta\Delta CT}$). As sequências de oligonucleotídeos utilizados no estudo estão apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados no estudo. (p.b.= pares de base)

Gene	Forward	Reverse	P.B.	Referência
MURF-1	TCGACATCTACAAGCAG GAA	CTGTCCTTGAAGATGCTTT	194	(Pires et al 2010)
ATROGINA-1	TGAAGACCGGCTACTGT GGAAGAGAC	TTGGGGTGAAAGTGAGACGGAG CAG	262	(Pires et al 2010)
REDD-2	CTTCAGCGTCTGGTGAA ATCC	ATGCTGGCCGTGTTCTTACTG	129	(Murakami et al 2011)
PGC1α	ACCAAACCCACAGAGA ACAG	GGGTACGAGGAAGAGATAAAG TTG	24	(Louzada RA et al 2014)
GAPDH	ACGCCAGTAGACTCCAC GAC	ATGACTCTACCCACGGCAAG	157	(Janjoppi et al 2018)

4.10. Análise estatística

Todos os dados obtidos passam inicialmente por teste de distribuição de dados de *Shapiro-Wilk*, sendo em seguida analisados através de métodos estatísticos correspondentes ao tipo de distribuição. Para análise entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma (*One-Way*) ou duas (*Two-way*) seguida de seus pós-testes correspondentes, e para análises entre grupos, *teste t* ou Mann-Whitney dependendo da distribuição ou tipo de análise, sendo os testes utilizados, descritos no momento da apresentação de cada resultado. Foram consideradas variações significativas, aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um *P* menor ou igual a 0,05. Os resultados estão apresentados como erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism*, versão 5.00 de 2007, para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA*).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Peso corporal

Todos os grupos que receberam glicocorticoides, tiveram diminuição de peso corporal quando comparados ao grupo controle, sem diferença entre grupos. O N-3 não influenciou na perda de peso já causada pela DX, e de forma isolada, o N-3 não influenciou o peso corporal quando comparado ao grupo controle (**Figura 7**).

A média de peso inicial dos animais variou entre 325 - 339g entre grupos, sendo o ganho de peso corporal linear no decorrer dos 30 dias iniciais do estudo (administração de N-3 via gavagem e antes de receberem as drogas) e proporcional ao crescimento natural dos animais, mostrando variações (perda) de peso significativas após o 4º dia de administração da DX (**Figura 7**). A administração dos glicocorticoides MP e DC foi também iniciada no 30º dia de estudo, não havendo qualquer intervenção nos grupos até esse momento. Observamos do 2º ao 10º dia de administração dos glicocorticoides, significativa diminuição do peso corporal em todos os animais em relação ao grupo controle ($P<0,001$ para todos os grupos).

A média de peso do grupo **CT** (N=10) foi de 317,0g com final de 461,4g, representando um ganho de peso corporal de 31,3%.

O grupo **N-3**; (N=10) apresentou média de peso inicial de 337,5g e média de peso final de 441.7g, com ganho de 30,9% de peso em 40 dias.

O grupo **DX+N-3** (N= 8), apresentou média de peso inicial de 332,5g e de 414,6g no início da administração de DX. A média de peso final foi de 324,4g, representando uma perda de 21,8% de peso após 10 dias de DX e 25,6% em comparação ao grupo CT ($p<0.001$).

O grupo **DX** (N= 9), apresentou média de peso inicial de 339,4g e de 433,9g ao início da administração de DX. A média de peso final foi de 336,7g, representando uma perda de 22,4% de peso após 10 dias de DX, 1,25 mg/kg/dia e de 24,8% em comparação ao peso final do grupo CT ($P<0.001$).

O grupo **MP** (N=8) teve média de peso inicial de 336,6g e de 439g no 30º dia, com peso final de 317g, representando perda de 27,8% após 10 dias de administração da droga e de 31,3% em comparação ao grupo CT. Sendo este, o glicocorticoide com maior

impacto sobre o peso corporal de forma significativa, a partir do 38º dia de droga

O grupo **DC** (N=10) teve média de peso inicial de 317,5g e de 418,2g no 30º dia, com peso final de 353g, representando perda de 15,6% após 10 dias de administração da droga e de 23,5% em comparação ao grupo CT.

Todos os grupos tiveram perda expressiva do peso comparado ao CT exceto o grupo N-3.

Grupos	Dias de estudo						
	1	30	32	34	36	38	40
CT	325,5g	424,9g	433,4g	434,0g	438,2g	444,8g	447,9g
N-3	337,5g	406,4g	424,8g	418,7g	424,7g	429,9g	441,7g
DX+N-3	332,5g	414,6g	405,9g	376,4g **	355,0g ***	330,0g ***	324,4g***
DX	339,4g	433,9g	414,1g	390,4g*	367,4g ***	348,0g ***	336,7g***
MP	336,6	439,0	400,5 *	368,5 ***	346,0 ***	323,4 ***	317,0 ***
DC	317,5	418,2	380,2 ***	379,7 ***	368,5 ***	355,3 ***	353,0 ***

Figura 7. Peso corporal durante os 40 dias de experimento e dados estatístico. Linha pontilhada representa o momento de início da administração dos glicocorticoides (30º dia). CT (N=10), N-3(N=10),DX(N=9), DX+N-3 (N=8), DC(N=10), MP(N=8).Asteriscos representam resultado estatístico da comparação da média de peso dos animais em relação ao grupo CT em cada momento do estudo. * = $P < 0,05$; **= $P < 0,01$ e ***= $P < 0,001$. Teste estatístico: Anova com medidas repetidas com pós teste de Bonferroni.

5.2. Peso da glândula adrenal

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos glicocorticoides sobre o eixo hipotalâmico/pituitária/adrenal (HPA), avaliamos o peso da glândula adrenal após os 10 dias de administração das drogas. A coleta das glândulas adrenais e suas respectivas pesagens mostraram que a administração de glicocorticoides levou a diminuição do peso da glândula adrenal (**Figura 8**), ocorrendo de forma significativa nos grupos DX (-68,9%, $P<0,001$), DX+N-3 (-64,3%, $P<0,01$), e de forma não significativa nos grupos MP (-27,1%) e DC (-25,06%), bem como em comparação ao grupo controle. Entre os glicocorticoides a DX causou o maior impacto sobre a glândula adrenal, dentre as doses utilizadas.

Figura 8. Peso da glândula adrenal ao fim do estudo. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (Anova de uma via); Sustenidos (#) representam comparações entre 2 grupos (*teste t*). # ou * = $P<0,05$; ## ou ** = $P<0,01$. N por grupo, CT (N=10), N-3 (N=10), DX (N=9), DX+N-3 (N=8), DC (N=10), MP (N=8).

5.3. Análise da área de secção transversa e proporção de fibras musculares.

A análise de área de secção transversa das fibras dos animais após coloração metacromática por ATPase (**Figura 9 e 10**) visou identificar o tipo de fibra mais afetada (1, 2A ou 2B) após a administração de DX associada ou não com N-3 e comparação entre glicocorticoides, em dosagens equipotentes a DX.

Nossos dados indicaram, que os glicocorticoides de forma isolada, bem como na associação da DX+N-3, podem levar a atrofia significativa da musculatura diafragmática em todos os tipos de fibras quando comparado ao grupo CT ($P<0.05$ para todos). Entre

os glicocorticoides a DX causou maior prejuízo muscular, dentre as doses utilizadas.

Todos os glicocorticoides causaram atrofia das fibras do tipo 1 quando comparados ao grupo CT ($P<0,05$), exceto o grupo N-3 (redução de 36,5% na área da fibra em relação ao grupo CT, $P=0,07$). Não observamos diferença entre os grupos de glicocorticoides ou na comparação entre DX vs DX+N-3. Nas fibras do tipo 2A, todos os grupos apresentaram redução na área de secção transversa, quando comparado ao grupo CT ($P<0,05$), exceto o grupo MP ($P=0,09$). Entre os glicocorticoides, a DX causou maior redução de área das fibras vs DC ($P<0,05$), tendência vs MP ($P=0,09$), não sendo influenciada pelo N-3. Nas fibras do tipo 2B, todos os grupos que receberam glicocorticoide apresentaram atrofia ($P<0,05$). Novamente notamos que o grupo DX apresentou maior atrofia vs DC ($P=0,01$). O N-3 não influenciou na atrofia causada pela DX, de forma isolada, apresentou tendência a atrofia quando comparado ao CT ($P=0,09$).

Figura 9. Área de secção transversa das fibras musculares. (a) Asteriscos representam significância estatística da comparação dos grupos em relação ao grupo controle. $*=P<0,05$; $**=P<0,01$, $***=P<0,001$, t descrito no gráfico. Teste estatístico: t de Student. N por grupo, CT (N=9), N-3 (N=5), DX (N=6), DX+N-3 (N=5), DC (N=8), MP (N=6).

Tabela 4: Porcentagem de redução da área de secção transversa vs CT.

% vs CT	Fibras tipo 1	Fibras tipo 2A	Fibras tipo 2B
N-3	-36,5% (P=0,07)	-32,3% (P<0,05)	-30,4% (P=0,09)
DX+N-3	-62,8% (P<0,01)	-28,3% (P<0,01)	-55,9% (P<0,001)
DX	-46,45% (P<0,05)	-27,5% (P<0,01)	-57,2% (P<0,001)
MP	-57,8% (P<0,01)	-17,9% (P=0,09)	-48,6% (P<0,01)
DC	-63,1% (P<0,00)	-18,1% (P<0,05)	-36,9% (P<0,01)
%DX+N-3 vs %DX	-16,35% (NS)	+0,8% (NS)	1,2% (NS)

Legenda: NS = não significativo.

Figura 10. Coloração metacromática de ATPase para diferenciação de fibras musculares e cálculo de área de secção transversa. Ampliação da foto = 20x, barra de escala = 100µm Legenda: seta vermelha = fibra tipo 1; seta verde = fibra 2A e seta amarela fibra 2B.

Na proporção de fibras musculares, o grupo CT apresentou: Tipo 1=11%, 2A=48% e 2B=41%. O ômega-3 reduziu a proporção das fibras tipo 1 e 2A, aumentando tipo 2B quando comparado ao grupo CT ($P<0,01$) (**Figura 11**). A DX diminuiu a proporção das fibras do tipo 2A, e quando associada ao N-3, atenuou a diminuição de forma expressiva com aumento da proporção de fibras tipo 1 em relação ao CT. A MP diminuiu a proporção de fibras do tipo 2A quando comparado ao grupo CT ($P<0,01$). O grupo DC aumentou a proporção de fibras do tipo 1 quando comparada ao CT e a DX ($P<0,01$ e $P<0,05$, respectivamente), diminuindo a proporção de fibras do tipo 2A quando comparado aos grupos CT ($P<0,01$).

Figura 11. Proporção de fibras do músculo diafragma. Asteriscos representam resultado estatístico da comparação entre grupos. Teste *Mann-Whitney*, N por grupo, CT (N=7), N-3 (N=5), DX+N-3 (N=5), DX (N=6), DC (N=7), MP (N=7).

Grupos	Fibras tipo 1	Fibras tipo 2A	Fibras tipo 2B
CT	** (N-3 ↓) *** (DC ↑)	*(DX ↓) ** (MP, DC, DXN3 ↓)	** (N3 ↑)
DX+N-3 vs DX	-	* (DX ↑)	-
DX	* (DC ↑)	-	-
MP	-	*(DX ↑)	-
DC	-	** (DX ↑)	-

Tabela 5. Comparação entre grupos da proporção de fibras. Quando comparado ao controle, o grupo N-3 deixou o músculo mais glicolítico, diminuindo a proporção das fibras oxidativas (tipo1) e aumentando as glicolíticas (tipo 2B) A associação de DX+N-3 aumentou as fibras do tipo 2A. Entre os glicocorticoides, a DC aumentou a proporção das fibras tipo 1 vs DX. E a DX aumentou a proporção das fibras do tipo 2A, quando comparada a MP e DC. (Figura 11 B)

Asteriscos representam resultado estatístico da comparação entre grupos. Teste *Mann-Whitney*, N por grupo, CT (N=7), N-3 (N=5), DX+N-3 (N=5), DX (N=6), DC (N=7), MP (N=7).

Tipo de fibra	N-3	DX+N-3	DX	MP	DC
1	↓67,2%	↑105,9%	↓11,8%	↑88,6%	↑140,4%
2A	↑14,3%	↓37,9%	↓13,5%	↓32,25%	↓39,15%
2B	↑34,6%	↑17,0%	↑12,9%	↑14,8%	↓9,4%

Tabela 6: Porcentagem da proporção de fibras vs CT.

Legenda: ↑ = aumento da proporção de fibras, ↓ = diminuição vs CT (N por grupo: CT (N=7), N-3 (N=5), DX+N-3 (N=5), DX (N=6), DC (N=7), MP (N=7)).

5.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

A expressão do RNAm dos atrogenes (*Atrogina-1/MAFbx*, *MuRF1* e *REDD-2*) e *PGC1-α*, no diafragma, após 10 dias de administração das drogas, associados ou não a 40 dias de N-3, está apresentado na **Figura 12**.

Observamos, aumento expressão gênica de *Atrogina-1*, *MuRF-1* e *REDD-2* no grupo DX, sugerindo maior ativação de enzimas E3 do SUP e atrofia, podendo estar associado a maior inibição da via mTOR, quando comparado ao o grupo CT. Também notamos aumento da expressão de *PGC1-α* ($P<0.01$). No grupo DX+N-3, houve menor expressão de *PGC1α*, *MuRF-1* e *REDD-2*, onde *REDD-2* foi normalizado quando comparado ao grupo CT (efeito positivo).

O grupo DX mostrou maior expressão de *MuRF-1*, também quando comparado ao DC ($P<0,01$) e de *REDD-2* entre todos os glicocorticoides. O grupo MP mostrou a maior expressão da *Atrogina-1* entre os glicocorticoides ($P<0.01$) e de *MuRF-1* quando comparada a DC ($P<0,01$). A expressão de *REDD-2* estava aumentada nos grupos DX e DC quando comparados ao grupo CT, $P<0,001$ e $P<0,05$, respectivamente e entre os glicocorticoides, a DX mostrou maior expressão.

Na associação com N-3 observamos redução importante de *REDD-2* quando comparada a DX de forma isolada, ficando ainda, abaixo do grupo CT. De forma geral, observamos que, a respeito da expressão de atrogenes, o N-3 pode ser favorável quando associado a DX.

De forma isolada, o N-3 se mostrou benéfico, elevando a expressão de *PGC1-α*

vs CT ($P < 0,01$).

A MP pode ter um efeito mais expressivo sobre atrogenes de forma mais tardia quanto as doses utilizadas, levando em consideração o tempo de expressão dos atrogenes, mostrando expressão elevada em atrogina-1, descrito como primeiro atrogene a ser ativado, enquanto a DX e DC já teriam atingido seu pico máximo.

Figura 12. RT-PCR. Expressão de RNAm de *Atrogina-1*, *MuRF-1*, *REDD-2* e *PGC1-α*. Asteriscos representam resultado estatístico da comparação dos grupos com o grupo CT (Anova de 1 via) e comparação entre dois grupos (test t). * = $P < 0,05$; ** ou = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. sustenido representa comparação entre grupos glicocorticoides # = $P < 0,05$; ## ou = $P < 0,01$, ### = $P < 0,001$. N por grupo, CT (N=6), N-3 (N=10), DX (N=7), DX+N-3 (N=8), DC (N=6), MP (N=7).

5.5. Western blotting

Avaliação das proteínas que integram as vias de sinalização proposta no estudo (IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR) está disposta nas **Figuras 13-16**. Ao estudarmos a expressão da proteína Akt, uma das mais importantes proteínas da via do IGF-1, observamos diminuída expressão de AKT total (Akt) e fosforilada (P-Akt- forma ativa) nos animais recebendo N-3, não havendo alterações para expressão total de Akt nos demais grupos do estudo em relação ao grupo CT. Notamos que a DX, associada ou não ao N-3, causou diminuição significativa de P-Akt, sugerindo que a associação da DX e N-3, não influencia, quanto a

diminuição da expressão, dessa proteína fosforilada.

Na comparação entre os glicocorticoides, observamos diminuição da expressão de P-Akt em todos os grupos quando comparadas ao grupo CT, sendo a DC, a droga que mostrou o menor impacto, sugerindo menor efeito negativo em vias subsequentes relacionadas (**Figura 13**).

Figura 13. Expressão de Akt e pAkt. Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos e em relação ao CT. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$ e (t) = tendência. Teste estatístico: *Mann Whitney test*. N por grupo, CT (N=10), N-3 (N=9), DX+N-3 (N=6), DX (N=8), DC (N=9), MP (N=6).

Na expressão de pFoxO3a (proteína fosforilada/inativa), observamos que o grupo DX teve tendência a menor expressão ($P=0,06$) e a MP uma diminuição expressiva na forma total e fosforilada, quando comparadas ao grupo CT ($P < 0,05$). No grupo DX+N3, observamos tendência em atenuar a diminuição de pFoxO3a ($P=0,06$) causada pela DX. Entre glicocorticoides o grupo MP mostrou diminuição de FoxO3a total quando comparada ao grupo DX ($P < 0,05$) (**Figura 14**).

Figura 14: Expressão proteica de FoxO3a total e fosforilado (Ser253). Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos e em relação ao CT. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$ e (t) = tendência. Teste estatístico: *Mann-Whitney test*. N por grupo, CT (N=6), N-3 (N=6), DX+N-3 (N=4), DX (N=6), DC (N=7), MP (N=4).

Na expressão da proteína P-GSK3 β (fosforilada/inativa) (**Figura 15**), observamos importante diminuição de expressão no grupo DX, N-3 e tendência a diminuição dos grupos MP ($P=0,08$) e DC ($P=0,09$), quando comparados ao CT, não havendo diferença entre os demais grupos. Observamos aumento da expressão de GSK3 β total dos grupos MP e DC, sendo ambos mais expressivos do que o grupo DX. Entre os grupos que receberam glicocorticoide, notamos que a DX foi a droga que menos influenciou na expressão de GSK3 β (proteína total) e o grupo DX+N-3, mostrou tendência a aumento de expressão, quando comparado ao CT ($P=0,10$).

Figura 15: Expressão proteica de GSK3 β total e fosforilado (Ser253). Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos e em relação ao CT. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$ e (t) = tendência ($P < 0,09$). Teste estatístico: *Mann-Whitney*. N por grupo, CT (N=9), N-3 (N=9), DX+N-3 (N=7), DX (N=8), MP (N=6), DC (N=9).

Adicionalmente, avaliamos a expressão proteica de PGC1 α no músculo diafragma (**Figura 16**). Inicialmente não inserida no estudo, mas por ser uma proteína relacionada a proteção das fibras musculares, principalmente de fibras oxidativas, consideramos que poderia adicionar informações, quanto a uma melhor compreensão da ação dos glicocorticoides e quando associado ao N-3.

Observamos diminuição importante da expressão proteica de PGC1 α nos grupos N-3, DX e DC quando comparados ao CT, sem diferença significativa entre os grupos que receberam glicocorticoides. O N-3, quando associado a DX, mostrou tendência em atenuar a queda de expressão quando comparado a DX de forma isolada ($P=0,09$).

Figura 16: Expressão proteica de PGC1 α . Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos e em relação ao CT. * = $P<0,05$. Teste estatístico: Mann-Whitney. N por grupo, CT (N=7), N-3 (N=7), DX+N-3 (N=5), DX (N=6), MP (N=7), DC (N=4).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como objetivo, avaliar o impacto de diferentes glicocorticoides, em dosagens equipotentes, sobre a musculatura diafragmática e determinar o potencial efeito benéfico do N-3, na prevenção da atrofia muscular induzida pela DX. Avaliamos peso corporal e glândula adrenal de ratos, expressão de proteínas envolvidas na síntese proteica (via do IGF-1/PI-3k/Akt) e degradação (GSK3 β , FoxO3a), principais atrogenes (RNAm), envolvidos na degradação proteica via SUP (*Atrogina-1 MURF1e REDD-2*) e, adicionalmente, RNAm do PGC1-a e a proteína PGC1 α .

Ômega-3

Trabalhos prévios do grupo mostraram que a associação N-3 e corticoide não foi benéfica para a musculatura apendicular. Assim, analisamos aqui os efeitos desta associação sobre o músculo diafragma. Diversos estudos têm mostrado efeitos benéficos do N-3, sobre diferentes sistemas fisiológicos (**Kremer *et al.*, 1985; Kremer *et al.*, 1987; Leonard *et al.*, 2004; Maes *et al.*, 2008; Calder, 2010; Maes *et al.*, 2011; Yoshino *et al.*, 2016; Del-Rio-Navarro *et al.*, 2019; Kwong *et al.*, 2019; Omar *et al.*, 2019**).

Os efeitos do N-3 na musculatura esquelética apendicular, também são bem discutidos, o que tem levado pesquisadores a tentar entender seus efeitos também no músculo diafragma (**Calder, 2010; Supinski *et al.*, 2010; Bando *et al.*, 2012; Fogagnolo Mauricio *et al.*, 2016; Mauricio *et al.*, 2017; de Tonnac *et al.*, 2018**), embora alguns estudos, também tenham mostrado ausência de efeito benéfico do N-3, sobre a musculatura esquelética (**Fappi *et al.*, 2014; Rolland *et al.*, 2019; Fappi *et al.*, 2019b**).

Sabemos que um dos efeitos colaterais do uso de glicocorticoides é a atrofia muscular (**Wilcox *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2017; Fappi *et al.*, 2019b; Hammers *et al.*, 2020**). Muitos pacientes que fazem uso, são portadores de doenças musculares, indo a óbito, normalmente por falência cardiorrespiratória, sendo o músculo diafragma o mais afetado em estágios tardios, como por exemplo na doença muscular de Duchenne (**Engel AG, 1994**).

No músculo esquelético o N-3 é descrito favorecendo o anabolismo, redução de citocinas pró-inflamatórias, mioesteatose, melhorando a sensibilidade a insulina (**Ewaschuk *et al.*, 2014**), síntese proteica, redução da emissão de espécies reativas ao oxigênio (ROS), mitocôndriais (**Gray & Mittendorfer, 2018**), sendo a proliferação

mitocondrial / replicação do DNA mitocondrial, benefício vinculado ao EPA (**Totland *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2016**).

Uma explicação para isso seria o fato de que, quando incorporado à membrana celular, o N-3 atuaria modulando diferentes sistemas celulares, como a sinalização, expressão gênica e função estrutural das membranas (**Surette, 2008**). Estudo com EPA em ratos submetidos a proteólise por fator de indução a proteólise (*PIF*), foi observado no grupo recebendo apenas *PIF*, diminuição significativa de peso corporal, da taxa metabólica de glicose no músculo diafragma e aumento expressivo dos marcadores de hipoglicemia, sendo estes reestabelecidos pela administração de EPA. Nesse estudo, o músculo diafragma mostrou diferente influência à hipoglicemia, com maior taxa metabólica de glicose em relação ao músculo apendicular (gastrocnêmio). (**Hussey & Tisdale, 1999**).

Em outro estudo, ratos Wistar alimentados com N-3, mostraram aumento da atividade termogênica induzida e maior queima de gordura do tecido adiposo periférico e marrom. A gordura marrom, seria responsável por manter a homeostase térmica corporal, ativada pela proteína UCP1 mitocondrial. Os adipócitos marrons são capazes de oxidar rapidamente seus próprios estoques de gordura e substratos circulantes, produzindo calor e aumentando a taxa metabólica mitocondrial, podendo estar associado a diminuição do peso corporal (**Hill *et al.*, 1992; Okuno *et al.*, 1997; Oudart *et al.*, 1997; Marlatt & Ravussin, 2017**).

Apesar dessa tendência a redução de gorduras, nossos dados sugerem que o N-3, não altera o ganho de peso corporal final, quando comparado ao grupo CT, corroborando com estudo similar em ratos mdx, onde o EPA não influenciou na perda de peso, quando associado a desnutrição induzida (**Bando *et al.*, 2012; Fogagnolo Mauricio *et al.*, 2016; Fappi *et al.*, 2019b**).

Em nosso estudo, observamos uma possível ação negativa do N-3, com tendência a atrofia do músculo diafragma nas fibras do tipo 1, reduzindo em 36,5%, ($P=0,07$) e 2B em 30,3% ($P=0,09$) e atrofiando significativamente fibras tipo 2A em 32,3% ($P<0,05$), corroborando em parte, com estudos similares, avaliando N-3 e EPA (**Totland *et al.*, 2000; Bando *et al.*, 2012**). Essa diminuição na área de fibra, também poderia estar relacionado a diminuição de gordura intracelular causada pelo EPA (**Totland *et al.*, 2000**).

A diminuição de área da fibra muscular em nosso estudo, estaria ocorrendo com

redução ou sem ativação dos principais atrogenes relacionados ao SUP, conforme os dados da expressão gênica RNAm (*Atrogina-1*, *MuRF-1* e *REDD2*) vs CT, reforçando resultados anteriores do grupo, na musculatura apendicular (**Fappi et al., 2019b**).

Observamos que isso, também pode estar relacionado, com a diminuição proteica de PGC1 α , também visto em nossos estudos prévios e em outros estudos, o que pode ter causado importante impacto, uma vez que essa atrofia, foi principalmente em fibras do tipo 2A no músculo diafragma e fibras do tipo 1 no músculo apendicular, que sabidamente, possui maior quantidade dessa proteína, e estaria relacionado a maior proteção contra atrofia muscular e aspectos inflamatórios (**Sandri et al., 2006; Martins et al., 2018**).

Em estudos anteriores do grupo, avaliando a musculatura apendicular, foi possível notar, importante ativação de outras vias catabólicas como a autofágica/lisossomal (LAMP-1, LC3-2 e IRS-1), o que também poderia sugerir, diminuição de aporte energético celular e atrofia pelo uso de N3 (**Fappi et al., 2019b**). Embora seja descrito que o SUP estaria relacionado a praticamente todos os modelos de atrofia muscular, catalisando a maioria das proteínas nas células de mamíferos (**Rock et al., 1994; Whitehouse & Tisdale, 2001; Khal & Tisdale, 2008**).

Estudo com miotubos, o EPA conseguiu suprimir a ativação das caspases, uma importante via de degradação, que também leva atrofia muscular (**Magee et al., 2008**). Isso também não teria sido suficiente para evitar a atrofia observada no presente estudo com o músculo diafragma. Já no músculo periférico, identificamos mínima atrofia muscular causada pela administração isolada de N-3 (**Fappi et al., 2019b**). O que nos possibilitou, extrair o músculo diafragma para o presente estudo, sendo possível, comparar o músculo diafragma com o músculo apendicular, dos mesmos animais, escasso na literatura. Nesse estudo inicial, o N3 na dosagem 100mg/kg/dia por 40 dias levou atrofia apenas das fibras do tipo 1 na musculatura apendicular.

No músculo diafragma, observamos aumento de expressão PGC1 α RNAm no grupo N-3, estando de acordo com estudo em células musculares C2C12 (**Lee et al., 2016**). Embora descrito como relacionado a efeito protetor das fibras do tipo 1 e 2A, não teria sido suficiente para a transcrição da proteína correspondente, diminuindo a expressão proteica de FoxO3a, conforme descreve outros autores (**Sandri et al., 2006**). Ainda que o estudo sugira que a expressão de RNAm não significaria uma real manifestação da proteína (**Frost et al., 2009**).

Apesar de similar resultado na diminuição de expressão proteica de PGC1 α no

músculo diafragma e apendicular, sugerindo influência negativa do N-3, notamos tendência a atrofia, em fibras tipo 1 e 2B no diafragma. Sugerindo, que essa suplementação de forma isolada, poderia prejudicar com maior intensidade o músculo diafragma. Entretanto, estudo sugere que as fibras do tipo 1 e 2A, seriam as mais influenciadas, positivamente, pelo N-3 (**Sandri et al., 2006**).

Acreditamos que o aumento de PGC1 α RNAm, observado no músculo diafragma, tenha ocorrido em resposta a diminuição da expressão proteica intracelular, influenciada pelo N-3.

Acreditamos que a mudança observada na proporção de fibras do tipo 1 para fibras do tipo 2B, sugerindo um músculo mais glicolítico, poderia ter relação com a atrofia dessa de fibra (tipo1), influenciado por maior esforço inspiratório, embora com pouco efeito, no tempo do estudo, já que a proporção de fibras do tipo 1 se revelou expressivamente menor em comparação as fibras do tipo 2A e 2B, apenas ~11% do total de fibras (fibras tipo 1 do animal CT). Dentre as poucas pesquisas que encontramos, relacionadas com os efeitos do N-3 no músculo diafragma, a mais recente foi estudando porcos, recebendo C18:3 (N-3 de linhaça) e C22:6 (N-3 de microalga Schizo Chytrium Microalgae), o autor descreve que a concentração de N-3 intracelular poderia variar de acordo com o tipo e função de cada músculo (**de Tonnac et al., 2018**). Nesse estudo, o diafragma foi o músculo que apresentou menor concentração de N-3, isso poderia explicar em parte, a atrofia no músculo diafragma (fibras 2A e tendência no tipo 1 e 2B) e atrofia apenas nas fibras do tipo 1 (mais ricas em PGC1- α), no músculo apendicular, após a suplementação isolada de N-3. Observamos nos dois músculos (diafragma e apendicular) redução expressiva na proporção de fibras do tipo 1 no grupo N-3 vs CT (**Fappi et al., 2019b**).

Estudo analisando o diafragma de ratos mdx, recebendo N-3, mostrou diminuição importante de Taurina (relacionado a regulação do cálcio e do estresse oxidativo), aspartato (relacionado a inflamação) e oxipurinol (relacionado ao estresse oxidativo), reduzindo cálcio total e TRPC1(*transient receptor potential channel-1*), envolvido com a redução da permeabilidade do Cálcio (**Mauricio et al., 2017**).

Estudo anterior do mesmo grupo, o N-3 melhorou o fator beta de fibrose, crescimento e transformação-9 e inibidor de metaloproteinase-1 tecidual, relacionado a melhora da distrofia diafragmática em ratos mdx (**Fogagnolo Mauricio et al., 2016**). Entretanto, nossos dados quanto ao N-3 de forma isolada, se mostraram desfavoráveis no músculo diafragma, quando comparados ao CT. Lembrando que nossos animais eram saudáveis e, portanto, sem *background* inflamatório que pudesse ser beneficiado pela administração de EPA (eicosanoides ímpares).

Comparação entre glicocorticoides

Todos os grupos recebendo glicocorticoide levaram à atrofia importante de fibras do tipo 1, 2A (MP, $p=0,09$) e 2B, diferente de estudos que mostraram atrofia preferencialmente de fibras do tipo 2B na musculatura periférica (**Dekhuijzen et al., 1995; Fournier et al., 2003; Fappi et al., 2014**). Estudos com ratos intubados recebendo MP também mostraram atrofia apenas em fibras do tipo 2B no músculo diafragma (**Maes et al., 2011**). Outro estudo com animais recebendo triancinolona, levou a redução de 51% em fibras do tipo 2B, porém sem alteração de fibras do tipo 1 ou 2A (**Dekhuijzen et al., 1995**).

Estudo com ratos intubados por 24 h recebendo MP desenvolveram importante atrofia de fibras 2A e 2B (**Maes et al., 2010**). No entanto, tal atrofia foi inibida com doses elevadas, provavelmente porque a maior dose evitaria a ativação da calpaína cálcio dependente, importante via de degradação ativada por glicocorticoides (**Maes et al., 2010**).

Nossos resultados mostraram, diminuição importante da expressão proteica de pAkt no grupo DX e MP e de PGC1 α nos grupos DC e DX, sinalizadores de síntese proteica e proteção celular, respectivamente.

Estudos mostram que a proteína pAkt, (forma fosforilada ou ativa), estaria modulando, a partir da cascata de sinalização de PI-3K, proteínas da via TORC-1 (**Lin et al., 2002; Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004; Qin et al., 2010**), relacionadas com a síntese proteica, mantendo pFoxO3a e pGSK3 β , fosforilados ou inativos (**Verhees et al., 2011**). Essas proteínas estariam envolvidas com a transcrição de atrogenes do SUP, sintetizando enzimas que culminaria na degradação proteica (**Jefferson et al., 1999; Latres et al., 2005**).

Outro possível agravante seria o desequilíbrio de Ca²⁺ intracelular, influenciado pelo uso de glicocorticoide, causando maior ativação de enzimas dependentes de cálcio como caspase-3, levando a maior atrofia muscular (**RANG, 2001**). Notamos que a MP ($p=0,05$) e a DX ($p=0,06$) diminuíram a expressão de pFoxoO-3a (inativo), proteína relacionada a transcrição de genes indutores de proteólise e inibição da síntese proteica como o caso da *Atrogina-1*, *MuRF-1* (**Waddell et al., 2008; Fappi et al., 2019 a**) e REDD-2 (**Miyazaki & Esser, 2009; Kelleher et al., 2015**). Em nosso estudo anterior, notamos aumento da expressão de *MuRF-1*, similar aos nossos resultados de expressão gênica, indicando maior ativação do SUP (**Bodine et al., 2001a**).

A DX, foi a droga que causou a maior atrofia da glândula adrenal, e fibras musculares tipo 2A e 2B, quando comparando a DC ($P<0,05$) e MP ($P<0,09$). Uma possibilidade seria o “tempo” do estudo. Pesquisadores identificaram que a ativação de atrogenes (*Atrogina-1* e *MuRF-1*) poderia ocorrer em diferentes momentos após estímulo com glicocorticoides, e nossos resultados apoiam esses dados. Estudo realizado com células C2C12, avaliando a presença de E3 ligases (*Atrogina-1* e *MURF-1*) após administração de DX, demonstrou um pico de expressão de *Atrogina-1* após 48h horas, com aumento de expressão de *MURF-1* em 24 horas e pico, somente após 96 horas (Verhees *et al.*, 2011).

Nossos dados da expressão gênica sugerem que, a DX, causaria atrofia muscular de forma mais precoce, seguido da MP e por último do DC, conforme discutido a seguir.

A DX também foi a droga que mais influenciou negativamente a proporção de fibras do tipo 1 e 2A, talvez pelo importante prejuízo observado na expressão proteica de PGC1 α , essa proteína estaria protegendo esses dois tipos de fibras conforme já discutido (Sandri *et al.*, 2006). Notamos ainda aumento importante da expressão gênica do PGC1 α RNAm no grupo DX, acreditamos que isso seria uma tentativa de reverter a diminuição observada na expressão proteica, causada por essa droga.

No resultado da expressão de *REDD-2*, também observamos que a DX foi a droga que mais elevou sua expressão, sua proteína correspondente, atua, inibindo a síntese proteica, diretamente sobre mTOR (Miyazaki M, 2009). Observamos diminuição importante de pAkt e pGSK3 β nas formas fosforiladas, sinalizando diminuição de síntese proteica e ativação de via de degradação, conforme descrito em outros estudos (Sandri *et al.*, 2004; Leger *et al.*, 2006; Verhees *et al.*, 2011; Schakman *et al.*, 2013; Schiaffino *et al.*, 2013).

Em nossa pesquisa inicial, estudando os efeitos da DX na MAp, notamos importante atrofia, com aumento significativo de atrogenes (*Atrogina-1*, *MURF-1* e *REDD-2*) e diminuída expressão proteica de pGSK3 β e pAkt (fosforilados) (Fappi *et al.*, 2014). Em estudo mais recente, a DX causou a maior atrofia de fibras do tipo 1 e importante atrofia das fibras do tipo 2B, onde também observamos, diminuição da expressão proteica de pAkt e RNAm do receptor de insulina IRS-1, diminuindo ainda a expressão proteica de pFoxO, pGSK3 β , e aumento de RNAm da *Atrogina-1*, *MURF-1*, *REDD-2* e Miostatina (Fappi *et al.*, 2019 a). Curiosamente, estudo com células mioblástica L6 de músculo gastrocnêmio, mostrou que a DX, teria diminuído a expressão de *REDD-2* (Wang *et al.*, 2006).

No atual estudo com o músculo diafragma, notamos atrofia mais branda de fibras do tipo 1 no grupo DX quando comparado ao MP ($P=0,2$) e ao DC ($P=0,14$) porém, sem significância estatística.

Na expressão de *PGC1 α* RNAm, a DX foi a única droga que elevou sua expressão, quando comparadas ao grupo CT ($P<0,01$), e conforme já discutido, talvez na tentativa de reverter a diminuição da expressão proteica. E que estaria associada a proteção das fibras do tipo 1 e 2A, ainda que a expressão de RNAm, pode não significar uma real manifestação de sua proteína (Frost *et al.*, 2009).

Em estudo similar no músculo diafragma, pesquisadores observaram que a DC causou maior atrofia nas fibras do tipo 1, 2A e 2B em comparação com a MP, diferente de nossos resultados (Dekhuijzen *et al.*, 1995). Em nosso estudo prévio, comparando glicocorticoides no músculo apendicular, os resultados indicaram que a DC, causou a menor atrofia das fibras do tipo 2A e 2B, em comparação a MP e DX e afetando mais as fibras do tipo 1, nas menores dosagens (Fappiet *et al.*, 2019a).

Já no diafragma, a DC mostrou o mesmo impacto quando comparada a MP nas fibras do tipo 1 e 2B. Foi menos agressiva quanto a atrofia muscular, quando comparada a DX nas fibras tipo 2A e 2B, indicando que diferentes tecidos podem responder de forma diferente, as mesmas drogas (de Tonnac *et al.*, 2018). Outros estudos tem indicado que menores doses de corticoides, podem causar maiores danos a MAP (Fappi *et al.*, 2019 a) e diafragmática (Dekhuijzen *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 2010).

A DC aumentou a proporção de fibras do tipo 1 quando comparado a DX e CT, mesmo diminuindo a expressão proteica de *PGC1 α* , quando comparada ao CT. Talvez por ter sido a única droga que não diminuiu a expressão proteica de pAkt, pFoxO3a e MuRF-1 RNAm, se mostrando a droga que menos influenciou negativamente sobre as vias relacionadas a atrofia no músculo diafragma.

Na expressão gênica, todos os glicocorticoides apresentaram aumento da expressão de *Atrogina-1*, sugerindo ativação importante de enzimas relacionadas a atrofia muscular (Sato *et al.*, 2017) e inibição da síntese proteica (Wang *et al.*, 2006). A MP apresentou a maior expressão, sugerindo que poderia ser o glicocorticoide com a ativação mais lenta de enzimas relacionadas com o SUP (Verhees *et al.*, 2011). Curiosamente, em nosso estudo anterior com a musculatura apendicular, observamos que a DX e MP ativaram esses mecanismos ao mesmo tempo, reforçando a hipótese de que diferentes tecidos podem responder de formas diferentes a mesmas drogas (de Tonnac *et al.*, 2018).

Essas drogas, elevaram a expressão de *MuRF-1*, considerada uma expressão mais tardia quando comparado a *Atrogina-1* (Sato *et al.*, 2017). Sugerindo que, durante o pico dos atrogenes (*Atrogina-1* e *MURF-1*), ambos foram ativados, enquanto a DC estaria ainda iniciando a ativação. Acreditamos que a DC, esteja relacionada a uma ativação mais tardia dentre as drogas do estudo.

A DX e DC elevaram a expressão de *REDD-2* quando comparados ao CT e a MP; enquanto a DX, foi a droga que mais influenciou quanto ao aumento de expressão. Isso estaria de acordo com outros estudos, sugerindo que a sequência de eventos catabólicos teria um tempo diferente de ação entre diferentes drogas (Ma *et al.*, 2003).

Acreditamos a partir desses dados, que a ativação do SUP, possa ter ocorrido em momentos diferentes, mostrado pela expressão da *Atrogina-1*, o que nos leva a imaginar que talvez a DX ative enzimas relacionadas a esse sistema catabólico de forma mais precoce.

Em estudo comparando dois glicocorticoides no músculo diafragma e gastrocnêmio, a DC se mostrou mais prejudicial que a MP, com importante atrofia muscular (Dekhuijzen *et al.*, 1995). Diferentemente, no nosso estudo, essas duas drogas mostraram padrão similar de envolvimento da área de secção transversa. Quanto a expressão gênica de atrogenes, a DX e MP apresentaram maior expressão quando comparado ao DC.

Dosagem de Dexametasona

Em estudo anterior do grupo, verificamos que a administração de 5 mg/kg/dia, a DX causou efeitos colaterais intensos e grande parte dos animais morreram antes do décimo dia de administração. Isto nos levou a estabelecer dois grupos de menores dosagens e que mostraram importantes impactos na dosagem de 1,25mg/kg/dia (Chrousos *et al.*, 2004; Schakman *et al.*, 2013; Fappi *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2019b). Assim, no presente estudo do músculo diafragma, utilizamos essa dosagem.

A equipotência da DX em humanos, seria de 0,082mg/kg, segundo a *normalization of body surface area (BSA)* ratos/humanos (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Encontramos estudos descrevendo atrofia muscular diafragmática após dose de 5 mg/kg/dia de MP em ratos e coelhos, e redução de 2,7% do peso corporal e atrofia de fibras tipo 1, 2A e 2B, com 1mg/kg/dia de MP por 11 dias (Verheul *et al.*, 2004). Estudos com diferentes dosagens de glicocorticoides, observaram maior atrofia do músculo

diafragma, em animais recebendo menores doses de glicocorticoide. (Nava *et al.*, 1996; Verheul *et al.*, 2004; Maes *et al.*, 2008; Maes *et al.*, 2010; Fappi *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2019 a). No entanto, estudos com a administração de dose única e muito alta de MP, entre 30 e 80 mg/kg/dia em 24 horas em ratos, levou a atenuação dos efeitos da disfunção diafragmática durante ventilação mecânica, sem impacto sobre a área das fibras em ratos. A hipótese sugerida seria que a alta dose de glicocorticoide seria capaz de inibir a atividade da calpaína, reduzindo a degradação proteica, protegendo a fibra de danos, sobre a área de secção transversa do músculo diafragma (Maes *et al.*, 2008; Maes *et al.*, 2010).

Associação de DX e N-3

O N-3 não influenciou no peso corporal, glândula adrenal e área de secção transversa de ratos, além do já causado pela DX de forma isolada. Observamos igual atrofia no estudo da área de secção transversa de fibras do tipo 1, 2A e 2B no grupo recebendo DX, não sendo influenciado pelo N-3. Ainda que estudos com N-3, de forma isolada, mostraram ação benéfica em alguns modelos de atrofia muscular (Hussey & Tisdale, 1999; Whitehouse & Tisdale, 2001; Khal & Tisdale, 2008; Calder, 2010; Supinski *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011; Bando *et al.*, 2012; Fogagnolo Mauricio *et al.*, 2016; Mauricio *et al.*, 2017)

Sugerindo uma possível ativação de outros mecanismos, em que o N-3 não consiga influenciar, de forma a evitar a atrofia, pelo menos nos modelos em que estudamos, diafragma (estudo atual) e MAp (Fappi *et al.*, 2019b). No entanto, observamos que o N-3 mostrou ação benéfica em alguns aspectos gênicos e metabólicos quanto a essa associação no músculo diafragma. Notamos tendência a maior expressão proteica de pFoxO3a no grupo DX+N-3, quando comparado ao grupo DX, sugerindo menor perda de fosforilação dessa proteína e consequentemente, menor transcrição de enzimas E3, relacionadas ao SUP (sugerindo menor atrofia pela via do SUP e da inativação de pFoxO-3a). Isso estaria de acordo com nossos resultados da expressão gênica de *MURF-1* e *REDD-2*, onde o grupo DX+N-3 mostrou menor expressão desses atrogenes, quando comparado ao grupo recebendo apenas DX, o que nos sugere, impacto positivo do N-3 ao reduzir importantes genes de transcrição relacionados a atrofia muscular (Miyazaki & Esser, 2009; Castillero *et al.*, 2013; Braun & Marks, 2015).

Outro aspecto positivo foi que o grupo DX+N-3 evitou a queda da expressão proteica de *PGC1α* quando comparado ao grupo DX e menor expressão gênica do *PGC1α*, quando comparado ao grupo DX. Entendemos que não teria sido necessária a ativação da transcrição e síntese proteica. Nossos dados apontam maior proteção das

fibras do tipo 1 e 2A devido a associação do N-3 com a DX notado na proporção de fibras, já que N-3 diminuiu a proporção de fibras do tipo 2B e aumentou as do tipo 1 e 2A. Acreditamos que um maior e prolongado esforço da musculatura respiratória, relacionado a fraqueza e ao quadro atrófico dessa musculatura, também tenha influenciado quanto a conversão para esses tipos de fibras mais oxidativas. (Booth & Thomason, 1991; Jarvis *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2002; Sandri *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016). Isso seria possível uma vez que a proteína PGC-1 α atuaria como um importante regulador na biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo (Lin *et al.*, 2002; Sandri, 2008). PGC-1 α protegeria principalmente as fibras do tipo 1 e 2A da atrofia, influenciando quanto a fosforilação da proteína FoxO3a (Sandri *et al.*, 2006). No músculo apendicular, a DX+N-3 levou a diminuição da expressão proteica do PGC1 α vs DX, o que novamente, poderia ser explicado por importante estudo mostrando que concentração e, portanto, os efeitos de N-3 intracelular podem variar de acordo com o tipo e função de cada músculo (de Tonnac *et al.*, 2018).

No resultado da expressão proteica, observamos diminuição de pAkt e pGSK3 β em ambos os grupos, sem diferença entre eles. Apesar de não significativa, observamos diminuição na expressão de pAkt no grupo DX+N-3, quando comparada a DX de forma isolada, o que pode ter influenciado na perda da fosforilação da proteína FoxO3a, e induziria maior transcrição nuclear de atrogenes, aumentando a atrofia muscular (Sandri *et al.*, 2004). Acreditamos também ter influenciado a proporção das fibras musculares, diminuindo fibras do tipo 2A e aumentando fibras do tipo 1.

Não encontramos estudos associando o N-3 a glicocorticoides no músculo diafragma para comparação dos dados, sugerindo que os resultados, referentes ao impacto do N-3 associado a um glicocorticoide (DX) no músculo diafragma, seja um dado novo na literatura.

Em estudo prévio do grupo, no músculo periférico, a associação DX+N3 levou a maior atrofia de fibras do tipo 1 e 2A no grupo DX+N3 (Fappi *et al.*, 2014; Fappi *et al.*, 2019 a). Acreditamos que a diferença nos resultados entre o músculo diafragma e o apendicular, seja em parte, pela influência benéfica que essa associação (DX+N-3) apresentou no músculo diafragma, reduzindo a expressão de *MURF-1* e *REDD-2*, atrogenes relacionados ao processo de atrofia muscular e inibição de mTOR. Nossos dados corroboram com estudo de Castillero *et al.* (2013) que mostrou haver um balanceamento entre *MURF-1* e *REDD2*, ficando nivelados, quando em maiores ou menores proporções (Castillero *et al.*, 2013). E que diferentes musculaturas podem

responder diferentemente a drogas, conforme sua função específica (**de Tonnac et al., 2018**). Notamos que o efeito benéfico relacionado ao N-3 no músculo diafragma, foi diferente do ocorrido no músculo apendicular, possivelmente pelas diferentes funções de cada músculo, sendo o diafragma, um músculo que possui mais fibras do tipo 2A, usando assim, mais energia de origem oxidativa, podendo assim ser mais favorecido pelo N-3 (**Sandri et al., 2006; Fappi et al., 2014; Fappi et al., 2019b**). Considerando um panorama geral de atrogenes do estudo, quanto a queda significativa da expressão gênica de *MuRF-1* e *REDD-2*, quando comparada ao grupo recebendo DX de forma isolada, talvez esteja relacionado ao efeito protetor, vinculado a diminuição da transcrição de atrogenes e inibição do complexo TORC1 (AKT/mTOR), respectivamente, estando de acordo com estudos avaliando esses atrogenes decorrente do uso de N-3 (**Bodine et al., 2001a; Waddell et al., 2008; Miyazaki & Esser, 2009; Castillero et al., 2013; Kelleher et al., 2015; Fappi et al., 2019 a**). Identificamos resultado similar em outros estudos com o N-3 que foi testado de forma isolada e associado a outros modelos de proteólise (**Whitehouse & Tisdale, 2001; Khal & Tisdale, 2008**). Isso estaria reforçando que o N-3 quando associado a DX, poderia agregar efeito protetor, conforme vimos em nosso estudo, podendo esse efeito ser maior no músculo diafragma quando comparado ao músculo apendicular (músculo tibial anterior e gastrocnêmio) (**Fappi et al., 2014; Fappi et al., 2019b**). Ao compararmos esses estudos anteriores do grupo com o músculo diafragma, observamos maior proporção de fibras do tipo 2A no diafragma (48%), do que na musculatura periférica (27%), o que indicaria diferença na expressão de PGC1 α e influência na proteção contra atrofia muscular (**Fappi et al., 2019b**). Outros autores, sugerem que a redução na área destas fibras após a associação entre DX+N-3 no músculo apendicular, poderia ser explicada também pelo impacto do N-3 sobre a prostaglandina F2 α (PGF2 α), onde o ácido araquidônico teria a capacidade de induzir maiores níveis de síntese proteica através da estimulação da produção de PGF2 α nesse músculo. E o uso do EPA/DHA em modelo animal mostrou que esses ácidos graxos reduzem os níveis normais de PGF2 α em 49% e 46%, respectivamente, e que ocorreria competição de precursores de N-3 por enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides com redução dos níveis de produção de prostaglandina F2 α (**Palmer and Wahle, 1987**). Outro possível agravante seria o desequilíbrio de Ca²⁺ intracelular devido ao uso de glicocorticoide, bem como pela ativação de receptores de ácidos graxos (FFAR – *Free fat acid receptors*), o que poderia levar a maior ativação de enzimas dependentes de cálcio como caspase-3 e maior atrofia. (**RANG, 2001**). Observamos em outro estudo que, na presença de DHA ou AA, a DX aumentaria a transcrição de genes relacionados a atividade do

glicocorticoide (25 – 42x o nível do controle), onde PUFA's poderiam ter um papel modulador intracelular na atividade do glicocorticoide (Vallette *et al.*, 1995). Outros sistemas de degradação que poderiam estar influenciando nesse modelo de atrofia também já foram descritos em outros músculos. No estudo anterior do grupo, além do SUP, as vias AMPK e autofágico/lisossomal, também se mostraram mais ativas, elevando a expressão de LC3II, LC3II/LC3I, LAMP-1 e fosfatase ácida (Fappi *et al.*, 2019b). Ainda que outros estudos demonstrem que, de forma isolada, o N-3 seria capaz de atenuar algumas dessas vias, como por exemplo redução da expressão da calpaína na proteólise induzida por lipopolisacarídeo (Supinski *et al.*, 2010).

Podemos de forma ampla, sugerir dois aspectos, quanto a associação de DX+N-3 e a comparação entre os glicocorticoides;

Primeiro, que a suplementação prévia e concomitante de N-3+DX por 10 dias em ratos, seria benéfica, no que se refere a velocidade “tempo” de atrofia causada pela DX, porém, sem evitar que ela aconteça;

Segundo que a DC, talvez seja o glicocorticoide com menores efeitos colaterais no tempo do estudo de forma equipotente, com relação a atrofia do músculo diafragma; e por fim, supor que a suplementação de N-3, associado ao DC, portanto, poderia trazer benefícios para àqueles em necessidade de corticoterapia e ventilação mecânica em curto prazo.

Consideramos nossa pesquisa, uma pequena somatória, para a compreensão dos efeitos dos principais glicocorticoides atualmente em uso clínico e o mais potente deles associado ao N-3, bem como de forma isolada no músculo diafragma. Tendo em vista, que grande parte dos indivíduos que necessitam fazer uso de glicocorticoide, são portadores de doenças neuromusculares autoimunes. Acreditamos que nossas respostas, possam auxiliar no manejo de quadros musculares diafragmáticos agudos, secundários a administração de glicocorticoides ou de carácter inflamatório. Bem como no uso concomitante com N-3, podendo ser benéfico em casos específicos. Novos estudos sobre as peculiaridades, em diferentes patologias diafragmáticas, como dosagens e tempo de suplementação prévias, possam se beneficiar dos dados apresentados em nosso estudo. Acreditamos que a deflazacorte associada a N-3, traria informações complementares e adicionais na tentativa de se atenuar a atrofia por glicocorticoides no músculo diafragma.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A administração de DX a 1,25 mg/kg/dia, DC 10 mg/kg/dia e MP 6,7 mg/kg/dia, por 10 dias foram suficientes para induzir importante redução do peso corporal, atrofia da glândula supra renal e atrofia do músculo diafragma de ratos.

A DX, foi a droga que causou a maior atrofia de fibras do tipo 2A e de 2B em menores proporções, diminuição da expressão de pAkt quando comparado ao DC e a maior expressão de *REDD-2*, entre as drogas e doses utilizadas no estudo.

Todos os glicocorticoides mostraram importante aumento da expressão de proteínas e genes relacionadas a degradação e diminuição da síntese proteica. Todos os grupos causaram atrofia das fibras diafragmáticas tipo 1, 2A e 2B em relação ao grupo CT, sendo a DC, a droga que causou a menor atrofia em fibras 2B comparado a DX, nas doses utilizadas.

A suplementação isolada de N-3 (EPA/DHA) em ratos (40 dias) favoreceu a substituição de fibras do tipo 1 por fibras do tipo 2B, deixando o músculo diafragma mais glicolítico e levando a atrofia de fibras do tipo 2A em ratos saudáveis.

A suplementação prévia e concomitantemente de N-3 com DX, não influenciou na perda de peso corporal, da glândula suprarrenal dos animais ou área de secção transversa. No entanto, se mostrou benéfico, aumentando a expressão proteica de FoxO3a, pFoxO3a, e diminuindo a expressão gênica de *MuRF-1* e *REDD-2*, quando comparado a DX de forma isolada. Tais resultados mostram uma possível proteção, relacionada ao N-3 nas fibras do músculo diafragma com relação ao tempo de atrofia causada pela DX.

8. REFERÊNCIAS

Agarkova, I. and J. C. Perriard (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 15(9): 477-485.

Bando, J. M., M. Fournier, X. Da and M. I. Lewis (2012). Effects of malnutrition with or without eicosapentaenoic acid on proteolytic pathways in diaphragm. *Respir Physiol Neurobiol* 180(1): 14-24.

Bassett, J. K., A. M. Hodge, D. R. English, R. J. MacInnis and G. G. Giles (2016). Plasma phospholipids fatty acids, dietary fatty acids, and breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 27(6): 759-773.

Beg, M., N. Abdullah, F. S. Thowfeik, N. K. Altorki and T. E. McGraw (2017). Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake. *Elife* 6.

Birkenkamp, K. U. and P. J. Coffey (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 292-297.

Black, K. L., B. Culp, D. Madison, O. S. Randall and W. E. Lands (1979). The protective effects of dietary fish oil on focal cerebral infarction. *Prostaglandins Med* 3(5): 257-268.

Bodine, S. C. and J. D. Furlow (2015). Glucocorticoids and Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol* 872: 145-176.

Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294(5547): 1704-1708.

Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass and G. D. Yancopoulos (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-1019.

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

Boonyarom, O. and K. Inui (2006). Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 188(2): 77-89.

Booth, F. W. and D. B. Thomason (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71(2): 541-585.

Bowden, S. A., A. M. Connolly, K. Kinnett and P. S. Zeitler (2019). Management of Adrenal Insufficiency Risk After Long-term Systemic Glucocorticoid Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy: Clinical Practice Recommendations. *J Neuromuscul Dis* 6(1): 31-41.

Braun, T. P. and D. L. Marks (2015). The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front Physiol* 6: 12.

Breen, L., K. A. Stokes, T. A. Churchward-Venne, D. R. Moore, S. K. Baker, K. Smith, P. J. Atherton and S. M. Phillips (2013). Two weeks of reduced activity decreases leg lean mass and induces "anabolic resistance" of myofibrillar protein synthesis in healthy elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 98(6): 2604-2612.

Brugarolas, J., K. Lei, R. L. Hurley, B. D. Manning, J. H. Reiling, E. Hafen, L. A. Witters, L. W. Ellisen and W. G. Kaelin, Jr. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18(23): 2893-2904.

Calder, P. C. (1998). Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res* 31(4): 467-490.

Calder, P. C. (2010). A novel effect of eicosapentaenoic acid: improved diaphragm strength in endotoxemia. *Crit Care* 14(2): 143.

Campos, Y., X. Qiu, E. Zanoteli, S. Moshiah, N. Vergani, A. Bongiovanni, A. J. Harris and A. d'Azzo (2010). Ozz-E3 ubiquitin ligase targets sarcomeric embryonic myosin heavy chain during muscle development. *PLoS One* 5(3): e9866.

Castillero, E., N. Alamdari, S. H. Lecker and P. O. Hasselgren (2013). Suppression of atrogin-1 and MuRF1 prevents dexamethasone-induced atrophy of cultured myotubes. *Metabolism* 62(10): 1495-1502.

Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1): 209-238.

Chehade, L., Z. A. Jaafar, D. El Masri, H. Zmerly, D. Kreidieh, H. Tannir, L. Itani and M. El Ghoch (2019). Lifestyle Modification in Rheumatoid Arthritis: Dietary and Physical Activity Recommendations Based on Evidence. *Curr Rheumatol Rev* 15(3): 209-214.

Chen, D., M. R. Yang, L. N. Huang, Y. W. Qiu and S. T. Li (2014). Different magnitude of resistance to non-depolarizing muscle relaxants in dexamethasone-treated rat diaphragm associated with altered acetylcholine receptor expression. *Genet Mol Res* 13(3): 5892-5900.

Chrousos, G. P., E. Charmandari and T. Kino (2004). Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology. *J Clin Endocrinol Metab* 89(2): 563-564.

Clemmons, D. R. (2009). Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab* 20(7): 349-356.

Combaret, L., D. Dardevet, I. Rieu, M. N. Pouch, D. Bechet, D. Taillandier, J. Grizard and D. Attaix (2005). A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol* 569(Pt 2): 489-499.

Combaret, L., C. Ralliere, D. Taillandier, K. Tanaka and D. Attaix (1999). Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol Biol Rep* 26(1-2): 95-101.

Combaret, L., T. Tilignac, A. Claustre, L. Voisin, D. Taillandier, C. Obled, K. Tanaka and D. Attaix (2002). Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem J* 361(Pt 2): 185-192.

Connolly, A. M., E. C. Malkus, J. R. Mendell, K. M. Flanigan, J. P. Miller, J. R. Schierbecker, C. A. Siener, P. T. Golumbek, C. M. Zaidman, C. M. McDonald, L. Johnson, A. Nicorici, P. I. Karachunski, J. W. Day, J. M. Kelecic, L. P. Lowes, L. N. Alfano, B. T. Darras, P. B. Kang, J. Quigley, A. E. Pasternak, J. M. Florence and M. D. C. R. Network (2015). Outcome reliability in non-ambulatory boys/men with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 51(4): 522-532.

Corradetti, M. N., K. Inoki and K. L. Guan (2005). The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 280(11): 9769-9772.

Cruz-Jentoft, A. J., J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J. P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinkova, M. Vandewoude, M. Zamboni and P. European Working Group on Sarcopenia in Older (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39(4): 412-423.

Cruz-Jentoft, A. J., F. Landi, S. M. Schneider, C. Zuniga, H. Arai, Y. Boirie, L. K. Chen, R. A. Fielding, F. C. Martin, J. P. Michel, C. Sieber, J. R. Stout, S. A. Studenski, B. Vellas, J. Woo, M. Zamboni and T. Cederholm (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing* 43(6): 748-759.

Cushing, H. (1969). The basophil adenomas of the pituitary body. *Ann R Coll Surg Engl* 44(4): 180-181.

de Tonnac, A., M. Guillevic and J. Mourot (2018). Fatty acid composition of several muscles and adipose tissues of pigs fed n-3 PUFA rich diets. *Meat Sci* 140: 1-8.

Dekhuijzen, P. N., G. Gayan-Ramirez, A. Bisschop, V. De Bock, R. Dom and M. Decramer (1995). Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *J Appl Physiol* (1985) 78(2): 629-637.

Dekhuijzen, P. N., G. Gayan-Ramirez, A. Bisschop, V. de Bock, R. Dom and M. Decramer (1996). Recovery of corticosteroid-induced changes in contractile properties and morphology of rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 153(2): 769-775.

Del-Rio-Navarro, B. E., A. L. Miranda-Lora, F. Huang, M. S. Hall-Mondragon and J. J. Leija-Martinez (2019). Effect of supplementation with omega-3 fatty acids on hypertriglyceridemia in pediatric patients with obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab*

32(8): 811-819.

Delaunay, A., K. D. Bromberg, Y. Hayashi, M. Mirabella, D. Burch, B. Kirkwood, C. Serra, M. C. Malicdan, A. P. Mizisin, R. Morosetti, A. Broccolini, L. T. Guo, S. N. Jones, S. A. Lira, P. L. Puri, G. D. Shelton and Z. Ronai (2008). The ER-bound RING finger protein 5 (RNF5/RMA1) causes degenerative myopathy in transgenic mice and is deregulated in inclusion body myositis. *PLoS One* 3(2): e1609.

Delgado-Lista, J., P. Perez-Martinez, J. Lopez-Miranda and F. Perez-Jimenez (2012). Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *Br J Nutr* 107 Suppl 2: S201-213.

Demoule, A., B. Jung, H. Prodanovic, N. Molinari, G. Chanques, C. Coirault, S. Matecki, A. Duguet, T. Similowski and S. Jaber (2013). Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact-a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 188(2): 213-219.

Diaz, M. C., G. A. Ospina-Tascon and C. B. Salazar (2014). Respiratory muscle dysfunction: a multicausal entity in the critically ill patient undergoing mechanical ventilation. *Arch Bronconeumol* 50(2): 73-77.

Ding, S., Q. Dai, H. Huang, Y. Xu and C. Zhong (2018). An Overview of Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol* 1088: 3-19.

Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116(Pt 7): 1175-1186.

Doucet, M., A. Dube, D. R. Joannisse, R. Debigare, A. Michaud, M. E. Pare, R. Vaillancourt, E. Frechette and F. Maltais (2010). Atrophy and hypertrophy signalling of the quadriceps and diaphragm in COPD. *Thorax* 65(11): 963-970.

Drakontides, A. B. (1982). The effect of glucocorticoid treatment on denervated rat hemidiaphragm. *Brain Res* 239(1): 175-189.

Dufner, A., M. Andjelkovic, B. M. Burgering, B. A. Hemmings and G. Thomas (1999). Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19(6): 4525-4534.

Dyerberg, J. and H. O. Bang (1979). Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 2(8140): 433-435.

Eason, J. M., S. L. Dodd and S. K. Powers (2003). Use of anabolic steroids to attenuate the effects of glucocorticoids on the rat diaphragm. *Phys Ther* 83(1): 29-36.

Authop. 1133e87.p. 1133e87.^M.-H. Professional(1994). Distrophinopathies. New York, McGraw-Hill.

Authop. 1133e87.p. 1133e87.^(1994). Distrophinopathies. New York: McGraw-Hill.

Ewaschuk, J. B., A. Almasud and V. C. Mazurak (2014). Role of n-3 fatty acids

in muscle loss and myosteatorsis. *Appl Physiol Nutr Metab* 39(6): 654-662.

Fappi, A., T. S. Godoy, J. R. Maximino, V. R. Rizzato, C. Neves Jde, G. Chadi and E. Zanoteli (2014). The effects of omega-3 fatty acid supplementation on dexamethasone-induced muscle atrophy. *Biomed Res Int* 2014: 961438.

Fappi, A., J. C. Neves, K. A. Kawasaki, L. Bacelar, L. N. Sanches, P. d. S. F, R. Larina-Neto, G. Chadi and E. Zanoteli (2019b). Omega-3 multiple effects increasing glucocorticoid-induced muscle atrophy: autophagic, AMPK and UPS mechanisms. *Physiol Rep* 7(1): e13966.

Fappi, A., J. C. Neves, L. N. Sanches, E. S. P. V. Massaroto, G. Y. Sikusawa, T. P. C. Brandao, G. Chadi and E. Zanoteli (2019 a). Skeletal Muscle Response to Deflazacort, Dexamethasone and Methylprednisolone. *Cells* 8(5).

Fiaccavento, R., F. Carotenuto, A. Vecchini, L. Binaglia, G. Forte, E. Capucci, A. M. Maccari, M. Minieri and P. Di Nardo (2010). An omega-3 fatty acid-enriched diet prevents skeletal muscle lesions in a hamster model of dystrophy. *Am J Pathol* 177(5): 2176-2184.

Fielitz, J., M. S. Kim, J. M. Shelton, S. Latif, J. A. Spencer, D. J. Glass, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2007a). Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* 117(9): 2486-2495.

Fielitz, J., E. van Rooij, J. A. Spencer, J. M. Shelton, S. Latif, R. van der Nagel, S. Bezprozvannaya, L. de Windt, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2007b). Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4377-4382.

Finkel, R. S., K. M. Flanigan, B. Wong, C. Bonnemann, J. Sampson, H. L. Sweeney, A. Reha, V. J. Northcutt, G. Elfring, J. Barth and S. W. Peltz (2013). Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 8(12): e81302.

Fletcher, L. K., S. K. Powers, J. S. Coombes, H. Demirel, H. Vincent, S. L. Dodd and J. McLaughlin (2000). Glucocorticoid-induced alterations in the rate of diaphragmatic fatigue. *Pharmacol Res* 42(1): 61-68.

Floeter, M. K. (2009). Structure and function of muscle fibers and motor units. Disorders of Voluntary Muscle.

Florini, J. R., D. Z. Ewton and S. A. Coolican (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17(5): 481-517.

Fognolo Mauricio, A., E. Minatel, H. Santo Neto and M. J. Marques (2013). Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice. *Clin Nutr* 32(4): 636-642.

Fognolo Mauricio, A., J. A. Pereira, H. Santo Neto and M. J. Marques (2016). Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice hearts at later stages of dystrophy. *Nutrition* 32(7-8): 855-862.

Fournier, M., Z. S. Huang, H. Li, X. Da, B. Cercek and M. I. Lewis (2003). Insulin-like growth factor I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(1): R34-43.

Frontera, W. R. and J. Ochala (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96(3): 183-195.

Frost, R. A., D. Huber, A. Pruznak and C. H. Lang (2009). Regulation of REDD1 by insulin-like growth factor-I in skeletal muscle and myotubes. *J Cell Biochem* 108(5): 1192-1202.

Garami, A., F. J. Zwartkruis, T. Nobukuni, M. Joaquin, M. Roccio, H. Stocker, S. C. Kozma, E. Hafen, J. L. Bos and G. Thomas (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 11(6): 1457-1466.

Gebauer, S. K., T. L. Psota, W. S. Harris and P. M. Kris-Etherton (2006). n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl): 1526S-1535S.

Glass, D. J. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med* 9(8): 344-350.

Gomes, M. D., S. H. Lecker, R. T. Jagoe, A. Navon and A. L. Goldberg (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440-14445.

Gordon, J. N., T. M. Trebble, R. D. Ellis, H. D. Duncan, T. Johns and P. M. Goggin (2005). Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut* 54(4): 540-545.

Gray, S. R. and B. Mittendorfer (2018). Fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids for the prevention and treatment of sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 21(2): 104-109.

Greising, S. M., C. B. Mantilla, J. S. Medina-Martinez, J. M. Stowe and G. C. Sieck (2015). Functional impact of diaphragm muscle sarcopenia in both male and female mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309(1): L46-52.

Grobet, L., D. Pirottin, F. Farnir, D. Poncelet, L. J. Royo, B. Brouwers, E. Christians, D. Desmecht, F. Coignoul, R. Kahn and M. Georges (2003). Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* 35(4): 227-238.

Guerri, R., A. Gayete, E. Balcells, A. Ramirez-Sarmiento, I. Vollmer, J. Garcia-Aymerich, J. Gea and M. Orozco-Levi (2010). Mass of intercostal muscles associates with risk of multiple exacerbations in COPD. *Respir Med* 104(3): 378-388.

Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86(3): 564-600.

Gutierrez, A. and J. D. England (2013). Administration of glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Continuum (Minneapolis, Minn)* 19(6 Muscle Disease): 1703-1708.

G. Koogan8527707136r (2002). Tratado de Semiologia Médica.

Haddad, M. and S. Sharma (2020). Physiology, Lung. StatPearls. Treasure Island (FL).

Hammers, D. W., C. C. Hart, A. Patsalos, M. K. Matheny, L. A. Wright, L. Nagy and H. L. Sweeney (2020). Glucocorticoids counteract hypertrophic effects of myostatin inhibition in dystrophic muscle. *JCI Insight* 5(1).

Hasselgren, P. O., N. Alamdari, Z. Aversa, P. Gonnella, I. J. Smith and S. Tizio (2010). Corticosteroids and muscle wasting: role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(4): 423-428.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.

Hill, J. O., D. Lin, F. Yakubu and J. C. Peters (1992). Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16(5): 321-333.

Hirai, A., T. Hamazaki, T. Terano, T. Nishikawa, Y. Tamura, A. Kamugai and J. Jajiki (1980). Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. *Lancet* 2(8204): 1132-1133.

Hornberger, T. A., R. Stuppard, K. E. Conley, M. J. Fedele, M. L. Fiorotto, E. R. Chin and K. A. Esser (2004). Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J* 380(Pt 3): 795-804.

Hussey, H. J. and M. J. Tisdale (1999). Effect of a cachectic factor on carbohydrate metabolism and attenuation by eicosapentaenoic acid. *Br J Cancer* 80(8): 1231-1235.

Hvid, L. G., C. Suetta, P. Aagaard, M. Kjaer, U. Frandsen and N. Ortenblad (2013). Four days of muscle disuse impairs single fiber contractile function in young and old healthy men. *Exp Gerontol* 48(2): 154-161.

Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4(9): 648-657.

Jarvis, J. C., T. Mokrusch, M. M. Kwende, H. Sutherland and S. Salmons (1996). Fast-to-slow transformation in stimulated rat muscle. *Muscle Nerve* 19(11): 1469-1475.

Jefferson, L. S., J. R. Fabian and S. R. Kimball (1999). Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 31(1): 191-200.

Jentsch, S., W. Seufert and H. P. Hauser (1991). Genetic analysis of the ubiquitin

system. *Biochim Biophys Acta* 1089(2): 127-139.

Jiang, T. X., A. Cairns, J. D. Road and P. G. Wilcox (1996). Effect of the beta-agonist clenbuterol on dexamethasone-induced diaphragm dysfunction in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 154(6 Pt 1): 1778-1783.

Jones, A., D. J. Hwang, R. Narayanan, D. D. Miller and J. T. Dalton (2010). Effects of a novel selective androgen receptor modulator on dexamethasone-induced and hypogonadism-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 151(8): 3706-3719.

Jones, S. W., R. J. Hill, P. A. Krasney, B. O'Conner, N. Peirce and P. L. Greenhaff (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18(9): 1025-1027.

Joep, R. S. and G. V. Johnson (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29(2): 95-102.

Kaestner, K. H., W. Knochel and D. E. Martinez (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14(2): 142-146.

Kalista, S., O. Schakman, H. Gilson, P. Lause, B. Demeulder, L. Bertrand, M. Pende and J. P. Thissen (2012). The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy. *Endocrinology* 153(1): 241-253.

Kandalla, P. K., G. Goldspink, G. Butler-Browne and V. Mouly (2011). Mechano Growth Factor E peptide (MGF-E), derived from an isoform of IGF-1, activates human muscle progenitor cells and induces an increase in their fusion potential at different ages. *Mech Ageing Dev* 132(4): 154-162.

Kandarian, S. C. and R. W. Jackman (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 33(2): 155-165.

Kelleher, A. R., S. L. Pereira, L. S. Jefferson and S. R. Kimball (2015). REDD2 expression in rat skeletal muscle correlates with nutrient-induced activation of mTORC1: responses to aging, immobilization, and remobilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308(2): E122-129.

Kelly, F. J. and D. F. Goldspink (1982). The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem J* 208(1): 147-151.

Khal, J. and M. J. Tisdale (2008). Downregulation of muscle protein degradation in sepsis by eicosapentaenoic acid (EPA). *Biochem Biophys Res Commun* 375(2): 238-240.

Kiecolt-Glaser, J. K., M. A. Belury, R. Andridge, W. B. Malarkey and R. Glaser (2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun* 25(8): 1725-1734.

Kovacs, J. J., P. J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J. T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt and T. P. Yao (2005). HDAC6 regulates Hsp90

acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18(5): 601-607.

Kremer, J. M., J. Bigaouette, A. V. Michalek, M. A. Timchalk, L. Lininger, R. I. Rynes, C. Huyck, J. Zieminski and L. E. Bartholomew (1985). Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1(8422): 184-187.

Kremer, J. M., W. Jubiz, A. Michalek, R. I. Rynes, L. E. Bartholomew, J. Bigaouette, M. Timchalk, D. Beeler and L. Lininger (1987). Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study. *Ann Intern Med* 106(4): 497-503.

Kris-Etherton, P. M., W. S. Harris, L. J. Appel and C. Nutrition (2003). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2): e20-30.

Kromann, N. and A. Green (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* 208(5): 401-406.

Kromhout, D., E. J. Giltay, J. M. Geleijnse and G. Alpha Omega Trial (2010). n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med* 363(21): 2015-2026.

Kudryashova, E., I. Kramerova and M. J. Spencer (2012). Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *J Clin Invest* 122(5): 1764-1776.

Kwong, R. Y., B. Heydari, Y. Ge, S. Abdullah, K. Fujikura, K. Kaneko, W. S. Harris, M. Jerosch-Herold, E. M. Antman, J. G. Seidman and M. A. Pfeffer (2019). Genetic profiling of fatty acid desaturase polymorphisms identifies patients who may benefit from high-dose omega-3 fatty acids in cardiac remodeling after acute myocardial infarction-Post-hoc analysis from the OMEGA-REMODEL randomized controlled trial. *PLoS One* 14(9): e0222061.

Lalia, A. Z., S. Dasari, M. M. Robinson, H. Abid, D. M. Morse, K. A. Klaus and I. R. Lanza (2017). Influence of omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein metabolism and mitochondrial bioenergetics in older adults. *Aging (Albany NY)* 9(4): 1096-1129.

Lanchais, K., F. Capel and A. Tournadre (2020). Could Omega 3 Fatty Acids Preserve Muscle Health in Rheumatoid Arthritis? *Nutrients* 12(1).

Latres, E., A. R. Amini, A. A. Amini, J. Griffiths, F. J. Martin, Y. Wei, H. C. Lin, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem* 280(4): 2737-2744.

Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal

and disease states. *J Nutr* 129(1S Suppl): 227S-237S.

Lee, M. S., Y. Shin, S. Moon, S. Kim and Y. Kim (2016). Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Mitochondrial DNA Replication and PGC-1 α Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *Prev Nutr Food Sci* 21(4): 317-322.

Leger, B., R. Cartoni, M. Praz, S. Lamon, O. Deriaz, A. Crettenand, C. Gobelet, P. Rohmer, M. Konzelmann, F. Luthi and A. P. Russell (2006). Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 576(Pt 3): 923-933.

Leonard, A. E., S. L. Pereira, H. Sprecher and Y. S. Huang (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43(1): 36-54.

Leupin, E. (1950). The influence of corticosteroids on deamination in the surviving diaphragm. *Biochem J* 46(5): 567-568.

Li, H. H., V. Kedar, C. Zhang, H. McDonough, R. Arya, D. Z. Wang and C. Patterson (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest* 114(8): 1058-1071.

Lin, J., H. Wu, P. T. Tarr, C. Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. N. Olson, B. B. Lowell, R. Bassel-Duby and B. M. Spiegelman (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418(6899): 797-801.

Lisi, M. T. and R. D. Cohn (2007). Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta* 1772(2): 159-172.

Liu, D., A. Ahmet, L. Ward, P. Krishnamoorthy, E. D. Mandelcorn, R. Leigh, J. P. Brown, A. Cohen and H. Kim (2013). A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 9(1): 30.

Livneh, I., V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, N. Avni and A. Ciechanover (2016). The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res* 26(8): 869-885.

Lokireddy, S., C. McFarlane, X. Ge, H. Zhang, S. K. Sze, M. Sharma and R. Kambadur (2011). Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Mol Endocrinol* 25(11): 1936-1949.

Ma, K., C. Mallidis, S. Bhasin, V. Mahabadi, J. Artaza, N. Gonzalez-Cadavid, J. Arias and B. Salehian (2003). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E363-371.

Machado, R. V., A. F. Mauricio, A. P. Taniguti, R. Ferretti, H. S. Neto and M. J. Marques (2011). Eicosapentaenoic acid decreases TNF- α and protects dystrophic

muscles of mdx mice from degeneration. *J Neuroimmunol* 232(1-2): 145-150.

Maes, K., A. Agten, A. Smuder, S. K. Powers, M. Decramer and G. Gayan-Ramirez (2010). Corticosteroid effects on ventilator-induced diaphragm dysfunction in anesthetized rats depend on the dose administered. *Respir Res* 11: 178.

Maes, K., D. Testelmans, P. Cadot, K. Deruisseau, S. K. Powers, M. Decramer and G. Gayan-Ramirez (2008). Effects of acute administration of corticosteroids during mechanical ventilation on rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 178(12): 1219-1226.

Maes, K., D. Testelmans, D. Thomas, M. Decramer and G. Gayan-Ramirez (2011). High dose methylprednisolone counteracts the negative effects of rocuronium on diaphragm function. *Intensive Care Med* 37(11): 1865-1872.

Magee, P., S. Pearson and J. Allen (2008). The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation. *Lipids Health Dis* 7: 24.

Mahzabin, T., J. J. Pillow, G. J. Pinniger, A. J. Bakker, P. B. Noble, R. B. White, K. Karisnani and Y. Song (2017). Influence of antenatal glucocorticoid on preterm lamb diaphragm. *Pediatr Res* 82(3): 509-517.

Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A. L. Goldberg, S. Schiaffino and M. Sandri (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6(6): 458-471.

Manson, J. E., N. R. Cook, I. M. Lee, W. Christen, S. S. Bassuk, S. Mora, H. Gibson, C. M. Albert, D. Gordon, T. Copeland, D. D'Agostino, G. Friedenberg, C. Ridge, V. Bubes, E. L. Giovannucci, W. C. Willett, J. E. Buring and V. R. Group (2019). Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *N Engl J Med* 380(1): 23-32.

Marlatt, K. L. and E. Ravussin (2017). Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Curr Obes Rep* 6(4): 389-396.

Martins, A. R., A. R. Crisma, L. N. Masi, C. L. Amaral, G. N. Marzuca-Nassr, L. H. M. Bomfim, B. G. Teodoro, A. L. Queiroz, T. D. A. Serdan, R. P. Torres, J. Mancini-Filho, A. C. Rodrigues, T. C. Alba-Loureiro, T. C. Pithon-Curi, R. Gorjao, L. R. Silveira, R. Curi, P. Newsholme and S. M. Hirabara (2018). Attenuation of obesity and insulin resistance by fish oil supplementation is associated with improved skeletal muscle mitochondrial function in mice fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 55: 76-88.

Matsakas, A. and K. Patel (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 24(5): 611-629.

Matthews, E., R. Brassington, T. Kuntzer, F. Jichi and A. Y. Manzur (2016). Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*(5): CD003725.

Mauricio, A. F., S. C. de Carvalho, H. Santo Neto and M. J. Marques (2017). Effects of dietary omega-3 on dystrophic cardiac and diaphragm muscles as evaluated by (1)H magnetic resonance spectroscopy: Metabolic profile and calcium-related proteins. *Clin Nutr ESPEN* 20: 60-67.

McDonnell, S. L., C. B. French, C. A. Baggerly and W. S. Harris (2019). Cross-sectional study of the combined associations of dietary and supplemental eicosapentaenoic acid+docosahexaenoic acid on Omega-3 Index. *Nutr Res* 71: 43-55.

McElhinny, A. S., K. Kakinuma, H. Sorimachi, S. Labeit and C. C. Gregorio (2002). Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol* 157(1): 125-136.

McFarlane, C., E. Plummer, M. Thomas, A. Hennebry, M. Ashby, N. Ling, H. Smith, M. Sharma and R. Kambadur (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 209(2): 501-514.

McGlory, C., P. C. Calder and E. A. Nunes (2019). The Influence of Omega-3 Fatty Acids on Skeletal Muscle Protein Turnover in Health, Disuse, and Disease. *Front Nutr* 6: 144.

Medina, R., S. S. Wing and A. L. Goldberg (1995). Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J* 307 (Pt 3): 631-637.

Meloux, A., L. Rochette, M. Maza, F. Bichat, L. Tribouillard, Y. Cottin, M. Zeller and C. Vergely (2019). Growth Differentiation Factor-8 (GDF8)/Myostatin is a Predictor of Troponin I Peak and a Marker of Clinical Severity after Acute Myocardial Infarction. *J Clin Med* 9(1).

Mendell, J. R., C. Shilling, N. D. Leslie, K. M. Flanigan, R. al-Dahhak, J. Gastier-Foster, K. Kneile, D. M. Dunn, B. Duval, A. Aoyagi, C. Hamil, M. Mahmoud, K. Roush, L. Bird, C. Rankin, H. Lilly, N. Street, R. Chandrasekar and R. B. Weiss (2012). Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 71(3): 304-313.

Autho583583^(2009). REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch.

Miyazaki, M. and K. A. Esser (2009). REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(3): C583-592.

Mordier, S., C. Deval, D. Bechet, A. Tassa and M. Ferrara (2000). Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 275(38): 29900-29906.

Morley, J. E., R. N. Baumgartner, R. Roubenoff, J. Mayer and K. S. Nair (2001). Sarcopenia. *J Lab Clin Med* 137(4): 231-243.

Moxley, R. T., 3rd, S. Pandya, E. Ciafaloni, D. J. Fox and K. Campbell (2010). Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol* 25(9): 1116-1129.

Nader, G. A. (2005). Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 1985-1996.

Nalepa, G., M. Rolfe and J. W. Harper (2006). Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 5(7): 596-613.

Nava, S., G. Gayan-Ramirez, H. Rollier, A. Bisschop, R. Dom, V. de Bock and M. Decramer (1996). Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 153(6 Pt 1): 1888-1896.

Nedergaard, A., M. A. Karsdal, S. Sun and K. Henriksen (2013). Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 4(1): 1-17.

Nicastro, H., N. E. Zanchi, C. R. da Luz, W. M. de Moraes, P. Ramona, M. A. de Siqueira Filho, D. F. Chaves, A. Medeiros, P. C. Brum, D. Dardevet and A. H. Lancha, Jr. (2012). Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. *Nutrition* 28(4): 465-471.

Nicolaides, N. C., E. Charmandari, G. P. Chrousos and T. Kino (2014). Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC Endocr Disord* 14: 71.

Nicolaides, N. C., Z. Galata, T. Kino, G. P. Chrousos and E. Charmandari (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75(1): 1-12.

Nishi, M., A. Yasue, S. Nishimatu, T. Nohno, T. Yamaoka, M. Itakura, K. Moriyama, H. Ohuchi and S. Noji (2002). A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 247-251.

Ogilvie, R. W. and D. L. Feedback (1990). A metachromatic dye-ATPase method for the simultaneous identification of skeletal muscle fiber types I, IIA, IIB and IIC. *Stain Technol* 65(5): 231-241.

Okuno, M., K. Kajiwarra, S. Imai, T. Kobayashi, N. Honma, T. Maki, K. Suruga, T. Goda, S. Takase, Y. Muto and H. Moriwaki (1997). Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. *J Nutr* 127(9): 1752-1757.

Omar, Z. A., B. A. Montser and M. A. R. Farahat (2019). Effect of high-dose Omega 3 on lipid profile and inflammatory markers in chronic hemodialysis children. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 30(3): 634-639.

Oudart, H., R. Groscolas, C. Calgari, M. Nibbelink, C. Leray, Y. Le Maho and A. Malan (1997). Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21(11): 955-962.

Palikaras, K. and N. Tavernarakis (2014). Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol* 56: 182-188.

Palmer, R. M. and K. W. Wahle (1987). Protein synthesis and degradation in isolated muscle. Effect of omega 3 and omega 6 fatty acids. *Biochem J* 242(2): 615-618.

Parente, L. (2017). Deflazacort: therapeutic index, relative potency and equivalent doses versus other corticosteroids. *BMC Pharmacol Toxicol* 18(1): 1.

Pereira, R. M. and J. Freire de Carvalho (2011). Glucocorticoid-induced myopathy. *Joint Bone Spine* 78(1): 41-44.

Perrini, S., L. Laviola, M. C. Carreira, A. Cignarelli, A. Natalicchio and F. Giorgino (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 205(3): 201-210.

Petrof, B. J., S. B. Gottfried, J. Eby, J. Lamanca and S. Levine (1995). Growth hormone does not prevent corticosteroid-induced changes in rat diaphragm structure and function. *J Appl Physiol* (1985) 79(5): 1571-1577.

Philippou, E. and E. Nikiphorou (2018). Are we really what we eat? Nutrition and its role in the onset of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 17(11): 1074-1077.

(2005). SMHS1 is involved in oxidative/glycolytic-energy metabolism balance of muscle fibers.

Polkey, M. I. (2019). Respiratory Muscle Assessment in Clinical Practice. *Clin Chest Med* 40(2): 307-315.

85277-0410-2r (1997). Semiologia Médica. Rio de Janiro Guanabara Koogan.

Powell, S. R. (2006). The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H1-H19.

Qin, J., R. Du, Y. Q. Yang, H. Q. Zhang, Q. Li, L. Liu, H. Guan, J. Hou and X. R. An (2013). Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy was associated with upregulation of myostatin promoter activity. *Res Vet Sci* 94(1): 84-89.

Qin, W., J. Pan, Y. Wu, W. A. Bauman and C. Cardozo (2010). Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 403(3-4): 473-478.

Qiu, J., L. Wang, Y. Wang, Q. Zhang, W. Ma, Q. Fang, H. Sun and F. Ding (2018). MicroRNA351 targeting TRAF6 alleviates dexamethasone-induced myotube atrophy. *J Thorac Dis* 10(11): 6238-6246.

Autho347347^G. Koogan8527706091r (2001). PHARMACOLOGICAL. Rio de Janeiro.

Reagan-Shaw, S., M. Nihal and N. Ahmad (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22(3): 659-661.

Reed, U. C. (2002). [Neuromuscular disorders]. *J Pediatr (Rio J)* 78 Suppl 1: S89-S103.

Reed, U. C. (2009). Congenital muscular dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives. *Arq Neuropsiquiatr* 67(2A): 343-362.

Reiling, J. H. and E. Hafen (2004). The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev* 18(23): 2879-2892.

Risk, G. Prevention Study Collaborative, M. C. Roncaglioni, M. Tombesi, F. Avanzini, S. Barlera, V. Caimi, P. Longoni, I. Marzona, V. Milani, M. G. Silletta, G. Tognoni and R. Marchioli (2013). n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors. *N Engl J Med* 368(19): 1800-1808.

Autho1153, 11541153, 1154^C. R. Robbins SL, Kumar V85-277-0364-5r (1996). **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro (RJ), Guanabara Koogan.

Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang and A. L. Goldberg (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78(5): 761-771.

Rolland, Y., P. S. Barreto, M. Maltais, S. Guyonnet, C. Cantet, S. Andrieu and B. Vellas (2019). Effect of Long-Term Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation with or without Multidomain Lifestyle Intervention on Muscle Strength in Older Adults: Secondary Analysis of the Multidomain Alzheimer Preventive Trial (MAPT). *Nutrients* 11(8).

Saito, M. and K. Kubo (2003). Relationship between tissue lipid peroxidation and peroxidizability index after alpha-linolenic, eicosapentaenoic, or docosahexaenoic acid intake in rats. *Br J Nutr* 89(1): 19-28.

Sandri, M., J. Lin, C. Handschin, W. Yang, Z. P. Arany, S. H. Lecker, A. L. Goldberg and B. M. Spiegelman (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16260-16265.

Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker and A. L. Goldberg (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117(3): 399-412.

Sandri, M. e. a. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 23: 160-170.

Sato, A. Y., D. Richardson, M. Cregor, H. M. Davis, E. D. Au, K. McAndrews, T. A. Zimmers, J. M. Organ, M. Peacock, L. I. Plotkin and T. Bellido (2017). Glucocorticoids Induce Bone and Muscle Atrophy by Tissue-Specific Mechanisms Upstream of E3 Ubiquitin Ligases. *Endocrinology* 158(3): 664-677.

Schacke, H., W. D. Docke and K. Asadullah (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96(1): 23-43.

Schakman, O., H. Gilson, S. Kalista and J. P. Thissen (2009). Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm Res* 72 Suppl 1: 36-41.

Schakman, O., H. Gilson and J. P. Thissen (2008). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197(1): 1-10.

Schakman, O., S. Kalista, C. Barbe, A. Loumaye and J. P. Thissen (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2163-2172.

Schiaffino, S., K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw and M. Sandri (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 280(17): 4294-4314.

Schiaffino, S. and C. Reggiani (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91(4): 1447-1531.

Shafiee, G., A. Keshtkar, A. Soltani, Z. Ahadi, B. Larijani and R. Heshmat (2017). Prevalence of sarcopenia in the world: a systematic review and meta- analysis of general population studies. *J Diabetes Metab Disord* 16: 21.

Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54(3): 438-463.

Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21(6): 495-505.

Simopoulos, A. P. (2009). Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev Nutr Diet* 99: 1-16.

Smith, H. J., N. A. Greenberg and M. J. Tisdale (2004). Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice. *Br J Cancer* 91(2): 408-412.

Sohal, P. S., V. E. Baracos and M. T. Clandinin (1992). Dietary omega 3 fatty acid alters prostaglandin synthesis, glucose transport and protein turnover in skeletal muscle of healthy and diabetic rats. *Biochem J* 286 (Pt 2): 405-411.

Song, J., Z. Li, X. Tong, C. Chen, M. Chen, G. Meng, P. Chen, C. Li, Y. Xin, T. Gai, F. Dai and C. Lu (2015). Genome-wide identification and characterization of Fox genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Funct Integr Genomics* 15(5): 511-522.

Spaulding, H. R., T. Quindry, J. C. Quindry and J. T. Selsby (2020). Nutraceutical

and pharmaceutical cocktails did not preserve diaphragm muscle function or reduce muscle damage in D2-mdx mice. *Exp Physiol* 105(6): 989-999.

Stedman, H. H., H. L. Sweeney, J. B. Shrager, H. C. Maguire, R. A. Panettieri, B. Petrof, M. Narusawa, J. M. Leferovich, J. T. Sladky and A. M. Kelly (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352(6335): 536-539.

Stitt, T. N., D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14(3): 395-403.

Sun, D., A. Krishnan, K. Zaman, R. Lawrence, A. Bhattacharya and G. Fernandes (2003). Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 18(7): 1206-1216.

Supinski, G. S. and L. A. Callahan (2013). Diaphragm weakness in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care* 17(3): R120.

Supinski, G. S., J. Vanags and L. A. Callahan (2010). Eicosapentaenoic acid preserves diaphragm force generation following endotoxin administration. *Crit Care* 14(2): R35.

Surette, M. E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids. *CMAJ* 178(2): 177-180.

Tanner, R. E., L. B. Bruner, J. Agergaard, K. M. Barrows, R. A. Briggs, O. S. Kwon, L. M. Young, P. N. Hopkins, E. Volpi, R. L. Marcus, P. C. LaStayo and M. J. Drummond (2015). Age-related differences in lean mass, protein synthesis and skeletal muscle markers of proteolysis after bed rest and exercise rehabilitation. *J Physiol* 593(18): 4259-4273.

Tarakci (2016). The sarcoglycan complex in skeletal muscle. *Frontiers in Bioscience*.

Tisdale, M. J. (2006). Clinical anticachexia treatments. *Nutr Clin Pract* 21(2): 168-174.

Tisdale, M. J. (2007). Eicosapentaenoic acid containing nutritional supplements for the treatment of cancer cachexia. *Clin Nutr* 26(1): 161-162; author reply 163.

Totland, G. K., L. Madsen, B. Klementsén, H. Vaagenes, H. Kryvi, L. Froyland, S. Hexeberg and R. K. Berge (2000). Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. *Biol Cell* 92(5): 317-329.

U.S., D.o. H.H.S.-N. (2019). "Omega-3 Fatty Acids." from <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-HealthProfessional/#change>.

Urmey, W. F., A. De Troyer, K. B. Kelly and S. H. Loring (1988). Pleural pressure increases during inspiration in the zone of apposition of diaphragm to rib cage.

J Appl Physiol (1985) 65(5): 2207-2212.

Van Der Heide, L. P., M. F. Hoekman and M. P. Smidt (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380(Pt 2): 297-309.

Vannice, G. and H. Rasmussen (2014). Position of the academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *J Acad Nutr Diet* 114(1): 136-153.

Veldsema-Currie, R. D., E. Wolters and R. S. Leeuwijn (1976). The effect of corticosteroids and hemicholinium-3 on choline uptake and incorporation into acetylcholine in rat diaphragm. *Eur J Pharmacol* 35(2): 399-402.

Verhees, K. J., A. M. Schols, M. C. Kelders, C. M. Op den Kamp, J. L. van der Velden and R. C. Langen (2011). Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(5): C995-C1007.

Verheul, A. J., C. B. Mantilla, W. Z. Zhan, M. Bernal, P. N. Dekhuijzen and G. C. Sieck (2004). Influence of corticosteroids on myonuclear domain size in the rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol* (1985) 97(5): 1715-1722.

Viires, N., D. Pavlovic, R. Pariente and M. Aubier (1990). Effects of steroids on diaphragmatic function in rats. *Am Rev Respir Dis* 142(1): 34-38.

Vilchez, D., I. Saez and A. Dillin (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* 5: 5659.

Vivan, L., C. Girotto, M. Fracasso, A. N. Pitaluga, G. Wagner and F. G. Battiston (2017). Influence of the fish oil in the gut microbiota of wistar rats (*Rattus norvegicus*) treated with dexamethasone and amoxicillin. *Microb Pathog* 113: 45-50.

Voisin, L., D. Breuille, L. Combaret, C. Pouyet, D. Taillandier, E. Aurousseau, C. Obled and D. Attaix (1996). Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* 97(7): 1610-1617.

Voit, T., H. Topaloglu, V. Straub, F. Muntoni, N. Deconinck, G. Campion, S. J. De Kimpe, M. Eagle, M. Guglieri, S. Hood, L. Liefwaard, A. Lourbakos, A. Morgan, J. Nakielnny, N. Quarcoo, V. Ricotti, K. Rolfe, L. Servais, C. Wardell, R. Wilson, P. Wright and J. E. Kraus (2014). Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol* 13(10): 987-996.

Waddell, D. S., L. M. Baehr, J. van den Brandt, S. A. Johnsen, H. M. Reichardt, J. D. Furlow and S. C. Bodine (2008). The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4): E785-797.

Wang, H., N. Kubica, L. W. Ellisen, L. S. Jefferson and S. R. Kimball (2006). Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem* 281(51): 39128-39134.

Whitehouse, A. S. and M. J. Tisdale (2001). Downregulation of ubiquitin-dependent proteolysis by eicosapentaenoic acid in acute starvation. *Biochem Biophys Res Commun* 285(3): 598-602.

Wilcox, P. G., J. M. Hards, K. Bockhold, B. Bressler and R. L. Pardy (1989). Pathologic changes and contractile properties of the diaphragm in corticosteroid myopathy in hamsters: comparison to peripheral muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1(3): 191-199.

Winbanks, C. E., K. L. Weeks, R. E. Thomson, P. V. Sepulveda, C. Beyer, H. Qian, J. L. Chen, J. M. Allen, G. I. Lancaster, M. A. Febbraio, C. A. Harrison, J. R. McMullen, J. S. Chamberlain and P. Gregorevic (2012). Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J Cell Biol* 197(7): 997-1008.

Wool, I. G. (1960). Accumulation of substrate by isolated rat diaphragm: a possible mechanism for the anti-inflammatory action of corticosteroids. *Nature* 186: 728.

Wu, Y., W. Zhao, J. Zhao, Y. Zhang, W. Qin, J. Pan, W. A. Bauman, R. D. Blitzer and C. Cardozo (2010). REDD1 is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss. *Endocrinology* 151(3): 1050-1059.

Wyke, S. M., S. T. Russell and M. J. Tisdale (2004). Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* 91(9): 1742-1750.

Yimlamai, T., S. L. Dodd, S. E. Borst and S. Park (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol* (1985) 99(1): 71-80.

Yoshino, J., G. I. Smith, S. C. Kelly, S. Julliard, D. N. Reeds and B. Mittendorfer (2016). Effect of dietary n-3 PUFA supplementation on the muscle transcriptome in older adults. *Physiol Rep* 4(11).

Yoshizawa, F., T. Kido and T. Nagasawa (1999). Stimulative effect of dietary protein on the phosphorylation of p70 S6 kinase in the skeletal muscle and liver of food-deprived rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(10): 1803-1805.

Youdim, K. A., A. Martin and J. A. Joseph (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 18(4-5): 383-399.

Yu, J. K., F. Mazet, Y. T. Chen, S. W. Huang, K. C. Jung and S. M. Shimeld (2008). The Fox genes of *Branchiostoma floridae*. *Dev Genes Evol* 218(11-12): 629-638.

Zhang, Y., B. Gan, D. Liu and J. H. Paik (2011). FoxO family members in cancer. *Cancer Biol Ther* 12(4): 253-259.

Zhao, W., J. Pan, Z. Zhao, Y. Wu, W. A. Bauman and C. P. Cardozo (2008). Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110(1-2): 125-129.

1) ANEXO

8.1. Quantificação de ácidos graxos – cápsula

LAUDO DE ANÁLISES

GLOBAL NUTRITION SUPRA OMEGA 50EPA/10DHA 1000MG 90

Cliente - ALAN FAPPI
 Quantidade - 1,000 UN
 Data de Fabricação - 27/09/2013
 Data de Validade - 27/09/2015

Nota Fiscal - 006175 21/01/2015

Lote do Fornecedor - 001567
 Procedência - BRASIL

Nome Químico/ou Botânico - NA
 Peso Molecular - NA
 DCB - NA

Fórmula Molecular - NA
 CAS - NA

ARMAZENAR EM LOCAL SECO, AREJADO E PROTEGIDO DA LUZ DIRETA
 EM TEMPERATURA DE 15 A 30°C E UMIDADE RELATIVA ENTRE 40 A 75%.

Análise / Ensaios	Especificações	Resultados das Análises
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		
DESCRIÇÃO DA CÁPSULA	CÁPSULA MOLE DE GELATINA, MOLDE	CONFORME
	OBLONG Nº16, INCOLOR, BRILHOSA	
	SELAGEM E DUREZA	
DESCRIÇÃO DO CONTEÚDO	LÍQUIDO OLEOSO, AMARELO, ODOR	CONFORME
	CARACTERÍSTICO, LÍMPIDO	
PESO MÉDIO BRUTO	INFORMATIVO	1381,30 MG/CAPS
PESO MÉDIO DO CONTEÚDO	925,00 A 1075,00 MG/CAPS	978,60 MG/CAPS
DESINTEGRAÇÃO	MÁXIMO 30 MINUTOS	8,0 MINUTOS
ÁCIDOS GRAXOS		
ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO C20:5 EPA	> OU = 50 %	50,60 %
ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO C20:6 DHA	> OU = 10 %	13,30 %
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS		
COLIFORMES A 45°C	MÁXIMO 5,0	< 0,3
MERCÚRIO	< 0,01 MG/KG	NÃO DETECTADO
*INFORMAÇÕES DE ACORDO COM LAUDO DO FABRICANTE		

Especificações e resultados

ESPECIFICAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE ACORDO COM DESENVOLVIMENTO LOCAL E LAUDO DO FORNECEDOR.

ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE ACORDO COM RDC Nº 12 DE 02/01/01.

MGA FÍSICO - QUÍMICAS DE ACORDO COM A FB 5ª EDIÇÃO

MGA MICROBIOLÓGICAS DE ACORDO COM MAPA - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº62

CONCLUSÃO(X) APROVADO

Informação Técnica - Dentro dos itens pesquisados, o lote cumpre com as especificações.

 David Leandro S. da Silva
 Responsável Técnico
 CRF-GO: 30843

 Valéria Chagas Faria
 Coordenadora Controle da Qualidade

Documento assinado eletronicamente.

SOFTECH BRASIL S/A

VIELA VI L1 QD. MODULO 01-DAIA-ANAPOLIS - GO - 75132013 - Fone (62) 3937-8600 - Fax