



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

HELOINA NATHALLIÊ MARIANO DA SILVA

**“ASPECTOS MULTIFATORIAIS DA DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE: ESTUDO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DA
TERAPIA ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

**“MULTIFACTORIAL ASPECTS OF DUCHENNE MUSCULAR
DYSTROPHY: STUDY OF PHOTOBIMODULATION AND
ANTIOXIDANT THERAPY *IN VITRO* AND *IN VIVO*”**

Campinas, 2024

HELOINA NATHALLIÊ MARIANO DA SILVA

**“ASPECTOS MULTIFATORIAIS DA DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE: ESTUDO DA FOTOBIOMODULAÇÃO E DA TERAPIA
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

**“MULTIFACTORIAL ASPECTS OF DUCHENNE MUSCULAR
DYSTROPHY: STUDY OF PHOTOBIMODULATION AND
ANTIOXIDANT THERAPY *IN VITRO* AND *IN VIVO*”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Molecular e Morfofuncional, na área de Biologia Tecidual.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of PhD in Molecular and Morphofunctional Biology, in the field of Tissue Biology.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA HELOINA
NATHALLIÊ MARIANO DA SILVA E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ELAINE MINATEL.

Campinas 2024

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

Si38a Silva, Heloína Nathalliê Mariano, 1994-
Aspectos multifatoriais da distrofia muscular de Duchenne : estudo da fotobiomodulação e da terapia antioxidante *in vitro* e *in vivo* / Heloína Nathalliê Mariano da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Elaine Minatel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Diodos emissores de luz. 2. Antioxidantes. 3. Camundongos endogâmicos mdx. 4. Distrofia muscular de Duchenne. I. Minatel, Elaine, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Multifactorial aspects os Duchenne muscular dystrophy : study of photobiomodulation and antioxidant therapy *in vitro* and *in vivo*

Palavras-chave em inglês:

Light-emitting diodes

Antioxidants

Mice, inbred mdx

Muscular dystrophy, Duchenne

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Doutora em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Elaine Minatel [Orientador]

Luciana Politti Cartarozzi

Elen Haruka Miyabara

Robson Francisco Carvalho

Adriana Fogagnolo Mauricio

Data de defesa: 22-03-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8242-0815>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9801805662915211>

Campinas, 22 de março de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Elaine Minatel (Orientadora)

Profa. Dra. Luciana Polliti Cartarozzi

Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Profa. Dra. Adriana Fogagnolo Mauricio

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional da Unidade Instituto de Biologia.

Dedico

*Aos pacientes com DMD e aos pais que
anseiam por mais qualidade de vida aos seus
filhos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pelo dom da vida e por permitir que eu esteja concluindo um dos sonhos da minha vida, que era realizar o doutorado. Também o agradeço por me dar toda força e coragem de que tanto necessito.

Agradeço, aos meus pais **Marli Veiga** e **Claudiney Mariano**, por terem me incentivado a estudar desde quando eu era criança, tendo toda paciência necessária para ensinar-me a ler, a escrever e a fazer contas, do jeito simples deles, mas com todo o amor e carinho. Agradeço-os por estarem também comigo nessa etapa tão importante para mim, fazendo-me acreditar em mim mesma quando nem eu mesma acreditava, mostrando-me o quanto eu posso ser capaz.

Agradeço aos meus irmãos: **Eduarda Nathalliê Mariano**, **Vitor Emanuel Mariano** e **Vinicius Veiga Mariano** por sempre me apoiarem e me transmitirem alegria mesmo eu estando distante deles.

Agradeço aos meus avós maternos e paternos: **Terezinha e Aparecido Veiga** e **Orzélia e Joaquim Mariano** por serem meu exemplo de vida e fortaleza e por todas as orações.

Agradeço ao meu esposo **Carlos Eduardo Andrade**, que trouxe paz, tranquilidade e boas energias aos meus dias, que sempre me incentivou e me apoiou em tudo.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Plasticidade Muscular: **Daniela Mizobuti**, **Caroline Covatti**, **Guilherme Rocha**, **Valéria Andrade**, **Evelynn Mendes**, **Camila Hayashi** e **Mauro Donisete**, que se tornaram para mim mais que colegas, que sempre foram meus companheiros e amigos para todas as horas.

Agradeço, de coração, à professora orientadora **Dra. Elaine Minatel**, por ter me dado a oportunidade de fazer pesquisa junto à ela, a qual teve uma grandiosa colaboração em minha vida acadêmica e pessoal, apoiando-me, incentivando, tendo toda paciência comigo e, além de tudo, por ser uma grande amiga para mim.

Agradeço aos professores **Dra. Elen Haruka Miyabara**, **Dr. Robson Francisco Carvalho**, **Dra. Luciana Polliti Cartarozzi** e **Dra. Adriana Fogagnolo Mauricio** por terem aceitado o meu convite para participarem da minha banca e pelas contribuições dadas a esse trabalho.

Agradeço a todos os professores que tive no **IFSULDEMINAS** – Campus Inconfidentes, que contribuíram para a minha formação tanto acadêmica como pessoal. Hoje sou o que sou porque tive grandes inspirações!

Agradeço à Profa. **Carla Beatriz Collares Buzato** e ao **Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni** por me permitirem participar do Programa de Estágio Docente, que foi crucial para para minha formação docente.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Anatomia, a **Sra. Tanacy de Nazaré, Sr. Walter Ferreira, Sr. Roberto e Sr. Paulo** pelo auxílio técnico e principalmente pela amizade.

Agradeço aos amigos do Laboratório de **Biologia da Reprodução, Lab. Regeneração Nervosa e Lab. de Biologia Fisiologia Vegetal** pela amizade e companheirismo.

Agradeço à **Unicamp** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional** por todo apoio estrutural e administrativo ao longo do meu doutorado.

Agradeço à Fundação de Desenvolvimento da Unicamp (**FUNCAMP**) pelo auxílio financeiro concedido durante o Programa de Estágio Docente (PED).

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro indispensável concedido pelo processo nº 2020/09733-4, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (**CNPq**) – concedido pelo processo nº 140845/2020-8 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) pelo apoio à pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de financiamento 001. Meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para a realização deste trabalho!

“Tudo posso naquele que me fortalece...”

Filipenses 4:13.

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética neuromuscular e progressiva, que acomete 1,3 para cada 10.000 meninos nascidos vivos. Distúrbios na biogênese e bioenergética mitocondrial, combinados com estresse oxidativo, influxo exacerbado de íons cálcio, processo inflamatório e alterações na via da autofagia, desempenham papéis fundamentais no comprometimento das fibras musculares de pacientes com DMD. Tanto a fotobiomodulação por diodo emissor de luz (LED), quanto o tratamento com o antioxidante Idebenona são conhecidos por estimular o transporte de elétrons mitocondriais, além de exercerem atividade sobre inflamação, estresse oxidativo e canais de cálcio. Diante do exposto, levantamos a hipótese que o tratamento em combinação das terapias de fotobiomodulação e antioxidante podem apresentar potencial efeito benéfico sobre o fenótipo da fibra muscular distrófica. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar “*in vitro*” e “*in vivo*” os efeitos da terapia combinada de Idebenona e LED sobre as fibras musculares distróficas de camundongos *mdx*, modelo experimental da DMD. No estudo “*in vitro*” foi analisada a combinação da LEDterapia (LEDT) no comprimento de onda de 850 nm e da Idebenona na dose de 0,06μM sobre as culturas primárias de células musculares de camundongos *mdx*. Após 24 e 48 horas do tratamento, foram analisados a citotoxicidade celular; quantificação de íons de cálcio; análise do estresse oxidativo; quantificação de proteínas associadas às vias mitocondriais, transporte e tamponamento de cálcio e marcadores de autofagia por *Western Blotting* e reguladores de diferenciação celular por PCR real time. Para o estudo “*in vivo*” foram utilizados camundongos *mdx*, com 14 dias de vida pós-natal, submetidos à aplicação da luz LED no terço médio do músculo quadríceps femoral (3x/semana) e tratados com Idebenona (200mg/kg, diariamente) por um período de duas semanas. Após o tratamento, o músculo quadríceps femoral foi retirado e utilizado para análises morfológicas, bioquímicas e moleculares. O tratamento com Idebenona e LEDT tanto isolados quanto combinados, não demonstraram efeitos citotóxicos nas células musculares distróficas. Em relação às vias do cálcio, após o tratamento com Idebenona e LEDT, houve redução significativa do conteúdo de cálcio intracelular; calpaína 1, calsequestrina e sarcolipina. Além disso, foi observada uma redução significativa dos marcadores de estresse oxidativo (H₂O₂; 4-HNE; Lipofuscina e DHE). Em relação às vias de sinalização mitocondrial, foi observado um aumento significativo na capacidade oxidativa (pelos níveis de OCR e OXPHOS). Além disso, os níveis de PGC-1α, SIRT-1 e PPARδ foram significativamente maiores nas células musculares distróficas tratadas com Idebenona mais

LEDT. Os tratamentos também modularam a autofagia através da regulação de (SQSTM1, Beclin e Parkin) e as vias de sinalização (AMPK e TGF- β). Concomitantemente, os tratamentos melhoraram a capacidade regenerativa reduzindo a degeneração muscular; regulando positivamente os níveis de miogenina e MHC-slow; e diminuindo os níveis de MyoD e MHC-fast. Os resultados obtidos demonstraram que a Idebenona e LEDT apresentam efeitos benéficos sobre as fibras musculares distróficas. Esses achados ilustram a potencial eficácia do tratamento com Idebenona e LEDT como uma terapia adjuvante na recuperação muscular do paciente distrófico.

PALAVRAS-CHAVE: Diodos emissores de luz, antioxidantes, camundongos endogâmicos *mdx*, Distrofia Muscular de Duchenne.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive neuromuscular genetic disease that affects 1.3 for every 10,000 live births. Disturbances in mitochondrial biogenesis and bioenergetics, combined with oxidative stress, exacerbated influx of calcium, inflammatory process and changes in autophagy play key roles in the impairment of muscle fibers in patients with DMD. Light emitting diode therapy (LEDT) photobiomodulation and treatment with antioxidant Idebenone are known to stimulate mitochondrial electron transport, in addition to exerting activity on inflammation, oxidative stress and calcium channels. In this way, we hypothesize that the treatment of photobiomodulation in combination with antioxidants may have a potential beneficial effect on the dystrophic muscle fiber phenotype. Therefore, the present study aimed to analyze “*in vitro*” and “*in vivo*” effects of the combined therapy of Idebenone and LED on dystrophic muscle fibers of *mdx* mice, an experimental model of DMD. In the “*in vitro*” study, a combination of LED therapy (LEDT) at a wavelength of 850 nm and Idebenone at a dose of 0,06μM was conducted on primary cultures of muscle cells from *mdx* mice. After 24 and 48 hours of treatment, the following tests were performed: cell cytotoxicity assays; quantification of calcium ions; analysis of oxidative stress; quantification of proteins associated with mitochondrial pathways, calcium transport and buffering, autophagy markers by Western Blotting and cell differentiation controllers by real time qPCR. For the “*in vivo*” study, *mdx* mice were used with 14 days after birth, approved for the application of LEDT light in the middle third of the quadriceps muscle (3x/week) and treated with Idebenone (200mg/kg, daily) for a period of two weeks. After treatment, the quadriceps muscle was removed and used for morphological, biochemical, molecular and genetic analyses. Treatment with LEDT and Idebenone did not demonstrate cytotoxic effects on dystrophic muscle cells. Regarding calcium pathways, there was a significant reduction in intracellular calcium content; calpain 1, calsequestrin and sarcolipin after treatment with LEDT and Idebenone. In addition, a significant reduction in oxidative stress level markers such as H₂O₂ and 4-HNE levels was observed. Regarding mitochondrial signaling pathways, a significant increase in oxidative capacity (by OCR and OXPHOS levels) was observed. Furthermore, PGC-1α, SIRT-1 and PPARδ levels were significantly higher in dystrophic muscle cells treated with Idebenone plus LEDT. Treatment with Idebenone and LEDT also modulated autophagy by increasing autophagy markers (SQSTM1, Beclin and Parkin) and signaling pathways (AMPK and TGF-β). Concomitantly, the treatment combination improved regenerative capacity by reducing muscle degeneration; up-regulated myogenin and MHC-slow levels; and down-regulated MyoD and MHC-fast

levels. These results showed that Idebenone and LEDT have beneficial effects on dystrophic muscle fibers. These findings illustrate the potential efficacy of treatment with LEDT and Idebenone as an alternative therapy in muscle recovery in dystrophic patients.

KEYWORDS: Light-emitting diodes, antioxidants, mice inbred *mdx*, Muscular Dystrophy Duchenne.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado do complexo proteico associado à distrofina (CDG).	21
Figura 2: Representação esquemática das alterações fisiológicas na distrofia muscular de Duchenne...	24
Figura 3: Fotorreceptores endógenos de FBM.	30
Figura 4: Comparação estrutural de Idebenona com CoQ10	31
Figura 5: Representação esquemática da aplicação das terapias em placas de 96 poços	37
Figura 6: Aplicação da LEDT no músculo quadríceps femoral	45
Figura 7: Aparelho Gripstrentgh Newprimer® utilizado para medir força muscular.	46
Figura 8: Análise da proliferação celular utilizando o ensaio MTT.	50
Figura 9: Curvas de dose-resposta de IC50	51
Figura 10: Análise da viabilidade celular por meio do teste Vermelho Neutro	52
Figura 11: Análise do diâmetro das fibras musculares	53
Figura 12: Análise qualitativa e quantitativa das concentrações intracelulares de cálcio $[Ca^{2+}]_i$	54
Figura 13: Análise da concentração de $O_2^{\cdot -}$	56
Figura 14: Análise da concentração de H_2O_2	57
Figura 15: Análise do estresse oxidativo	58
Figura 16: Western Blotting das vias de sinalização de cálcio.....	60
Figura 17: Parâmetros mitocondriais	61
Figura 18: Western Blotting dos marcadores de autofagia – mitofagia	63
Figura 19: Western Blotting dos reguladores de autofagia	64
Figura 20: Expressão gênica dos reguladores de diferenciação celular	65
Figura 21: Fibras em degeneração com marcação positiva para IgG (seta branca).....	68
Figura 22: Coloração em HE, mostrando fibras com núcleo central (seta preta) e núcleo periférico (cabeça de seta).....	69
Figura 23: Coloração em TM, mostrando fibrose pela cor verde-luz	70
Figura 24: Western Blotting dos reguladores de diferenciação miogênica	72
Figura 25: Coloração em HE, mostrando áreas de inflamação (área demarcada)	73
Figura 26: Western Blotting da via inflamatória	74

Figura 27: Western Blotting dos marcadores de autofagia – mitofagia.....75

Figura 28: Western Blotting dos dos reguladores das vias de sinalização da autofagia76

Figura 29: Western Blotting dos ativadores de biogênese mitocondrial.....77

Figura 30: Grânulos de Lipofuscina (seta branca).....78

Figura 31: Intensidade de DHE79

Figura 32: Western Blotting do marcador de estresse oxidativo.....80

Figura 33: Esquema dos efeitos do tratamento com Idebenona+LEDT82

Figura 34: Representação esquemática da autofagia após tratamentos com Idebenona+LEDT89

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Parâmetros ópticos da LEDT *in vitro*.38

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados no Western Blotting42

Tabela 3: Anticorpos secundários utilizados no Western Blotting 43

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para qRT-PCR.....43

Tabela 5: Parâmetros ópticos da LEDT *in vivo*45

Tabela 6: Efeito das terapias nos ensaios *in vitro*.....59

Tabela 7: Parâmetros funcionais.....66

Tabela 8: Quantificação dos níveis de CK67

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE - 4-Hidroxinoneal

AMPK - Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina 5'

ATP: Adenosina trifosfato;

BSA – albumina bovina sérica

Ca²⁺ – Íons cálcio

CI - Complexo I

CII - Complexo II

CIII – Complexo III

CIV - Complexo IV

CV - Complexo V

C57BL/10 - Camundongo C57BL/10 –ScCr/PasUnib

CDG: complexo distrofina-glicoproteína

CEMIB - Centro Multidisciplinar para investigação Biológica

CK - Creatina quinase

CO₂ - Dióxido de Carbono

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

DCM - Cardiomiopatia dilatada

DHE - Reação Dihydroetídeo

DMD - Distrofia muscular de Duchenne

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EROs - Espécies reativas de oxigênio

HE - Hematoxilina-Eosina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IL-1β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IgG - Imunoglobulina G

mdx - Camundongo da linhagem C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib

MMP9: matrix metalloproteinase 9

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide

MyOD - Fator de diferenciação Miogênica

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NC - Núcleo central

NF-κB - Fator de transição nuclear – kappa B

NO - Óxido nítrico

O₂^{•-} - Ânion radical superóxido

OXPHOS - Fosforilação Oxidativa

PCR - reações em cadeia da polimerase

PBS - *Phosphate buffer saline* (tampão fosfato salina)

PGC1- α - Proliferadores de peroxissomas

PPARs - Receptores ativados por proliferador de peroxissoma gama

SERCA - sarco/cálcio endoplasmático ATPase

SIRT-1 – Sirtuína 1

TBS-T - *Tris-Buffered Saline*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β Fator de transformação do crescimento beta

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....20

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne20

1.2 Modelo experimental da DMD: camundongo *mdx*.....22

1.3 Fisiopatogênese.....23

1.4 Fotobiomodulação28

1.5 Idebenona31

2.0 OBJETIVOS34

2.1 Objetivo Geral.....34

2.1 Objetivos específicos.....34

3.0 MATERIAL E METÓDOS35

3.1 Animais35

3.2 Estudos “*in vitro*”35

3.2.1 Cultura primária35

3.2.2 Protocolo Experimental36

3.2.3 Análises de proliferação celular38

3.2.3 Análise de IC50.....39

3.2.4 Análises de viabilidade celular.....39

3.2.5 Detecção de H₂O₂39

3.2.6 Produção de superóxido mitocondrial40

3.2.7 Determinação de cálcio intracelular40

3.2.8 Consumo de oxigênio40

3.2.9 Western Blotting41

3.2.10 Expressão gênica (mRNA) em tempo real qPCR.....43

3.3 Estudos “*in vivo*”44

3.3.1 Protocolo Experimental44

3.3.2 Controle de massa corporal.....45

3.3.3 Peso relativo dos órgãos45

3.3.3 Medição de força muscular46

3.3.4 Dosagem sérica de Creatina-Quinase (CK)46

3.3.5 Dosagem Residual de Creatina-Quinase (CK).....47

3.3.6 Análise Histomorfológica47

3.3.7 *Western Blotting*.....49

3.4 Análise Estatística49

4.0 RESULTADOS50

4.1 Avaliação das terapias “<i>In vitro</i>”	50
4.1.1 Análise da proliferação e viabilidade celular	50
4.1.2 Análise da morfologia e diâmetro das células musculares	53
4.1.3 Análise da concentração de cálcio intracelular	54
4.1.4 Análise do estresse oxidativo	55
4.1.5 Análise para a escolha da dose e período	58
4.1.6 Análise das vias de sinalização de cálcio.....	59
4.1.7 Análise dos parâmetros mitocondriais	60
4.1.8 Análise dos marcadores de autofagia – mitofagia.....	62
4.1.9 Análise dos reguladores de autofagia	63
4.1.10 Análise dos reguladores de diferenciação celular	65
4.2 Avaliação das terapias “<i>In vivo</i>”	66
4.2.1 Análise dos parâmetros funcionais.....	66
4.2.2 Análise do processo de degeneração/regeneração muscular.....	67
4.2.3 Análise do processo de fibrose	70
4.2.4 Análise dos reguladores de diferenciação miogênica.....	71
4.2.5 Análise do processo inflamatório	72
4.2.6 Análise marcadores de autofagia – mitofagia	74
4.2.7 Análise dos reguladores das vias de sinalização da autofagia	75
4.2.8 Análise dos ativadores da biogênese mitocondrial.....	76
4.2.9 Análise do estresse oxidativo.....	77
5.0 DISCUSSÃO	81
5.1 Efeitos colaterais dos tratamentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	82
5.2 Efeito dos tratamentos sobre a análise funcional	84
5.3 Efeito dos tratamentos no processo de degeneração/regeneração muscular	84
5.4 Efeito das terapias no processo de inflamação	86
5.5 Efeito dos tratamentos no processo de autofagia	87
5.6 Efeito das terapias nas vias de regulação do cálcio	89
5.7 Efeito das terapias nas vias de regulação mitocondrial e estresse oxidativo.....	90
6.0 CONCLUSÃO	92
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8.0 ANEXOS	115

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética neuromuscular, recessiva ligada ao cromossomo X, com prevalência estimada entre 1,3 para cada 10.000 nascidos vivos do sexo masculino (RYDER et al., 2017; ROMITTI et al., 2015; MOAT et al., 2013), caracterizada por alterações musculares que apresentam graus variáveis de atrofia, hipertrofia, mionecrose, regeneração e fibrose endomisial (MAH et al., 2016; BLAKE et al., 2002).

A DMD é causada por mutações no gene da distrofina, que é o gene mais longo no DNA humano, constituído de 79 exons, responsável por codificar a proteína distrofina de 427 kDa (TENNYSON et al., 1995; AHN et al., 1993). No músculo esquelético e cardíaco, a distrofina fornece um importante papel estrutural, por ser um dos componentes do complexo distrofina-glicoproteína (CDG), que ancora o citoesqueleto celular a matriz extracelular, o que dá estabilidade mecânica para os movimentos de contração e relaxamento dos miócitos (Fig. 1). (SCIANDRA et al., 2003; BROWN et al., 1999). A ocorrência de deleções ou mutações pontuais resulta na perda da expressão ou mal funcionamento da proteína distrofina, o que acarreta a instabilidade no CDG pela perda da conexão entre o citoesqueleto com a matriz extracelular, desestabilizando o sarcolema durante o movimento de contração muscular (BOGDANOVICH et al., 2004; BIGGAR et al., 2002). Desta forma, ocorrem rupturas no sarcolema durante as tensões de cisalhamento mecânico, permitindo assim, o influxo exacerbado de íons de cálcio para o meio intracelular, ativação de proteases endógenas extravasamento da enzima creatina-quinase (CK) e necrose da fibra muscular (BOGDANOVICH et al., 2004; BIGGAR et al., 2002).

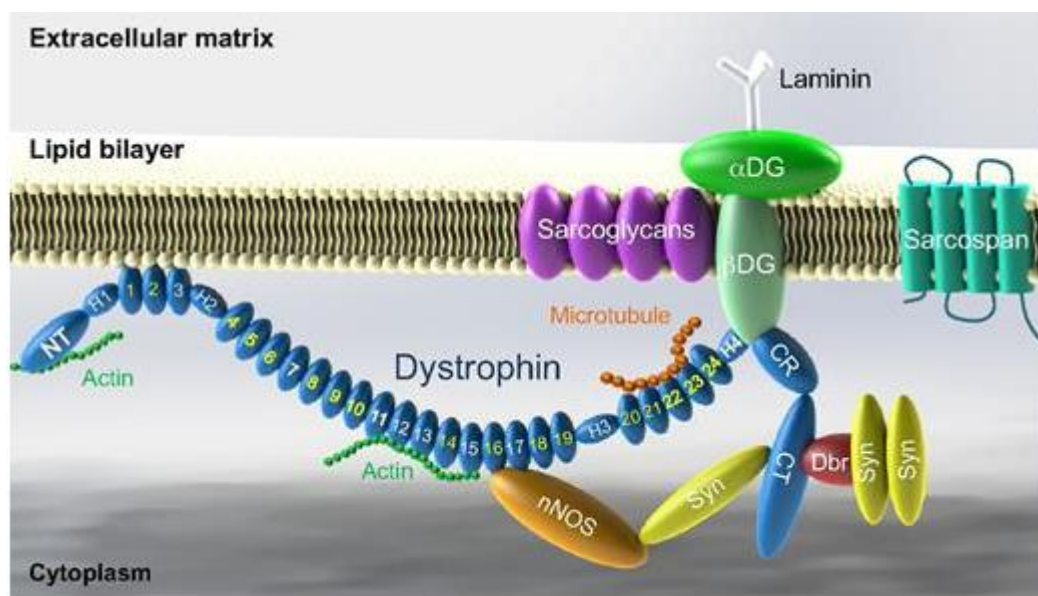


Figura 1: Esquema simplificado do complexo proteico associado à distrofina (CDG). Fonte: Adaptado de MCGREEVY et al., 2015.

Os sinais clínicos iniciam-se geralmente em torno de 2 a 3 anos de idade, quando os músculos das extremidades inferiores começam a enfraquecer, sendo observado que a criança apresenta dificuldades ao tentar subir e descer escadas, quedas frequentes, caminhadas sobre as pontas do pés e sinal de Gower's (quando a criança escala o próprio corpo para manter-se na posição bípede) (BIRNKRANT et al., 2018). Progressivamente, os músculos distais e os membros superiores vão enfraquecendo e com a idade os sintomas tornam-se mais proeminentes. No início da adolescência, os pacientes geralmente são dependentes de cadeira de rodas (RYDER et al., 2017). Com a evolução da doença, os pacientes distróficos apresentam cardiomiopatia dilatada (DCM), arritmias e fibrose extensa, levando-os a óbito por volta da segunda década de vida, devido a problemas cardiorrespiratórios (BIRNKRANT et al., 2018; MCNALLY et al., 2015).

O tratamento para a DMD é baseado em três estratégias terapêuticas principais: terapias gênicas, terapias celulares (transplantes de mioblastos e células-tronco) e farmacológicas. A primeira abordagem é vantajosa, por atuar na tentativa de corrigir a falta da distrofina, especialmente quando iniciadas precocemente, baseando-se em tecnologias de restauração do códon de parada prematura e na tecnologia *Exon Skipping* (McDONALD et al., 2018; SIDDIQUI & SONENBERG, 2016). Porém ela acaba enfrentando diversas dificuldades biológicas e técnicas que incluem, por exemplo, a falta de especificidade na transferência dos genes. Além disso, por ser destinada a mutações específicas, seu custo é elevado e não atende toda a comunidade.

A terapia celular consiste no transplante de mioblastos e células troncos na tentativa de

repor as fibras musculares degeneradas; no entanto, ela apresenta também algumas dificuldades com relação a pouca dispersão das células injetadas, rejeição imunológica e a escolha da linhagem celular (ICHIM et al., 2010).

A abordagem farmacológica, por sua vez, é paliativa e inclui a administração de glicocorticóides. No entanto, o uso prolongado desses medicamentos pode produzir diversos efeitos colaterais, como: redução da captação e utilização da glicose, aumento da gliconeogênese, ganho de peso, retardo de crescimento, glaucoma, mudanças comportamentais, puberdade tardia e desmineralização óssea (ANDREWS et al., 2018; BUSHBY et al., 2010; BALABAN et al., 2005). Desta maneira, novos estudos envolvendo a terapia farmacológica são fundamentais, no sentido de prolongar a mobilidade e melhorar a qualidade de vida do paciente distrófico com menos efeitos colaterais possíveis.

1.2 Modelo experimental da DMD: camundongo *mdx*

Para elucidar a patogênese da DMD e avaliar a eficácia de novas terapias, são realizados estudos pré-clínicos que utilizam de modelos animais com alterações genéticas homólogas ao gene defeituoso da DMD, tais como: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Sapje zebrafish*, diferentes raças de cães e gatos, suínos e camundongos. Cada modelo apresenta suas vantagens e desvantagens, dependendo do que se pretende avaliar (ZAYNITDINOVA et al., 2021).

O modelo tradicional para pesquisas relacionadas a DMD é o camundongo da linhagem C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib (*X chromosome-linked muscular dystrophy*), que surgiu através de uma mutação espontânea da colônia de camundongos C57BL/10ScSn/PasUnib, no exon 23, que resultou na ausência da proteína distrofina (MCGREEVY et al., 2015; DE LUCA et al., 2012). Foi observado que esses animais apresentam elevados níveis de CK, que é uma enzima parâmetro de lesão muscular quando alterada (BULFIELD et al., 1984) e intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose (MCGREEVY et al., 2015).

Embora os camundongos *mdx* e os pacientes distróficos apresentem genes homólogos, a evolução da doença é diferente entre eles. Os camundongos *mdx* apresentam um fenótipo mais brando quando comparado a humanos, devido ao aumento da expressão da utrofina, que é semelhante em estrutura e função à distrofina, e elevada capacidade de proliferação das células satélites para o reparo de fibras danificadas (MCGREEVY et al., 2015).

Neste modelo, os músculos apresentam diferenças na intensidade da distrofinopatia. Entre o 14º e 21º dia de vida pós-natal, a porcentagem de fibras degeneradas é muito baixa,

sendo este período caracterizado como estado pré-necrótico (MINATEL et al., 2003; PORTER et al., 2003). Por volta do 21º e 28º dias de vida pós-natal, observa-se extensa área de necrose, principalmente nos músculos dos membros, considerado este o período necrótico. Essa fase é excelente para estudos de tratamentos que tem como objetivo prevenir ou reduzir a mionecrose (RADLEY & GROUNDS, 2006). Entre o 35º e 90º dias a necrose atinge seu ápice, com um número elevado de fibras com núcleos centrais (indicativo de degeneração), considerado então período pós-necrótico (STEDMAN et al., 1991).

Embora os camundongos *mdx* apresentem diferenças no quadro clínico e na fisiopatologia quando comparados com pacientes distróficos, eles são considerados um excelente modelo pré-clínico, sendo amplamente utilizado em pesquisas científicas para compreensão dos mecanismos envolvidos na distrofia muscular, além da maior disponibilidade e baixo custo, favorecendo no desenvolvimento de novas terapias adjuvantes na DMD (GROUND, 2008).

1.3 Fisiopatogênese

Como nosso estudo aborda sobre a ação terapêutica nos mecanismos secundários da DMD, nesse tópico serão elucidados a correlação dessas alterações com a progressão da doença.

Várias hipóteses tentam explicar os mecanismos que levam a degeneração muscular progressiva em pacientes distróficos; dentre elas podemos destacar: (1) instabilidade mecânica; (2) alterações nos canais de cálcio; (3) aumento das espécies reativas de oxigênio; (4) processo inflamatório exacerbado; (5) disfunção mitocondrial; (6) desregulação da autofagia, como demonstrado na Fig. 2.

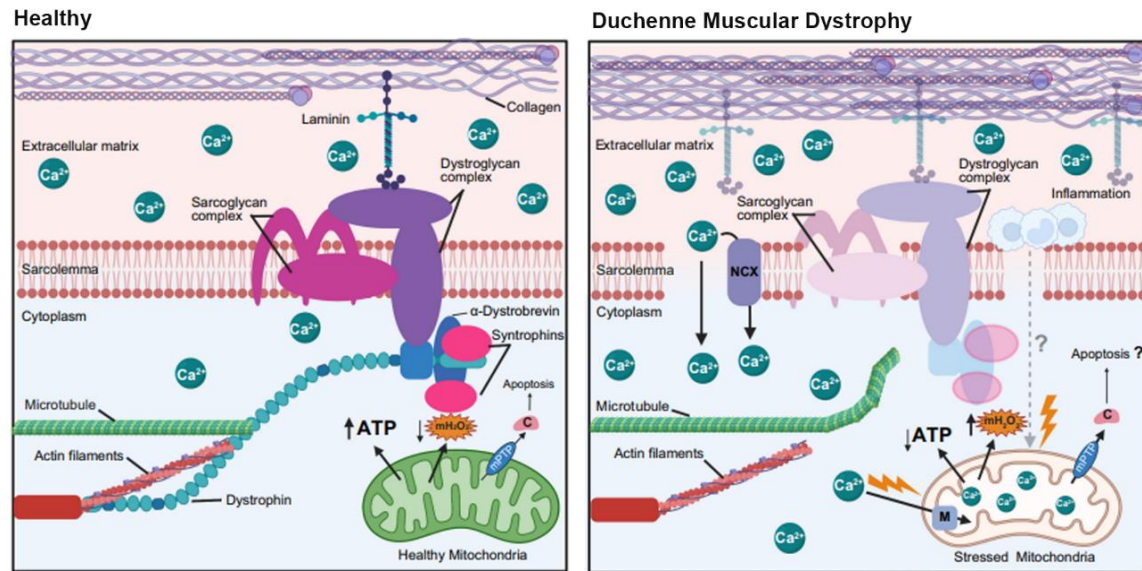


Figura 2: Representação esquemática das alterações fisiológicas na distrofia muscular de Duchenne. No músculo saudável, a distrofina fornece suporte estrutural para o sarcolema, impedindo que o excesso de cálcio extracelular entre no citosol e nas mitocôndrias e também fornece um ponto de ancoragem para microtúbulos e citoesqueleto de actina. Na DMD, as mutações da distrofina desestabilizam o sarcolema levando a lesões durante as contrações e consequente alterações nas vias de sinalização. Fonte: Adaptado de BELLISSIMO et al., 2022.

Considerando que a distrofina tem um importante papel estrutural, a sua deficiência ou ausência torna o sarcolema instável, susceptível a lesão durante os ciclos de relaxamento e contração muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005). Em consequência, ocorrem rupturas no sarcolema que alteram o fluxo de substâncias do meio intracelular e extracelular; permitindo o extravasamento da CK e o influxo intensificado de íons de cálcio (ENGEL, 1994). Desta forma, a CK se torna um importante biomarcador de lesão muscular em ensaios pré-clínicos, tanto em camundongos *mdx* quanto em humanos (BURDI et al., 2009; DE LUCA et al., 2008).

O influxo exacerbado dos íons de cálcio na fibra muscular se dá tanto pela lesão do sarcolema, como mencionado, como pela alteração dos canais de cálcio que encontram-se comprometidos na DMD (BARONE et al., 2015). Além disso, a atividade da Sarco/retículo endoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA) encontra-se alterada nas células distróficas, o que compromete a remoção do Ca^{2+} citosólico (TUPLING, 2009; PERIASAMY & KALYANASUNDARAM, 2007). Desta forma, ocorrem sobrecargas das mitocôndrias com consequente aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução da síntese de adenosina trifosfato (ATP), ativação de proteases cálcio-dependentes, como por exemplo as calpaínas e ativação de fosfolipases A2, enzimas que digerem os fosfolípidos da membrana (WHITEHEAD et al., 2006; GISSEL 2005). Em conjunto, essas alterações levam a apoptose celular e a degeneração da fibra muscular (VANLANGENAKKER et al., 2008; GISSEL 2005).

Foram observados também em pacientes e modelos experimentais distróficos alterações bioquímicas que são características de lesão oxidativa (PETRILLO et al., 2017; RAGUSA et al., 1997), indicadas por aumento da excreção do 8-hidroxy 2'-deoxyguanosine, indicativo de lesão oxidativa no DNA (HAUSER et al., 1995); aumento da expressão de enzimas antioxidantes (MATSUMURA et al., 2013); alterações de carbonilas e lipídios, indicados pelo aumento de malondialdeído e isoprostanos (WILSON et al., 2017); carbonilação elevada de proteínas (TERRILL et al., 2016); e acúmulo de lipofuscina, indicando um ciclo de dano oxidativo na DMD (NAKAE et al., 2004).

Embora na DMD as enzimas antioxidantes estejam elevadas, o sistema antioxidante não consegue restabelecer o equilíbrio do organismo. Desta forma, pesquisas vêm investigando diferentes tratamentos utilizando antioxidantes na prevenção da doença, o que têm demonstrado resultados promissores para o tratamento da distrofia muscular, (SILVA et al., 2021; MIZOBUTI et al., 2019; MÂNCIO et al., 2017; NAKAE et al., 2012; WHITEHEAD et al., 2008).

Vale ressaltar que as espécies reativas de oxigênio, além de provocarem danos oxidativos também podem contribuir com o processo inflamatório distrófico e consequente perda muscular, por estarem relacionadas à ativação do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) (LANGEN et al., 2001), responsável por expressão de genes pró-inflamatórios e síntese de citocinas (ALICJA et al., 2021); além de aumentar também a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, o qual promove a degradação proteica e a fraqueza muscular (LJUBICIC et al., 2014).

Músculos distróficos de camundongos *mdx* apresentam elevado conteúdo de neutrófilos, provavelmente em decorrência de contínuas mionecroses (TERRILL et al., 2016); e um grande número de mastócitos (RADLEY & GROUNDS, 2006), que são responsáveis pela liberação de mediadores químicos (histamina e a citocina pró-inflamatória TNF), que são rapidamente liberados em resposta a lesão e promovem a necrose de fibras distróficas (TIDBALL et al., 2018).

O aumento dos níveis de TNF no músculo distrófico é de grande interesse, por estar relacionado com o processo de mionecrose. Estudos que utilizaram diferentes abordagens terapêuticas que demonstram a redução dos níveis de TNF, que consequentemente preveniram a mionecrose (SILVA et al., 2021; DE CARVALHO et al., 2018; HODGETTS et al., 2006).

Os macrófagos são outro tipo de células inflamatórias que desempenham papéis importantes nos estágios iniciais e posteriores da regeneração muscular (TIDBALL et al.,

2018). Eles são classificados como M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios). Os macrófagos M1, são essenciais para os eventos iniciais de fagocitose, remodelação da matriz extracelular (MEC) e miogênese, com a formação de miotubos; e macrófagos M2, são essenciais para a maturação das novas miofibras e para melhorar o processo regenerativo (TIDBALL et al., 2018). No entanto, essa distinção é complicada em músculos distróficos, nos quais há intensa mionecrose e regeneração, resultando em desequilíbrio nas populações de macrófagos e consequente degeneração (DADGAR et al., 2014).

Em conjunto com os mecanismos citados acima, a disfunção mitocondrial é outro fator responsável pela fraqueza muscular na DMD (BURELLE et al., 2010). São descritas importantes alterações metabólicas envolvidas no ciclo de Krebs de camundongos *mdx* e de pacientes distróficos, nos quais encontram-se reduzidos os níveis de citrato, cis aconitato, alfa-cetoglutarato, succinato e malato, observando uma consequente redução de ATP (LINDSAY et al., 2019), além de encontrar-se reduzido o número de mitocôndrias (TIMPANI et al., 2015).

Um dos mecanismos propostos para o colapso do metabolismo energético celular na DMD está relacionado com a via do cálcio que, em condições patológicas, leva a uma geração acelerada de EROs, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e sobrecarga mitocondrial (GAGLIANONE et al., 2019). Desta forma, as alterações mitocondriais acabam sendo importantes contribuintes para a lesão muscular na DMD e servem como potenciais alvos para novas intervenções terapêuticas (BURELLE et al., 2010).

Estudos anteriores mostraram que a superexpressão do co-ativador-1 α de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1- α) pode proteger os músculos *mdx*, estimulando a biogênese mitocondrial, melhorando a captação de Ca²⁺ e aumentando o processo de autofagia (GODIN et al., 2012; HANDSCHIN et al., 2007).

O PGC-1 α é um regulador da biogênese mitocondrial encontrado em vários tecidos, (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2006); sua ativação é regulada pelos proliferadores de peroxissomas (PPARs), proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina 5' (AMPK) e Sirtuína 1 (SIRT1) (CANTÓ & AUWERX, 2009), sendo responsável pela modulação de diferentes vias, incluindo íons cálcio, EROs e citocinas (FINCK et al., 2006; PUIGSERVER & SPIEGELMAN, 2003).

Foi demonstrado em estudos anteriores os efeitos benéficos da regulação positiva de PGC-1 α em camundongos *mdx*, indicando que o PGC-1 α está ligado à resposta anti-inflamatória e antioxidante (SUNTAR et al., 2020; KIM et al., 2011). Recentemente, nosso

grupo de pesquisa também relatou a correlação entre níveis elevados de PGC-1 α e a redução nos níveis de TNF e NF- κ B no músculo distrófico tratado com o antioxidante Tempol (SILVA et al., 2021). Além disso, os níveis elevados de PGC-1 α também foram associados à redução do estresse oxidativo, associados à melhora do fenótipo distrófico (SILVA et al., 2021).

O AMPK também tem um papel crucial na orquestra das vias de sinalização para a regulação das alterações mitocondriais, incluindo o processo de autofagia, que permite a renovação das mitocôndrias danificadas (XIA et al., 2021). Alguns estudos também sugerem que a via autofágica é insuficiente nos músculos distróficos e que a restauração dessa via recupera a função e diminui o dano muscular. (NG et al., 2023; LJUBICIC et al., 2013; PAULY et al., 2012).

A via autofágica compreende uma série de etapas sequenciais altamente organizadas, responsáveis pelo recrutamento e degradação de proteínas defeituosas e pela reciclagem dos produtos de decomposição, sendo essencial para os processos de geração/consumo de energia e renovação de macromoléculas nos músculos esqueléticos (XIA et al., 2021). A autofagia anormal nos músculos resulta em alterações celulares, como dano mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, prejuízo na renovação da proteína sarcomérica e morte celular, acarretando no desenvolvimento de vários tipos de doenças do músculo esquelético (BONALDO & SANDRI, 2013).

Em camundongos *mdx* foi relatado que a ativação da AMPK estimulou a autofagia, levando à eliminação de mitocôndrias danificadas e a melhora da função do músculo diafragma (PAULY et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a estimulação crônica da AMPK levou a alguns efeitos benéficos no músculo esquelético de modelos experimentais de DMD, incluindo a redução da fragilidade do músculo esquelético e a indução da miogênese (THOMSON, 2018; LJUBICIC & JASMIN, 2013).

A ativação da AMPK, induz a autofagia no músculo esquelético através de dois mecanismos: regulação negativa da rapamicina em mamíferos (mTOR) e ativação do ULK1 (Unc-51-Like Kinase 1, um mamífero ortólogo de Atg1) por fosforilação direta (WANG et al., 2020).

A regulação positiva da mTOR está relacionada a resposta aos fatores de crescimento, aminoácidos, ATP e estresse. Quando a mTORC1 é suprimida pela falta desses nutrientes ou pelo estresse, promove a autofagia, através da regulação negativa do complexo de iniciação macromolecular mediado pelo gene ATG13 (DE PALMA et al., 2014).

Vários estudos também demonstraram que a autofagia está sob a influência de múltiplos fatores de transcrição, como TGF- β e NF- κ B (XIA et al., 2021). O TGF- β tem um papel importante na regulação da massa muscular, proliferação e diferenciação de mioblastos; também foi relatado por ativar a autofagia (LEE et al., 2010; SCHABORT et al., 2009). Em relação ao NF- κ B, este fator pode tanto estimular quanto inibir a autofagia: por exemplo, a sinalização do NF- κ B pode ativar mTOR e promover a expressão de inibidores de autofagia como Bcl-2 (um membro da família Bcl-2 e um parceiro de ligação BECLIN1), ou estimular a autofagia, através da sinalização de citocinas pró-inflamatórias que ativarão os genes (BECLIN1, LC3B e ATG-5) responsáveis pelo processo autofágico (XIA et al., 2021).

Dentre as proteínas relacionadas com a autofagia em mamíferos, a LC 3, proteína homóloga ao ATG8, é um importante marcador de autofagia envolvido na formação de autofagossomos (KLIONSKY et al., 2016). A conjugação da LC 3 com outras proteínas ATG resulta na sua forma lipídica (LC 3-II), que está presente durante a fase ativa do processo autofágico (MIZUSHIMA et al., 2008).

Foi demonstrado que os níveis de LC 3 apresentaram-se diminuídos nos camundongos distróficos (DE PALMA et al., 2012). Esses achados fornecem a primeira evidência de que a via autofágica é essencial para a atividade normal e que alterações excessivas ou defeituosas no processo de autofagia levam a distrofias musculares. Isso sugere ainda que os ativadores da autofagia poderiam servir como alvos potenciais para o tratamento de distrofias musculares (GRUMATI et al., 2012, 2011).

1.4 Fotobiomodulação

A terapia por fotobiomodulação (FBM), consiste na aplicação de luz com a finalidade de promover a reparação tecidual, diminuir a inflamação e produzir analgesia, geralmente usando uma fonte de luz de baixa potência (laser ou LED) (DE FREITAS & HAMBLIM, 2016). O termo fotobiomodulação já teve mais de 60 outros nomes na literatura científica, como por exemplo; terapia de laser de baixa intensidade (MESTER et al., 2013). No entanto, atualmente foi sugerido o uso do termo FBM, por remeter a efeitos terapêuticos que podem, em algumas circunstâncias, ser devido a efeitos de inibição, bem como aos efeitos de estimulação (HEISKANEN & HAMBLIN, 2018).

O dispositivo laser revolucionou tremendamente o campo da medicina após sua criação por Theodore H. Maiman em 1960, que ampliou o espectro de modalidades terapêuticas (PATIL et al., 2008). Os tipos de laser comumente empregados na medicina são: Rubi (694 nm), Nd:YAG (1064 nm), Er:YAG (2940 nm), diodo (630–980 nm), argônio (350–

514 nm), CO₂ (10.600 nm) e corante bombeado (504–690 nm), dos quais emitem radiação do tipo colimada (ou seja, as ondas possuem a mesma direção e a luz é paralela e concentrada) e coerente (as ondas eletromagnéticas apresentam a mesma frequência e direção) (AZADGOLI & BAKER, 2016).

Mais tarde, em 1990, os diodos emissores de luz (LEDs) foram implementados. Os LEDs são fontes de radiação que emitem radiação monocromática, não colimadas ou coerentes e podem ser utilizados para fototerapia com comprimentos de ondas que variam de menos de 390 nm (ultravioleta) até 1200 nm (no espectro infravermelho) (SCHUBERT & KIM, 2005). Semelhante aos lasers de baixa potência, os LEDs também podem induzir efeitos de bioestimulação (EMELYANOV & KIRYANOVA, 2015).

Os efeitos biológicos induzidos pela radiação da FBM, são iniciados pela absorção de energia de fótons incidentes por cromóforos endógenos (também chamados de fotorreceptores), que mudam seu estado de energia de fundamental para excitado. Como os estados excitados são instáveis, ele decai de volta para o estado fundamental, transferindo o excesso de energia para outras moléculas, o que leva a um conjunto de processos biológicos, como aumento da transferência de elétrons na cadeia respiratória, oxidação de NADH, produção de radicais livres e alteração da força motriz protônica e aumento do potencial de membrana mitocondrial (DA SILVA et al., 2023).

O principal fotorreceptor para a luz visível e infravermelha (700–1100 nm) é a citocromo c oxidase (CCO) (complexo IV da cadeia respiratória nas mitocôndrias) (HAMBLIN, 2018). Ademais, são relatados também outros fotorreceptores encontrados em diferentes tecidos, tais como as flavinas e flavoproteínas, que podem absorver luzes verde-azuladas (400–550 nm); porfirinas, que absorvem luzes amarelo-vermelhas (560–700 nm); e opsinas, que absorvem luzes ultravioletas (380–560 nm) (CHEN et al., 2022; BUHR et al., 2019). A Fig. 3 mostra a absorção de radiação pelos fotorreceptores, por diferentes parâmetros de irradiação.

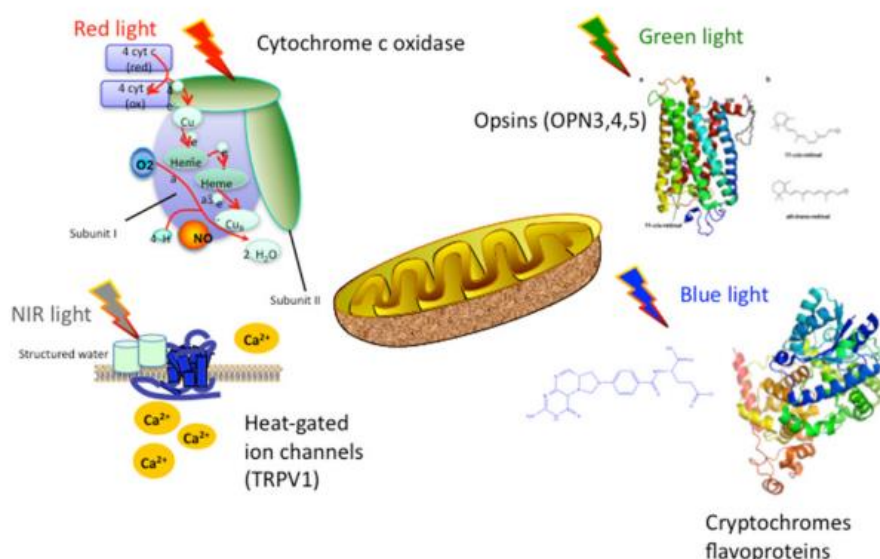


Figura 3: Fotorreceptores endógenos de FBM. Fonte: Adaptado de HAMBLIN, 2017.

As aplicações terapêuticas da FBM avançaram por conta da compreensão de seus mecanismos de ação a níveis molecular, celular e sistêmico (DA SILVA et al., 2023). A sua ação a nível molecular envolve a sinalização de moléculas efetoras e de transcrição. Tem sido sugerido que a absorção de energia luminosa pelo CCO causa a fotodissociação do óxido nítrico inibitório (NO) do CCO, e então leva ao aumento da atividade enzimática, transporte de elétrons, respiração mitocondrial e produção de ATP (JIANFEI & XIONG, 2017). Por outro lado, a fotossensibilização tem sido associada com a produção de EROs, os quais podem induzir eventos moleculares estimulando moléculas sinalizadoras e efetoras (segundos mensageiros) e ativação de fatores de transcrição (DE FREITAS & HAMBLIN, 2016). No entanto, foi observado que em células em estado de estresse, a FBM reduz os níveis de EROs e de Ca^{2+} após exposição a diferentes comprimentos de onda (420, 470, 660 e 850 nm) (DA ROCHA et al., 2022; HUANG et al., 2013). Além disso, foi observado que a FBM foi capaz de atuar em moléculas efetoras em certas vias de sinalização, como TGF- β e VEGF (SOUZA et al., 2018) e também na redução de NF κ B e TNF em diferentes modelos experimentais (HONG et al., 2022; ESTEVES et al., 2022).

Os efeitos celulares envolvidos na FBM ocorrem como consequência desses efeitos moleculares, que iniciarão uma cascata de sinalizações. São relatados efeitos celulares após exposição ao LED como: proliferação celular, viabilidade, diferenciação, apoptose, e migração (TAM et al., 2020). Como consequência, são observados efeitos sistêmicos tais como: modulação do processo inflamatório, promoção da reparação tecidual e cicatrização de feridas, redução do edema e da dor e melhora do desempenho muscular. Embora os mecanismos relacionados a alguns efeitos sistêmicos envolvidos na FBM ainda não estejam

compreendidos, esses efeitos foram demonstrados em modelos experimentais e estudos clínicos, e estão sendo considerados em protocolos terapêuticos baseados em radiação emitidos por lasers e LEDs de baixa potência para o tratamento de doenças e quadros clínicos (DA SILVA et al., 2023).

No modelo distrófico, nosso grupo de pesquisa demonstrou efeitos positivos utilizando diferentes doses de LEDT em cultura de células primárias de *mdx*, na redução do cálcio intracelular, processo inflamatório, angiogênese e marcadores mio gênicos (DA ROCHA et al., 2022). No entanto, há escassez de trabalhos utilizando-se da fotobiomodulação, principalmente através da LEDT, o que se faz necessário mais estudos para que se possa compreender os mecanismos de ação dessa terapia.

1.5 Idebenona

A segunda potencial intervenção de interesse é administração da Idebenona (2-(10-hydroxydecyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione), um composto bem conhecido, desenvolvido no início dos anos de 1980 pela indústria farmacêutica *Takeda Pharmaceuticals* para o tratamento da demência (GUEVEN et al., 2021). Análoga a coenzima Q-10 (CoQ10), ela foi desenvolvida com melhores características farmacológicas, o que permite maior solubilidade e biodisponibilidade, devido a uma cadeia lateral lipofílica significativamente mais curta e também por conter um grupo hidroxila terminal para aumentar a polaridade (Fig. 4).

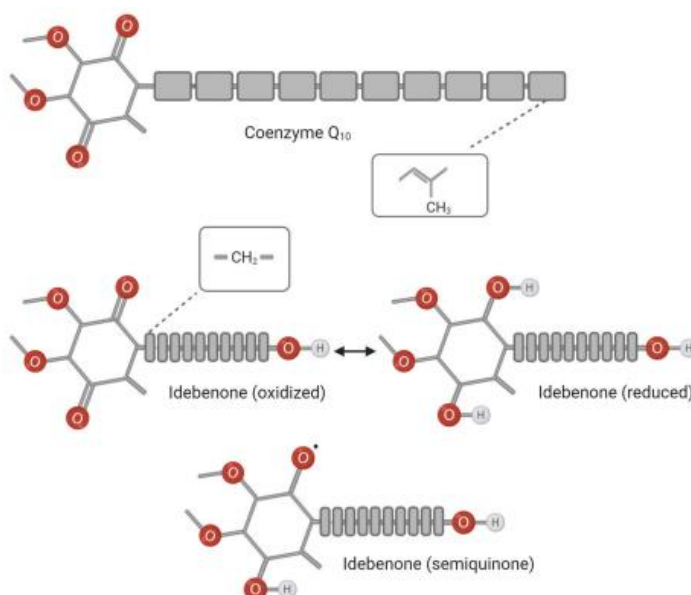


Figura 4: Comparação estrutural de Idebenona com CoQ10. Além da porção benzoquinona que é compartilhada por ambas as moléculas, elas se diferenciam pela quantidade de átomos de carbono. A Idebenona apresenta apenas 10 átomos de carbono em sua estrutura enquanto que a Ubiquinona apresenta 50 átomos. Fonte: Adaptado de GUEVEN et al., 2021.

A Idebenona é uma benzoquinona (Fig. 4) e, como todas as quinonas (incluindo CoQ10) pode receber e doar elétrons, o que lhe permite atuar como um antioxidante e transportador de elétrons em um contexto celular (GUEVEN et al., 2015). Em condições patológicas, é visto que a Idebenona também melhora a função mitocondrial. O mecanismo proposto para esse efeito é que a Idebenona é reduzida pelo Complexo I à 2H-Idebenona, que é capaz de retornar elétrons ao Complexo III, facilitando, assim, a geração de ATP (JABER & POLSTER, 2015). Por conta de seu mecanismo de ação, a Idebenona tem sido utilizada no tratamento de doenças neurodegenerativas de etiologia mitocondrial (MONTENEGRO et al., 2018).

Outros estudos também verificaram o efeito da Idebenona na redução do processo inflamatório em diferentes condições patológicas como: lúpus (BLANCO et al., 2020), neuroinflamação (PENG et al., 2020), colite ulcerativa (SHASTRI et al., 2020) sepse (HILL et al., 2009), nanotoxicidade (FADDA et al., 2018) e aterosclerose (JIANG et al., 2020). Este efeito não pode ser explicado apenas pela atividade antioxidante ou normalização do fornecimento de energia, mas também pela ação da Idebenona em prevenir a liberação de mtDNA e a subsequente ativação do inflamassoma LAMP3, interferindo nos primeiros estágios da cascata pró-inflamatória (PENG et al., 2020). É importante notar que a inflamação está tipicamente associada à hipóxia (MCGARRY et al., 2018) e tem um claro envolvimento mitocondrial, o que sugere que as condições podem ser clinicamente melhoradas com a Idebenona (AGUILAR-LOPEZ et al., 2020).

No tratamento das distrofias musculares, experimentos com a Idebenona em camundongos *mdx* demonstram que esta apresenta efeito cardioprotetor e melhora o desempenho físico (BUYSE et al., 2009). O primeiro relato clínico em pacientes com DMD apontou melhoras no músculo cardíaco e no quadro respiratório dos pacientes, após uso diário de Idebenona por 12 meses (BUYSE et al., 2011). Estudos de fase II e III, reportaram melhora na função respiratória de pacientes com DMD (BUYSE et al., 2013, 2015). No entanto, estes estudos não avaliaram profundamente o efeito da Idebenona no fenótipo do músculo esquelético de pacientes com DMD. Assim, é importante compreender os efeitos da Idebenona nas diferentes vias secundárias promotoras das características distróficas, o que contribuiria para melhor compreensão de sua ação na DMD.

Diante dos mecanismos de ação de ambas as terapias expostas, no presente projeto levantamos a hipótese de que o tratamento em conjunto das terapias LEDT e antioxidante, no estágio inicial da doença, pode apresentar potencial efeito terapêutico sobre as fibras musculares distróficas dos camundongos *mdx*.

É visto na literatura, em estudos recentes, que a combinação de terapias farmacológicas e fotobiomoduladoras potencializam seus efeitos. A associação de laser (810 nm, 200 mW e 6.66 W/cm^2 , $33,3 \text{ J/cm}^2$) com antioxidante coenzima Q10 apresentou melhora na disfunção mitocondrial em modelo animal de isquemia cerebral transitória global em ratos envelhecidos artificialmente (SALEHPOUR et al., 2019a). A fotobiomodulação (FBM) no infravermelho (laser de 810nm, $33,3 \text{ J/cm}^2$), combinada com a coenzima Q10, também reduziu o estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose em modelo animal de depressão (SALEHPOUR et al., 2019b). A combinação de CoQ10 com FBM mostrou efeito mais efetivo, do que cada terapia aplicada isoladamente, no alívio da dor neuropática em ratos adultos. Acredita-se que haja sinergismo celular e molecular no uso simultâneo de CoQ10 e FBM no alívio da dor (JAMEIE et al., 2014).

Com relação a DMD, até o presente momento não há na literatura estudos demonstrando os efeitos da combinação das terapias de FBM e antioxidante. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com LEDT (uma terapia não invasiva) e Idebenona (um potente antioxidante), aplicados isoladamente e em conjunto, em células musculares distróficas e no músculo quadríceps femoral, avaliando diferentes mecanismos de ação como: disfunções mitocondriais, processos de degeneração/regeneração muscular, estresse oxidativo, regulação dos canais de cálcio, autofagia e no processo inflamatório das fibras musculares distróficas.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos tanto *in vitro* quanto *in vivo* dos tratamentos com fotobiomodulação (LED) e antioxidante (Idebenona), administrados isoladamente ou em conjunto, sobre as fibras musculares distróficas de camundongos *mdx*.

2.2 Objetivos Específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos verificar o efeito do tratamento com LEDT e/ou Idebenona *in vitro* e *in vivo* sobre:

- Possíveis efeitos citotóxicos: Analisar os efeitos do tratamento com LEDT e/ou Idebenona na viabilidade e proliferação celular (*in vitro*) e no ganho de massa corporal ao longo do período de tratamento (*in vivo*).
- Processo de degeneração/regeneração muscular: Analisar os níveis protéicos e gênicos dos fatores regulatórios miogênicos (*in vitro* e *in vivo*); analisar a morfologia das fibras quanto ao seu diâmetro (*in vitro* e *in vivo*); quantificar fibras em degeneração e regeneração (*in vivo*) e realizar análise bioquímica da degeneração muscular (*in vivo*), quantificar a porcentagem de fibrose (*in vivo*).
- Processo inflamatório: Determinar a porcentagem de área de inflamação no músculo quadríceps femoral (*in vivo*) e analisar citocinas e fatores envolvidos no processo inflamatório (*in vitro* e *in vivo*).
- Processo de autofagia: Analisar os níveis proteicos de marcadores de autofagia (*in vitro* e *in vivo*).
- Regulação do cálcio: Analisar o conteúdo de cálcio intracelular (*in vitro*) e analisar os níveis proteicos de moléculas relacionadas às vias de sinalização de cálcio (*in vitro*).
- Parâmetros mitocondriais: Analisar os efeitos do tratamento com LEDT e/ou Idebenona no consumo de oxigênio (*in vitro*) e quantificar os níveis proteicos de moléculas relacionadas à via de regulação mitocondrial.
- Estresse oxidativo: Quantificar os níveis proteicos de moléculas relacionadas a resposta oxidativa (*in vitro* e *in vivo*) e analisar histologicamente marcadores de estresse oxidativo no músculo quadríceps femoral (*in vivo*).

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib (*mdx*) e C57BL/10ScSn/PasUnib (C57BL/10) (BULFIELD et al., 1984), de ambos os sexos, com 28 dias de vida pós-natal (protocolo *in vitro*) e 14 dias de vida pós-natal (protocolo *in vivo*). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia e as matrizes foram disponibilizadas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Durante todo o experimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o dia da eutanásia e foram mantidos em sala com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) e umidade relativa ($55\% \pm 1$) com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água “*ad libitum*” (SILVA et al., 2021). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEE-IB/UNICAMP – Protocolo nº 5603-1/Anexo 1).

3.2 Estudos “*in vitro*”

3.2.1 Cultura primária

Foram realizadas três culturas primárias de células musculares estriadas esquelética da linhagem *mdx* e C57BL/10 com 28 dias de vida pós-natal. Para cada cultura foram utilizados os músculos do membro pélvico de 5 animais (como machos e fêmeas são afetados igualmente na DMD, cada cultura foi realizada com 5 animais independente de serem machos ou fêmeas). Os animais foram anestesiados por via intra-peritoneal com solução de cloridrato de xilazina 2% (*Vyrbaxyl*, *Virbac*) e cloridrato de quetamina (*Francotar*, *Virbac*) na proporção de 1:1. Ao apresentarem sinais de anestesia geral, rapidamente os músculos foram coletados e isolados em PBS contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v). Em seguida, o tecido muscular foi triturado manualmente com o auxílio de tesoura e a suspensão foi digerida com collagenase II 1,5% (w/v), tripsina 2,5% (w/v) e DNase 0,1% (w/v) em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v) por 30 min à 37°C . Logo após, foi adicionado 15 mL do meio de crescimento, composto por DMEM contendo soro de cavalo 10% (v/v), soro fetal bovino 10% (v/v), L-glutamina 2mM e penicilina 1% (v/v). A suspensão foi centrifugada a 1000rpm, a 4°C por 20 min. e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 30 mL do meio de crescimento e a suspensão foi

filtrada através de um filtro esterelizado com poros de 50 μm e as células foram sedimentadas em microplacas para cultura cobertas com matrigel 0,1% (w/v) a uma densidade de 6×10^4 células por microplaca. Estas então ficaram armazenadas na incubadora de CO_2 (dióxido de carbono) à 5% e 37°C. Entre 48-72 horas após o início da preparação das culturas, o meio de crescimento foi alterado para meio de fusão contendo soro de cavalo 10% (v/v) e L-glutamina 2mM (MIZOBUTI et al., 2022). No sexto dia, as culturas de células foram tratadas e depois de 24 e 48 horas os ensaios e coletas foram realizados. Células *mdx* (C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib) controle e células C57BL/10 (C57BL/10ScCr/PasUnib) não receberam nenhum tratamento e foram utilizadas como controle.

3.2.2 Protocolo Experimental

Para a realização deste projeto, utilizamos a Idebenona fornecida pela *Sigma Aldrich* (I5659-25mg). Primeiramente, para estabelecermos a melhor dose de Idebenona para tratamento em cultura de células musculares distróficas (*mdx*) e de camundongos C57BL/10 (controle), utilizamos o ensaio de proliferação celular, MTT. As culturas celulares receberam diferentes doses de Idebenona (0,5, 0,25, 0,12, 0,06 e 0,03 μM), diluídas previamente em carboximetilcelulose sódica (CMC, *Fluka, Buchs*, Suíça) 0,05% em água. A proliferação foi avaliada em 24 e 48 horas após administração das doses. Posteriormente, somente células musculares *mdx* receberam duas doses: 0,06 e 0,03 μM , as quais mostraram melhores resultados do ensaio MTT e IC50; e foram avaliadas após 24 e 48 horas de tratamento quanto à viabilidade celular (ensaio de vermelho neutro); $[\text{Ca}^{2+}]_i$; superóxido mitocondrial ($\text{O}_2^{\bullet-}$); e análises de produção de H_2O_2 . A partir dessas análises, escolheu-se a dose 0,06 μM , que demonstrou melhor resultado avaliado após 48 horas, para prosseguir com o restante dos ensaios preconizados neste estudo. As culturas celulares foram divididas nos seguintes grupos:

1. Cultura C57BL/10 (C57BL/10): foi utilizada como controle;
2. Cultura *mdx* controle (*mdxC*): não foi submetida a nenhuma intervenção;
3. Cultura *mdx* LED 850 nm (LEDT): foi tratada com LEDT de alta potência (*ThorLabs, Newton, New Jersey, United States*) no comprimento de onda 850nm (infravermelho, M850L3) na dose de 0,5J e avaliada após 24 e 48 horas da estimulação (DA ROCHA et al., 2022);
4. Cultura *mdx* Idebenona (Ide 0,06 μM): foi tratada com 0,06 μM de Idebenona e avaliada após 24 e 48 horas do tratamento (VALDUGA et al., 2022);

- 5. Cultura *mdx* Idebenona (Ide 0,03μM): foi tratada com 0,03μM de Idebenona e avaliada após 24 e 48 horas do tratamento;
- 6. Cultura *mdx* Idebenona+LEDT (Ide 0,06μM+LEDT): foi tratada com Idebenona 0,06 μM e LEDT e avaliada após 24 e 48 horas do tratamento.
- 7. Cultura *mdx* Idebenona+LEDT (Ide 0,03μM+LEDT): foi tratada com Idebenona Ide 0,03 μM e LEDT e avaliada após 24 e 48 horas do tratamento.

Com relação a LEDT, o dispositivo foi previamente calibrado através de um sensor de calibração (S121C, *ThorLabs, Newton, New Jersey, United States*) interligado ao programa *Optical Power Meter Utility (ThorLabs)*. Para a segurança analítica do experimento, dividiu-se a placa em poços que foram irradiados e os que não receberam irradiação, sendo utilizados como controle do experimento, conforme a representação esquemática das placas de 96 poços mostrados na Fig. 5.

MDX			IDE 0,06μM			IDE 0,03μM			LEDT			ID 0,06μM+LEDT			ID 0,03μM+LEDT		
X	X	X				X			X			X			X		
X	X	X					X			X			X			X	
X	X	X				X			X			X			X		
X	X	X					X			X			X			X	
X	X	X				X			X			X			X		
X	X	X					X			X			X			X	
X	X	X				X			X			X			X		
X	X	X					X			X			X			X	

Figura 5: Representação esquemática da aplicação das terapias em placas de 96 poços. Fonte: autoria

Além disso, o meio de fusão foi substituído por FM sem fenol para que nenhuma coloração pudesse interferir na absorção e a irradiação ocorreu no escuro para evitar influência de outras fontes de luz. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os parâmetros ópticos da LEDT que foram utilizados encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros ópticos da LEDT *in vitro*.

Informação do dispositivo		
Fabricante	ThorLabs Mounted High-Power equipment	
Parâmetros	96 poços	6 poços
Densidade de potência (mW)	110	38
Área de irradiação (cm²)	0,32	9,5
Densidade de potência (mW/cm²)	343	4
Densidade de energia (J/cm²)	1,5	0,05
Energia por Ponto (J)	0,5	0,5
Tempo de irradiação (s)	4,5	13,1
Comprimento de onda (nm)	850	
Formato	Circular	
Modo operacional	Continuous	
Número de tratamentos	1	
Aplicação da técnica	Aplicação direto às células pelo fundo de cada poço	

Fonte: Cálculos realizados de acordo com as densidades de potência do fabricante (Thorlabs)

3.2.3 Análise da proliferação celular - MTT:

O ensaio de MTT é uma análise colorimétrica usada para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade e proliferação celular. O método é baseado na redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio, REF M5655, *Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*), a cristais de formazan de coloração roxa (MOSMANN, 1983). Para este experimento, as células (controle e tratadas) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e após 24 e 48 horas de tratamento, foi retirado o meio de cultura e adicionados 100 µl de DMEM sem fenol e 10 ul do reagente MTT por poço. As placas foram incubadas posteriormente por 3-4 horas em CO₂ a 5% à 37°C. Após incubação, todo o meio foi retirado novamente e foram adicionados 100 µl de isopropanol:HCl 37% P.A por poço. A placa foi lida por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm, utilizando o equipamento *Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy HIM (Bio-Tek Instruments)*. Os ensaios foram realizados em triplicata (MIZOBUTI et al., 2019; MACEDO et al., 2015).

3.2.4 Análise de IC50

Os valores obtidos pelo ensaio MTT foram utilizados para o cálculo do IC50, a fim de identificar a dose responsável pela inibição de 50% do crescimento celular para o tempo de exposição analisado. Os valores de dose testados (eixo X) foram transformados usando $X=\log[X]$. Os dados foram normalizados considerando Y=0 igual a 0%, e a maior média em cada um dos *data sets* como 100%. Em seguida, foi calculada a regressão não-linear dos dados através da equação escolhida: $\log[Idebenona]$ vs. resposta normalizada (inclinação variável). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se do *Software GraphPad Prism 8.0*. A dose escolhida baseou-se na menor dose apontada pelo valor de IC50.

3.2.5 Análise da viabilidade celular - Vermelho Neutro:

O corante Vermelho Neutro tem por princípio avaliar a permeabilidade da membrana e a atividade lisossômica de células em resposta ao tratamento utilizado. Este ensaio foi realizado em 24 e 48 horas após os tratamentos. Foi retirado todo o meio das células e adicionado 150µl de solução (25:1 de DMEM + Vermelho Neutro), e incubada por 3 horas em incubadora de CO₂ a 37 °C. Dado o tempo, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), e com uma solução de 1% CaCl₂ em Formaldeído 0,5%. Após a lavagem, foi adicionada uma quantidade igual de solução com 1% ácido acético em etanol 50%. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm, utilizando o equipamento *Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy HIM (Bio-Tek Instruments)*. (BORENFREUND & PUERNER, 1985). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.2.6 Detecção de H₂O₂

O kit de ensaio *Amplex® Red (Molecular Probes, Life Technologies, California, EUA)* foi utilizado para determinar os níveis de H₂O₂, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com a sonda *Amplex red* (50µM) e *horseradish* peroxidase (0,1U/mL) por 30 min à 37°C. Em seguida, foram coletados 100 µL do meio para serem pipetados em uma placa preta para a realização da leitura no equipamento *Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy HIM (Bio-Tek Instruments)* com a intensidade de fluorescência determinada em 530 nm de excitação e 590 nm de emissão. Para o controle positivo foi utilizado 20 mM de H₂O₂ em solução tampão e para o controle negativo foi utilizado somente solução tampão. Foram realizadas análises em triplicata.

3.2.7 Produção de superóxido mitocondrial ($O_2^{\cdot-}$)

O corante fluorescente *MitoSOXTM Red* (M36008, *ThermoFisher*) foi usado para avaliar os níveis de superóxido mitocondrial ($O_2^{\cdot-}$) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células musculares primárias distróficas foram incubadas com *MitoSOXTM Red* por 15 minutos a 37° C. O *MitoSOX* é acumulado seletivamente na mitocôndria e emite fluorescência vermelha quando oxidado pelo ânion superóxido. As intensidades de fluorescência do *MitoSOX* foram monitoradas em um microscópio fluorescente invertido (*Nikon, Eclipse TS100/TS100F*) para análises qualitativas. As medições quantitativas foram realizadas utilizando a intensidade de fluorescência de 510 nm de excitação e 580 nm de emissão, através do espectrofotômetro (*Synergy H1, Hybrid Reader, Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA*).

3.2.8 Determinação de cálcio intracelular

A sonda *Fluo-4*, foi utilizada para mensurar a concentração de cálcio intracelular nas células musculares esqueléticas, de acordo com Macedo et al, (2015) e Mizobuti et al, (2019). Após 24 e 48 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas com *Fluo-4 AM* (10 μ M, sonda molecular) e *Pluronic® F-127* por 60 min. Dado o tempo, as células foram lavadas novamente com PBS e fotografadas utilizando um microscópio de fluorescência (*Nikon®, Eclipse TS100/TS100F*) conectado à câmera de vídeo (*Nikon® Express Series*), para análise qualitativa. Em seguida, as células foram tripsinizadas com 0,1% EDTA + 0,1% SDS, centrifugadas (11000 rpm, por 5 minutos a 4°C) e 100 μ L do sobrenadante de cada amostra foram utilizados para leitura da absorbância, através do equipamento *Multi- Mode Microplate Reader Model Synergy H1M* (Bio-Tek Instruments) com intensidade de fluorescência determinada em 494 nm de excitação e 516 nm de emissão.

3.2.9 Consumo de oxigênio

Para avaliar as taxas de consumo de oxigênio foi usado o equipamento *O2k-FluoRespirometer* e o software *DatLab* (*OROBOROS, Innsbruck, Áustria*) para aquisição e análise de dados. Após o tratamento, as células musculares distróficas foram tripsinizadas e centrifugadas (1250 RPM) por 5 min. Em seguida as células foram ressuspensas e contadas na câmara de Neubauer para padronizar a leitura do ensaio em 1×10^6 de células em meio de DMEM sem fenol e colocados no equipamento *Oxygraph-2k* (*O2k, OROBOROS Instruments*) para as leituras. Foram utilizadas as seguintes drogas no ensaio: 1 μ M de oligomicina (Oligo), 2 μ M de cianato de carbonila m-clorofenil hidrazona (CCCP) e 1 μ M de antimicina (Ant).

Para a determinação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) basal foi subtraído o OCR pré-oligomicina pelo OCR pós-antimicina; OCR ligado a ATP foi calculado subtraindo OCR pós-oligomicina de OCR pré-oligomicina; vazamento de prótons foi obtido subtraindo OCR pós-oligomicina de OCR pós-antimicina; OCR máximo foi determinado subtraindo-se o OCR pós-CCCP do OCR pós-antimicina; a capacidade de reserva foi determinada subtraindo OCR pós-CCCP de OCR pré-oligomicina; e a respiração não mitocondrial foi avaliada pelo valor de OCR pós-antimicina.

3.2.10 Western Blotting

O protocolo de *Western Blotting* foi previamente descrito por Mizobuti et al, (2019) e Da Rocha et al, (2022). Foram utilizadas placas de 6 wells para obtenção do extrato celular, após 48 horas de tratamento com a dose previamente selecionada. Para tal, o meio foi removido e as culturas foram lavadas com PBS, raspadas e homogeneizadas imediatamente em 150µL de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/mL de aprotinina) por meio de um sonicador ultrassônico *SONICS VibraCells™* (*Sonics & Material, Inc., EUA*). A seguir, os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante armazenado em Biofreezer para posterior análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976). Foram acrescentados nas amostras o tampão *Laemmli* (*BIO-RAD #1610737*) e posteriormente aquecidas em banho seco por 5 minutos a 100°C. Foram pipetadas 30µg de proteína em gel SDS-poliacrilamida a 12% e 15% em aparelho para eletroforese da *Bio-Rad* (*mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA*). Uma vez realizada a eletrotransferência, as membranas foram cortadas em diferentes pesos para a otimização dos anticorpos e incubadas com anticorpo primário à 4°C por overnight. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 3 x 10 minutos com solução basal (*Trisma* base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e *Tween-20* 0,02%) e incubadas por duas horas em leite desnatado 1% contendo o anticorpo secundário diluído na proporção de 1:1000-5000, conforme as especificações descritas na Tabela 3. As membranas foram reveladas utilizando a solução de quimioluminescência (*Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce*) por 5 minutos e colocadas na Câmara *G-Box* para exposição. A quantificação foi realizada pelo programa *Gene Tools from Syngene*.

Para a normalização dos dados foi utilizado como controle interno o anticorpo β -actina (*monoclonal mouse, Sigma-Aldrich*). Para posteriores reutilizações, as membranas

previamente usadas foram incubadas com 3mL de *Stripping Buffer* (*Thermo Scientific*) durante 15 min à 35°C (SILVA et al., 2021). As seguintes Tabelas 2 e 3 reúnem os anticorpos primários e secundários utilizados na etapa *in vitro* e *in vivo* no desenvolvimento deste projeto.

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados no *Western Blotting*

Anticorpo	Tipo	Marca
Via do cálcio		
Calpaína	Policlonal	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> sc-7530
Calsequestrina	Monoclonal	<i>Affinity BioReagents</i> VIIID12
Sarcolipina	Policlonal	<i>Merckmilipore</i> ABT 13
Serca 1a	Monoclonal	<i>Cell-Sinaling</i> D54G12
Serca 2a	Monoclonal	<i>Cell-Sinaling</i> 4388S
Fatores mitocondriais		
OXPHOS	Policlonal	<i>Abcam</i> STN- 19467
PGC-1α	Monoclonal	<i>Calbiochem</i> 4C1.3
PPARδ	Policlonal	<i>Invitrogen</i> PA1-823A
SIRT-1	Policlonal	<i>Cell-Sinaling</i> C14H4
Marcadores de autofagia		
LC3	Monoclonal	<i>Cell-Sinaling</i> D3U4C
SQSTM1	Monoclonal	<i>Cell-Sinaling</i> D3U4C
Beclin-1	Monoclonal	<i>Cell-Sinaling</i> D40C5
Parkin	Monoclonal	<i>Cell-Sinaling</i> Prk8
AMPK	Monoclonal	<i>Invitrogen</i> MA5-14922
p-AMPK	Monoclonal	<i>Invitrogen</i> PA517831
mTORC1	Policlonal	<i>Cell-Sinaling</i> #2972
NFκB	Monoclonal	<i>BIO-RAD</i> AHP1342
TGF-β	Monoclonal	<i>Sigma-Aldrich</i> T0438
Reguladores miogênicos		
MHCfast	Monoclonal	<i>Sigma-Aldrich</i> M4276
MHCslow	Monoclonal	<i>Sigma-Aldrich</i> M8421
MyoD	Policlonal	<i>Santa-Cruz</i> m-318
Miogenina	Monoclonal	<i>Santa-Cruz</i> F5D
Reguladores inflamatórios		
TNF-α	Policlonal	<i>Bio-Rad</i> AAM19GA

Marcador de estresse oxidativo

4-HNE	Policlonal	Bio-Rad AHP1251
-------	------------	-----------------

Tabela 3: Anticorpos secundários utilizados no Western Blotting

Anticorpo	Tipo	Marca
Anti-rabbit	Policlonal	Promega Corporation/ W4011
Anti-mouse	Policlonal	Promega Corporation/ W4021
Rabbit anti-goat IgG-HRP	Policlonal	KPL/14-13-06

3.2.11 Expressão gênica (mRNA) em tempo real qPCR

O RNA total da cultura de células musculares *mdx* foi extraído usando o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, foi utilizado 2µg de RNA total para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) usando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Sicentific), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram preparadas em uma mistura final de 20 µL, contendo cDNA da amostra, água DEPC, 300nM de cada sequência de *primers* (*sense* (Fw) e *antisense* (Rv)) e *Fast SYBR Green Master Mix* (ThermoFisher Sicentific), realizadas em um sistema de PCR em tempo real 7500 *Fast* (Applied Biosystems). A proteína ribossomal L39 (RPL39) foi utilizada como controle endógeno da reação e os *primers* utilizados (*Exxtend*, *Oligo Solutions*, SP, Brazil) encontram-se descritos na Tabela 4. Os níveis de expressão gênica foram analisados de acordo com o método do ciclo limiar comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizando os valores de Ct (*threshold cycle*) dos genes de interesse com o gene de referência (RPL39).

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para qRT-PCR

Primer	Sequência 5’-3’
Ribosomal Protein L39 (RPL39)	F: 5’ -C AAAATCGCCCTATTCCTCA-3’ R: 5’ -AGACCCAGCTT CGTTCTCCT-3’
MyoD1	F:5’ -CTGCTCTGATGGCATGATTGGA-3’ R:5’ -CACTGTAGTAGGCGGTGTCG-3’
Miogenina	F:5’ -GTCCCAACCCAGGAGATCATTT-3’ R: 5’ -CGATGGACGTAAGGGAGTGC-3’

3.3 Estudos “*in vivo*”

3.3.1 Protocolo Experimental

Foram utilizados camundongos da linhagem *mdx* (C57BL/10-Dmd^{*mdx*}/PasUnib) e C57BL/10 (C57BL/10ScSn/PasUnib) com 14 dias de vida, divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- C57BL/10 Controle (Ctrl; n = 21): não foram submetidos a nenhuma intervenção
- *mdx* Sham (*mdxS*; n = 21): receberam a simulação da aplicação do LED, com o equipamento desligado, durante o mesmo período do grupo *mdxL* e simulado com o veículo da Idebenona via gavagem.
- *mdx* LEDT (*mdxL*; n = 21): foram tratados com o LED 850nm na dose de 3J.
- *mdx* Idebenona (*mdxI*; n = 21): foram tratados com a Idebenona 200mg/kg por gavagem.
- *mdx* Idenenona + LEDT (*mdxI+L*; n = 21): foram tratados com 200mg/kg de Idebenona e 3J de LEDT.

Os animais do grupo *mdxI* foram pesados e tratados diariamente após o 14º dia pós-natal com 200mg/kg Idebenona diluída em carboximetilcelulose 0,05% por meio de gavagem, por um período de duas semanas.

Os animais do grupo *mdxL*, a partir do 14º dia de vida pós-natal, foram tratados com o equipamento LED (*ThorLabs*®), utilizando os comprimento de onda de 850nm sob os parâmetros ópticos que se encontram descritos na Tabela 5. A aplicação ocorreu no período da manhã com frequência de três vezes por semana, durante duas semanas consecutivas, totalizando 6 sessões. O músculo escolhido para o estudo nesse projeto foi o quadríceps femoral, uma vez que é um músculo superficial e maior, permitindo assim que a luz penetre no tecido alvo. Os animais foram tricotomizados na região anterior da coxa de ambas as patas, para a exposição do m. quadríceps femoral, de modo que não houvesse interferência dos pêlos na absorção da luz. O dispositivo foi posicionado a 3 cm de distância do músculo do animal, de maneira perpendicular a cada ponto a ser irradiado, conforme ilustrado na Fig. 6.

Os animais do grupo *mdxI+L*, foram tratados 3x por semana com LEDT por 2 semanas totalizando 6 sessões, 2 horas antes da gavagem, que foi administrada diariamente (SALEHPOUR et al., 2019).

Tabela 5: Parâmetros ópticos da LEDT *in vivo*.

Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Área de irradiação (cm ²)	Densidade de potência (mW/cm ²)	Densidade de energia (J/cm ²)	Tempo de irradiação (s)	Energia por Ponto (J)
850	300	0,32	937	9,37	10	3

Fonte: Cálculos realizados de acordo com as densidades de potência do fabricante (*Thorlabs*).

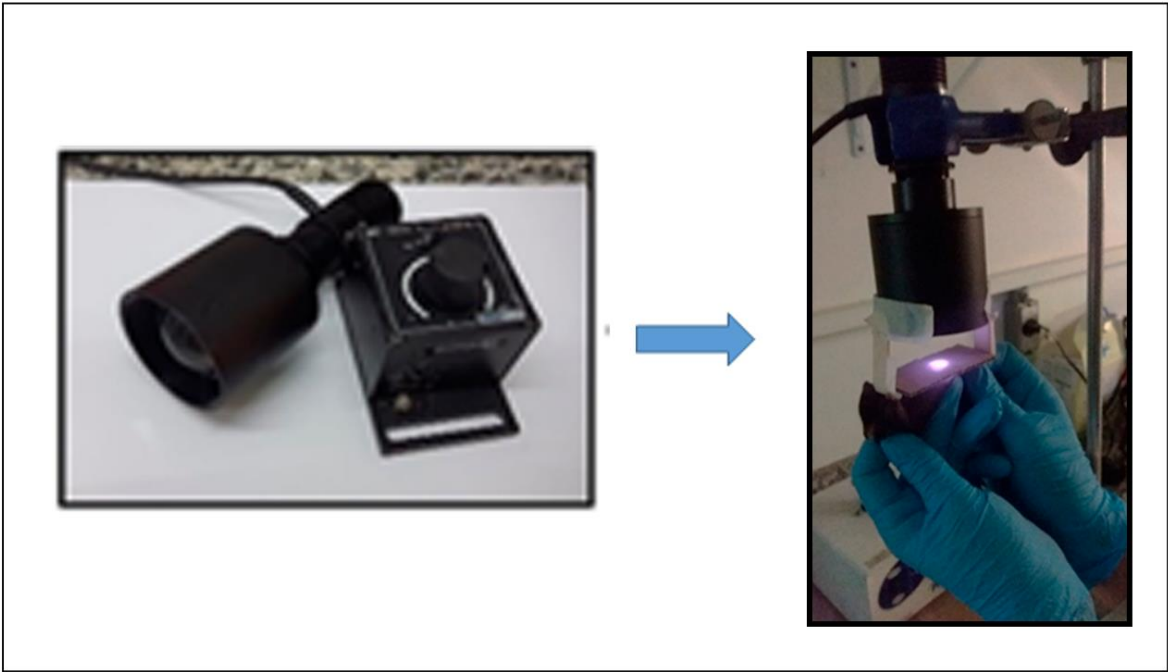


Figura 6: Aplicação da LEDT no músculo quadríceps femoral. Fonte: autoria.

3.3.2 Controle da Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada diariamente por meio de uma balança de precisão modelo AS2000C (Marte balanças e equipamentos®), ao longo de todo o período experimental (14° ao 28° dia pós- natal). O controle da massa corporal foi analisado através do seguinte cálculo:

$$[\text{Delta } (\Delta \%) = [(\text{massa final} - \text{massa inicial} / \text{massa inicial}) \times 100]].$$

3.3.3 Peso relativo dos órgãos

Imediatamente após a eutanásia, o m. quadríceps femoral de ambas as patas foram

removidos e pesados em uma balança eletrônica de precisão (modelo EK-2000G – AND). O peso relativo dos órgãos foi calculado como a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal. O intuito dessa avaliação é observar se houve alguma alteração ou não após o período experimental (KYSILOVA et al., 2003).

3.3.4 Medição de Força Muscular (GRIP STRENGTH)

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

Foi utilizado o aparelho *Gripstrentgh; Newprimer®* para a análise da força muscular das patas dianteiras dos camundongos dos grupos experimentais. Para essa análise, o camundongo foi colocado no aparelho em frente a um sistema de haste que permite o camundongo agarra-la com ambas as patas (Fig. 6). Através de um transdutor de força é registrado no *display* a tração máxima exercida pelo animal. O resultado é expresso pela média das três medidas, representado em Kg/força.



Figura 7: Aparelho *Gripstrentgh Newprimer®* utilizado para medir força muscular.

3.3.5 Dosagem sérica de Creatina-Quinase (CK)

Após o período dos tratamentos, os animais receberam injeção via intra-peritoneal com solução de cloridrato de xilazina 2% (*Vyrbaxyl, Virbac*) e cloridrato de quetamina (*Francotar, Virbac*) na proporção de 1:1. Ao apresentarem sinais de anestesia geral, foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca com exposição da cavidade torácica. Foi realizada a centrifugação das amostras coletadas a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. (centrífuga refrigerada *Sigma® 3-18K*). O plasma sanguíneo foi coletado para determinar a atividade de CK através do kit *CK Nac Cinético Crystal* da *Bioclin*. As absorbâncias das

amostras foram lidas no comprimento de onda de 340nm a 25°C, utilizando o equipamento *Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy HIM (Bio-Tek Instruments)* (SILVA et al., 2021).

3.3.6 Dosagem residual de Creatina-Quinase (CK)

Os músculos quadríceps femoral foram retirados e homogeneizados em 4 mL de PBS por 10 segundos, utilizando o equipamento *Polytron (PTA 20s - PT 10/35, Kinematica AG)*. A seguir, foi adicionado 1 mL de PBS contendo 0,5% de triton X-100. Os homogenatos foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi diluído a 1:35 v/v, com PBS para a quantificação da atividade CK. A atividade creatina-quinase foi determinada através de kit diagnóstico *CK Nac Cinético Crystal* da *Bioclin*. A leitura foi realizada no equipamento *Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy HIM (Bio-Tek Instruments)*, no comprimento de onda de 340 nm. O resultado foi expresso em unidades de CK/litro, em que uma unidade corresponde à fosforilação de 1 nmol de CK por minuto, a 25°C (BARBOSA et al., 2009).

3.3.7 Análise Histomorfológica

Os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente no item 3.3.5. O músculo quadríceps femoral foi retirado, pré-congelado em isopentano a -95°C por um minuto, transferido para o nitrogênio líquido para o congelamento e armazenado em biofreezer a -80°C. Os cortes foram realizados em criostato (*Leica CM1860-UV*) e seccionados transversalmente na espessura de 8 µm. Foram obtidas lâminas com 5 cortes seriados dos referidos grupos experimentais, para cada uma das seguintes análises: coloração com Hematoxilina e Eosina, Tricômico de Masson, incubação com o anticorpo anti-*mouse* IgG-FITC, incubação com Dihydroetidio para detecção de EROs e contagem de grânulos de lipofuscina. Todas as lâminas foram observadas através do microscópio de luz (*Nikon® Eclipse*), acoplado a câmera de vídeo (*Nikon® Express Series*), conectado a um microcomputador com o software *NIS-elements AR Advances Reserches* e analisadas pelo programa *Image-Pro Plus 6.0®*.

Hematoxilina e Eosina (HE)

Os cortes do m. quadríceps femoral de cada grupo experimental foram corados com hematoxilina de *Harris* e posteriormente lavados em água corrente por dez minutos e corados com eosina. Em seguida, os cortes foram desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 95%, absoluto I, II e III), diafanizados em xilol e então as lâminas foram montadas em Entellan. As lâminas coradas com HE foram observadas em objetiva de 20X e realizada a

fotomicrografia para análise das alterações histopatológicas conforme descritas abaixo:

1 - Análise do percentual de fibras com núcleo central - indicativo de fibras musculares regeneradas (TORRES & DUCHEN 1987) e fibras com núcleo periférico (característica de fibras normais). Foram contabilizadas todas as fibras dos cortes para estimar a porcentagem de fibras normais e regeneradas dos grupos experimentais. 2 - Também foi realizada a análise do diâmetro mínimo de *Feret*, através da demarcação da distância mínima de tangentes paralelas nas bordas opostas da fibra muscular, utilizando-se de um total de cem diâmetros de fibras musculares de 10 campos aleatórios com ampliação de 20x (BRIGUET et al., 2004). 3 - Para análises da porcentagem de áreas de inflamação, foram demarcadas as áreas de inflamação e a área total do músculo quadríceps femoral.

Coloração de Tricrômico de Masson (TM)

Os cortes foram corados com hematoxilina de *Harris* por cinco minutos e lavados em água corrente. Posteriormente, foram imersos em solução de Masson por 9 minutos. Dado o tempo, as lâminas foram então banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de azofloxina (AFO) por três minutos, seguido por solução de verde luz (*light green*) por 30 segundos. Após esta etapa, os cortes foram banhados em ácido acético a 0,2% novamente e submetidos à desidratação em série de etanol (70%, 95%, absoluto I, II e III), e à diafanização com xilol. As lâminas foram montadas com Entellan e o todo o corte do músculo foi fotografado para análises da área de tecido fibroso.

Anticorpo Anti-mouse IgG-FITC

Para detecção de fibras em processo de degeneração, foi utilizado o anticorpo anti-mouse IgG conjugado a fluoresceína. Inicialmente, os cortes foram bloqueados com BSA 3% por 1 h. Dado o tempo, os cortes foram incubados com o anticorpo FITC- conjugado anti-mouse IgG (*Sigma*) por 1 h e posteriormente, as lâminas foram lavadas com *Tris-Buffered Saline* com *Tween* 20% (TBST) e montadas em TBST+glicerol. Foi realizada a contagem de fibras marcadas com o anticorpo IgG em relação ao total de fibras muscular pelo programa *Image-Pro Plus 6.0®* (SILVA et al., 2021).

Reação Dihydroetídio (DHE) para detecção de EROs (Radical ânion superóxido - O₂⁻)

Para avaliar a produção tecidual do radical ânion O₂⁻ no m. quadríceps femoral, foi utilizada a sonda dihydroetídio (DHE). No interior da célula, o DHE é oxidado pelos ânion superóxido, o que leva à formação de um produto intermediário, o 2-hidroxi-etídio (2-

OHEt+) que, ao ser excitado, exibe uma fluorescência de cor vermelha. Para a realização do teste, os cortes histológicos foram incubados com 5 µl de DHE em dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C durante 30 min. A intensidade de DHE reativo por área muscular foi quantificada em um microscópio invertido fluorescente (*Nikon® Eclipse*) através da mensuração de pixels em uma faixa específica (70 ± 255 comprimento de onda). O equipamento foi ajustado para eliminar interferências de fluorescência de fundo (WHITEHEAD et al., 2008).

Contagem de Grânulos de Lipofuscina

A lipofuscina é um pigmento citoplasmático castanho-amarelado produzida pelo estresse oxidativo (NAKAE et al., 2004). Uma vez que a lipofuscina é auto-fluorescente, as secções transversais do m. quadríceps femoral foram montadas diretamente em TBST+glicerol sob lamínula. O número total de grânulos de lipofuscina foi determinado em relação à área total do corte pela sua espessura de 8 µm, sendo o resultado dado por mm³ conforme o seguinte cálculo:

$$(\text{Total de grânulos de lipofuscina} / \text{área total do músculo} \times 8 \mu\text{m}).$$

3.3.8 Western Blotting

No momento da eutanásia, logo após punção cardíaca, os animais foram perfundidos com PBS e os m. quadríceps femoral foram removidos e homogeneizados imediatamente em tampão (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando homogeneizador tipo *Polytron PTA 20S* (modelo PT 10/35; *Kinematica Ag*). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi recolhido para ser utilizado em análise do extrato total (proteínas) pelo método de Bradford 1976. As seguintes etapas que seguem após essa etapa foram realizadas conforme descrito no item **3.2.10**.

3.4 Análise Estatística

Para análise estatística dos testes foi aplicado o teste *ANOVA One Way* seguido do teste *Tukey* para as devidas comparações entre os grupos. Foi utilizado um nível de significância de 0,5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Para rodar a estatística utilizou-se o pacote de *software GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software, CA, EUA*).

4.0 RESULTADOS

4.1 Avaliação das terapias “In vitro”

4.1.1 Análise da proliferação e viabilidade celular

Para avaliar a proliferação e a citotoxicidade celular das terapias tanto isoladas quanto combinadas, utilizamos os ensaios MTT e Vermelho Neutro avaliados em 24 e 48 horas.

Através do ensaio MTT, foi observado uma redução significativa na proliferação celular em células musculares C57BL/10 e *mdx* tratadas isoladamente com Idebenona e associadas com LEDT nas concentrações (Ide 0,5µM; Ide 0,25µM; Ide 0,12µM; Ide 0,06µM; Ide 0,5µM + LEDT; Ide 0,25µM + LEDT e Ide 0,12µM + LEDT) após 24h e 48 horas após o tratamento (Ide 0,5µM; Ide 0,25µM; Ide 0,12µM; Ide 0,5µM + LEDT; Ide 0,25µM + LEDT) quando comparadas com seus respectivos grupos controles (Fig. 8, A-D).

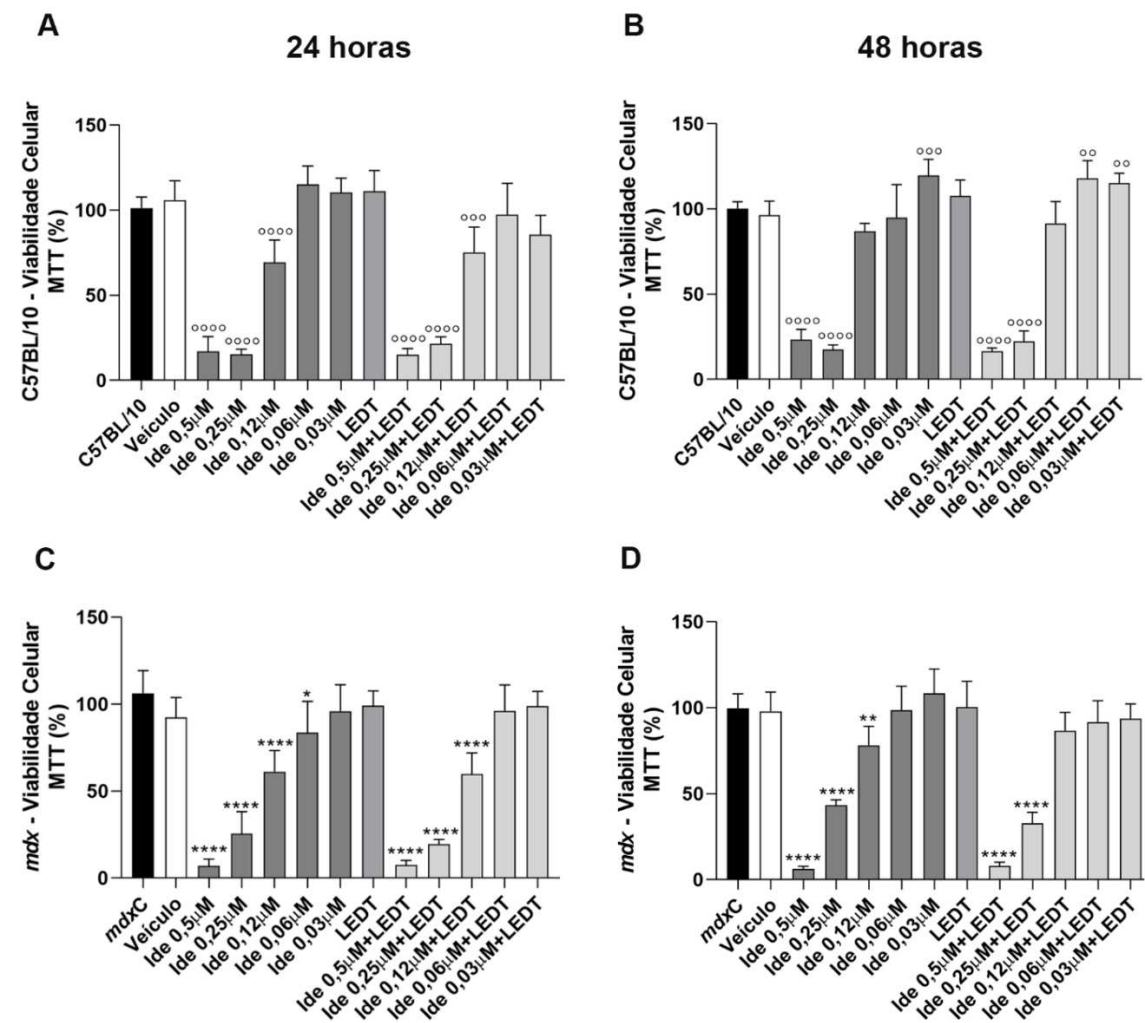


Figura 8: Análise da proliferação celular utilizando o ensaio MTT. Cultura de células musculares controle não tratadas (C57BL/10), tratadas com veículo (carboximetilcelulose), tratadas com Idebenona nas doses (0,5μM, 0,25μM, 0,12μM, 0,06μM e 0,03μM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,5μM, 0,25μM, 0,12μM, 0,06μM e 0,03μM de Idebenona + LEDT. **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com veículo (carboximetilcelulose), tratadas com Idebenona nas doses (0,5μM, 0,25μM, 0,12μM, 0,06μM e 0,03μM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,5μM, 0,25μM, 0,12μM, 0,06μM e 0,03μM de Idebenona + LEDT. **C.** 24 horas após o tratamento. **D.** 48 horas após o tratamento. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. °° P< 0,01 difere do grupo C57BL/10; °°° P< 0,001 difere do grupo C57BL/10; °°°°P< 0,00001 difere do grupo C57BL/10; *P< 0,05 difere do grupo *mdxC*; **P< 0,01 difere do grupo *mdxC*; ****P< 0.00001 difere do grupo *mdxC*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

Foi calculado também a partir do MTT, a concentração inibitória média (IC50; (Fig. 9, A-D), o que observou-se uma redução de 50% da viabilidade celular utilizando-se as doses (Ide 0,14μM; Ide+LEDT 0,14μM) analisadas 24 horas e (Ide 0,14μM; Ide+LEDT 0,18μM) analisadas 48 horas em células musculares C57BL/10.

Em cultura de células musculas *mdx* observou-se redução de 50% da viabilidade celular em concentrações de (0,15μM tanto para Ide quanto Ide+LEDT) após 24 horas de tratamento e (Ide 0,21μM; Ide+LEDT 0,20μM) após 48 horas.

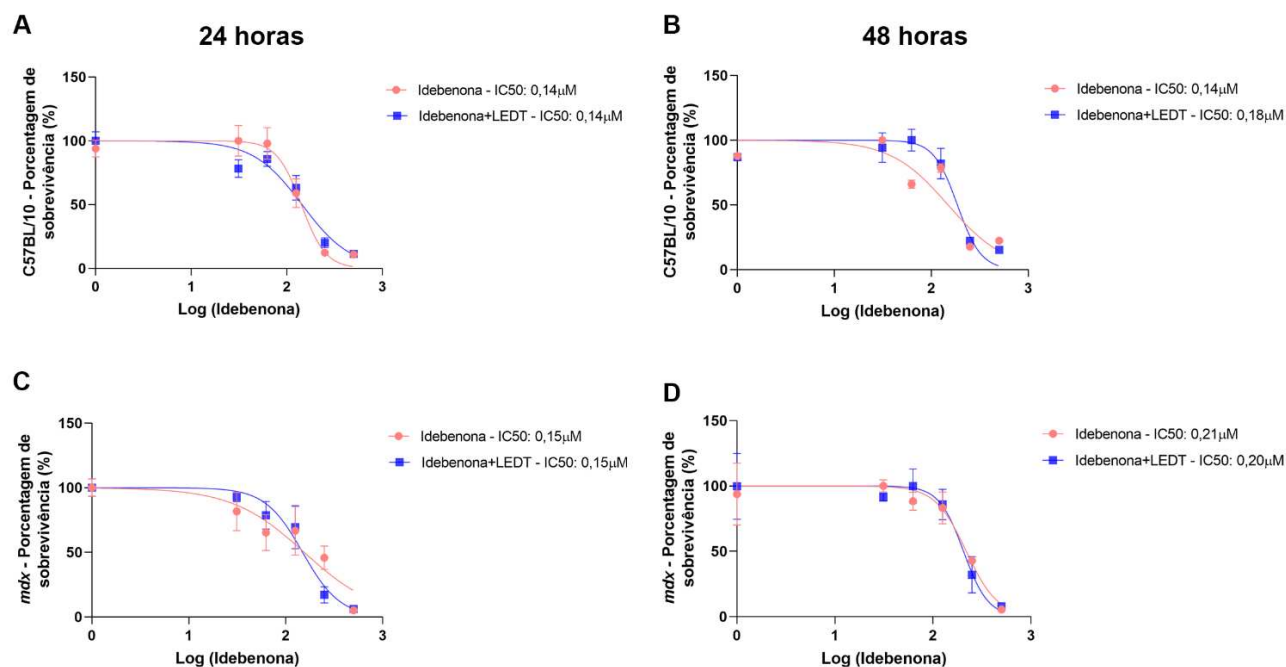


Figura 9. Curvas de dose-resposta de IC50. Tratamentos com Idebenona e Idebenona+LEDT em células musculares C57BL/10 tratadas com Idebenona nas doses (0,5μM, 0,25μM, 0,12μM, 0,06μM e 0,03μM) associadas com LEDT (850nm e 0,5J). **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. Curvas de dose-resposta de IC50 para Idebenona e Idebenona+LEDT em células musculares *mdx* tratadas com Idebenona nas doses (0,5μM, 0,25μM, 0,12μM, 0,06μM e 0,03μM) associadas com LEDT (850nm e 0,5J). **C.** 24 horas após o tratamento. **D.** 48 horas após o tratamento. A resposta à dose de Idebenona foi normalizada e as concentrações transformadas em log. Os valores de IC50 foram determinados usando análise de regressão não linear.

Com base nos resultados dos ensaios MTT e IC50 escolheu-se as doses 0,06µM e 0,03µM para dar continuidade aos estudos.

Através da análise do ensaio de Vermelho Neutro (Fig. 10, A-D), não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados nas células musculares C57BL/10 quando comparadas com o grupo controle. No entanto, foi observado um aumento significativo na viabilidade das células musculares *mdx* tratadas, quando comparadas ao grupo *mdxC* após 24 horas de tratamento (18,8% para Ide 0,06µM; 15,3% para Ide 0,03 µM; 30,6% para LEDT; 22,6% para Ide 0,06µM + LEDT; e 23,2% para Ide 0,03µM + LEDT) e após 48 horas de tratamento (23,6% para LEDT; 14,8% para Ide 0,06µM + LEDT; e 22,7% para Ide 0,03µM + LEDT).

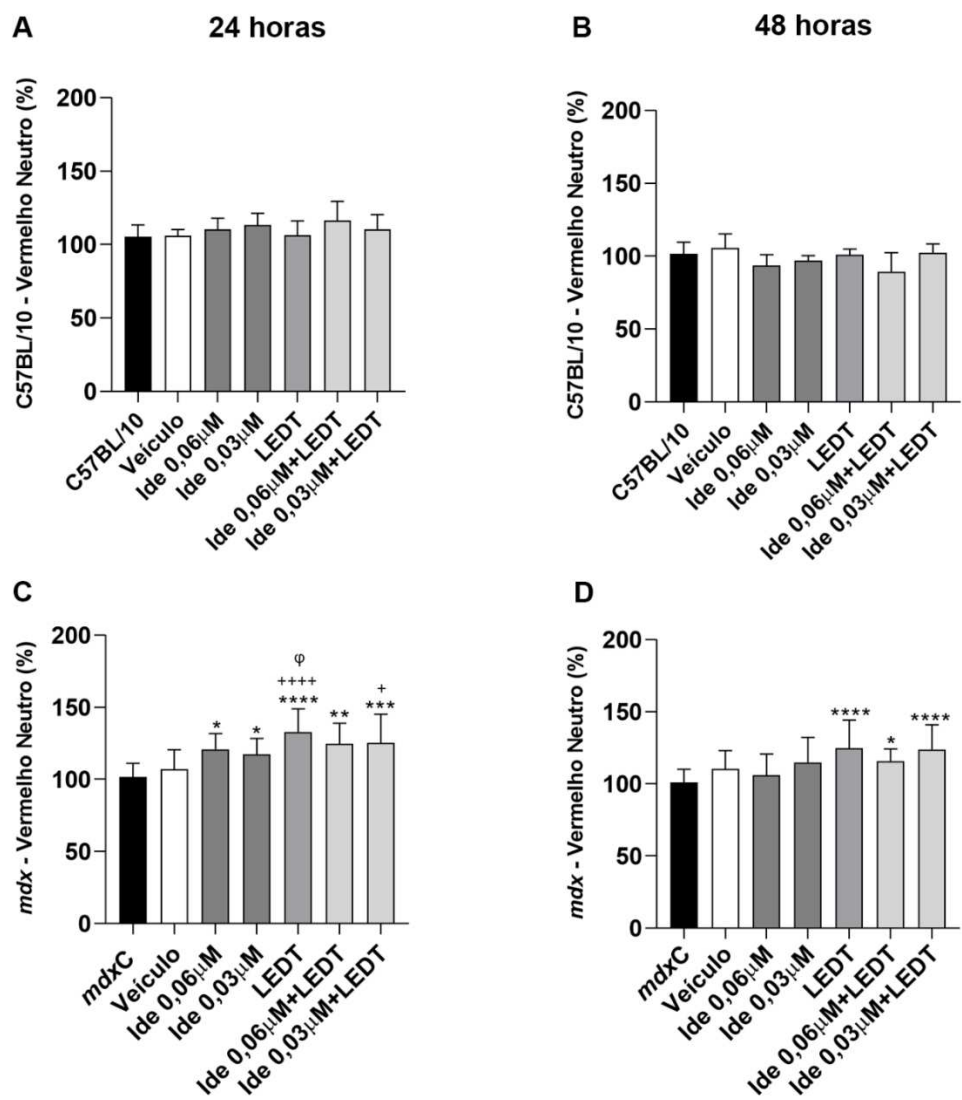


Figura 10: Análise da viabilidade celular por meio do teste Vermelho Neutro. A e B. Cultura de células musculares controle não tratadas (C57BL/10), tratadas com veículo (carboximetilcelulose), tratadas com Idebenona nas doses (0,06µM e 0,03µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM e 0,03µM de Idebenona + LEDT. **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. **C e D.** Análise da viabilidade celular por

meio do teste Vermelho Neutro em células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com veículo (carboximetilcelulose), tratadas com Idebenona nas doses (0,06µM e 0,03µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM e 0,03µM de Idebenona + LEDT. **C.** 24 horas após o tratamento. **D.** 48 horas após o tratamento. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 difere do grupo *mdxC*; **P<0,001 difere do grupo *mdxC*; ***P<0,0001 difere do grupo *mdxC*; ****P<0,00001 difere do grupo *mdxC*; +P<0,05 difere do grupo veículo; +++P<0,00001 difere do grupo veículo; °P<0,05 difere do grupo Ide 0,03µM. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.1.2 Análise da morfologia e diâmetro das células musculares

Após 24 horas de tratamento, não houve diferença significativa na morfologia dos miotubos quando comparado entre os grupos experimentais (Fig. 11, A-B). No entanto, em 48 horas foi observado um aumento significativo no diâmetro das células musculares *mdx* após todos os tratamentos (por 26,4%; para Ide 0,06µM; 27,3% para LEDT e 31,2% para Ide 0,06µM + LEDT; Fig. 11, C-D).

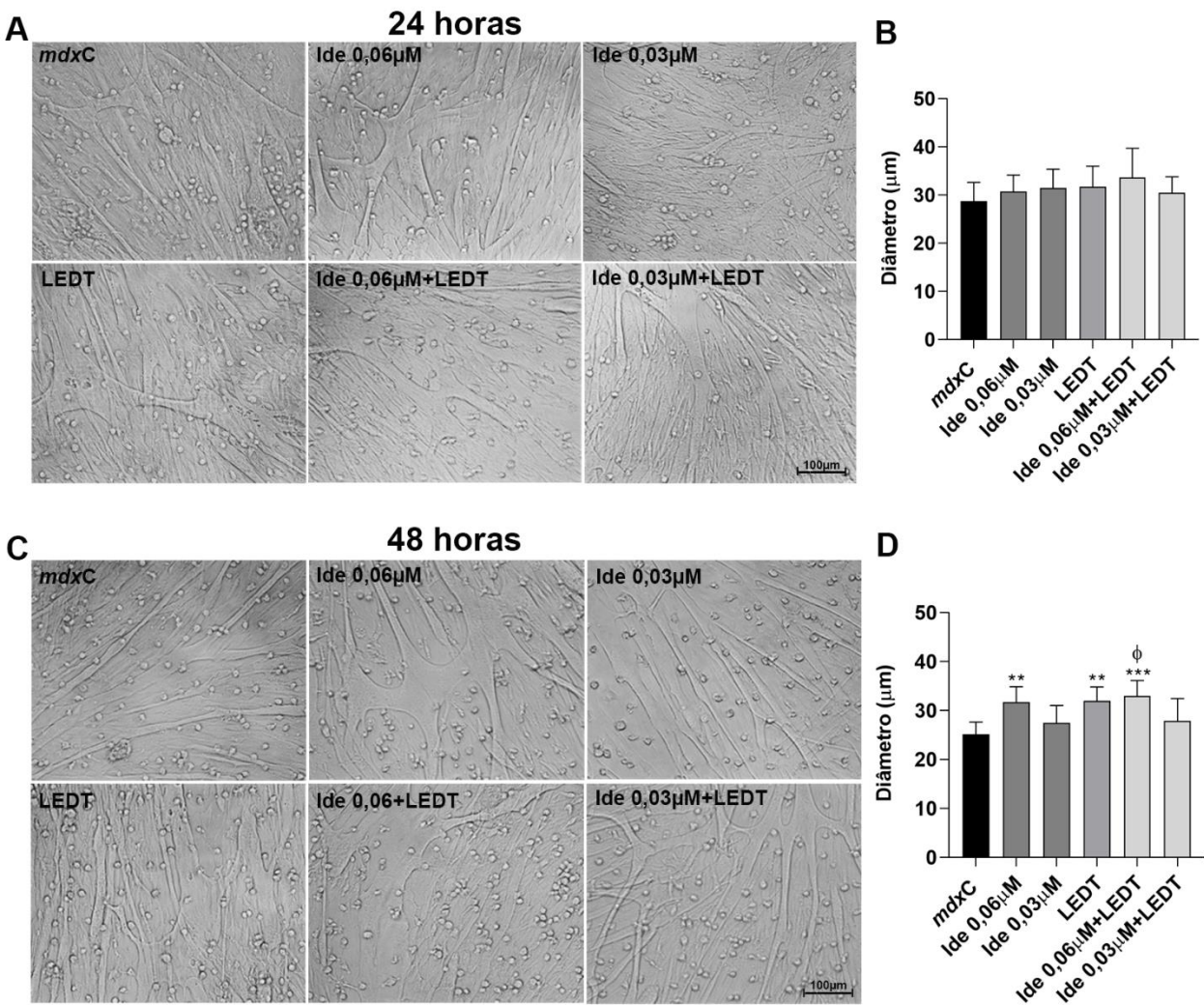


Figura 11: Análise do diâmetro das fibras musculares. Cultura de células *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com veículo (carboximetilcelulose), tratadas com Idebenona nas doses (0,06µM e 0,03µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM e 0,03µM de Idebenona+LEDT. **A,B.** 24 horas após o tratamento. **C,D.** 48 horas após o tratamento. Barra de escala: 100µm, 20x. **B e D.** O gráfico representa o diâmetro das fibras musculares.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. **P<0,001 difere do grupo *mdxC*; ***P<0,0001 difere do grupo *mdxC*; ^oP<0,05 difere do grupo Ide 0,03 μ M. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.1.3 Análise da concentração de cálcio intracelular

Para analisar a concentração de $[Ca^{2+}]_i$ na cultura de células musculares distróficas, foi utilizado o Fluo-4, um indicador de cálcio intracelular que emite fluorescência verde quando ligado ao Ca^{2+} livre no citosol. Observou-se qualitativamente na (Fig. 12, A) que após 24 horas de tratamento não houve alteração na marcação de cálcio entre os grupos experimentais, observado também através da análise quantitativa da emissão de fluorescência por meio da espectrofotometria (Fig. 12, B).

Por outro lado, 48 horas após os tratamentos, as células musculares *mdx* tratadas apresentaram redução significativa de $[Ca^{2+}]_i$ (13,0% para Ide 0,06 μ M; 9,1% para LEDT; 11,6% para Ide 0,06 μ M + LEDT; e 11,0% para Ide 0,03 μ M + LEDT) em comparação com as células musculares controle (Fig. 12 C,D).

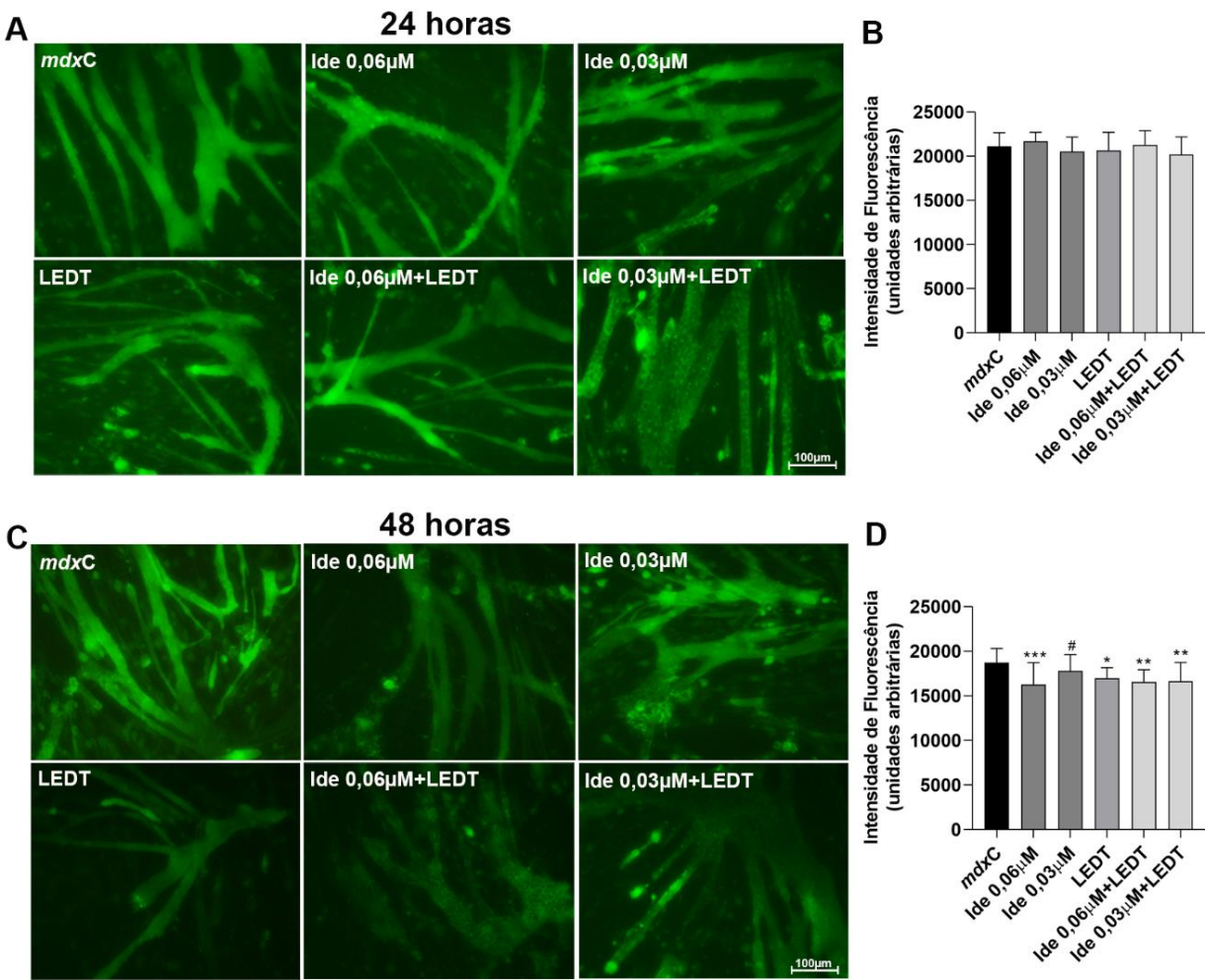


Figura 12. Análise qualitativa e quantitativa das concentrações intracelulares de cálcio $[Ca^{2+}]_i$. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona nas doses (0,06 μ M e 0,03 μ M); com LEDT (850 nm e 0,5J) e com 0,06 μ M e 0,03 μ M de Idebenona+LEDT. **A e B.** 24 horas após o tratamento. **C e D.** 48 horas após o tratamento. **A e C.** Concentração intracelular de Ca^{2+} avaliada pelo marcador de cálcio Fluo-4 (verde). Barra de escala: 100 μ m, 20x. **B e D.** O gráfico demonstra a intensidade de fluorescência da concentração de Ca^{2+} nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 difere do grupo *mdxC*; **P<0,01 difere do grupo *mdxC*; ***P< 0,001 difere do grupo *mdxC*; #P< 0,05 difere do grupo Ide 0,06 μ M. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.1.4 Análise do estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo das células musculares distróficas, foram mensuradas as concentrações de superóxido mitocondrial, peróxido de hidrogênio através da sonda amplex- red e pelos níveis de 4 hidroxinoneal (4-HNE; indicador de peroxidação lipídica).

Vinte e quatro horas após a aplicação dos tratamentos (Idebenona, LEDT e/ou Idebenona mais LEDT), as células musculares *mdx* tratadas apresentaram redução significativa na produção de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (16,6% para Ide 0,06 μ M; 15,6% para Ide 0,03 μ M; 12,1 % para LEDT; 13,6% para Ide 0,06 μ M + LEDT; e 12,0% para Ide 0,03 μ M + LEDT) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 13 A,B). Resultados semelhantes também foram observados nos tratamentos avaliados após 48 horas (14,7% para Ide 0,06 μ M; 15,1% para Ide 0,03 μ M; 19,3% para LEDT; 15,3% para Ide 0,06 μ M + LEDT; e 12,8% para Ide 0,03 μ M + LEDT) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 13 C, D).

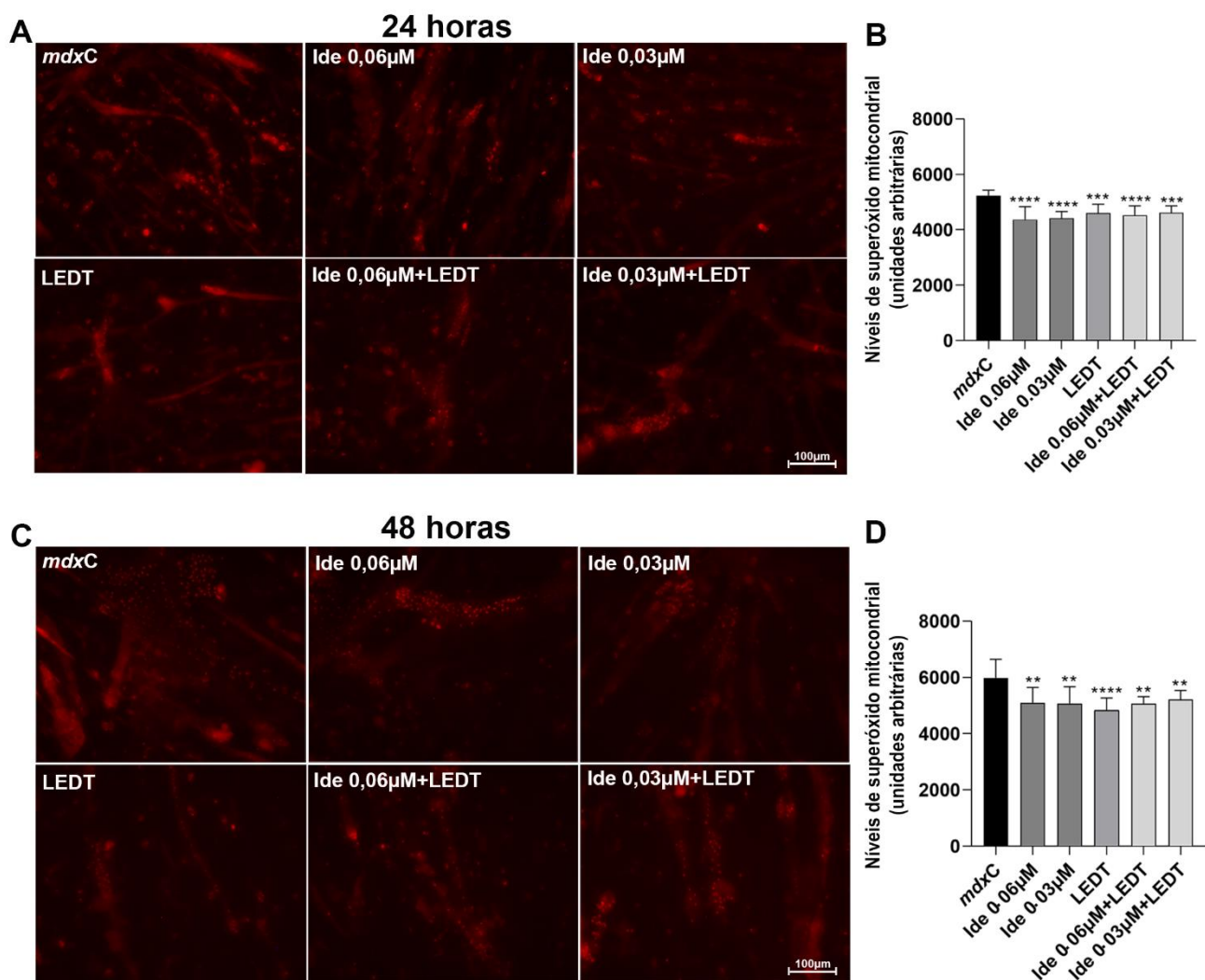


Figura 13: Análise da concentração de $O_2^{\bullet-}$. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona nas doses (0,06µM e 0,03µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM e 0,03µM de Idebenona + LEDT. **A e B.** 24 horas após o tratamento. **C e D.** 48 horas após o tratamento. **A e C.** Imagens de fluorescência da concentração de $O_2^{\bullet-}$ avaliada por Mitosox (vermelho). Barra de escala: 100µm, 20x. **B e D.** O gráfico demonstra a intensidade de fluorescência da concentração de $O_2^{\bullet-}$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. **P<0,01 difere do grupo *mdxC*; ***P< 0,001 difere do grupo *mdxC*; ****P< 0,00001 difere do grupo *mdxC*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Em relação à concentração de H_2O_2 , observou-se que as células musculares *mdx* tratadas, analisadas 24h após todos os tratamentos, apresentaram redução significativa na produção de H_2O_2 (12,6% para Ide 0,06µM; 12,9% para Ide 0,03µM; 10,9% para LEDT; 18,0% para Ide 0,06µM + LEDT; e 14,3% para Ide 0,03µM + LEDT) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 14, A). Porém, 48h após os tratamentos, apenas células musculares *mdx* tratadas com Ide 0,06µM; LEDT; e Ide 0,06µM + LEDT mostraram uma redução significativa na produção de H_2O_2 (em 16,0%, 8,9% e 13,0%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 14, B).

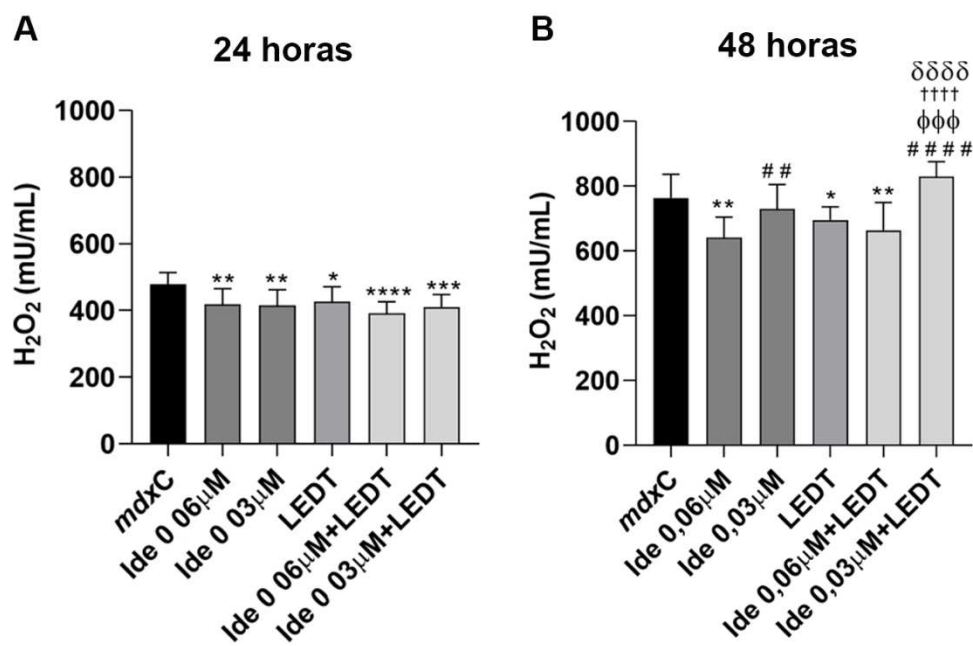


Figura 14: Análise da concentração de H₂O₂. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona nas doses (0,06µM e 0,03µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM e 0,03µM de Idebenona + LEDT. **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. **A e B.** O gráfico demonstra a concentração de H₂O₂. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 difere do grupo *mdxC*; **P<0,01 difere do grupo *mdxC*; ***P< 0,001 difere do grupo *mdxC*; ****P< 0,00001 difere do grupo *mdxC*; #P<0,01 difere do grupo Ide 0,06µM; ##P<0,01 difere do grupo Ide 0,06µM; φφφφP<0,001 difere do grupo Ide 0,03µM; †††† P<0,00001 difere do grupo LEDT; #### P<0,00001 difere do grupo Ide 0,06µM + LEDT. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

Em relação ao marcador de peroxidação lipídica, observa-se que as células musculares *mdx* tratadas com Ide 0,06µM; LEDT e Ide 0,06µM + LEDT (analisadas 48h após os tratamentos) mostraram uma redução significativa nos níveis de 4-HNE (em 10,0%, 11,0% e 13%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 15 G, H)

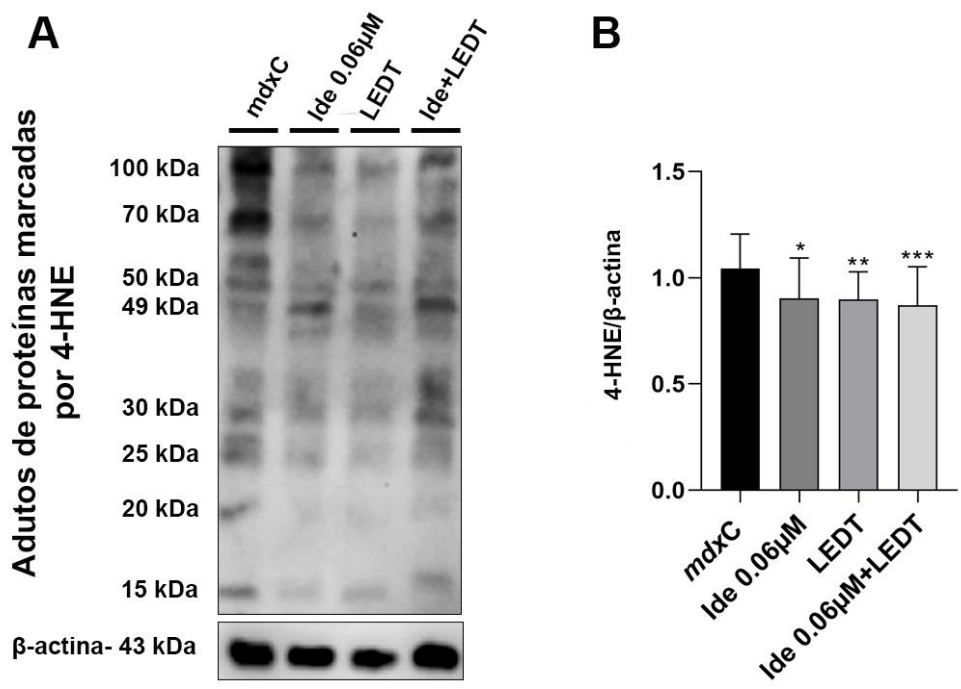


Figura 15: Análise do estresse oxidativo. **A.** Análise de *Western Blotting* de adutos de proteínas marcadas pelo 4-HNE em cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM de Idebenona + LEDT. Bandas correspondentes a proteína (linha superior) e β-actina (linha inferior; usada como controle). **B.** O gráfico mostra níveis de adutos de proteínas marcadas por 4-HNE nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 difere do grupo *mdxC*; **P<0,01 difere do grupo *mdxC*; ***P< 0,001 difere do grupo *mdxC*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.1.5 Análise para a escolha da dose e período

A partir das análises de diâmetro das fibras musculares, concentração de cálcio intracelular, superóxido mitocondrial e peróxido de hidrogênio, observa-se que a dose de Idebenona 0,06µM avaliada após 48 horas de tratamento, apresentou-se melhores resultados que a dose de Idebenona 0,03µM quando comparadas com o grupo de células *mdx* controle, conforme demonstrado na Tabela 6.

Desta forma, nós escolhemos a concentração de 0,06µM e o período de 48h para seguir com o ensaio de *Western Blotting*.

Tabela 6: Efeito das terapias nos ensaios *in vitro*.

Doses	Diâmetro	Cálcio	O ₂ ^{•-}	H ₂ O ₂
	24h – 48h	24h – 48h	24h – 48h	24h – 48h
Ide 0,06µM	= ↑	= ↓	↓ ↓	↓ ↓
Ide 0,03µM	= =	= =	↓ ↓	↓ =
Ide 0,06µM + LEDT	= ↑	= ↓	↓ ↓	↓ ↓
Ide 0,03µM + LEDT	= =	= ↓	↓ ↓	↓ =

= (não houve alteração significativa quando comparado com o grupo *mdx* controle)

↑ (aumento significativo quando comparado com o grupo *mdx* controle)

↓ (redução significativa quando comparado com o grupo *mdx* controle)

4.1.6 Análise das vias de sinalização de cálcio

Nós analisamos na cultura de células musculares distrófica os marcadores calpaína-1 (proteases de cisteína dependentes de cálcio); calsequestrina (proteína do retículo sarcoplasmático, relacionada com o tamponamento do cálcio); sarcolispina (proteína reguladora da atividade da SERCA) e SERCA (transporte de cálcio).

Em relação à calpaína-1, observou-se que os tratamentos com as terapias IDE; LEDT e IDE + LEDT reduziram seus níveis (57,7%, 46,2% e 64,7%, respectivamente), quando comparadas com as células musculares *mdx* controle (Fig. 16 A,B).

Quanto aos níveis de calsequestrina, foi observada redução significativa nas células musculares *mdx* tratadas com LEDT e IDE+LEDT (em 83,0% e 80,9%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 16 A,B).

Em relação aos níveis de sarcolispina e SERCA 2a, apenas as células musculares *mdx* tratadas com IDE+LEDT apresentaram redução significativa (em 49,2% e 30,0%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 16 A, B).

Quanto aos níveis de SERCA 1a, observou-se aumento significativo nas células musculares *mdx* tratadas com IDE; LEDT; e IDE + LEDT (em 227,4%, 201,9% e 205,8%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig.16A,B).

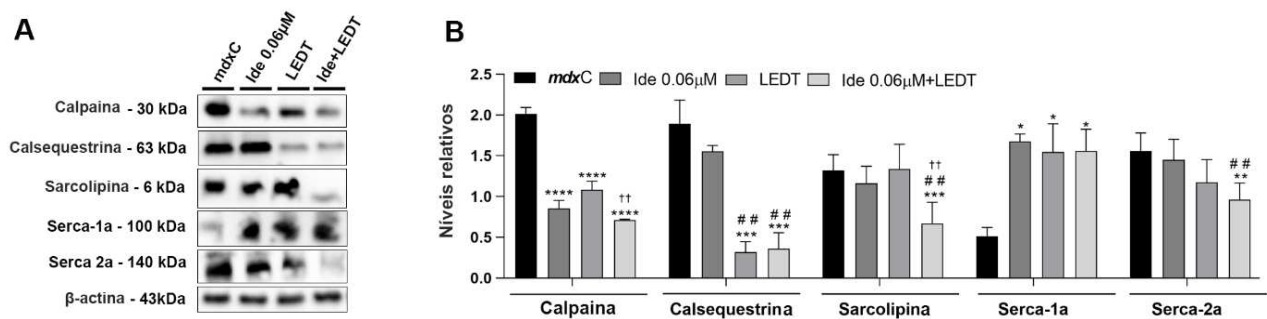


Figura 16: Western Blotting das vias de sinalização de cálcio. Análise de Western Blotting de Calpaina, Calsequestrina, Sarcoplipina, SERCA 1a, SERCA 2a em cultura de células musculares *mdxC* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06 μ M); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06 μ M de Idebenona + LEDT. Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). **B.** O gráfico mostra os níveis relativos de proteína nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. * $P < 0,05$ difere do grupo *mdxC*; ** $P < 0,01$ difere do grupo *mdxC*; *** $P < 0,001$ difere do grupo *mdxC*; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxC*; ## $P < 0,01$ difere do grupo Ide 0,06 μ M; †† $P < 0,05$ difere do grupo LEDT. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.1.7 Análise dos parâmetros mitocondriais

Foram avaliadas as taxas de consumo de oxigênio e constatou-se que as células musculares *mdxC* tratadas com IDE aumentaram os níveis basais, ATP-linked e a sua capacidade máxima (em 98,8%, 100,0% e 55,2%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdxC* controle (Fig. 17, A). Além disso, os níveis basais, ATP-linked, a capacidade máxima e de reposição foram aumentadas nas células musculares *mdxC* tratadas com LEDT (em 107,8%, 201,5%, 138,7% e 511,7%, respectivamente) e/ou IDE+LEDT (em 51,8%, 85,8%, 96,9% e 198,6 %, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdxC* controle (Fig. 17, A).

Em relação a OXPHOS, observou-se que as células musculares *mdxC* tratadas com IDE, LEDT e IDE+LEDT, apresentaram um aumento significativo nos níveis de OXPHOS no complexo V (em 125,0%, 94,1% e 182,3%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdxC* controle (Fig. 17 B,C). Além disso, as células musculares *mdxC* tratadas com IDE + LEDT também mostraram um aumento significativo no complexo II e I (em 39,1% e 55,4%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdxC* controle (Fig. 17 B, C).

Em relação ao PGC-1 α , observou-se que as células musculares *mdxC* tratadas com IDE, LEDT, e IDE+LEDT apresentaram um aumento significativo (em 27,0%, 32,8% e 27,0%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdxC* controle (Fig. 17 D,E). Resultados semelhantes também foram observados no PPAR δ onde as células musculares *mdxC* tratadas com IDE, LEDT, e IDE+LEDT apresentaram um aumento significativo (em

66,6%, 33,3% e 38,8%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 17 D,E).

Por outro lado, apenas as células musculares *mdx* tratadas com IDE+LEDT apresentaram um aumento significativo nos níveis de SIRT-1 (31,8%), em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 17 D, E).

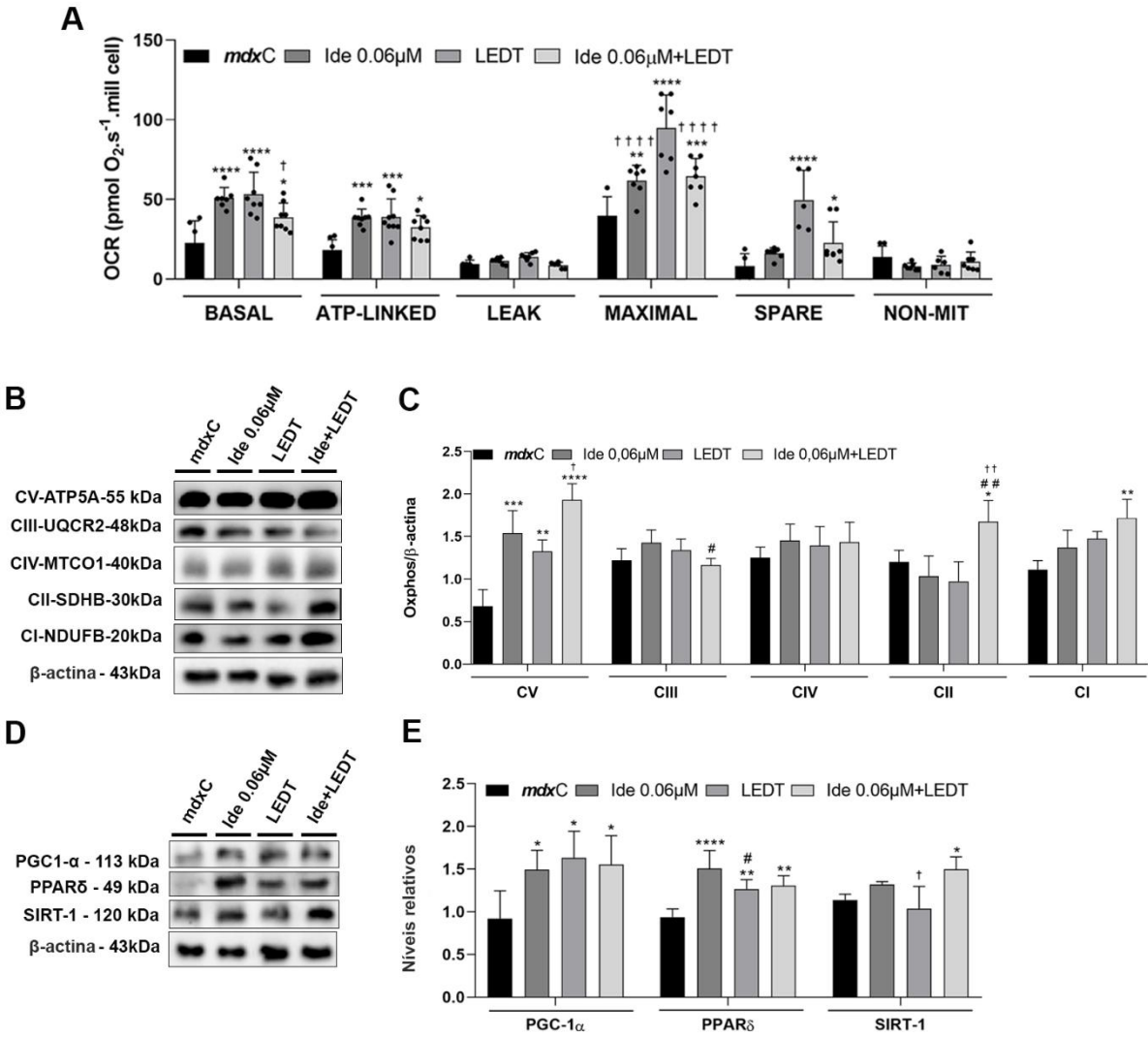


Figura 17: Parâmetros mitocondriais. **A.** OCR foi mensurado em cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM de Idebenona + LEDT. As medidas foram feitas para capacidade basal, ligada a ATP, vazamento, capacidade máxima e sobressalente **B.** Análise de *Western Blotting* de OXPHOS e **D.** PGC-1α, PPARδ, SIRT-1 em cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM de Idebenona + LEDT. Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β-actina (linha inferior; usada como controle). **C e E.** O gráfico mostra os níveis relativos de proteína nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P < 0,05 difere do grupo *mdxC*; **P < 0,01 difere do grupo *mdxC*; ***P < 0,001 difere do grupo *mdxC*; ****P < 0,00001 difere do grupo *mdxC*; # P < 0,05 difere do grupo Ide 0,06 µM; ##P < 0,01 difere do grupo Ide 0,06 µM; †P < 0,05 difere do grupo LEDT; ††P < 0,01 difere do grupo LEDT; ††††P < 0,00001 difere do grupo LEDT. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.1.8 Análise dos marcadores de autofagia – mitofagia

Para analisar o papel da autofagia-mitofagia em células musculares distróficas controle e tratadas (IDE, LEDT, e IDE + LEDT), avaliou-se quatro marcadores: LC3 (I/II), Sequestossomo 1 (SQSTM1/p62), Beclin-1 e Parkin.

Em relação ao LC3, são detectadas duas bandas após imunotransferência; a banda de 16 kDa que representa a LC3-I (proteína citosólica), e a outra de 14 kDa que é a LC3-II (presente em membranas de isolamento e autofagossomos). Sob nossas condições experimentais, nenhuma diferença significativa nos níveis de LC3 (II/I) foi observada entre os grupos experimentais (Fig. 18 A, B).

Também analisamos o acúmulo do sequestossomo 1 (SQSTM1), que é responsável por ligar proteínas ubiquitinadas à maquinaria autofágica para degradação. Observou-se que os níveis de SQSTM1/p62 foram significativamente reduzidos nas células musculares *mdx* tratadas com LEDT (em 35,0%) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 18 A, C). Por outro lado, as células musculares *mdx* tratadas com IDE 0,06μM e/ou IDE+LEDT mostraram um aumento significativo nos níveis de SQSTM1/p62 (em 69,8% e 58,7%, respectivamente), em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 18 A,C).

Em nossos experimentos, observou-se que as terapias aplicadas em conjunto (IDE + LEDT), levaram à regulação positiva de proteínas envolvidas na via da mitofagia. Foi observado que os níveis de Beclin-1 e Parkin aumentaram significativamente nas células musculares *mdx* tratadas com IDE+LEDT (em 35,7% e 34,1%, respectivamente) em comparação com as células musculares utilizadas como controle (Fig. 18 A, D, E).

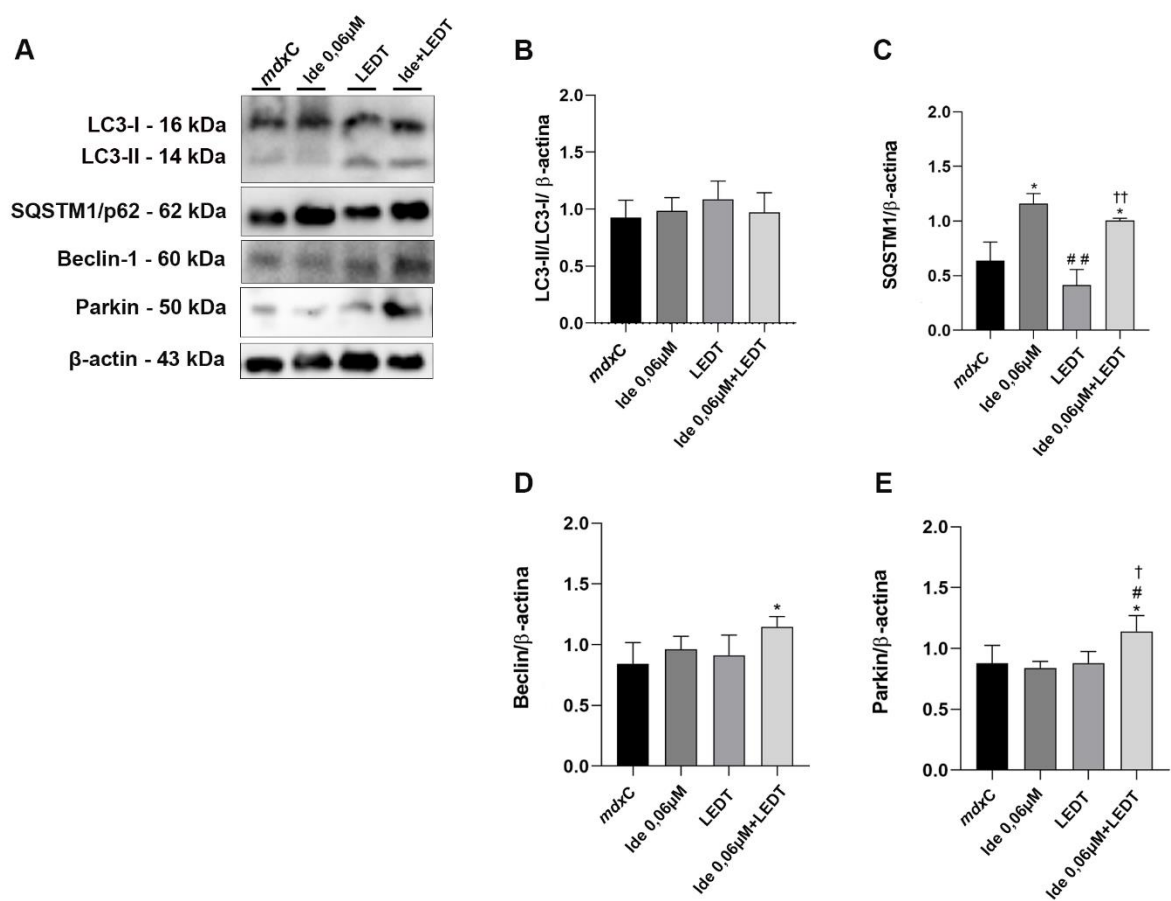


Figura 18: Western Blotting dos marcadores de autofagia – mitofagia: **A.** Análise de Western Blotting de LC3, SQSTM1, Beclin e Parkin em cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06 μ M); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06 μ M de Idebenona + LEDT. Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). **B.** LC3; **C.** SQSTM1; **D.** Beclin; **E.** Parkin. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P< 0,05 difere do grupo *mdxC*; #P< 0,05 difere do grupo Ide 0,06 μ M; ##P< 0,01 versus Ide 0,06 μ M; † P< 0,05 difere do grupo *mdxL*; †† P< 0,01 difere do grupo *mdxL*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.1.9 Análise dos reguladores de autofagia

Nos músculos esqueléticos, a autofagia é regulada por diferentes vias de sinalização. Nós avaliamos no presente estudo a proteína quinase ativada por monofosfato de 5'-adenosina (AMPK); alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina (mTORC1); fator nuclear κ B (NF- κ B); e as vias de sinalização do fator de crescimento transformador (TGF- β).

Em relação aos níveis de AMPK, não foi observada diferença entre os grupos experimentais (Fig. 19 A, B). Por outro lado, os níveis de p-AMPK foram significativamente aumentados nas células musculares *mdx* tratadas com IDE+LEDT (em 120,0%) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 19 A, C).

Em relação à proteína mTORC1, observou-se níveis aumentados nas células musculares

mdx tratadas com IDE e LEDT (em 106,2% e 39,5%, respectivamente) em comparação com as células musculares utilizadas como controle (Fig. 19 A,D). Os níveis de NF-κB foram significativamente reduzidos nas células musculares *mdx* tratadas com IDE, LEDT e IDE+LEDT (em 25,8%, 46,4% e 33,0%, respectivamente) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 19 A, E).

Em relação aos níveis de TGF-β, foi observado um aumento significativo nas células musculares *mdx* tratadas com IDE e IDE+LEDT (em 88,9% e 76,4%, respectivamente) em comparação com o músculo *mdx* controle células (Fig. 19 A, F).

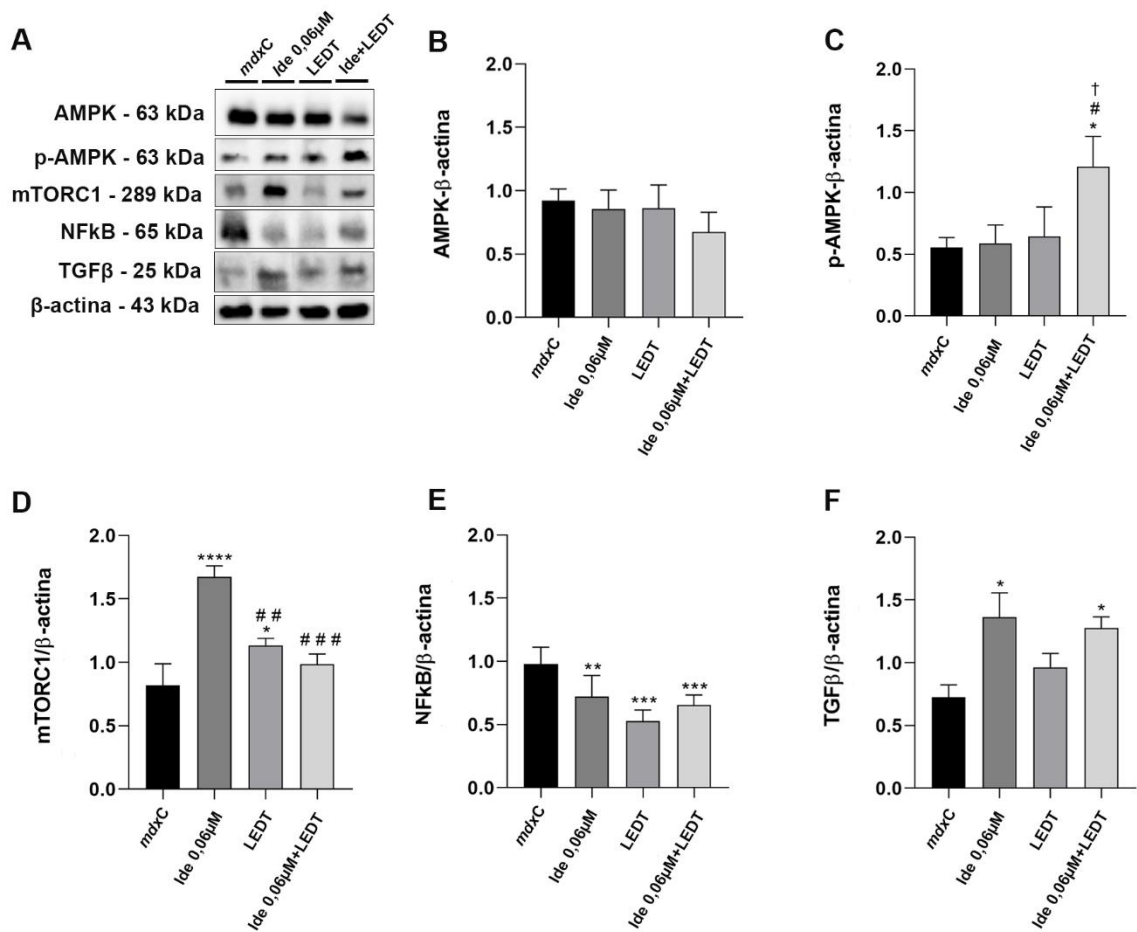


Figura 19: Western Blotting dos reguladores de autofagia: **A.** Análise de *Western Blotting* de AMPK, p-AMPK, mTORC1, NFκB, TGF-β em cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06μM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06μM de Idebenona + LEDT. Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β-actina (linha inferior; usada como controle). **B.** AMPK; **C.** p-AMPK; **D.** mTORC1; **E.** NFκB; **F.** TGF-β. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P < 0,05 difere do grupo *mdxC*; **P < 0,01 difere do grupo *mdxC*; ***P < 0,001 difere do grupo *mdxC*; ****P < 0,00001 difere do grupo *mdxC*; #P < 0,05 difere do grupo Ide 0,06 μM; ##P < 0,01 difere do grupo Ide 0,06 μM; ###P < 0,001 difere do grupo Ide 0,06 μM; † P < 0,05 difere do grupo LEDT . *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.1.10 Análise dos reguladores de diferenciação celular

Para compreender os mecanismos de ação das terapias isoladas e combinadas, foi analisada também a expressão gênica dos reguladores de diferenciação celular, tais como MyoD e miogenina, como mostra a (Fig. 20, A-B).

Observa-se que a expressão relativa de mRNA de MyoD foi significativamente menor nas células musculares *mdx* tratadas com IDE (em 42,3%); LEDT (em 53,8%) e IDE+LEDT (em 34,6%) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 20, A).

Por outro lado, a expressão relativa de mRNA da miogenina foi significativamente maior nas células musculares *mdx* tratadas com IDE (em 85,7%); LEDT (em 85,7%) e IDE+LEDT (em 107,1%) em comparação com as células musculares *mdx* controle (Fig. 20, B)

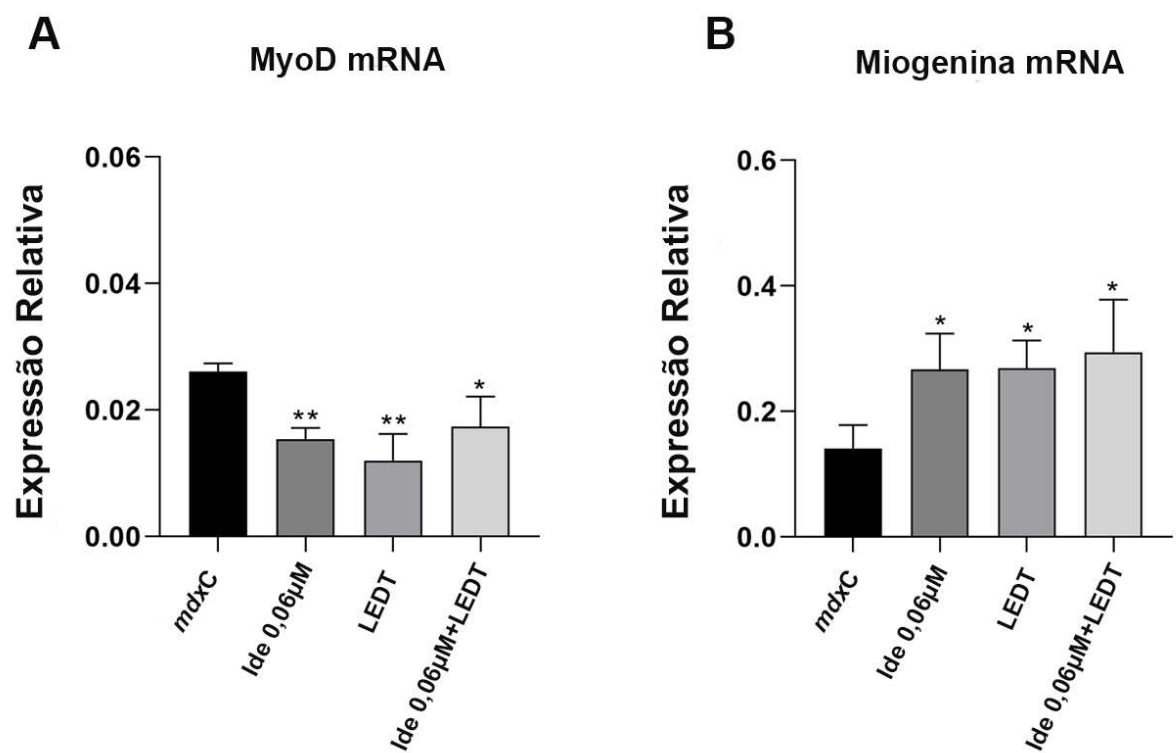


Figura 20. Expressão gênica dos reguladores de diferenciação celular. Análise de qPCR em cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdxC*), tratadas com Idebenona (Ide 0,06µM); com LEDT (850nm e 0,5J) e com 0,06µM de Idebenona + LEDT. **A.** MyoD; **B.** Miogenina. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P < 0,05 difere do grupo *mdxC*; **P < 0,01 difere do grupo *mdxC*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2 Avaliação das terapias “In vivo”

4.2.1 Análise dos parâmetros funcionais

Todos os animais utilizados para os experimentos *in vivo* foram previamente pesados no 14º dia de vida pós-natal (início do tratamento) e 28º dia de vida pós-natal (final do tratamento), a fim de estipular o ganho em porcentagem da massa corporal dos animais de todos os grupos experimentais, conforme demonstrado na Tabela 7.

É possível observar que todos os grupos experimentais ganharam massa corporal durante o período experimental (88,5% no grupo Ctrl; 42,8% no grupo *mdxS*; 43,1% no grupo *mdxL*; 49,2% no grupo *mdxI*; e 62,7% no grupo *mdxI+L*; Tabela 7). Concomitantemente, foi observado aumento no peso relativo do órgão (m. quadríceps) de camundongos *mdx* tratados com LEDT (em 193,7%), IDE (em 156,25%) e IDE+LEDT (em 112,6%) em comparação com os camundongos *mdx* controle (Tabela 7).

Com relação à força muscular, foi realizada a medição da tração da pata dianteira de todos os animais dos grupos experimentais, normalizados pela massa corporal. Observa-se que os grupos Ctrl; *mdxL* e *mdxI+L* apresentaram aumento no ganho de força (23%, 7,1% e 7,1%, respectivamente) durante o período experimental (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros funcionais.

	Ctrl		mdxS		mdxL		mdxI		mdxI+L	
	Ínicio	Final	Ínicio	Final	Ínicio	Final	Ínicio	Final	Ínicio	Final
Massa Corporal (g)	7,0±0,7	13,2±1,2	5,6±0,3 oooo	8,0±0,9 oooo	5,1±0,3 oooo	7,3±1,2 oooo	6,3±0,2 oo * †††	9,4±0,1 oooo * †††	5,9±0,5 ooo†	9,6±0,8 oooo*†††
Ganho de MC (%)	88,5		42,8		43,1		49,2		62,7	
Quadríceps (g/g)	0,01059±0,1		0,003226±0,1 oooo		0,009493±0,1 ****		0,008242±0,09 ****		0,006806±0,2 oo***#	
Força/massa corporal (g/g)	1,3±0,1	1,6±0,01	1,4±0,2	1,4±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1	1,4±0,1	1,4±0,2	1,4±0,1	1,5±0,1
Ganho de força/período (%)	23,0		0		7,1		0		7,1	

A massa corporal (g) foi medida dos animais com 14 dias de vida-pós natal (Início) e com 28 dias de vida pós-natal (Final) após tratamento com Idebena e LEDT. O ganho de massa corporal (MC) foi expresso em porcentagem. A força muscular do membro anterior foi avaliada por meio de medidas de força nos momentos inicial e final e normalizadas pelo peso corporal (g/g). Grupos experimentais: camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebena (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebena e LEDT (*mdxI+L*). Valores expressos por média ± desvio padrão. °° P< 0,001 difere do grupo Ctrl; °°° P< 0,0001 difere do grupo Ctrl; °°°° P< 0,0001 difere do grupo Ctrl; * P< 0,05 difere do grupo *mdxS*; *** P< 0,0001 difere do grupo *mdxS*; **** P< 0,00001 difere do grupo *mdxS*; † P< 0,05 difere do grupo *mdxL*; ††† P< 0,0001 difere do grupo *mdxL*; †††† P< 0,00001 difere do grupo *mdxL*; # P< 0,05 difere do grupo *mdxI*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.2 Análise do processo de degeneração/regeneração muscular

O efeito das terapias (Idebenona e LEDT) isoladas e combinadas sobre o processo de degeneração e regeneração muscular do músculo quadríceps femoral foi avaliado através das análises dos níveis séricos e muscular de CK, pela análise morfológica de fibras positivas ao IgG, pelo número de fibras com núcleos centrais e pelo diâmetro mínimo de *Feret*.

Em relação aos níveis plasmáticos da enzima CK, observou-se um aumento significativo de (1011,7%) do grupo *mdxS* em relação ao grupo Ctrl. No que se refere às terapias, observou-se que apenas o grupo que recebeu tratamento com Idebenona apresentou uma redução significativa de 73,0% em comparação ao grupo *mdxS* (Tabela 8). Em relação aos níveis de CK obtidos das amostras de tecido muscular (quadríceps femoral), observou-se níveis elevados (334,0%) em camundongos *mdx* tratados com IDE+LEDT em comparação aos camundongos *mdxS* (Tabela 8).

Tabela 8: Quantificação dos níveis de CK.

	Ctrl	<i>mdxS</i>	<i>mdxL</i>	<i>mdxI</i>	<i>mdxI+L</i>
Níveis de CK - plasma (U/L)	325,0±173.9	3613±477.9 oooo	3368±1079 oooo	972,7±465.5 *****††††	3105±624,2 oooo# ###
Níveis de CK - muscular (U/L)	2665± 751.2	983,1± 92.08 oo	1079±206.9 ooo	1514±213.3 o	4266±414,6 oooo*****††††# ###

Grupos experimentais: camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Valores expressos por média ± desvio padrão. ° P< 0,05 difere do grupo Ctrl; °° P< 0,001 difere do grupo Ctrl; °°° P< 0,0001 difere do grupo Ctrl; °°°° P< 0,0001 difere do grupo Ctrl; ***** P< 0,00001 difere do grupo *mdxS*; †††† P< 0,00001 difere do grupo *mdxL*; # # # P<0,05 difere do grupo *mdxI*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

Para analisar os danos no sarcolema, utilizou-se o anticorpo IgG (indicativo de fibras degeneradas), que emite fluorescência verde. Observa-se qualitativamente que o grupo Ctrl não apresenta fibras em processo de degeneração, diferentemente dos grupos experimentais *mdxS*, *mdxL*, *mdxI*, *mdxI+L* (Fig. 21, A). No entanto, observa-se também que quantitativamente os grupos *mdxL*, *mdxI* e *mdxI+L* apresentaram redução significativa no número de fibras musculares degeneradas (em 87,0%, 42,3% e 75,0%; respectivamente) em comparação ao grupo *mdxS* (Fig. 21, B).

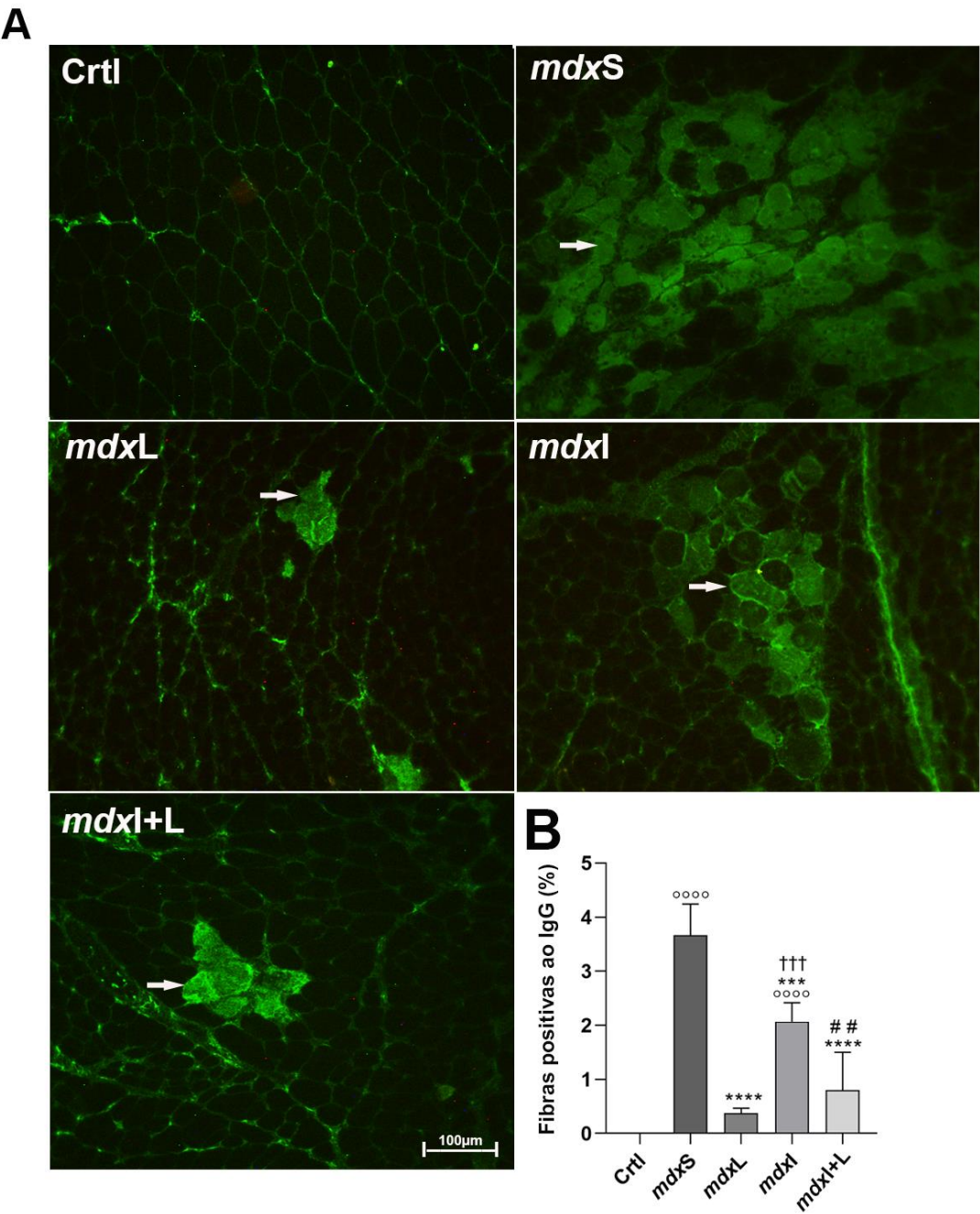


Figura 21. Fibras em degeneração com marcação positiva para IgG (seta branca). **A.** Cortes transversais do músculo quadríceps femoral nos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Fibras positivas ao IgG (seta branca). Aumento 20X. Escala 100µm. **B.** O gráfico mostra a porcentagem de fibras positivas ao IgG do músculo quadríceps femoral nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos por média ± desvio padrão. ○○○○ $P < 0,0001$ difere do grupo Ctrl; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*; ††† $P < 0,001$ difere do grupo *mdxL*; ### $P < 0,01$ difere do grupo *mdxI*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Na (Fig. 22, A), é possível observar a presença de fibras musculares regeneradas (indicado por núcleos centrais) e fibras musculares normais (indicado por núcleos periféricos) no músculo quadríceps femoral de animais distróficos. Com relação aos grupos *mdxL* e *mdxI+L*, observa-se uma redução significativa no número de fibras musculares regeneradas

(em 21,6% e 52,2% respectivamente) em comparação ao grupo *mdxS* (Fig. 22, B). Concomitantemente, os grupos *mdxL* e *mdxI+L* apresentaram aumento no número de fibras musculares normais (em 8,0% e 19,8%, respectivamente) em comparação ao grupo *mdxS* (Fig. 22, B).

Em relação ao diâmetro dessas fibras, observa-se que houve aumento significativo no diâmetro das fibras musculares regeneradas em camundongos *mdx* tratados com IDE (17,9%) IDE+LEDT (12,0%), em comparação com os camundongos *mdxS* (Fig. 22, C). Não foi observada diferença significativa no diâmetro das fibras musculares normais dos grupos experimentais (Fig. 22, D).

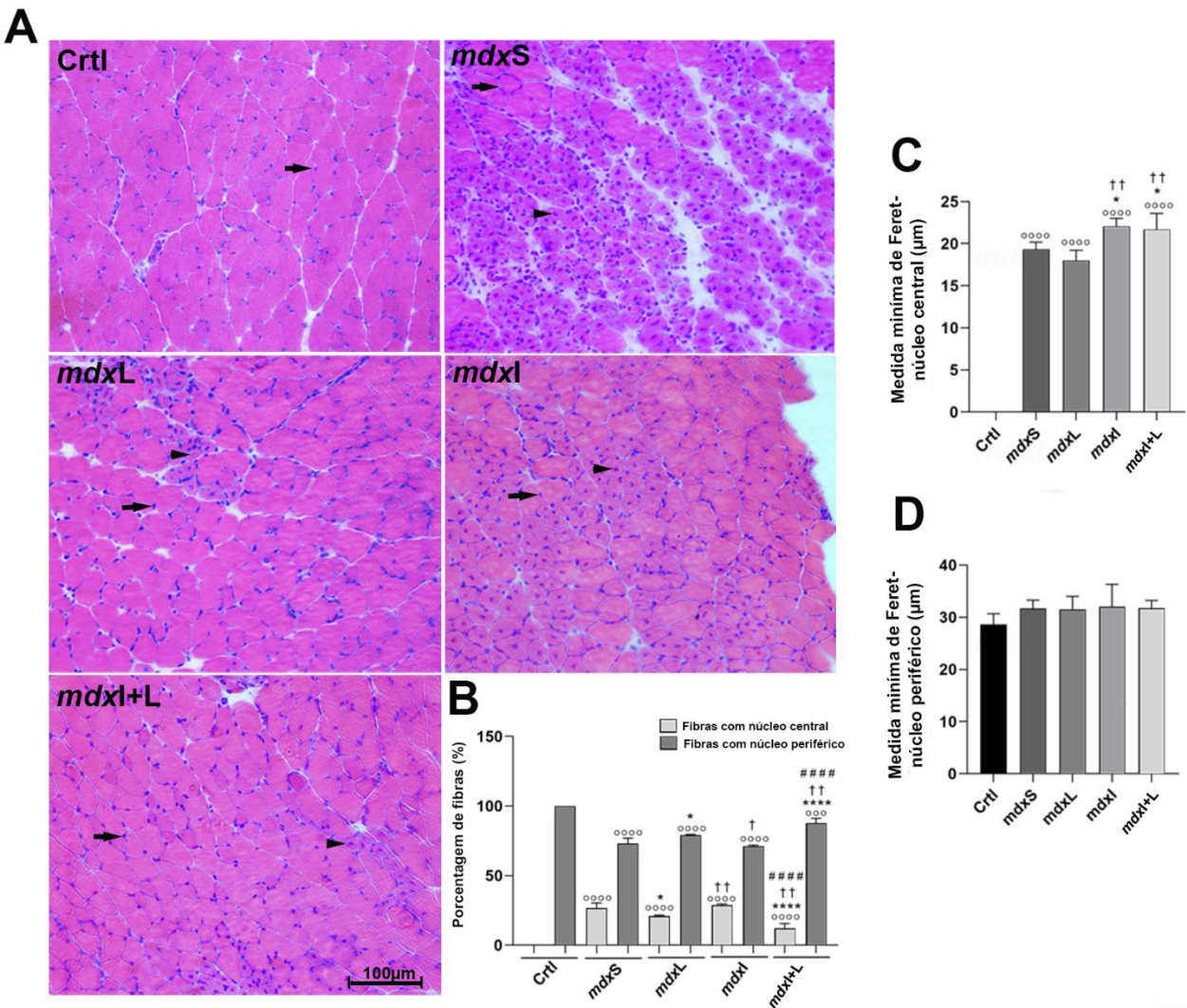


Figura 22. Coloração em HE, mostrando fibras com núcleo central (seta preta) e núcleo periférico (cabeça de seta). A. Cortes transversais do músculo quadríceps femoral nos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Fibras com núcleo central (seta preta) e fibras com núcleo periférico (cabeça de seta). Aumento 20X. Escala 100µm. B. O gráfico mostra a porcentagem de fibras com núcleos centrais e núcleos periféricos dos diferentes grupos experimentais. C. O gráfico mostra o diâmetro mínimo de Feret (µm) de fibras com núcleos centrais. D. O gráfico mostra o diâmetro mínimo de Feret (µm) de fibras com núcleos periféricos. Valores

expressos por média ± desvio padrão. ^{ooo} P< 0,001 difere do grupo Ctrl ^{oooo} P< 0,0001 difere do grupo Ctrl; * P< 0,05 difere do grupo *mdxS* ****P< 0,00001 difere do grupo *mdxS*; [†] P< 0,05 difere do grupo *mdxL*; ^{††} P< 0,01 difere do grupo *mdxL*; ^{###} P<0,00001 difere do grupo *mdxI*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.3 Análise do processo de fibrose

Foi analisada a porcentagem da área de fibrose nos músculos quadríceps femoral dos grupos experimentais pela coloração de tricrômico de Masson (Fig. 23, A). Observa-se que a área de fibrose foi significativamente aumentada no grupo *mdxS* (em 2.476,0%) em comparação ao grupo Ctrl (Fig. 23, B). Os grupos *mdxL*, *mdxI* e *mdxI+L* apresentaram redução significativa da área de fibrose (em 73,6%; 64,9%; e 70,49%; respectivamente) em comparação aos grupos Ctrl e *mdxS* (Fig. 23, B).

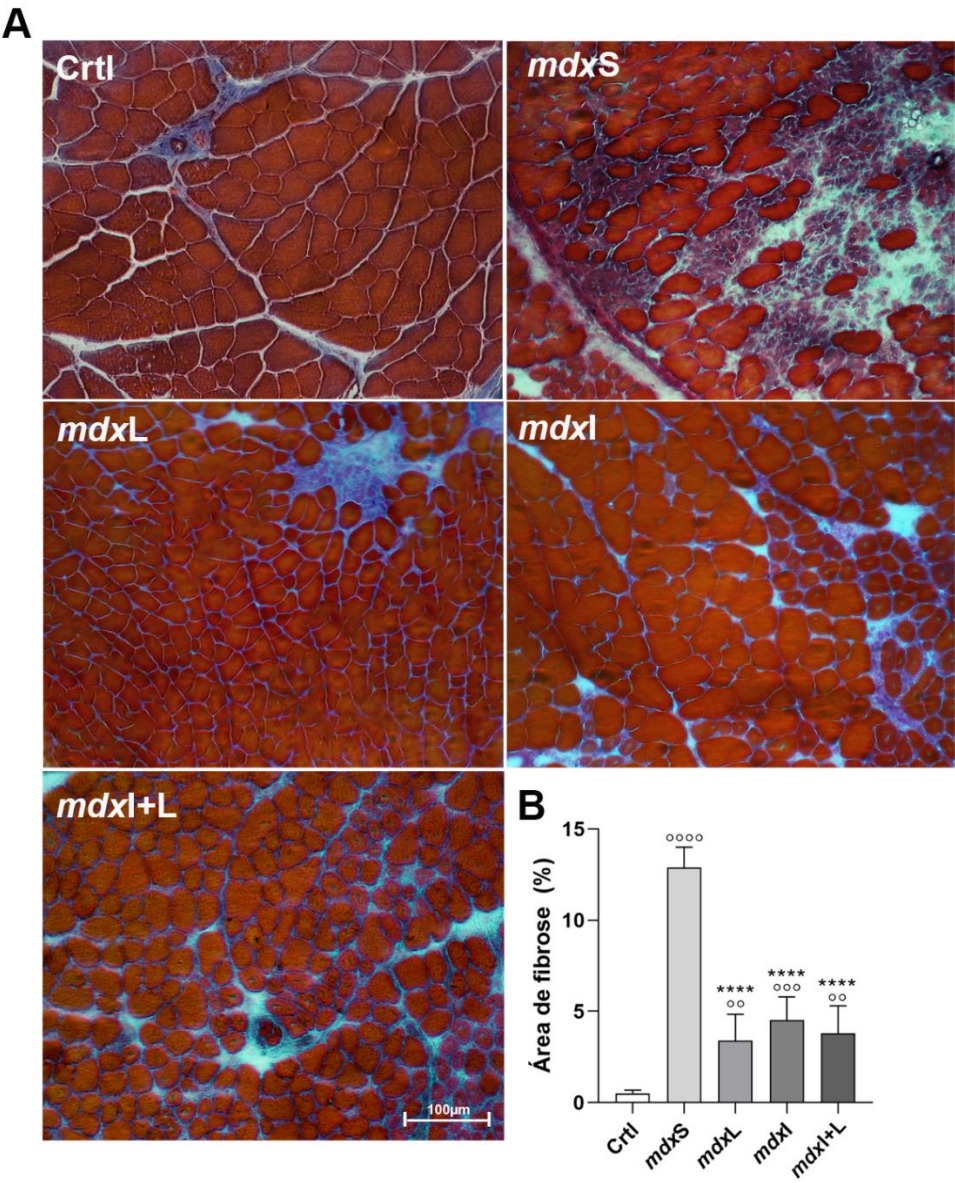


Figura 23. Coloração em TM, mostrando fibrose pela cor verde-luz. A. Cortes transversais do músculo quadríceps femoral nos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Fibrose representada pela cor verde-luz. Aumento 20X. Escala 100µm. **B.** O gráfico mostra a porcentagem de fibrose dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos por média $\pm$ desvio padrão. $^{\circ\circ}$ $P < 0,01$ difere do grupo Ctrl; $^{\circ\circ\circ}$ $P < 0,001$ difere do grupo Ctrl; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.2.4 Análise dos reguladores de diferenciação miogênica

O processo de diferenciação miogênica foi avaliado nos grupos experimentais através das análises dos fatores regulatórios miogênicos: MyoD e miogenina, envolvidas na proliferação e diferenciação celular. Além do mais, foram analisados os níveis da cadeia pesada de miosina (MHC) com suas isoformas lenta (MHC*slow*) e rápida (MHC*fast*), para avaliar fibras musculares já diferenciadas.

Em relação aos reguladores de diferenciação celular, os grupos *mdxI* e *mdxI+L* mostraram uma redução significativa nos níveis de MyoD no músculo quadríceps femoral (36,8%; e 26,5%; respectivamente) em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 24 A,B). Além disso, observou-se que os níveis de miogenina estavam significativamente maiores no grupo *mdxL* (107,0%) em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 24 A, C).

Em relação aos níveis da cadeia pesada de miosina (MHC), os grupos que receberam tratamentos *mdxL*, *mdxI* e *mdxI+L* mostraram uma redução significativa nos níveis de MHC-Fast no músculo quadríceps femoral (em 43,2%; 38,3%; e 50,6%; respectivamente) em comparação ao grupo *mdxS* (Fig. 24 A,D). Por outro lado, os níveis de MHC-Slow foram significativamente maiores no grupo *mdxI* (em 103,9%) e *mdxI+L* (em 98,7%) em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 24 A,E).

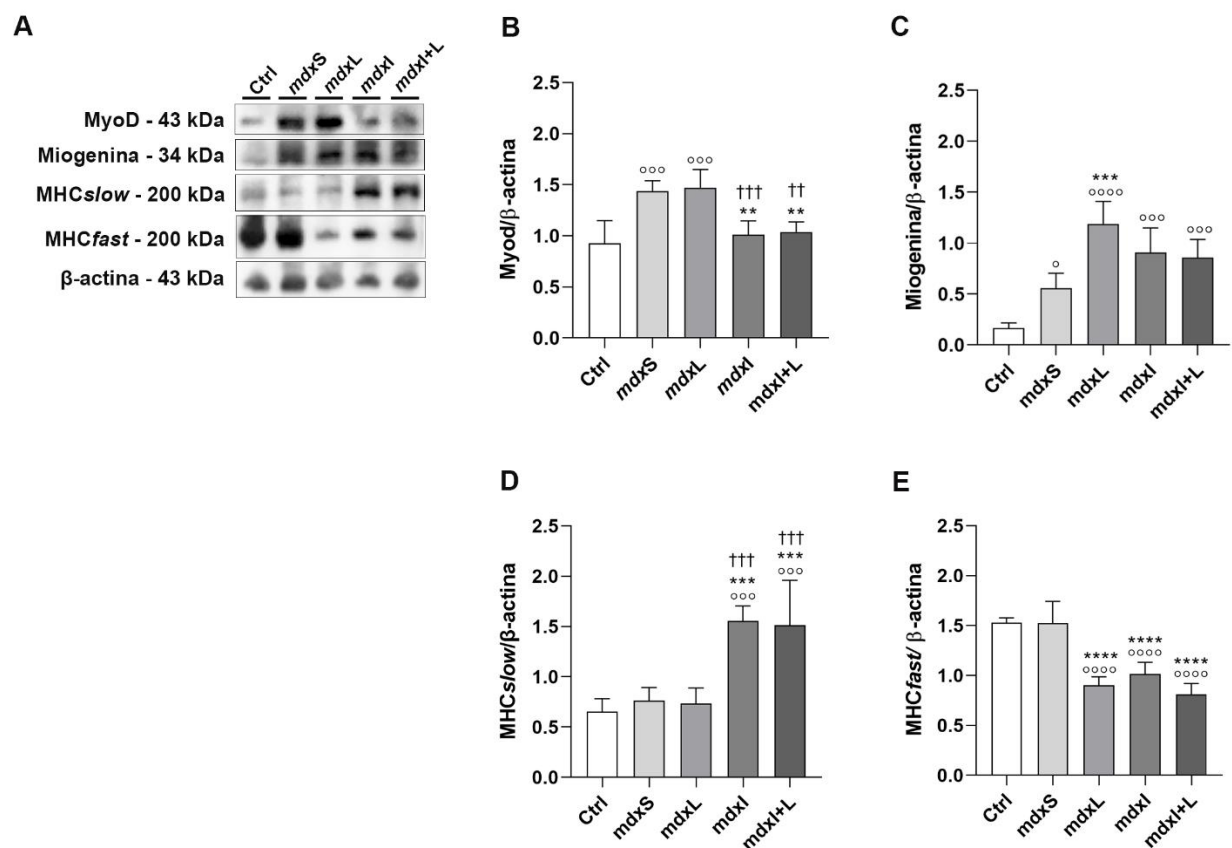


Figura 24. Western Blotting dos reguladores de diferenciação miogênica. A. Análise de Western Blotting de MyoD, Miogenina, MHC-*slow*, MHC-*fast* do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). B. MyoD; C. Miogenina; D. MHC-*slow*; E. MHC-*fast*. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. ° P < 0,05 difere do grupo Ctrl; °° P < 0,001 difere do grupo Ctrl; °°° P < 0,00001 difere do grupo Ctrl; **P < 0,01 difere do grupo *mdxS*; ***P < 0,001 difere do grupo *mdxS*; ****P < 0,00001 difere do grupo *mdxS*; †† P < 0,01 difere do grupo *mdxL*; ††† P < 0,001 difere do grupo *mdxL*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.5 Análise do processo inflamatório

Pela coloração de HE, foi analisada a área inflamatória do músculo quadríceps femoral de todos os grupos experimentais. Neste estudo, observa-se qualitativamente que o grupo *mdxS* apresentou regiões mais extensas de processo inflamatório comparados com o grupo Ctrl, enquanto que, os animais que receberam os tratamentos IDE, LEDT e IDE+LEDT, apresentaram regiões menores de inflamação (Fig. 25, A). Quantitativamente, o grupo *mdxS* teve um aumento significativo em áreas de inflamação (1215,0%) em relação ao grupo controle. Os grupos que receberam tratamentos com IDE, LEDT e IDE+LEDT tiveram uma redução significativa nas áreas de inflamação (81,2%, 66,1%, 77,2%, respectivamente) quando comparados com o grupo *mdxS* (Fig. 25, B).

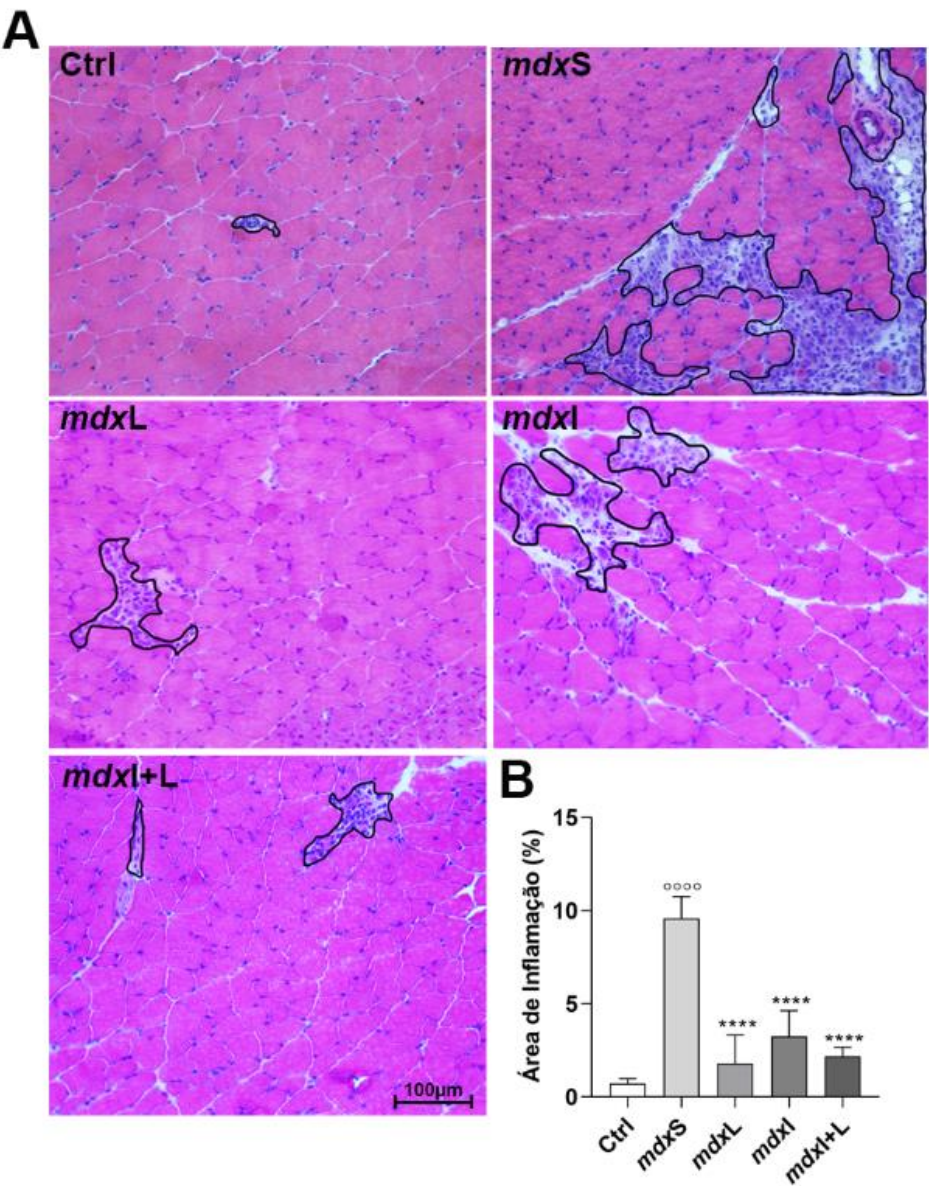


Figura 25: Coloração em HE, mostrando áreas de inflamação (área demarcada). **A.** Cortes transversais do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). **B.** O gráfico mostra a percentual da área de inflamação dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $P < 0,00001$ difere do grupo Ctrl; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Foi determinado também por *imunoblotting* os níveis de TNF. Observa-se que o grupo *mdxS* apresentou níveis elevados de TNF (em 26,8%) quando comparado com o grupo Ctrl (Fig. 26 A,B). Em relação aos tratamentos com LEDT, IDE e IDE+LEDT, observa-se redução (17,3%; 34,6%; 40,4%, respectivamente) comparados ao grupo *mdxS*.

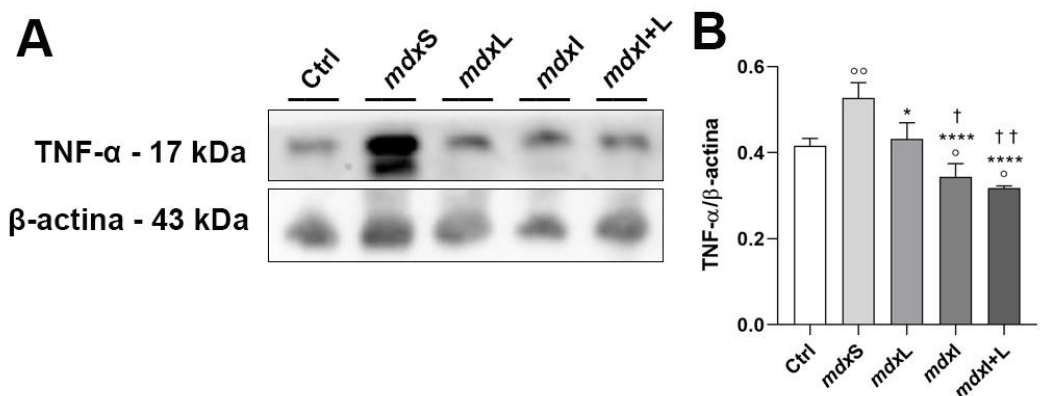


Figura 26. Western Blotting da via inflamatória. A. Análise de *Western Blotting* de TNF- α : Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). B. TNF- α . O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. ° $P < 0,05$ difere do grupo Ctrl; °° $P < 0,01$ difere do grupo Ctrl * $P < 0,05$ difere do grupo *mdxS*; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*; † $P < 0,05$ difere do grupo *mdxL*; †† $P < 0,01$ difere do grupo *mdxL*; # $P < 0,05$ difere do grupo *mdxI*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.2.6 Análise marcadores de autofagia – mitofagia

Foram analisados os marcadores LC3 (II/I), SQSTM1/p62, Parkin e Beclin para avaliar a via da autofagia/mitofagia no modelo experimental *in vivo*.

Em relação aos níveis de LC3 (II/I) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Fig. 27 A, B). No entanto, foram observados maiores níveis de SQSTM1/p62 nos camundongos *mdx* tratados com LEDT (em 234,3%) e IDE+LEDT (em 182,8%), em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 27 A,C).

Em relação aos marcadores de mitofagia, foi observado que os níveis de Parkin foram significativamente maiores no grupo *mdx* tratado com LEDT (40,3%) em comparação aos grupos Ctrl e *mdxS* (Fig. 27 A,E). Já os níveis de Beclin apresentaram aumento significativo no grupo tratado IDE+LEDT (em 54,4%) em comparação com o grupo Ctrl (Fig. 27 A,D).

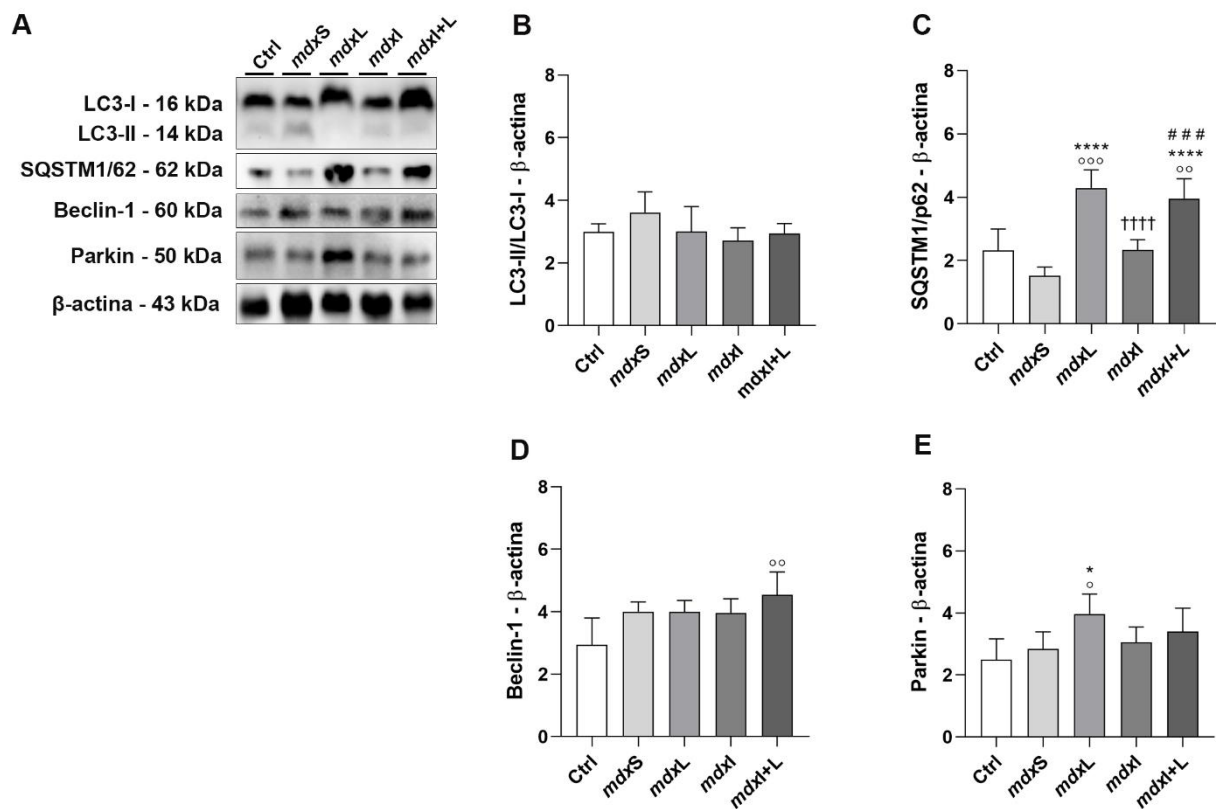


Figura 27. Western Blotting dos marcadores de autofagia – mitofagia. **A.** Análise de Western Blotting de LC3, SQSTM1, Beclin-1, Parkin do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β-actina (linha inferior; usada como controle). **B.** LC3; **C.** SQSTM1; **D.** Beclin; **E.** Parkin. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. ° $P < 0,05$ difere do grupo Ctrl; °° $P < 0,01$ difere do grupo Ctrl; °°° $P < 0,001$ difere do grupo Ctrl; * $P < 0,05$ difere do grupo *mdxS*; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*; †††† $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxL*; #### $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxI*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.7 Análise dos reguladores das vias de sinalização da autofagia

Foram avaliados *in vivo* os níveis de AMPK, p-AMPK, mTORC1 e NF-κB para os analisar a via de sinalização autofágica.

Em relação aos níveis de AMPK e p-AMPK, foi observado no grupo *mdx* tratado com LEDT+IDE um aumento significativo (168,4% e 65,3%, respectivamente) em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 28 A-C). Resultados semelhantes foram obtidos em relação aos níveis de mTORC1, apresentando um aumento significativo nos níveis de mTORC1 em camundongos *mdx* tratados com LEDT+IDE (em 80,0%), em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 28 A,D).

Em relação aos níveis de NF-κB, foram observados redução significativa nos camundongos *mdx* tratadas com IDE e IDE+LEDT (34,0% e 36,2%, respectivamente) em

comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 28 A,E).

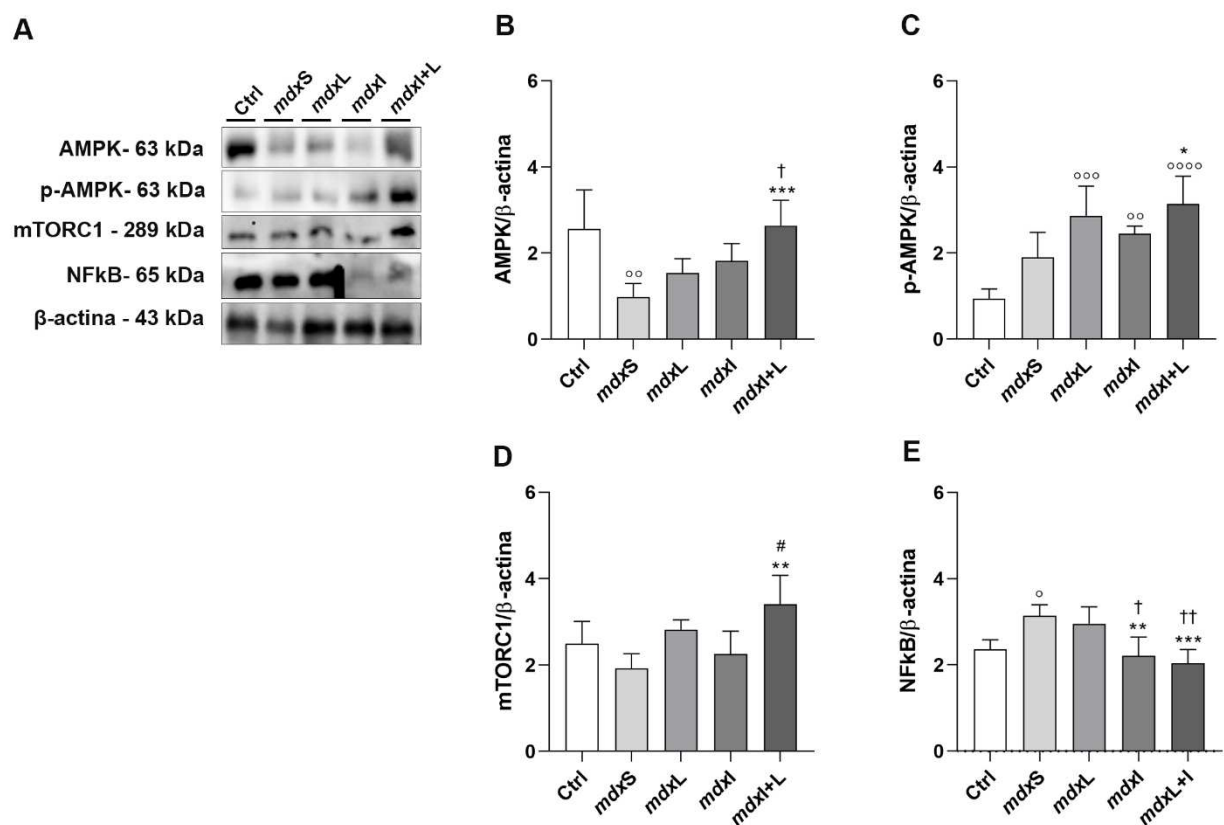


Figura 28. Western Blotting dos reguladores das vias de sinalização da autofagia. **A.** Análise de *Western Blotting* de AMPK, p-AMPK, mTORC1, NFkB do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). **B.** AMPK; **C.** p-AMPK; **D.** mTORC1; **E.** NFkB. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. $^{\circ}$ P < 0,05 difere do grupo Ctrl; $^{\circ\circ}$ P < 0,01 difere do grupo Ctrl; $^{\circ\circ\circ}$ P < 0,001 difere do grupo Ctrl; $^{\circ\circ\circ\circ}$ P < 0,0001 difere do grupo Ctrl * P < 0,05 difere do grupo *mdxS*; ** P < 0,01 difere do grupo *mdxS*; *** P < 0,001 difere do grupo *mdxS*; † P < 0,05 difere do grupo *mdxL*; †† P < 0,01 difere do grupo *mdxL*; $^{\#}$ P < 0,05 difere do grupo *mdxI*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.2.8 Análise dos ativadores da biogênese mitocondrial

Para avaliar a biogênese mitocondrial, nós analisamos os marcadores mitocondriais PGC-1 α , PPAR δ e SIRT-1, no modelo experimental *in vivo*.

Em relação ao PGC-1 α , observa-se que os camundongos *mdx* tratados com LEDT e IDE+LEDT, apresentaram um aumento significativo em 53,9%, e 41% em ambos tratamentos, em comparação com o grupo Ctrl, e de 41,0% e *mdxS*, respectivamente (Fig. 29 A,B).

Em relação ao PPAR δ , observa-se que todos os tratamentos LEDT, IDE e IDE+LEDT apresentaram maiores níveis (86,6%, 64,8%, 94,9% respectivamente) quando comparados

com o grupos Ctrl e que apenas as terapias LEDT e IDE+LEDT apresentaram maiores níveis (34,4% e 40,7%, respectivamente) em relação ao grupo *mdxS* (Fig. 29 A,C). Resultados semelhantes foram obtidos em relação ao SIRT-1, que apresentou maiores níveis nos grupos LEDT e IDE+LEDT (36,7% e 39,7%, respectivamente) em comparação com o grupo *mdxS* (Fig. 29 A, D).

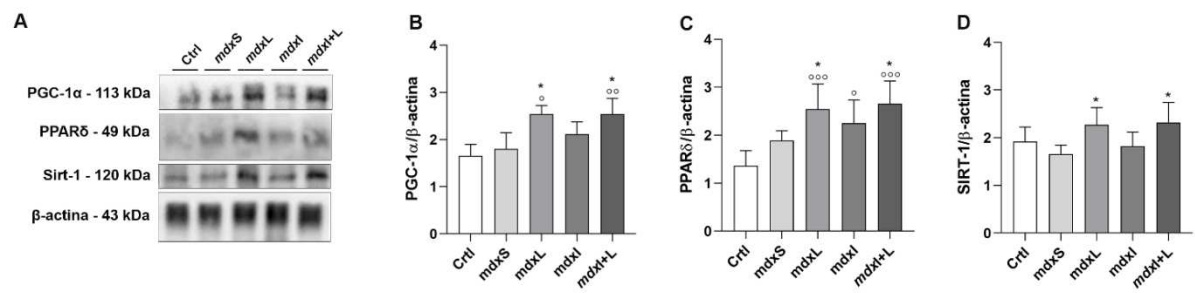


Figura 29. Western Blotting dos ativadores de biogênese mitocondrial. **A.** Análise de *Western Blotting* de PGC-1 α , PPAR δ , SIRT-1 do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). **B.** PGC-1 α ; **C.** PPAR δ ; **D.** SIRT-1. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. $^{\circ}$ $P < 0,05$ difere do grupo Ctrl; $^{\circ\circ}$ $P < 0,01$ difere do grupo Ctrl; $^{\circ\circ\circ}$ $P < 0,001$ difere do grupo Ctrl; * $P < 0,05$ difere do grupo *mdxS*. *One-way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*.

4.2.9 Análise do estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo tecidual, foram analisados os grânulos de lipofuscina, DHE e 4-HNE.

Os grânulos de lipofuscina são um pigmento acastanhado depositados nas fibras musculares, os quais podemos observar em abundância no músculo quadríceps femoral de camundongos *mdxS* (4.666,0%) em relação ao grupo Ctrl (Fig. 30 A,B). Os tratamentos com IDE, LEDT e IDE+LEDT reduziram significativamente esses grânulos (54,7%, 48,0% e 64,3%), respectivamente, comparados com grupo *mdxS*.

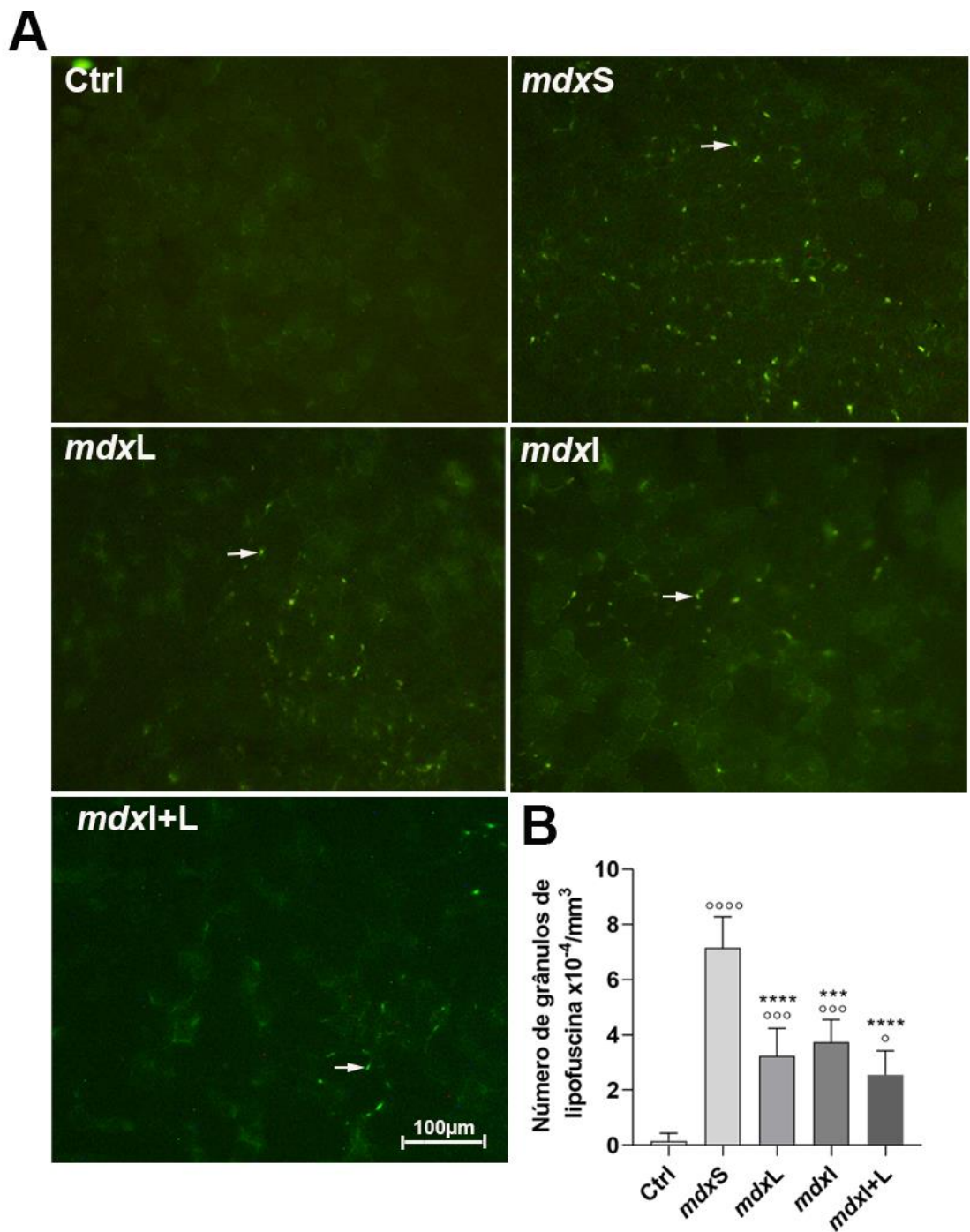


Figura 30: Grânulos de Lipofuscina (seta branca). **A.** Cortes transversais do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Grânulos autofluorescentes de Lipofuscina (seta branca). Aumento 20X. Escala 100µm. **B.** Gráfico mostra o volume de grânulos de Lipofuscina dos grupos experimentais. Dados representados em média ± desvio padrão. ° $P < 0,05$ difere do grupo Ctrl; °°° $P < 0,001$ difere do grupo Ctrl; °°°° $P < 0,00001$ difere do grupo Ctrl; *** $P < 0,001$ difere do grupo *mdxS*; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Em termos da reação do DHE, observa-se que o grupo *mdxS* apresentou maior fluorescência (3.233,0%; indicativo de radicais ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$) em relação ao grupo Ctrl (Fig. 31 A,B). Os tratamentos com IDE, LEDT e IDE+LEDT reduziram significativamente (73,5%, 70,0% e 87,5% respectivamente) a marcação de DHE em comparação ao grupo *mdxS*.

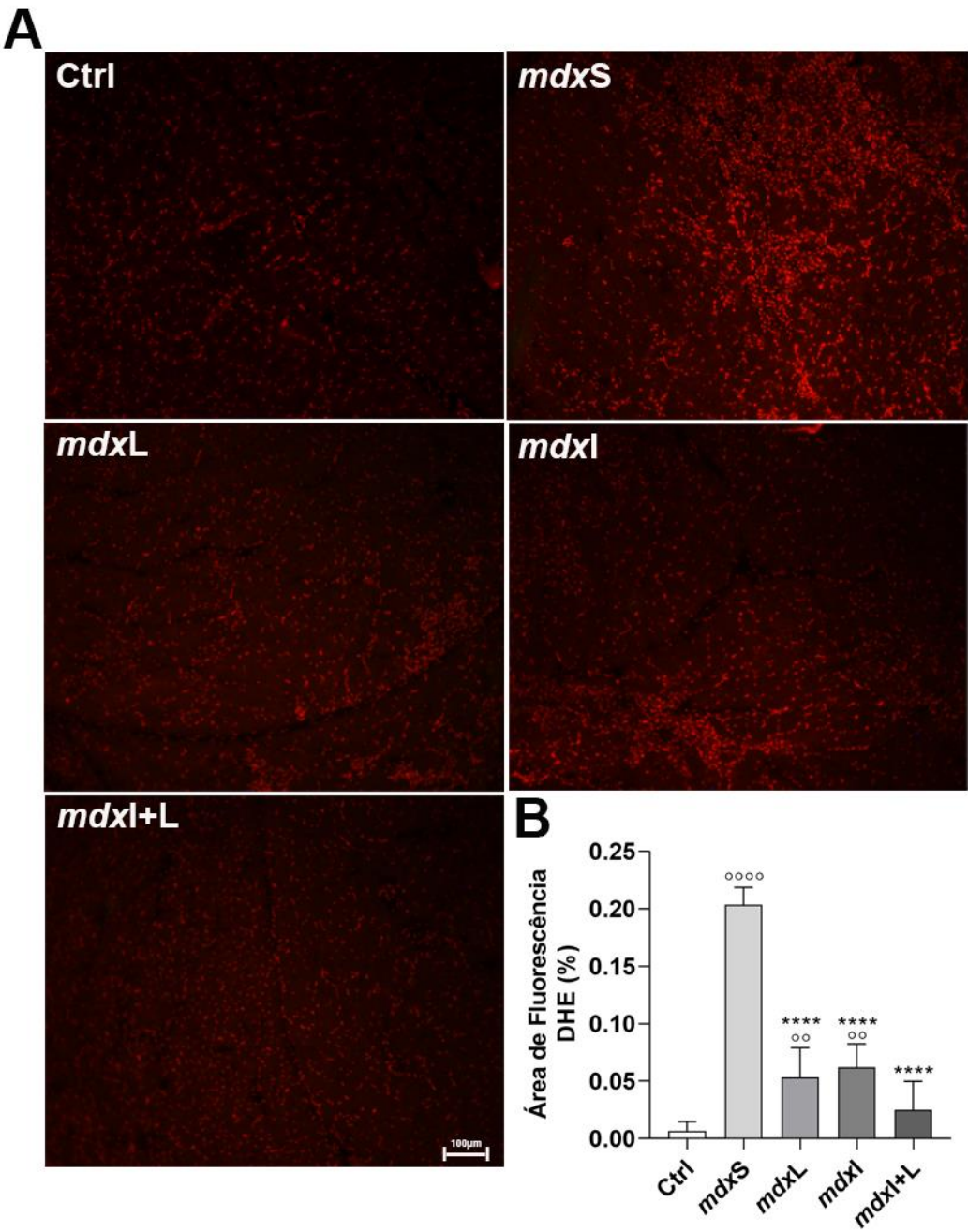


Figura 31: Intensidade de DHE. **A.** Cortes transversais do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Fluorescência de DHE. Aumento 10X. Escala 100µm. **B.** O gráfico mostra a intensidade de DHE dos grupos experimentais. Dados representados em média $\pm$ desvio padrão. °° $P < 0,01$ difere do grupo Ctrl; °°°° $P < 0,00001$ difere do grupo Ctrl; **** $P < 0,00001$ difere do grupo *mdxS*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Em relação ao marcador de peroxidação lipídica (4-HNE), foram observadas neste estudo, bandas de 17 kDa à 150 kDa em todos os grupos experimentais. Os resultados da quantificação dos níveis relativos de 4-HNE no m. quadríceps femoral mostraram um aumento significativo no grupo *mdxS* (16,8%) em relação ao grupo Ctrl. Após tratamento com IDE e IDE+LEDT, houve uma redução significativa deste indicador oxidativo (11,8% e 12,7%, respectivamente) em relação ao grupo *mdxS* (Fig. 32 A,B)

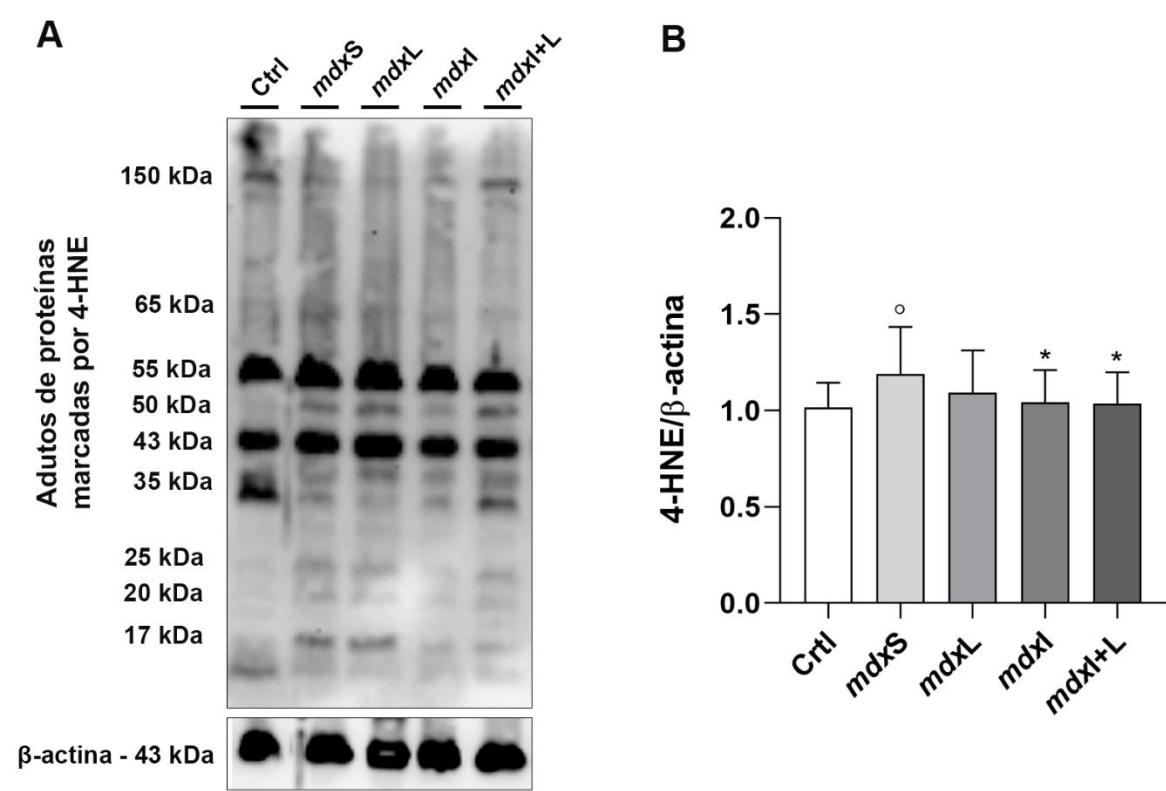


Figura 32. Western Blotting do marcador de estresse oxidativo. A. Análise de Western Blotting de de adutos de proteínas marcadas pelo 4-HNE do músculo quadríceps femoral dos diferentes grupos experimentais: Camundongos C57BL/10 (Ctrl); camundongos *mdx* do grupo Sham (*mdxS*); camundongos *mdx* tratados com LEDT (*mdxL*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona (*mdxI*); camundongos *mdx* tratados com Idebenona e LEDT (*mdxI+L*). Bandas correspondentes às proteínas (linha superior) e β -actina (linha inferior; usada como controle). B. 4-HNE. O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. [°] $P < 0,05$ difere do grupo Ctrl; * $P < 0,05$ difere do grupo *mdxS*. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey

5.0 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós identificamos que a Idebenona combinada com a LEDT em nossas condições experimentais, apresentou efeitos benéficos sobre as células musculares distróficas e sobre o m. quadríceps femoral de camundongos *mdx*, atuando em diferentes mecanismos de ação como: processos de degeneração/regeneração, inflamação, autofagia, regulação do cálcio, estresse oxidativo e parâmetros mitocondriais, como demonstrado na (Fig. 33). Nós organizamos esses resultados em três artigos científicos.

O primeiro artigo científico foi publicado no periódico *Cell Stress and Chaperones* e está intitulado: *LED therapy plus idebenone treatment targeting calcium and mitochondrial signaling pathways in dystrophic muscle cells* (Anexo II). Constituiu dos experimentos exploratórios iniciais com os tratamentos LEDT e Idebenona sobre células musculares *mdx*, analisando a citotoxicidade celular para definição de dose, regulação do cálcio, estresse oxidativo e parâmetros mitocondriais. Foi demonstrado nesse artigo que as terapias combinadas de LEDT e Idebenona mostraram resultados ligeiramente melhores do que os tratamentos isolados em termos de SLN, OXPHOS e SIRT-1.

O segundo artigo científico foi publicado no periódico *Plos one* e está intitulado: *LEDT and Idebenone treatment modulate autophagy and improve regenerative capacity in the dystrophic muscle through an AMPK-pathway* (Anexo III). Reunimos os experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo* em termos de degeneração/regeneração muscular e autofagia. Esse estudo sugeriu que os tratamentos LEDT e IDE melhoraram a autofagia e preveniram a degeneração muscular no músculo distrófico, principalmente pela ativação da AMPK e das vias de sinalização associadas. Foi relatado também que as terapias combinadas de LEDT e Idebenona mostraram resultados ligeiramente melhores do que os tratamentos isolados em termos de Ck muscular, Beclin, Parkin, AMPK, p-AMPK e mTOR.

O terceiro artigo está em fase de escrita e está intitulado: *Photobiomodulation and Idebenone inhibiting inflammation and oxidative stress via PGC-1 α /SIRT-1 in mdx mouse skeletal muscle*. Está sendo abordado nesse artigo a histologia do m. quadríceps e analisados marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de biogênese mitocondrial em animais distróficos no estágio inicial da doença. Destaca-se a modulação do PGC-1 α pelas terapias, uma vez que está associado com a regulação das EROs e de citocinas inflamatórias.

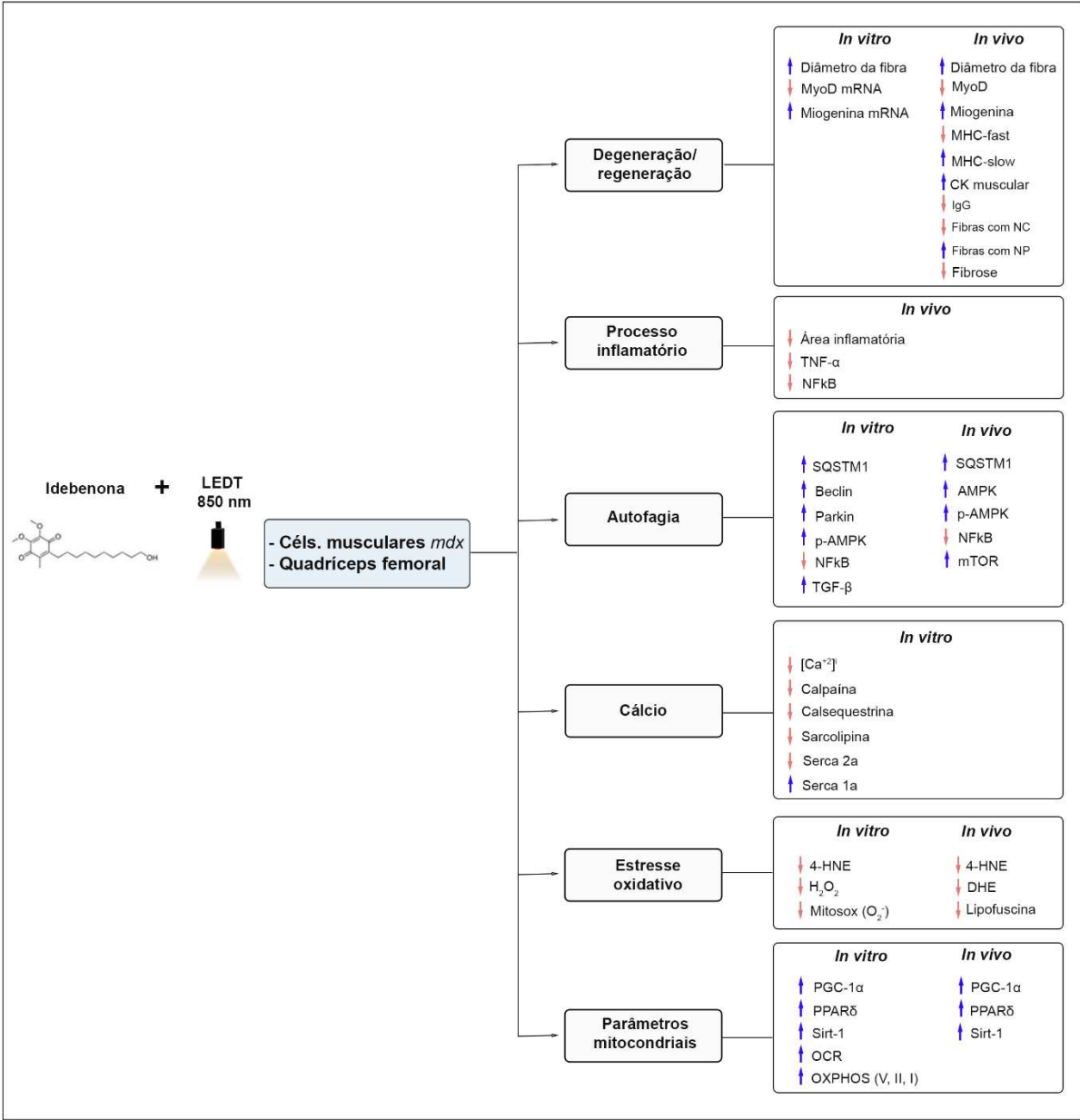


Figura 33: Esquema dos efeitos do tratamento com Idebenona+LEDT. Cultura de células musculares distróficas (estudo *in vitro*) e músculo quadríceps femoral (estudo *in vivo*), quando comparadas com o grupo *mdx* controle.

5.1 Efeitos colaterais dos tratamentos *in vitro* e *in vivo*

No presente estudo, analisou-se o efeito das terapias isoladas de Idebenona e LEDT e/ou a associadas quanto a citotoxicidade celular nos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, através de ensaios biológicos tais como: MTT, Vermelho Neutro e análise da massa corporal.

Com relação aos estudos *in vitro*, nossos resultados demonstraram que as doses superiores a 0,14µM de Idebenona apresentaram redução da viabilidade celular em culturas de células musculares C57BL/10 e *mdx* e que as doses de 0,06µM de Idebenona e 0,5J de LEDT,

analisadas 48 horas após o tratamento, não apresentaram citotoxicidade para essas células. Colaborando com nossos resultados, foram observados efeitos benéficos após administração de 0,05 μ M de Idebenona e 0,5J LEDT em culturas de células distróficas, sem apresentarem efeitos citotóxicos (VALDUGA et al., 2022; ROCHA et al., 2022).

Em contrapartida, em outros tipos celulares foi visto que doses superiores a 0,14 μ M não apresentaram redução da viabilidade celular, diferentemente dos nossos achados, como no estudo de Arend e colaboradores (2015) que utilizaram a dose de 20 μ M de Idebenona em cultura de células da retina e de Palumbo e colaboradores (2002), dos quais utilizaram-se da concentração de 0,50 μ M em cultura de fibroblastos. Desta forma, sugere-se que a Idebenona apresenta uma dose-resposta diferente dependendo do tipo celular. No entanto, com relação a LEDT, foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que independente do comprimento de onda, a LEDT não apresentou efeito citotóxico sobre as células musculares de camundongos *mdx*, demonstrando assim, ser uma terapia segura para a realização de outros testes (ROCHA et al., 2022).

Com relação aos estudos *in vivo*, nossos resultados demonstraram que todos os grupos experimentais obtiveram ganho de massa corporal ao longo do período estudado, demonstrando que o tratamento isolado de Idebenona e LEDT e/ou a associação das duas terapias não apresentaram efeitos colaterais nas nossas condições experimentais.

Na literatura, tem sido relatado que a Idebenona nas doses de 450 a 2250 mg administradas por via oral por 14 dias diariamente, não apresentaram efeitos adversos graves ou clinicamente relevantes em adultos do sexo masculino (Bodmer et al., 2009). Em um outro estudo clínico, realizado com adultos, adolescentes e crianças, também não foi relatado toxicidade até a dose máxima de 75 mg/kg, sugerindo assim, que essa faixa de dose é segura (DI PROSPERO et al, 2007). No presente trabalho, nós utilizamos a dose de 200 mg/kg administrada por via de gavagem em animais C57BL/10 e em camundongos *mdx*, estando dentro da faixa de dose sugerida.

O estudo realizado com a administração de Idebenona 200 mg/kg por 4 semanas em camundongos *mdx* de 10 meses de idade relatou efeitos benéficos na proteção cardíaca e melhora no desempenho do exercício sem apresentar efeitos adversos, o que nos levou a considerar essa dose para nosso estudo experimental *in vivo* (BUYSE et al., 2015).

Com relação a aplicação da fotobiomodulação, trabalhos demonstraram efeitos benéficos após o uso da dose de 3J, utilizando-se do dispositivo laser em camundongos *mdx*, mostrando redução do estresse oxidativo e na modulação da proteína distrofina (SILVA et al.,

2015; ALBUQUERQUE-PONTES et al., 2018). É observado também na literatura que os parâmetros de LLLT e LEDT são vistos em diferentes modelos experimentais e em trabalhos clínicos. No entanto, observa-se que a radiação no infravermelho é a mais utilizada para estudos clínicos (FERRARESI et al., 2012; VIERA et al., 2012; BARONI et al., 2010; LEAL-JUNIOR., 2009). Desta forma, para esse estudo, escolheu-se trabalhar com o dispositivo LED na dose de 3J e no comprimento de onda de 850nm (infravermelho).

5.2 Efeito dos tratamentos sobre a análise funcional

O teste de força muscular é uma ferramenta simples e não invasiva, projetada para avaliar a condição da função muscular. Através do teste *grip strength* é possível analisar a tração das patas dianteiras *in vivo*, a fim de compreender os possíveis benefícios dos tratamentos em relação à atividade muscular (GROUNDS, 2008).

Nas nossas condições experimentais, não foi possível observar diferenças estatísticas significativas entre os grupos ao longo do período estudado, embora tenha-se observado um aumento no ganho de força dos grupos Ctrl, *mdxL* e *mdxI+L* de 23%, 7,1% e 7,1% respectivamente, quando comparados entre o início e final do tratamento, o que difere dos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (DA SILVA et al., 2021; HERMES et al., 2019; MÂNCIO et al., 2017), sugerindo então que o papel da Idebenona na proteção muscular não é suficiente para o ganho de força muscular.

Quanto à aplicação da LEDT, apesar de ser pontual, seus efeitos podem ser sistêmicos. Já é relatado na literatura efeitos sistêmicos após o uso do dispositivo laser que, apesar de ser local, é capaz de liberar fatores de crescimento e citocinas na circulação sanguínea (COELHO et al., 2014; SCHINDL et al., 2002). No entanto, em nossas condições experimentais não foi possível observar alterações sistêmicas em termos de força muscular das patas dianteiras após irradiação com LEDT.

5.3 Efeito dos tratamentos no processo de degeneração/regeneração muscular

Na DMD, as fibras musculares sofrem ciclos repetidos de degeneração e regeneração, levando a exaustão das células satélites, responsáveis pela capacidade regenerativa e atrasos na diferenciação celular (DUMONT et al., 2015; WHITEHEAD et al., 2006). Esses processos podem ser mensurados em estudos pré-clínicos para avaliar a progressão da doença utilizando-se de análises morfológicas, bioquímicas, histológicas e proteicas.

A quantificação do nível sérico de CK é amplamente utilizada como biomarcador para detecção de distrofias musculares, estando presente tanto em humanos quanto em

camundongos *mdx* (BURDI et al., 2009; DE LUCA et al., 2008). Em pacientes com DMD, são observadas alterações de 50 a 100 vezes acima dos limites superiores dos valores de referência (ENGEL et al., 2004). No entanto, o ensaio pode sofrer influências de fatores como: idade, atividade física e tratamentos farmacológicos, o que implicaria na sua utilização como uma análise complementar para acompanhar a progressão da doença (HASHIM et al., 2011).

Uma vez que a mionecrose também causa alterações histológicas, é possível medir a extensão das miofibras danificadas em estudos pré-clínicos, através de análise morfológica das fibras musculares coradas por HE, uma vez que, as miofibras regeneradas em camundongos *mdx* são identificadas pela presença de núcleos centrais (GROUNDS, 2014). Através de técnicas como imunofluorescência é possível identificar também o influxo de substâncias (corantes ou proteínas) que permanecem no sarcoplasma, através do sarcolema danificado, como o IgG (CALL et al., 2013).

Em nossos estudos, observou-se que os níveis séricos de CK estavam elevados nos grupos *mdx* quando comparados com o grupo controle; concomitantemente houve uma redução dos níveis de CK muscular, aumento da porcentagem de fibras positivas ao IgG, fibras com núcleos centrais, aumento do diâmetro dessas fibras e acúmulo de tecido fibroso, sugerindo assim, presença de mionecrose como resultado da distrofinopatia, de acordo com a literatura (GROUNDS, 2008).

Em relação ao tratamento com a Idebenona, nós observamos uma redução dos níveis séricos de CK e em relação aos outros parâmetros analisados, nós observamos que as terapias isoladas de Idebenona e LEDT e/ou associadas apresentaram efeito protetor contra a mionecrose, através da diminuição significativa de fibras positivas ao IgG, redução de fibras musculares com núcleo central e o aumento concomitante de fibras com núcleos periféricos, redução do diâmetro de fibras com núcleos centrais e redução da fibrose no músculo quadríceps femoral analisado.

Os efeitos benéficos na proteção contra a mionecrose observados neste estudo podem ser explicados em partes pela ação antioxidante da Idebenona e da LEDT, uma vez que os danos no sarcolema também ocorrem via peroxidação lipídica (BURDI et al., 2006; MESSINA et al., 2006).

É visto na literatura que tanto a LEDT quanto a Idebenona foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica, induzida pelo estresse oxidativo, em diferentes modelos experimentais (DA ROCHA et al., 2023; AVCI et al., 2021; DOS SANTOS, 2017; LIN et al., 2015).

Consistente com os achados anteriores, nossos resultados também demonstraram redução do marcador 4-HNE tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que corrobora com nossa hipótese.

No presente estudo, também descobrimos que os tratamentos com Idebenona e LEDT levam a uma diferenciação avançada no músculo distrófico, pela regulação negativa dos níveis de MyoD e pela regulação positiva dos níveis de miogenina. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores, que demonstraram melhora na expressão de miogenina no músculo de modelo murino após envenenamento por cobra *Bothrops jararacussu* após aplicação de FBM (VIEIRA et al., 2021) e modulação dos fatores reguladores miogênicos após múltiplos comprimentos de onda de LEDT (DA ROCHA et al., 2022). Além disso, também identificamos a regulação negativa dos níveis de MHC de cadeia rápida e a regulação positiva dos níveis de MHC de cadeia lenta após o tratamento com IDE e LEDT. Esta é uma descoberta interessante, uma vez que as fibras de contração rápida sofrem mais danos do que as fibras de contração lenta no músculo distrófico (WEBSTER et al., 1988).

5.4 Efeito das terapias no processo de inflamação

A resposta inflamatória exacerbada é outro fator contribuinte para a mionecrose das fibras musculares distróficas, observado tanto em pacientes DMD quanto em camundongos *mdx* (RADLEY et al., 2008; RADLEY et al., 2006; HODGETTS et al., 2006; TIDBALL et al., 2005). Em um estado normal, a inflamação tem um papel importante de remover miofibras danificadas e ativar o programa de reparação muscular, no entanto, em um estado inflamatório crônico como já estabelecidos nos músculos distróficos, ocorre a degeneração das miofibras através da superprodução do fator nuclear – κ B (NF- κ B), e de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e a desregulação de macrófagos M1/M2 (VILLALTA et al., 2011; CHEN et al., 2005).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória, sintetizada por macrófagos, células T, mastócitos e fibroblastos. É uma proteína de interesse farmacêutico para estudos com DMD, visto que o bloqueio dessa citocina pode promover melhoras no fenótipo distrófico, reduzindo a necrose muscular (BENNY KLIMEK et al., 2016; GROUNDS & TORRISI, 2004).

A ativação do fator de necrose tumoral (NF- κ B), é outra via que têm um papel proeminente na resposta inflamatória em músculos distróficos, responsável pela ativação do processo de transcrição e expressão de TNF, IL-1 β , IL-6 e outros mediadores inflamatórios (TIDBALL et al., 2018).

No presente estudo, observou-se em relação aos efeitos da Idebenona e da LEDT, uma redução significativa nos parâmetros inflamatórios analisados, como na demarcação da área

inflamatória no músculo quadríceps femoral e redução dos níveis de TNF e NF- κ B. Esses resultados morfológicos e moleculares observados, corroboram com a eficácia anti-inflamatória dos tratamentos aqui estudados encontrados na literatura.

Em relação a fotobiomodulação, é descrito que o seu efeito anti-inflamatório pode estar atrelado à modulação das EROs e de outras vias de sinalização como NO, AMPc e Ca^{2+} (HAMBLIN, 2017). Nós observamos em nosso estudo que a LEDT foi capaz de modular as EROs (H_2O_2 , 4-HNE e O^2) e a concentração de cálcio intracelular (Fluo-4), o que corroboraram para a compreensão de seu mecanismo de ação frente ao processo inflamatório.

Efeitos positivos anti-inflamatórios, também foram vistos em relação a Idebenona em diferentes modelos experimentais, tais como: lúpus (BLANCO et al., 2020), neuroinflamação (PENG et al., 2020), colite ulcerativa (SHASTRI et al., 2020) sepse (HILL et al., 2009), nanotoxicidade (FADDA et al., 2018) e aterosclerose (JIANG et al., 2020). Este efeito não pode ser explicado apenas pela atividade antioxidante ou normalização do fornecimento de energia, mas também pela ação da Idebenona em prevenir a liberação de mtDNA e a subsequente ativação do inflamassoma LAMP3, interferindo nos primeiros estágios da cascata pró-inflamatória (PENG et al., 2020).

5.5 Efeito dos tratamentos no processo de autofagia

Vários estudos sugeriram que a autofagia desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase muscular, e a sua desregulação tem sido associada à atrofia muscular e miopatia (XIA et al., 2021). Neste estudo, detectamos que o tratamento com LEDT e IDE modula o fluxo autofágico aumentando os níveis de SQSTM1/p62, Beclin e Parkin. O tratamento com LEDT e IDE desencadeia a autofagia em fibras musculares distróficas, regulando positivamente as vias AMPK e TGF- β ou suprimindo a sinalização de NF- κ B, conforme resumido na (Fig. 34).

As vias de sinalização da AMPK desempenham um papel importante na sobrevivência, proliferação e metabolismo celular. Além disso, a AMPK tem algumas ligações com os genes centrais da via autofágica (ZHU et al., 2021). Descobrimos que o tratamento com IDE e LEDT ativou a via da AMPK, regulando positivamente os níveis de p-AMPK. De acordo com nossos resultados, um estudo anterior mostrou que o FBM desencadeou a via AMPK/PGC-1 α para reparar a bioenergética mitocondrial e promoveu efeitos neuroprotetores após lesão medular (ZHU et al., 2021). Também foi relatado que a ativação da AMPK estimulou a autofagia e melhorou a distrofia muscular no músculo diafragma de camundongos *mdx* (PAULY et al., 2009).

A ativação da AMPK induz a autofagia através de pelo menos dois mecanismos no músculo esquelético: regulação negativa da mTOR e ativação da ULK1 (Unc-51-Like Kinase 1, um ortólogo mamífero de Atg1) por fosforilação direta (WANG et al., 2022; LEE et al., 2010). No presente estudo, o tratamento com LEDT e IDE induziu a autofagia em fibras de células musculares distróficas, mas não foi associado a evidências de inibição de mTORC1. Assim, especulamos que a autofagia induzida por IDE + LEDT em nossas condições experimentais pode ter ocorrido, pelo menos em parte, através de um mecanismo independente de mTOR. É possível que isso envolva potencialmente a fosforilação direta de ULK1 pela AMPK, conforme sugerido por trabalhos anteriores (EGAN et al., 2011; KIM et al., 2011; LIU et al., 2001).

Vários estudos também demonstraram que a autofagia está sujeita à influência de múltiplos fatores de transcrição, como TGF- β e NF- κ B (XIA et al., 2021). O TGF- β tem papel importante na regulação da massa muscular, proliferação e diferenciação de mioblastos, também foi relatado que ativa a autofagia (LEE et al., 2010; SCHABORT et al., 2009; LIU et al., 2001). Em relação ao NF- κ B, esse fator pode estimular e inibir a autofagia (por exemplo, a sinalização do NF- κ B pode ativar a mTOR, promovendo a expressão do inibidor da autofagia) (XIA et al., 2021). Além disso, o NF- κ B também está relacionado à fraqueza muscular tanto em condições fisiológicas quanto fisiopatológicas, intensificando primeiramente, a expressão de proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina-proteassoma, o que estimularia a perda do músculo esquelético; por segundo, é responsável por aumentar a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, que agravariam a perda muscular esquelética; e finalmente, uma vez ativado pode dificultar a regeneração das miofibras em resposta a danos (LI et al., 2008). Portanto, nossos resultados em relação ao TGF- β e NF- κ B também podem contribuir para a modulação da autofagia em células musculares distróficas tratadas com LEDT e IDE. Além disso, é importante destacar que a regulação positiva do TGF- β (KHAN et al., 2021) e a regulação negativa do NF- κ B pelo FBM (DA ROCHA et al., 2022) e IDE (VALDUGA et al., 2023) já foram observadas. No entanto, a compreensão do papel do TGF- β e do NF- κ B na autofagia muscular ainda é limitada, uma vez que a maioria dos estudos se concentra no câncer, sendo necessárias investigações mais aprofundadas.

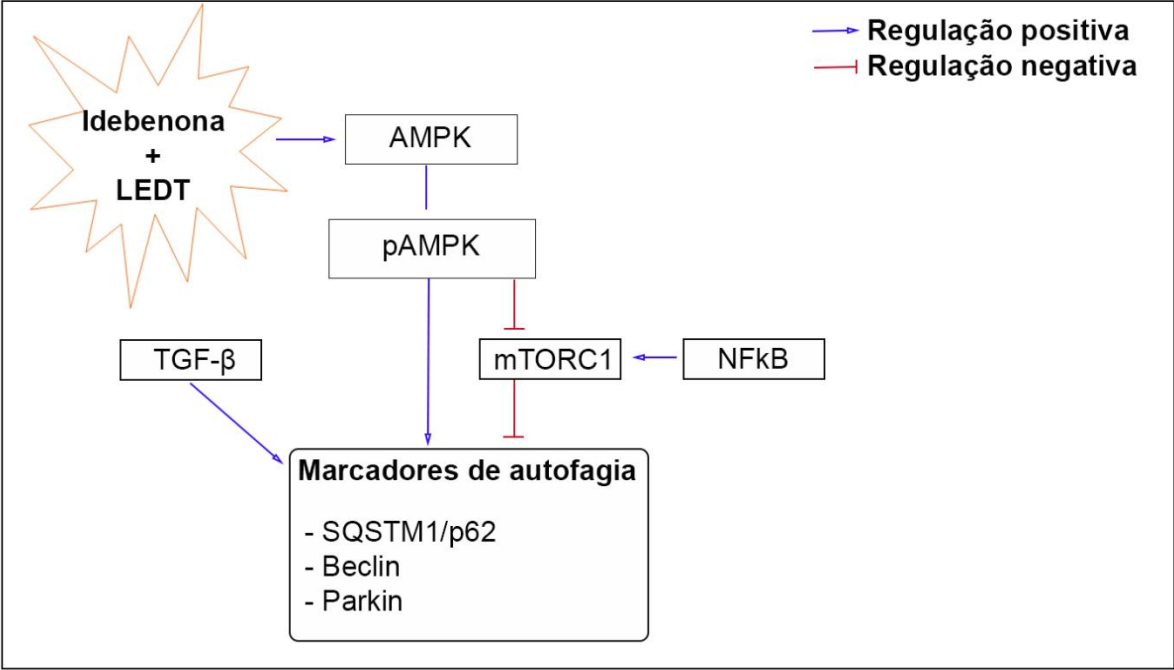


Figura 34: Representação esquemática da autofagia após tratamentos com Idebenona+LEDT. Fonte: autoria

5.6 Efeito das terapias nas vias de regulação do cálcio

Embora os mecanismos envolvidos na DMD sejam complexos e multifatoriais, a desregularização das concentrações dos íons de Ca^{2+} é um dos principais contribuintes para o início e progressão da doença, estando associado com a ativação de enzimas hidrolíticas, bem como alterações mitocondriais, fatores estes que acabam resultando em necrose da fibra muscular (MAREEDU et al., 2021).

Nas nossas condições experimentais, observamos que o tratamento com IDE e LEDT diminuiu a concentração de $[Ca^{2+}]_i$ nas células musculares *mdx*. Concomitantemente, foi observado diminuição dos níveis de sarcolipina (SLN), um achado significativo para este estudo, uma vez que, estudo anterior demonstrou correlação entre a melhora na homeostase do Ca^{2+} citosólico em camundongos *mdx* sem SLN (TANIHATA et al., 2018).

A SLN é um importante regulador da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), que é exclusivamente expressa no músculo estriado de todos os mamíferos (VANGHELUWE et al., 2005). Um estudo anterior forneceu evidências de que a regulação positiva da SLN está relacionada com a disfunção da SERCA nos músculos esqueléticos e cardíacos da DMD (VOIT et al., 2017). Além disso, camundongos *knockout* para SLN apresentaram um aumento na função da SERCA (BOMBARDIER et al., 2013; TUPLING et al., 2011).

O aumento da atividade ou expressão da SERCA apresenta um alto potencial estratégico de uso farmacológico para o tratamento do músculo esquelético distrófico e de doenças metabólicas, uma vez que a SERCA é responsável por remover $\geq 70\%$ de Ca^{2+} do citosol (NOGAMI et al., 2021; KANG et al., 2016). Além do mais, diferentes estudos vêm mostrando que maiores expressões de SERCA podem aumentar a geração de força e capacidade de exercício em camundongos distróficos e proteger o músculo da perda de função induzida por contração excêntrica e estresse oxidativo (NOGAMI et al., 2021; LINDSAY et al., 2020; QAISAR et al., 2019). É importante destacar que no presente estudo que observamos um aumento nos níveis de SERCA 1, que é a isoforma primária expressa no músculo esquelético de contração rápida (WU & LYTTON, 1993). No entanto, também encontramos uma redução nos níveis de SERCA 2.

A ação da SERCA no músculo esquelético é regulada por proteínas inibitórias, como a SLN (como mencionado anteriormente) e a fosfolamban (PLN) (GAMU et al., 2020). Estudos *in vivo* descobriram que o PLN se liga preferencialmente à SERCA 2, que é altamente expressa no músculo cardíaco e de contração lenta (FAJARDO et al., 2013; BABU et al., 2007). Por outro lado, a SLN tem sido associada à SERCA 1 (MACLENNAN et al., 1973). Assim, esses estudos anteriores podem colaborar com nossos achados sobre SERCA e SLN.

Ainda em relação às vias de sinalização do cálcio, encontramos redução nos níveis de calpaína-1 e calsequestrina após tratamento com Idebenona e LEDT. Já está bem estabelecido que o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ poderia ativar calpaínas, promovendo assim a perda muscular através do aumento da proteólise em músculos distróficos (SPENCER et al., 1995). Além disso, foi relatado que as fibras musculares *mdx* isoladas exibem maior proteólise mediada pela calpaína quando comparadas com fibras musculares normais (GAILLY et al., 2007). Assim, almejar uma redução nos níveis de calpaína é uma abordagem promissora no tratamento da DMD. Por outro lado, a calsequestrina (a proteína de ligação ao cálcio mais abundante) apresentou níveis mais elevados nos músculos poupados de camundongos *mdx* (PERTILLE et al., 2010). Porém, em nossas condições experimentais, observamos redução nos níveis de calsequestrina, sugerindo que a diminuição de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por outras vias, após tratamento com Idebenona e LEDT, reduziu a necessidade de sua regulação positiva.

5.7 Efeito das terapias nas vias de regulação mitocondrial e estresse oxidativo

A disfunção mitocondrial é outra via que está comprometida em músculos distróficos (ROBERT et al., 2001). Um dos mecanismos propostos para o colapso do metabolismo energético celular na DMD, está relacionado com a desregulação dos níveis de cálcio que, em

condições patológicas, leva a uma geração acelerada de EROs, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e sobrecarga mitocondrial (GAGLIANONE et al., 2019). Além disso, o excesso de EROs, contribui também para o estresse oxidativo em músculos distróficos (KYRYCHENKO et al., 2015).

No presente estudo, utilizando tratamento com Idebenona e LEDT, observamos melhora da capacidade oxidativa em células musculares distróficas, pelas análises de OCR e OXPHOS. Concomitantemente, também encontramos níveis reduzidos de EROs e peroxidação lipídica após o tratamento. Um mecanismo principal do efeito benéfico da Idebenona está relacionado a sua capacidade de modular a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, bem como a sua capacidade de proteger as membranas contra a peroxidação lipídica (MUSCOLI et al., 2002). Em relação à LEDT, já é bem conhecida a melhora da função mitocondrial pela estimulação direta da cadeia transportadora de elétrons (SALECHPOUR et al., 2018b). Vários estudos mostraram que a FBM pode melhorar as funções mitocondriais, aumentando o ATP e o potencial de membrana mitocondrial e diminuindo a produção de EROs (SALECHPOUR et al., 2018a, 2018b, 2017).

A via de sinalização entre a desacetilase-1 NAD dependente (SIRT1), o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPARs) e o coativador-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) poderiam ser outra explicação possível para a redução das EROs observados em células musculares distróficas. O PGC-1 α é o principal regulador da biogênese e função mitocondrial em vários tecidos (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2006) e é regulado por PPARs e SIRT1 (CANTÓ & AUWERX, 2009). Em nosso estudo, o tratamento com Idebenona e LEDT aumentou os níveis de SIRT1, PPAR δ e PGC-1 α tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Recentemente, nosso grupo de pesquisa também relatou a correlação entre níveis elevados de PGC-1 α e a redução do estresse oxidativo no músculo distrófico tratado com antioxidantes (MIZOBUTI et al., 2022; SILVA et al., 2021). Em relação à Idebenona, um estudo anterior, colaborando com nossos resultados, mostrou que este antioxidante pode influenciar positivamente a biogênese mitocondrial, aumentando a expressão do gene PPARGC1A em células-tronco pluripotentes de humanos (AUGUSTYNIAK et al., 2017). De acordo com nossos resultados, estudos anteriores demonstraram que a FBM pode induzir a biogênese mitocondrial pelo aumento de SIRT1 e PGC-1 α nas células musculares C2C12 (NGUYEN et al., 2014) e em modelo animal de isquemia cerebral transitória (SALEHPOUR et al., 2019).

6.0 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os resultados demonstram os efeitos benéficos do tratamento com Idebenona e LEDT, administrados isolados ou em conjunto no modelo experimental distrófico. Os tratamentos *in vitro* e *in vivo* não apresentaram toxicidade para as fibras distróficas, com relação a viabilidade celular e ganho de peso. No que diz respeito a compreensão da ação desses tratamentos no fenótipo distrófico, foi observado que ambas as terapias modulam o cálcio e as vias de sinalização mitocondrial, como SLN, SERCA 1 e PGC-1 α , PPAR δ , mas que em conjunto elas apresentaram melhores resultados em termos de SLN, OXPHOS e SIRT-1 em cultura de células primárias de *mdx*; no entanto mais estudos são necessários em modelo animal em termos da via de cálcio para comprovar esses achados. Com relação ao processo autofágico e o processo de degeneração muscular, foi observado *in vitro* e comprovado *in vivo* que os tratamentos com LEDT e Idebenona em conjunto modulam marcadores de autofagia (AMPK, p-AMPK, SQSTM1, mTORC1, NFkB) e atuam na capacidade regenerativa no músculo (Miogenina, MyoD, MHCfast, MHCslow), observando uma melhora no CK (marcador de mionecrose).

Para resumir, nosso estudo sugere que os tratamentos em conjunto atenuam os efeitos deletérios causados pela patologia característica do camundongo *mdx*. Seus efeitos podem-se dar através de atividades distintas: (1) atividade antioxidante direta sobre espécies reativas de oxigênio, que consequentemente reduz o processo inflamatório e melhora a regeneração muscular; (2) modulação de sinalizadores de cálcio, com subsequente melhora mitocondrial e redução das EROs (3) modulação do regulador de biogênese mitocondrial e complexos da cadeia respiratória de oxigênio com melhora da atividade mitocondrial e (4) Modulação de reguladores de autoglia com consequente melhora mitocondrial e da capacidade regenerativa muscular. Esses efeitos benéficos da associação das terapias fotobiomoduladora e antioxidante no estágio inicial da doença são potenciais terapias para a DMD, sendo um complemento ou uma alternativa terapêutica viável para futuros estudos clínicos.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-LOPEZ, B. A.; MORENO-ALTAMIRANO, M. M. B.; DOCKRELL, H. M.; DUCHEN, M. R.; SÁNCHEZ-GARCÍA, F. J. Mitochondria: an integrative hub coordinating circadian rhythms, metabolism, the microbiome, and immunity. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.
- AHN, A. H.; KUNKEL, L. M. The Structural and Functional Diversity of Dystrophin. **Nat. Genet.**, v. 3, p. 283–291, 1993.
- ALBUQUERQUE-PONTES, G. M.; CASALECHI, H. L.; TOMAZONI, S. S.; SERRA, A. J.; FERREIRA, C. D. S. B.; BRITO, R. B. D. O.; LEAL-JUNIOR, E. C. P. Photobiomodulation therapy protects skeletal muscle and improves muscular function of mdx mice in a dose-dependent manner through modulation of dystrophin. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 755-764, 2018.
- ALICJA, J. G.; TIDBALL, S. S.; WELC, M.; WEHLING, H.; PATRYK, K. Therapeutic aspects of cell signaling and communication in Duchenne muscular dystrophy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 4867–4891, 2021.
- ANDREWS, J. G., WAHL, R. A. Duchenne and Becker muscular dystrophy in adolescents: current perspectives. **Adolescent health, medicine and therapeutics**, v. 9, p. 53-63, 2018.
- AREND, N.; WERTHEIMER, C.; LAUBICHLER, P.; WOLF, A.; KAMPIK, A.; KERNT, M. Idebenone prevents oxidative stress, cell death and senescence of retinal pigment epithelium cells by stabilizing BAX/Bcl-2 ratio. **Ophthalmol**, p. 73-82, 2015.
- AUGUSTYNIAK, J.; LENART, J.; ZYCHOWICZ, M.; STEPIEN, P. P.; BUZANSKA, L. Mitochondrial biogenesis and neural differentiation of human iPSC is modulated by idebenone in a developmental stage-dependent manner. **Biogerontology**, v. 18, p. 665–677, 2017.
- AVCI, B.; GÜNAYDIN, C.; GÜVENÇ, T.; YAVUZ, C. K.; KURUCA, N.; & BILGE, S. S. Idebenone ameliorates rotenone-induced Parkinson's disease in rats through decreasing lipid peroxidation. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 3, p. 513-522, 2021.
- AZADGOLI, B.; BAKER, R. Y. Laser applications in surgery. **Ann Transl Med**, v. 4, n. 23, p. 452, 2016.
- BABU, G. J.; BHUPATHY, P.; CARNES, C. A.; BILLMAN, G. E.; PERIASAMY, M. Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 43, p. 215–222, 2007.
- BAKY, N. A. A.; ZAIDI, Z. F.; FATANI, A. J.; SAYED-AHMED, M. M.; & YAQUB, H.

Nitric oxide pros and cons: The role of l-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat. **Brain research bulletin**, v. 1, n. 83, p. 49-56, 2010.

BALABAN, B.; MATTHEWS, D. J.; CLAYTON, G. H.; CARRY, T. Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v. 84, n. 11, p. 843-50, 2005.

BALAKRISHNAN, R.; MAREEDU, S.; BABU, G. J. Reducing sarcolipin expression improves muscle metabolism in mdx mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 322, p. 260–274, 2022.

BARBOSA, A. M.; VILLAVERDE, A. B.; SOUSA, L. G.; MUNIN, E.; FERNANDEZ, C. M.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 4, p.591-7, 2009.

BARONE, V.; RANDAZZO, D.; DEL RE, V.; SORRENTINO, V.; ROSSI D. Organização de proteínas do retículo sarcoplasmático juncional em fibras musculares esqueléticas. **J. Muscle Res. Celular Motil**, v. 36, p. 501-515, 2015.

BARONI, B. M.; LEAL, E. C. J.; GEREMIA, J. M.; DIEFENTHAELER, F.; VAZ, M. A. Effect of light-emitting diodes therapy (LEDT) on knee extensor muscle fatigue. **Photomed Laser Surg**, v. 5, n. 28, p. 653– 8, 2010.

BELLISSIMO, C. A.; GARIBOTTI, M. C.; PERRY, C. G. R. Mitochondrial stress responses in Duchenne muscular dystrophy: Metabolic dysfunction or adaptive reprogramming?. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 323, n. 3, p. C718-C730, 2022.

BENNY KLIMEK, M. E.; SALI, A.; RAYAVARAPU, S.; VAN DER MEULEN, J. H.; NAGARAJU, K. Effect of the IL-1 Receptor Antagonist Kineret (R) on Disease Phenotype in mdx Mice. **PloS one.**, v. 11, n. 5, e0155944, 2016.

BIGGAR, W. D.; KLAMUT, H. J.; DEMACIO, P. C.; STEVENS, D. J.; RAY, P. N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clin Orthop Relat Research**, v. 401, p. 88-106, 2002.

BIRNKRANT, D. J.; BUSHBY, K.; BANN, C. M.; APKON, S. D.; BLACKWELL, A.; BRUMBAUGH, D.; & WEBER, D. R. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 3, p. 251-267.

2018.

BLAKE, D. J.; WEIR, A.; NEWHEY, S. E.; DAVIES, K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiol Rev**, v. 82, p. 291 – 329, 2002.

BLANCO, L. P.; PEDERSEN, H. L.; WANG, X.; LIGHTFOOT, Y. L.; SETO, N.; CARMONA-RIVERA, C.; et al. Improved mitochondrial metabolism and reduced inflammation following attenuation of murine lupus with coenzyme Q10 analog idebenone. **Arthritis & Rheumatology**, p. 72, 2020.

BODMER, M.; VANKAN, P.; DREIER, M.; KUTZ, K. W.; DREWE, J. Pharmacokinetics and metabolism of idebenone in healthy male subjects. **European journal of clinical pharmacology**, .v 65, p. 493-501, 2009.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of molecular medicine**, v. 82, n. 2, p. 102-15, 2004.

BOMBARDIER, E.; SMITH, I. C.; VIGNA, C.; FAJARDO, V. A.; TUPLING, A. R. Ablation of sarcolipin decreases the energy requirements for Ca²⁺ p transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ p -ATPases in resting skeletal muscle. **FEBS Lett**, p. 1687–1692, 2013.

BONALDO, P.; AND SANDRI, . Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Dis. Model. Mech**, v. 6, p. 25–39, 2013.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v. 24, p. 119–124, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J. P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 10, p.675-82, 2004.

BRIYAL, S.; RANJAN, A. K.; & GULATI, A. Oxidative stress: A target to treat Alzheimer's disease and stroke. **Neurochemistry International**, e: 105509, 2023.

BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L.; ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. 817 – 833, 2004.

BROWN, S.C.; FASSATI, A.; POPPLEWELL, L.; PAGE, A.M.; HENRY, M.D.; CAMPBELL, K.P.; DICKSON, G. Dystrophic Phenotype Induced in Vitro by Antibody Blockade of Muscle Alpha-Dystroglycan-Laminin Interaction. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 209–216, 1999.

BUHR, E. D.; VEMARAJU, S.; DIAZ, N.; LANG, R. A.; VAN GELDER, R. N. Neuropsin (OPN5) mediates local light-dependent induction of circadian clock genes and circadian photoentrainment in exposed murine skin. **Curr Biol**, v. 29, p. 3478–3487, 2019.

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

BURDI, R.; DIDONNA, M. P.; PIGNOL, B.; NICO, B.; MANGIERI, D.; ROLLAND, J. F.; CAMERINO, C.; ZALLONE, A.; FERRO, P.; ANDREETTA, F.; CONFALONIERI, P.; DE LUCA, A. First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. **Neuromuscul Disord**, v. 16, n. 2, p. 37 – 48, 2006.

BURDI, R.; ROLLAND, J. F.; FRAYSSE, B.; LITVINOVA, K.; COZZOLI, A.; GIANNUZZI, V.; PALMIERI, B. Multiple pathological events in exercised dystrophic mdx mice are targeted by pentoxifylline: outcome of a large array of in vivo and ex vivo tests. **Journal of applied physiology**, v. 106, n. 4, p. 1311 - 1324, 2009.

BURELLE, Y.; KHAIRALLAH, M.; ASCAH, A.; ALLEN, B. G.; DESCHEPPER, C. F.; PETROF, B. J.; DESROSIERS, C. Alterations in mitochondrial function as a harbinger of 80 cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 48, n. 2, p. 310 – 321, 2010.

BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D. J.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet. Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77-93, 2010.

BUYSE, G. M.; MIEREN, G. V.; D' HOOGE, J. Long-term blinded placebo-controlled study of SNTMC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. **European Heart Journal**, v. 30, p. 116-124, 2009.

BUYSE, G. M.; VAN DER MIEREN, G.; ERB, M.; D'HOOGE, J.; HERIJGERS, P.; VERBEKEN, E.; MEIER, T. Estudo cego de longo prazo controlado por placebo de SNT-

- MC17 / idebenona em camundongos mdx deficientes em distrofina: proteção cardíaca e melhor desempenho no exercício. **Jornal Europeu do Coração**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2009.
- BUYSE, G.M.; GOEMANS, N.; HAUWE, M.; MEIER, T. Effects of glucocorticoids and idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Pediatr Pulmonol**, v. 48, p. 912-920, 2013.
- BUYSE, G.M.; GOEMANS, N.; VAN DER HAUWE, M.; THIJS, D.; GROOT, I.J.M.; SCHARA, U.; CEULEMANS, B.; MEIER, T.; MERTENS, L. Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. **Neuromusc Disord**, v. 21, p. 396-405, 2011.
- BUYSE, G.M.; VOIT, T.; SCHARA, U.; STRAATHOF, C.S.M.; D'ANGELO, M.G.; BERNERT, G.; CUISSET, J-M.; FINKEL, R.S.; GOESMANS, N.; MCDONALD, C.M.; RUMMEY, C.; MEIER, T. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomized placebocontrolled phase 3 trial. **Lancet**, v. 385, p. 1748-1757, 2015.
- CALL, J. A.; WARREN, G. L.; VERMA, M.; LOWE, D. A. Acute failure of action potential conduction in mdx muscle reveals new mechanism of contraction-induced force loss. **J Physiol**, v. 591, n. 15, p. 3765 - 3776, 2013.
- CAMARGO, M. Z.; SIQUEIRA, C. P.; PRETI, M. C.; NAKAMURA, F. Y.; DE LIMA, F. M.; DIAS, I. F.; TOGINHO FILHO, D. O.; RAMOS, S. P. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscledamage in rats. **Lasers in medical Science**, v. 27, n. 5, p. 1051- 8, 2012.
- CANTÓ, C.; AUWERX, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Curr Opin Lipidol**, v. 20, p. 98–95, 2009.
- CHAKKALAKAL, J. V.; THOMPSON, J.; PARKS, R. J.; JASMIN, B. J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 880 – 891, 2005.
- CHEN, Y. W.; NAGARAJU, K.; BAKAY, M.; et al. Early onset of inflammation and later involvement of TGF β in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, p. 826-34, 2005.
- CHEN, Z.; HUANG, S.; LIU, M. The review of the light parameters and mechanisms of photobiomodulation on melanoma cells. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 38, p. 3–11, 2022.
- CHEN, Z.; ZHANG, R.; QIN, H.; JIANG, H.; WANGM A.; ZHANG, X.; HUANG, S.;

SUN, M.; FAN, X.; LU, Z.; LI, Y.; LIU, S.; LIU, M. The pulse light mode enhances the effect of photobiomodulation on B16F10 melanoma cells through autophagy pathway. **Lasers in Medical Science**, v. 38, n. 1, p. 71, 2023.

COELHO, R. C. P.; ZERBINATI, L. P. S.; DE OLIVEIRA, M. G.; WEBER, J. B. B. Systemic effects of LLLT on bone repair around PLLA-PGA screws in the rabbit tibia. **Lasers Med Sci.**, v. 2, n. 29, p. 703–8, 2014.

DA COSTA SANTOS, V. B.; DE PAULA RAMOS, S.; MILANEZ, V. F.; CORRÊA, J. C.; DE ANDRADE ALVES, R. I.; DIAS, I. F.; NAKAMURA, F. Y. LED therapy or cryotherapy between exercise intervals in Wistar rats: anti-inflammatory and ergogenic effects. **Lasers in medical Science**, v. 29, n. 2, p. 599-605, 2013.

DA ROCHA, G. L.; GUIMARÃES, D. S. P. S. F.; DA CRUZ, M. V.; MIZOBUTI, D. S.; DA SILVA, H. N. M.; PEREIRA, E. C. L.; et al. Antioxidant effects of LEDT in dystrophic muscle cells: involvement of PGC-1 α and UCP-3 pathways. **Photochemical & Photobiological Sciences**, p. 1-12, 2023.

DA ROCHA, G. L.; MIZOBUTI, D. S.; DA SILVA, H. N. M.; COVATTI, C.; DE LOURENÇO, C. C.; SALVADOR, M. J.; MINATEL, E. Multiple LEDT wavelengths modulate the Akt signaling pathways and attenuate pathological events in mdx dystrophic muscle cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 21, p. 1257-1272, 2022.

DA SILVA, H. N. M.; COVATTI, C.; DA ROCHA, G. L.; MIZOBUTI, D. S.; MÂNCIO, R. D.; HERMES, T. A.; KIDO, L. A.; CAGNON, V.; PEREIRA, E.; MINATEL, E. Oxidative Stress, Inflammation, and Activators of Mitochondrial Biogenesis: Tempol Targets in the Diaphragm Muscle of Exercise Trained-mdx Mice. **Frontiers in physiology**, 2021.

DA SILVA, T. G.; RIBEIRO, R. S.; MENCALHA, A. L.; & DE SOUZA FONSECA, A. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. **Lasers in Medical Science**, v. 38, n. 1, p. 136, 2023.

DADGAR, S.; WANG, Z.; JOHNSTON, H.; KESARI, A.; NAGARAJU, K.; CHEN, Y.-W.; HILL, D. A.; PARTRIDGE, T. A.; GIRI, M.; FREISHTAT, R. J. ET AL. Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **J. Cell Biol.** v. 207, p. 139-158, 2014.

DE CARVALHO, S. C.; MATSUMURA, C. Y.; SANTO NETO, H. AND MARQUES, M. J. Identification of plasma interleukins as biomarkers for deflazacort and omega-3 based Duchenne muscular dystrophy therapy. **Cytokine** v. 102, p. 55-61, 2018.

DE FREITAS, LUCAS FREITAS; HAMBLIN, MICHAEL R. Proposed mechanisms of

photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of selected topics in quantum electronics**, v. 22, n. 3, p. 348-364, 2016.

DE LUCA, A. et al. Gentamicin treatment in exercised mdx mice: identification of dystrophinsensitive pathways and evaluation of efficacy in work-loaded dystrophic muscle. **Neurobiology of disease**, v. 32, n. 2, p. 243-253, 2008.

DE LUCA, A. Pre-clinical drug tests in the mdx mouse as a model of dystrophinopathies: An overview. **Acta myologica**, v. 31, n. 1, p. 40, 2012.

DE MELO, C. A.; ALVES, A. N.; TERENA, S. M.; FERNANDES, K. P.; NUNES, F. D.; DA SILVA, D. F.; BUSSADORI, S. K.; DEANA, A. M.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. **Lasers in medical Science**, v. 31, n. 3, p. 531- 8, 2016.

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

DI PROSPERO, N. A.; BAKER, A.; JEFFRIES, N.; FISCHBECK, K. H. Neurological effects of highdose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomized, placebo-controlled trial. **Lancet Neurol**, p. 878-886, 2007.

DOS SANTOS, S. A.; SERRA, A. J.; STANCKER, T. G.; SIMÕES, M. C. B.; DOS SANTOS VIEIRA, M. A.; LEAL-JUNIOR, E. C; et al. Effects of photobiomodulation therapy on oxidative stress in muscle injury animal models: a systematic review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; VON MALTZAHN, J.; PASUT, A.; BENTZINGER, C. F.; BRUN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. **Nature Medicine**, v. 21, 2015.

EGAN, D. F.; SHACKELFORD, D. B.; MIHAYLOVA, M. M.; GELINO, S.; KOHNZ, R. A.; MAIR, W.; VASQUEZ, D. S.; JOSHU, A.; GWINN, D. M.; TAYLOR, R.; ASARA, J. M.; FITZPATRICK, J.; DILIN, A.; VIOLLET, B.; KUNDU, M.; HANSEN, M.; SHAW, R. J. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. **Science**, v. 331, p. 456-61, 2011.

EMELYANOV, A. N.; KIRYANOVA, V. V. Photomodulation of proliferation and differentiation of stem cells by the visible and infrared light. **Photomed Laser Surg**, v. 33, p. 164–174, 2015.

- ENGEL, A. G. Muscular Dystrophies. In: Engel A. G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology: basic and clinical**. Ed. 3, v.2, p.961-1012, 2004.
- ENGEL, A. G. Y. M.; FISCHBECK, K. H. Distrophinopathies. *Myology: Basic and Clinical*. A. G. F.-A. Engel, C. **New York, McGraw-Hill**: p. 1133-1187, 1994.
- ESTEVES, G. R.; JUNIOR, I. E.; MASSON, I. F. B.; MACHADO, A. F. P.; OLIVEIRA, M. C. D.; BALDAN, C. S.; FARCIC, T. S.; LIEBANO, R. E.; PLAPLER, H. Photobiomodulation effect in tumoral necrosis factor-alpha(TNF- α) on the viability of random skin flap in rats. **Lasers Med Sci**, v. 37, p. 1495–1501, 2022.
- FADDA, L. M.; HAGAR, H.; MOHAMED, A. M.; ALI, H. M. Quercetin and idebenone ameliorate oxidative stress, inflammation, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in rat liver. **Dose-Response**, v. 16, 2018.
- FAJARDO, V. A.; BOMBARDIER, E.; VIGNA, C.; DEVJI, T.; BLOEMBERG, D.; GAMU, D.; GRAMOLINI, A. O.; QUADRILATERO, J.; TUPLING, A. R. Co-expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human skeletal muscle fibers. **PloS One**, 2013.
- FERRARESI, C.; PANEPUCCI, R.; REIFF, R.; JÚNIOR, E.; BAGNATO, V.; PARIZOTTO, N. Molecular effects of lowlevel laser therapy (808 nm) on human muscle performance. **Phys Ther Sport**, v. 3, n. 13, 2012.
- FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N. A.; PIRES DE SOUSA, M. V.; KAIPPERT, B.; HUANG, Y. Y.; KOISO, T.; BAGNATO, V. S.; HAMBLIN, M. R. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **Journal of biophotonics**, v. 9, n. 9, 2015.
- FINCK, B. N.; KELLY, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 3, p. 615 - 622, 2006.
- FOGAGNOLO MAURICIO, A.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J. Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice. **Clin. Nutr.**, v. 32, n. 4, p. 636 - 642, 2013.
- GAGLIANONE, R. B.; SANTOS, A. T.; BLOISE, F. F.; ORTIGA-CARVALHO, T. M.; COSTA, M. L.; QUIRICO-SANTOS, T.; SILVA, W. S.; MERMELSTEIN. Reduced mitochondrial respiration and increased calcium deposits in the EDL muscle, but not in soleus, from 12-week-old dystrophic mdx mice. **Sci. Rep.**, v. 9, p. 1986, 2019.
- GAILLY, P.; DE BACKER, F.; VAN SCHOOR, M.; GILLIS, J. M. In situ measurements of calpain activity in isolated muscle fibres from normal and dystrophin-lacking mdx mice. **J Physiol**, v. 582, p. 1261–1275, 2007.

- GAMU, D.; JURACIC, E. S.; HALL, K. J.; TUPLING, A. R. The sarcoplasmic reticulum and SERCA: a nexus for muscular adaptive thermogenesis. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 45, p. 1–10, 2020.
- GANLEY, I. G.; LAMDU, H.; WANG, J.; DING, X.; CHEN, S.; JIANG, X. ULK1. ATG13. FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **J. Biol.Chem.**, v. 284, p. 12297–12305, 2009.
- GISSEL, H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, p. 166-180, 2005.
- GODIN, R.; DAUSSIN, F.; MATECKI, S.; LI, T.; PETROF, B. J.; BURELLE, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α gene transfer restores mitochondrial biomass and improves mitochondrial calcium handling in post-necrotic mdx mouse skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 21, p. 5487-5502, 2012.
- GONZÁLEZ-JAMETT, A.; VÁSQUEZ, W.; CIFUENTES-RIVEROS, G.; MARTÍNEZ-PANDO, R.; SÁEZ, J. C.; CÁRDENAS, A. M. Oxidative Stress, Inflammation and Connexin Hemichannels in Muscular Dystrophies. **Biomedicines**, v. 10, p. 507, 2022.
- GROUND M.; RADLEY H.; LYNCH G.; NAGARAJU K.; LUCA A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiology of Disease**, v. 19, 2008.
- GROUND, M. D. The need to more precisely define aspects of skeletal muscle regeneration. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 56, p. 56-65, 2014.
- GROUND, M. D.; TORRISI, J. O. (2004). Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 6, p. 676-682, 2011.
- GRUMATI, P.; AND BONALDO, P. Autophagy in skeletal muscle homeostasis and in muscular dystrophies. **Cells**, v. 1, p. 325–345, 2012.
- GRUMATI, P.; COLETTI, L.; SCHIAVINATO, A.; CASTAGNARO, S.; BERTAGGIA, E.; SANDRI, M. ET A. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. **Autophagy**, v. 7, p. 1415–1423, 2011.
- GUEVEN, N.; WOOLLEY, K , J. Smith, Border between natural product and drug: comparison of the related benzoquinones idebenone and coenzyme Q10, **Redox Biology**, v. 4, 2015.
- GUEVEN, NURI. ET AL. Idebenone: When an antioxidant is not an antioxidant. **Redox biology**, v. 38, e101812, 2021.

- HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, v. 4, n. 3, p. 337-61, 2017.
- HAMBLIN, M. R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochem Photobiol**, v. 94, p. 199–212, 2018.
- HAN, R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 10, 2011.
- HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. **Endocr Rev**, v. 27, p. 728–35, 2006.
- HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463 – 469, 2008.
- HASHIM, R.; SHAHEEN, S.; AHMAD, S.; SATTAR, A.; KHAN, F.A. Comparison of serum creatine kinase estimation with short tandem repeats based linkage analysis in carriers and affected children of duchenne muscular dystrophy. **J. Ayub Med. Coll. Abbottabad**, v. 23, p. 125–128, 2011.
- HAUSER, E.; HOGER, H.; BITTNER, R.; WIDHALM, K.; HERKNER, K.; LUBEC, G. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. **Neuroped.**, v. 26, p. 260-2, 1995.
- HEISKANEN, VLADIMIR; HAMBLIN, MICHAEL R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes?. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1003-1017, 2018.
- HERMES, T. A.; MÂNCIO, R. D.; MACEDO, A. B.; MIZOBUTI, D. S.; ROCHA, G. L.; CAGNON, V. H. A.; et al. Tempol treatment shows phenotype improvement in MDX mice. **PLoS One.**, 2019.
- HILL, A. L.; LOWES, D. A.; WEBSTER, N. R.; SHETH, C. C.; GOW, N. A. R.; GALLEY, H. F. Regulation of pentraxin-3 by antioxidants, Br. **J. Anaesth.** v. 103, 2009.
- HODGETTS, S.; RADLEY, H.; DAVIES, M.; GROUNDS, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, n. 9 – 10, p. 591 – 602, 2006.
- HONG, J. U.; KWON, J. J.; HEO, S. C.; SHIN, S. H.; KIM, H. J.; LEE, J. Y. Effects of photobiomodulation on bone remodeling in an osteoblast-osteoclast co-culture system. **Lasers Med Sci**, v. 37, p.1049–1059, 2022.
- HUANG, Y. Y.; NAGATA, K.; TEDFORD, C. E.; MCCARTHY, T.; HAMBLIN, M. R.

Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **J Biophotonics**, v. 6, p. 829–838, 2013.

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

JABER, S; POLSTER, B.S. Idebenone and neuroprotection: antioxidant, pro-oxidant, or electron carrier? **J Bioenerg Biomembr**, v. 47, p. 111-118, 2015.

JAMEIE, S, B; et al. Combined therapeutic effects of low power laser (980nm) and CoQ10 on Neuropathic Pain in adult male rat. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 28, p. 58, 2014.

JAMES, A. M.; COCHEME, H. M.; SMITH, R. A. J.; MURPHY, M.P. Interactions of Mitochondriatargeted and untargeted Ubiquinones with the Mitochondrial Respiratory Chain and Reactives Oxygen Species. **The Journal of Biological Chemistry**, v 280, n.22, p. 21295-21312, 2005.

JIANFEI DONG, J.; XIONG, D. Applications of Light Emitting Diodes in Health Care. **Annals of biomedical engineerin**, v. 45, n. 11, p. 2509-23, 2017.

JIANG, W.; GENG, H.; LV, X.; MA, J.; LIU, F.; LIN, P.; ET AL. Idebenone protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via activation of the Sirt3- SOD2-mtROS pathway, **Cardiovasc. Drugs Ther**, 2020.

KANG, S.; et al. Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders. **J. Biol. Chem.**, v. 291, p. 5185–5198, 2016.

KHAN, I.; RAHMAN, S. U.; TANG, E.; ENGEL, K.; HALL, B.; KULKARNI, A. B.; ARANY, P. Accelerated burn wound healing with photobiomodulation therapy involves activation of endogenous latent TGF- β 1. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132-41, 2011.

KIM, M. H.; KAY, D. I.; RUDRA, R. T.; CHEN, B. M.; HSU, N.; IZUMIYA, Y. ET AL. Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. **Hum Mol Genet**, v. 20, p.

1324–1338, 2011.

KLIONSKY, D. J. ET AL. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v.12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KYRYCHENKO, V.; POLÁKOVÁ, E.; JANÍČEK, R.; SHIROKOVA, N. Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy. **Cell Calcium**, v. 58, p. 186–195, 2015.

LANGEN, R.; SCHOLS, A. M.; KELDERS, M. C.; WOUTERS, E. F.; JANSSEN-HEININGER, Y. M. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. **FASEB journal**, v.15, n. 7, p. 1169-80, 2001.

LEAL, E. C. J.; LOPES-MARTINS, R. A.; ROSSI, R. P.; DE MARCHI, T.; BARONI, B. M.; DE GODOI, V.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. **Lasers Surg Med**, v. 8, n. 41, p. 572–7, 2009.

LEAL-JUNIOR, E. C. P.; BARONI, B. M.; ROSSI, R. P.; GODOI, V.; MARCHI, T.; TOMAZONI, S. S.; ALMEIDA, P.; SALVADOR, M.; GROSSELI, D.; GENEROSI, R. A.; BASSO, M.; MANCALOSSI, J. L.; LOPES-MARTINS, R. A. B. A fototerapia com diodo emissor de luz (LEDT) aplicada pré-exercício inibe a peroxidação lipídica em atletas após exercício de alta intensidade. Um estudo preliminar. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 17, n. 1, p. 2011.

LEE, J. W.; PARK, S.; TAKAHASHI, Y.; WANG, H. G. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. **PLoS One**, v. 5, n. 11, e15394, 2010.

LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 10, p. 1113-26, 2008.

LIN, P.; LIU, J.; REN, M.; JI, K.; LI, L.; ZHANG, B.; et al. Idebenone protects against oxidized low density lipoprotein induced mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells via GSK3 β / β -catenin signalling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 3, p. 548-555, 2015.

LINDSAY, A.; CHAMBERLAIN, C. M.; WITTHUHN, B. A.; LOWE, D. A.; ERVASTI, J. M. Dystrophinopathy-associated dysfunction of Krebs cycle metabolism. **Hum Mol Genet**. v. 28, p. 942–51, 2019.

LINDSAY, A.; et al. Mechanical factors tune the sensitivity of mdx muscle to eccentric strength loss and its protection by antioxidant and calcium modulators. **Skelet. Muscle**, 2020.

LIU, D.; BLACK, B. L.; DERYNCK, R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through

functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. **Genes & Devellopment**, v. 15, n. 22, p. 2950-66, 2001.

LJUBICIC, V.; JASMIN, B. J. Amp-activated protein kinase at the nexus of therapeutic skeletal muscle plasticity in duchenne muscular dystrophy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 10, p. 614-24, 2013.

LJUBICIC, V.; BURT, M.; JASMIN, B. J. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. **FASEB journal**, v. 28, n. 2, p. 548-68, 2014.

LOBODA, A.; DULAK, J. Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: Past, present, and future. **Pharmacological Reports**, v. 72, n.5, p. 1227-63, 2020.

MACEDO, A. B.; MORAES, L. H. R.; MIZOBUTI, D. S.; FOGACA, A. R.; MORAES, F. R. S.; HERMES, T. A.; PERTILLE, A.; MINATEL, E. Low-level laser therapy (LLLT) in dystrophin-deficient muscle cells: effects on regeneration capacity, inflammation response and oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 10, e0128567, 2015.

MACLENNAN, D. H.; YIP, C. C.; ILES, G. H.; SEEMAN, P. Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins. **Cold Spring Harb Sym**, v. 37, p. 469–477, 1973.

MAH, J. K.; KORNGUT, L.; FIEST, K. M.; DYKEMAN, J.; DAY, L. J.; PRINGSHEIM, T.; JETTE, N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of the muscular dystrophies. **Can J Neurol Sci**, v. 43, n. 1, p. 163 – 177, 2016.

MÂNCIO, R. D.; HERMES, T. A.; MACEDO, A. B.; MIZOBUTI, D. S.; VALDUGA, A. H.; RUPCIC, I. F.; MINATEL, E. Vitamin E treatment decreases muscle injury in mdx mice. **Nutrition**, p. 39 – 46, 2017.

MAREEDU, S.; MILLION, E. D.; DUAN, D.; BABU, G. J. Abnormal calcium handling in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms and potential therapies. **Front Physiol**, 2021.

MATSUMURA, C. Y.; DE OLIVEIRA, B. M.; DURBEEJ, M.; MARQUES, M. J. Isobaric tagging-based quantification for proteomic analysis: a comparative study of spared and affected muscles from mice at the early phase of dystrophy. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e85631, 2013.

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

1489-98, 2017.

MCGARRY, T.; BINIECKA, M.; VEALE, D. J.; FEARON, U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. **Free Radic. Biol. Med.** v. 125, 2018.

MCGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; MCINTOSH, M. A.; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: From basic mechanisms to gene therapy. **Disease models & mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 195-213, 2015.

MESSINA, S.; ALTAVILLA, D.; AGUENNOUZ, M.; SEMINARA, P.; MINUTOLI, L.; MONICI, M. C.; BITTO, A.; MAZZEO, A.; MARINI, H.; SQUADRITO, F.; VITA, G. Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice. **Am J Pathol**, v. 168, p. 18 – 26, 2006.

MESTER, A. Laser Biostimulation. **Photomed Laser Surg**, v. 31, p. 237–239, 2013.

MINATEL, E.; NETO, H. S.; AND M. J. MARQUES. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 5, p. 561-569, 2003.

MIZOBUTI, D. S.; FOGAÇA, A. R.; MORAES, F. S. R.; MORAES, L. H. R.; MÂNCIO, R. D.; HERMES, T. A.; MACEDO, A. B.; VALDUGA, A. H.; DE LOURENÇO, C. C.; PEREIRA, E. C. L.; MINATEL, E. Coenzyme Q10 supplementation acts as antioxidant on dystrophic muscle cells. **Cell.**, v. 24, p. 1175-1185, 2019.

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

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

MOAT, S.J.; BRADLEY, D.M.; SALMON, R.; CLARKE, A.; HARTLEY, L. Newborn Bloodspot Screening for Duchenne Muscular Dystrophy: 21 Years Experience in Wales (UK). **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 21, p. 1049–1053, 2013.

MONTENEGRO, L.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G. Differential scanning calorimetry analyses of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles interactions with a model of bio-membrane: A comparison with in vitro skin permeation data. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, 2018.

MOORE, T. M.; LIN, A. J.; STRUMWASSER, A. R.; CORY, K.; WHITNEY, K.; HOT, H. O. T.; LEE J. L.; RUCKER D. H.; NGUYEN CQ, YACKLY A, MAHATA S.

K.; WANAGAT J.; STILES, L.; TURCOTTE L. P.; CROSBIE, R. H.; ZHOU Z. Mitochondrial Dysfunction Is an Early Consequence of Partial or Complete Dystrophin Loss in mdx Mice. **Front Physiol**, v. 11, p. 690, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol.Methods**, 65, 55-63, 1983.

MOXLEY, R.T. R. D.; PANDYA. S.; CIAFALONI, E.; FOX, D. J.; CAMPBELL, K. Change in Natural History of Duchenne Muscular Dystrophy With Long-term Corticosteroid Treatment: Implications for Management. **J Child Neurol**, v. 25, n. 9,1 p. 116–1129, 2010.

MUSCOLI, C.; FRESTA, M.; CARDILE, V.; PALUMBO, M.; RENIS, M.; PUGLISI, G.; PAOLINO, D.; NISTICÒ, S.; ROTIROTI, D.; MOLLACE, V. Ethanolinduced injury in rat primary cortical astrocytes involves oxidative stress: efect of idebenone. **Neurosci Lett**, v. 329, p. 21–24, 2002.

NAKAE, Y.; DORCHIES, O. M.; STOWARD, P. J.; ZIMMERMANN, B. F.; RITTER, C.; RUEGG, U. T. Quantitative evaluation of the beneficial effects in the mdx mouse of epigallocatechin gallate, an antioxidant polyphenol from green tea. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 137, n. 6, p. 811 – 827, 2012.

NAKAE, Y.; STOWARD, P.J.; KASHIYAMA, T.; SHONO, M.; AKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; NONAKA, I. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. **J Mol Histol.**, v. 35, p. 489-499, 2004.

NG, S. Y.; MIKHAIL, A. I.; MATTINA, S. R.; MANTA, A.; DIFFEY, I. J.; LJUBICIC, V. Acute, next-generation AMPK activation initiates a disease-resistant gene expression program in dystrophic skeletal muscle. **FASEB Jornal**, v. 37, n. 5, e 22863, 2023.

NGUYEN, L. M.; MALAMO, A. G.; LARKIN-KAISER, K. A.; BORSA, P. A.; ADHIHETTY, P. J. Effect of near-infrared light exposure on mitochondrial signaling in C 2 C 12 muscle cells. **Mitochondrion**, v. 14, p. 42–48, 2014.

NOGAMI, K.; et al. Pharmacological activation of SERCA ameliorates dystrophic phenotypes in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 30, 1006–1019 (2021)

PALUMBO, M.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblastos. **Pharm Researc**, 2002.

PATIL, U. A.; DHAMI, L. D. Overview of lasers. **Indian J Plast Surg 41(Suppl):** p-101-113, 2008.

- PAULY, M.; DAUSSIN, F.; BURELLE, Y.; LI, T.; GODIN, R.; FAUCONNIER, J.; KOECHLIN-RAMONATXO, C.; HUGON, G.; LACAMPAGNE, A.; COISY-QUIVY, M.; LIAN, F.; HUSSAIN, S.; MATECKI, S.; PETROF, B. J. AMPK Activation Stimulates Autophagy and Ameliorates Muscular Dystrophy in the mdx Mouse Diaphragm. **The American Journal of Pathology**, v. 181, v. 2, p. 583-92, 2012.
- PENG, J.; WANG, H.; GONG, Z.; LI, X.; HE, L.; SHEN, Q.; ET AL. Idebenone attenuates cerebral inflammatory injury in ischemia and reperfusion via dampening NLRP3 inflammasome activity, **Mol. Immunol.**, v. 123, 2020.
- PERIASAMY, M.; KALYANASUNDARAM, A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. **Muscle Nerve**, v. 35, p. 430–442, 2007.
- PERTILLE, A.; CARVALHO, C. L. T.; MATSUMURA, C. Y.; NETO, H. S.; MARQUES, M. J. Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Int J Exp Pathol**, v. 91, p. 63–71, 2010.
- PETRILLO, S. ET AL. Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. **Hum. Mol. Genet.**, v. 26, p. 2781–2790, 2017.
- PORTER, J. D.; MERRIAM, A. P.; LEAHY, B. GONG AND S. KHANNA. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophindeficient (mdx) mice. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 15, p. 1813-1821, 2003.
- PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr. Rev.** v. 24, n. 1, p. 78 - 90; 2003.
- Qaisar, R. et al. Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. **Redox Biol.**, v. 20, p. 68–74, 2019.
- RADLEY, H. G.; DAVIES, M. J.; GROUNDS, M. D. Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cV1q (blockade of TNF) treatment. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 3, p. 227-238, 2008.
- RADLEY, H. G.; GROUNDS, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiology of Disease**, v. 23, n. 2, p. 387 – 397, 2006.
- RAGUSA, R.J.; CHOW, C.K.; PORTER, J.D. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul.Disord.**, v. 7, p. 379-386, 1997.
- ROBERT, V.; MASSIMINO, M. L.; TOSELLO, V.; MARSAULT, R.; CANTINI, M.;

- SORRENTINO, V.; POZZAN, T. Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. **J Biol Chem**, v. 276, p. 4647–4651, 2001.
- ROMITTI, P.A.; ZHU, Y.; PUZHANKARA, S.; JAMES, K.A.; NABUKERA, S.K.; ZAMBA, G.K.D.; CIAFALONI, E.; CUNNIFF, C.; DRUSCHEL, C.M.; MATHEWS, K.D.; ET AL. Prevalence of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies in the United States. **Pediatrics**, v. 135, p. 513–521, 2015.
- RYBALKA, E.; TIMPANI, C.A.; COOKE, M.B.; WILLIAMS, A.D.; HAYES, A. Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.
- RYDER, S.; LEADLEY, R.M.; ARMSTRONG, N.; WESTWOOD, M.; DE KOCK, S.; BUTT, T.; KLEIJNEN, J. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2017.
- SALEHPOUR, F.; FARAJDOKHT, F.; CASSANO, P.; SADIGH-ETEGHAD, S.; ERFANI, M.; HAMBLIN, M. R.; SALIMIK, M.; KARIMI, P.; RASTA, S. H.; MAHMOUDI, J. Near-infrared photobiomodulation combined with coenzyme Q10 for depression in a mouse model of restraint stress: reduction in oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v. 144, p. 213–222, 2019b
- SALEHPOUR, F.; FARAJDOKHT, F.; ERFANI, M.; SADIGH-ETEGHAD, S.; SHOTORBANI, S. S.; HAMBLIN, M. R.; KARIMI, P.; RASTA, S. H.; MAHMOUDI, J. Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleepdeprived mice. **Brain Res.**, p. 36–43, 2018a.
- SALEHPOUR, F.; FARAJDOKHT, F.; MAHMOUDI, J.; ERFANI, M.; FARHOUDI, M.; KARIMI, P.; RASTA, S. H.; SADIGH-ETEGHAD, S.; HAMBLIN, M. R.; GJEDDE, A. Photobiomodulation and Coenzyme Q10 Treatments Attenuate Cognitive Impairment Associated With Model of Transient Global Brain Ischemia in Artificially Aged Mice. **Front. Cell. Neurosci**, v. 13, n. 74, 2019a.
- SALEHPOUR, F.; MAHMOUDI, J.; KAMARI, F.; SADIGH-ETEGHAD, S.; RASTA, S. H.; HAMBLIN, M. R. Brain photobiomodulation therapy: a narrative review. **Mol Neurobiol**, v. 55, p. 6601–6636, 2018b.
- SALEHPOUR, F.; AHMADIAN, N.; RASTA, S. H.; FARHOUDI, M.; KARIMI, P.; SADIGH-ETEGHAD, S. Transcranial low-level laser therapy improves brain mitochondrial function and cognitive impairment in D-galactose-induced aging mice. **Neurobiol Aging**, v.

58, p. 140–150, 2017.

SCHABORT, E.; MERWE, V. D.; LOOS, B.; MOORE, F.; NIESLER, C. TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 3, p. 373-84, 2009.

SCHINDL, A.; HEINZE, G.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHÖN, H.; SCHINDL, L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvasc Res.**, v. 2, n. 64, p. 240–6, 2002.

SCHUBERT, E.; KIM, J. Solid-state light sources getting smart. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1274-78, 2005.

SCIANDRA, F.; BOZZI, M.; BIANCHI, M.; PAVONI, E.; GIARDINA, B.; BRANCACCIO, A. Dystroglycan and Muscular Dystrophies Related to the Dystrophin-Glycoprotein Complex. **Ann. Ist. Super. Sanita**, v. 39, p. 173–181, 2003.

SHASTRI, S.; SHINDE, T.; SOHAL, S. S.; GUEVEN, N.; ERI, R. Idebenone protects against acute murine colitis via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Int. J. Mol. Sci.** v. 21, 2020.

SIDDIQUI, N., SONENBERG, N. Proposing a mechanism of action for ataluren. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 113, p.12353-5, 2016.

SILVA, A. A. D. O.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; D'AVILA, K. D. A. L.; SERRA, A. J.; ALBERTINI, R.; FRANÇA, C. M.; DE CARVALHO, P. D. T. C. Pre-exercise low-level laser therapy improves performance and levels of oxidative stress markers in mdx mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1719-1727, 2015.

SILVA, H. N. M.; COVATTI, C.; DA ROCHA, G. L.; MIZOBUTI, D. S.; MÂNCIO, R. D.; HERMES, T. A.; KIDO, L. A.; CAGNON, V.; PEREIRA, E.; MINATEL, E. Oxidative Stress, Inflammation, and Activators of Mitochondrial Biogenesis: Tempol Targets in the Diaphragm Muscle of Exercise Trained-mdx Mice. **Frontiers in physiology**, v. 12, 2021.

SOUZA, N. H. C.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; RODRIGUES, M. F. S. D.; DA SILVA, D. F. T.; RIBEIRO, B. G.; ALVES, A. N.; GARCIA, M. P.; NUNES, F. D.; DA SILVA JUNIOR, E. M.; FRANÇA, C. M.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. Photobiomodulation and diferent macrophages phenotypes during muscle tissue repair. **J Cell Mol Med**, v. 22, p. 4922–4934, 2018.

SPENCER, M. J.; CROALL, D. E.; TIDBALL, J. G. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. **J Biol Chem**, 1995.

STEDMAN, H.H.; SWEENEY, H.L.; SHRAGER, J.B.; MAGUIRE, H.C.; PANETTIERI, R.A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J.T.; KELLY, A.M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v. 8, n. 352, p. 6335, 5369, 1991.

SUNTAR, I.; SUREDA, A.; BELWAL, T.; SANCHES SILVA, A.; VACCA, R. A.; TEWARI, D. ET AL. Natural products, PGC-1 α , and Duchenne muscular dystrophy. **Acta Pharm Sin B**, v. 10, p. 734–745, 2020.

TAM, S. Y.; TAM, V. C. W.; RAMKUMAR, S.; KHAW, M. L.; LAW, H. K. W.; LEE, S. W. Y. Review on the cellular mechanisms of low-level laser therapy use in oncology. **Front Oncol**, v. 10, e1255, 2020.

TANIHATA, J.; NAGATA, T.; ITO, N.; SAITO, T.; NAKAMURA, A.; MINAMISAWA, S.; AOKI, Y.; RUEGG, U. T.; TAKEDA, S. Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 505, p. 51–59, 2018.

TENNYSON, C.N.; KLAMUT, H.J.; WORTON, R.G. The Human Dystrophin Gene Requires 16 Hours to Be Transcribed and Is Cotranscriptionally Spliced. **Nat. Genet.**, v. 9, p. 184–190, 1995.

TERRILL, J. R.; DUONG, M. N.; TURNER, R.; LE GUINER, C.; BOYATZIS, A.; KETTLE, A. J.; GROUNDS, M. D. AND ARTHUR, P. G. Levels of inflammation and oxidative stress, and a role for taurine in dystropathology of the golden retriever muscular dystrophy dog model for Duchenne muscular dystrophy. **Redox Biol.**, v. 9, p. 276-286, 2016a.

TERRILL, J. R.; RADLEY-CRABB, H. G. T.; IWASAKI, F. A.; LEMCKERT, P. G.; ARTHUR AND M. D. GROUNDS. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4149-4164, 2013.

THOMSON, D. M. The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3125, 2018.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. Journal Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 288, n. 2, p. 345 – 353, 2005.

TIDBALL, J. G.; WELCH, S. S.; WEHLING-HENRICKS, M. Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 4, p. 1313–1356, 2018.

TIMPANI, C.A.; HAYES, A.; RYBALKA, E. Revisiting the dystrophin-ATP connection: How half a century of research still implicates mitochondrial dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy aetiology. **Med. Hypotheses**, v. 85, p. 1021–1033, 2015.

TUPLING, A. R. The decay phase of Ca²⁺ transients in skeletal muscle: regulation and physiology. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, p. 373–376, 2009.

TUPLING, A. R.; BOMBARDIER, E.; GUPTA, S. C.; HUSSAIN, D.; VIGNA, C.; BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J.; TRIVIERI, M. G.; BABU, G. J.; BACKX, P. H.; PERIASAMY, M.; MACLENNAN, D. H.; GRAMOLINI, A. O. Enhanced Ca²⁺ transport and muscle relaxation in skeletal muscle from sarcolipinnull mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, p. 841–849, 2011.

VALDUGA, A. H.; MIZOBUTI, D. S.; MORAES, F. S. R.; MÂNCIO, R. D.; MORAES, L. H. R.; HERMES, T. A.; MACEDO, A. B.; MINATEL, E. Protection of dystrophic muscle cells using Idebenone correlates with the interplay between calcium, oxidative stress and inflammation. **International journal of experimental pathology**, v.10, n.1, p4-12, 2022.

VALDUGA, A. H.; MIZOBUTI, D. S.; MORAES, F. S. R.; MÂNCIO, R. D.; MORAES, L. H. R.; HERMES, T. A.; MACEDO, A. B.; MINATEL, E. Protection of dystrophic muscle cells using Idebenone correlates with the interplay between calcium, oxidative stress and inflammation. **International journal of Experimental Pathology**, v. 104, n. 1, p. 4-12, 2023.

VANGHELUWE, P.; SCHUERMANS, M.; ZÁDOR, E.; WAELEKENS, E.; RAEYMAEKERS, L.; WUYTACK, F. Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. **Biochem J.**, v. 389, p. 151–159, 2005.

VANLANGENAKKER, N.; VANDEN BERGHE, T.; KRYSKO, D.V.; FESTJENS, N.; VANDENABEELE, P. Mecanismos moleculares e fisiopatologia da morte celular necrótica. **Atual Mol. Med.**, v. 8, p. 207-220, 2008.

VIEIRA, W. F.; KENZO-KAGAWA, B.; ALVARES, L. E.; COGO, J. C.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M. A. Exploring the ability of low-level laser irradiation to reduce myonecrosis and increase Myogenin transcription after Bothrops jararacuçu envenomation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 571-83, 2021.

VIEIRA, W. H.; FERRARESI, C.; PEREZ, S. E.; BALDISSERA, V.; PARIZOTTO, N. A. Effects of low-level laser therapy (808 nm) on isokinetic muscle performance of young women submitted to endurance training: a randomized controlled clinical trial. **Lasers Med**

Sci., v. 2, n. 27, p. 497–504, 2012.

VILLALTA, S. A.; RINALDI, C.; DENG, B.; et al. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Hum Mol Genet.**, v. 20, p. 790-805, 2011.

VOIT, A.; PATEL, V.; PACHON, R.; SHAH, V.; BAKHUTMA, M.; KOHLBRENNER, E.; MCARDLE, J. J.; DELL'ITALIA, L. J.; MENDEKK, J. R.; XIE, L.; HAJJAR, R. J.; DUAN, D.; FRAIDENRAICH, D.; BABU, G. J. Reducing sarcolipin expression mitigates Duchenne muscular dystrophy and associated cardiomyopathy in mice. **Nat Commun**, 2017.

WANG, A.; LI, H.; YUAN, M.; FAN, H.; CAI, Z. Role of AMPK in autophagy. **Frontiers in Physiology**, 2022.

WEBSTER, C.; SILBERSTEIN, L.; HAYS, A. P.; BLAU, H. M. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. **Cell.**, v. 52 n. 4, p. 503-13, 1988.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W. AND D. G. ALLEN. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol** v. 33, n. 7, p. 657-662, 2006.

WHITEHEAD, N. P.; PHAM, C.; GERVASIO, O. L.; ALLEN, D. G. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 7, p. 2003 – 2014, 2008.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; FROEHNER, S. C.; ALLEN, D. G. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e15354, 2010.

WILSON, K.; FAELAN, C.; PATTERSON-KANE, J. C.; RUDMANN, D. G.; MOORE, S. A.; FRANK, D.; CHARLESTON, J.; TINSLEY, J.; YOUNG, G. D; AND MILICI, A. J. Duchenne and Becker muscular dystrophies: a review of animal models, clinical end points, and biomarker quantification. **Toxicol. Pathol.** v. 45, p. 961-976, 2017.

WONG, P. M.; PUENTE, C.; GANLEY, I. G.; JIANG, X. TheULK1complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. **Autophagy**, v. 9, p. 124–137, 2013.

WU, K. D.; LYTTON, J. Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms in rat muscles. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 264, p. 333–341, 1993.

XIA, Q.; HUANG, X.; HUANG, J.; ZHENG, Y.; MARCH, M. E.; LI, J.; WEI, Y. The Role of Autophagy in Skeletal Muscle Diseases. **Frontiers in Physiology**, 2021.

ZAYNITDINOVA, M. I.; LAVROV, A. V.; SMIRNIKHINA, S. A. Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy. **Transgenic Research**, v. 30, n. 6, p. 709-725, 2021.

ZHU, Z.; WANG, X.; SONG, Z.; ZUO, X.; MA, Y.; ZHANG, Z.; JU, C.; LIANG, Z.; LI, K.; HU, X.; WANG Z. Photobiomodulation promotes repair following spinal cord injury by restoring neuronal mitochondrial bioenergetics via AMPK/PGC-1 α /TFAM pathway. **Frontiers in Pharmacology**, 2022.

8.0 ANEXOS

8.1 Anexo I – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Aspectos multifatoriais da Distrofia Muscular de Duchenne: estudo da fotobiomodulação e da terapia antioxidante in vitro e in vivo**, registrada com o nº **5603-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Elaine Minatel e Heloína Nathalliê Mariano da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/09/2020**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/11/2020 a 29/02/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/09/2020 a 29/02/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	30
Idade/Peso:	28.00 Dias / 10.00 Gramas
Sexo:	15 Machos 15 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10ScCr/PasUnib
No. de animais:	30
Idade/Peso:	28.00 Dias / 10.00 Gramas
Sexo:	15 Machos 15 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10ScCr/PasUnib
No. de animais:	28
Idade/Peso:	14.00 Dias / 10.00 Gramas
Sexo:	14 Machos 14 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	140
Idade/Peso:	14.00 Dias / 10.00 Gramas
Sexo:	70 Machos 70 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Anatomia, Área de Anatomia, DBEF, IB/UNICAMP

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

Campinas, **28 de outubro de 2020**.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

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

CERTIFICADO CEUA nº 19/2020

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 29/10/2020, às 09:39 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PROFESSOR DOUTOR I**, em 04/11/2020, às 13:53 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
7A62867D F7A0467E 88CE0F20 8F53FEBE



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **HELOINA NATHALLIÊ MARIANO DA SILVA** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 23 julho 2020.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP

8.2 Anexo II: Artigo publicado no periódico *Cell Stress and Chaperones*

Cell Stress and Chaperones (2023) 28:773–785
<https://doi.org/10.1007/s12192-023-01369-2>

ORIGINAL ARTICLE



LED therapy plus idebenone treatment targeting calcium and mitochondrial signaling pathways in dystrophic muscle cells

Heloina Nathalliê Mariano da Silva¹ · Daniela Sayuri Mizobuti¹ · Valéria Andrade Pereira¹ ·
 Guilherme Luiz da Rocha¹ · Marcos Vinícius da Cruz^{1,2} · André Gustavo de Oliveira^{1,2} · Leonardo Reis Silveira^{1,2} ·
 Elaine Minatel¹

Received: 17 May 2023 / Revised: 20 July 2023 / Accepted: 7 August 2023 / Published online: 14 August 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Cell Stress Society International 2023

Abstract

Intracellular calcium dysregulation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction are some of the main pathway contributors towards disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). This study is aimed at investigating the effects of light emitting diode therapy (LEDT) and idebenone antioxidant treatment, applied alone or together in dystrophic primary muscle cells from *mdx* mice, the experimental model of DMD. *Mdx* primary muscle cells were submitted to LEDT and idebenone treatment and evaluated for cytotoxic effects and calcium and mitochondrial signaling pathways. LEDT and idebenone treatment showed no cytotoxic effects on the dystrophic muscle cells. Regarding the calcium pathways, after LEDT and idebenone treatment, a significant reduction in intracellular calcium content, calpain-1, calsequestrin, and sarcolipin levels, was observed. In addition, a significant reduction in oxidative stress level markers, such as H₂O₂, and 4-HNE levels, was observed. Regarding mitochondrial signaling pathways, a significant increase in oxidative capacity (by OCR and OXPHOS levels) was observed. In addition, the PGC-1 α , SIRT-1, and PPAR δ levels were significantly higher in the LEDT plus idebenone treated-dystrophic muscle cells. Together, the findings suggest that LEDT and idebenone treatment, alone or in conjunction, can modulate the calcium and mitochondrial signaling pathways, such as SLN, SERCA 1, and PGC-1 α , contributing towards the improvement of the dystrophic phenotype in *mdx* muscle cells. In addition, data from the LEDT plus idebenone treatment showed slightly better results than those of each separate treatment in terms of SLN, OXPHOS, and SIRT-1.

Keywords Dystrophic muscle cells · Photobiomodulation · Calcium signaling · Oxidative stress · Mitochondrial parameters

8.3 Anexo III: Artigo publicado periódico *Plos one*

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

LEDT and Idebenone treatment modulate autophagy and improve regenerative capacity in the dystrophic muscle through an AMPK-pathway

Heloína Nathalliê Mariano da Silva, Evelyn Mendes Fernandes, Valéria Andrade Pereira, Daniela Sayuri Mizobuti, Caroline Covatti, Guilherme Luiz da Rocha, Elaine Minatel*

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

* minatel@unicamp.br



Abstract

Purpose

Considering the difficulties and challenges in Duchenne muscular dystrophy (DMD) treatment, such as the adverse effects of glucocorticoids, which are the main medical prescription used by dystrophic patients, new treatment concepts for dystrophic therapy are very necessary. Thus, in this study, we explore the effects of photobiomodulation (PBM; a non-invasive therapy) and Idebenone (IDE) treatment (a potent antioxidant), applied alone or in association, in dystrophic muscle cells and the quadriceps muscle, with special focus on autophagy and regenerative pathways.

Methods

For the *in vitro* studies, the dystrophic primary muscle cells received 0.5J LEDT and 0.06µM IDE; and for the *in vivo* studies, the dystrophic quadriceps muscle received 3J LEDT and the mdx mice were treated with 200mg/kg IDE.

Results

LEDT and IDE treatment modulate autophagy by increasing autophagy markers (SQSTM1/

OPEN ACCESS

Citation: Silva HNMd, Fernandes EM, Pereira VA, Mizobuti DS, Covatti C, Rocha GLd, et al. (2024) LEDT and Idebenone treatment modulate autophagy and improve regenerative capacity in the dystrophic muscle through an AMPK-pathway. PLoS ONE 19(3): e0300006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300006>

Editor: Atsushi Asakura, University of Minnesota Medical School, UNITED STATES

Received: October 2, 2023

Accepted: February 19, 2024

Published: March 18, 2024

Copyright: © 2024 Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which

8.4 Anexo IV: Declaração dos direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“ASPECTOS MULTIFATORIAIS DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: ESTUDO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DA TERAPIA ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO*”** não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de abril de 2024

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Heloína Nathalliê Mariano da Silva**

RG n.º MG-17.695.569

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): **Profa. Dra. Elaine Minatel**

RG n.º 284.592.068-74