



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LÍLIAN DE SOUZA LEITE FAUSTO

**EFEITOS DA DIETA CETOGENICA NA AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS DA Distrofia Muscular de Duchenne:
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

PALHOÇA
2018

LÍLIAN DE SOUZA LEITE FAUSTO

**EFEITOS DA DIETA CETOGENICA NA AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS DA Distrofia Muscular de Duchenne:
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Clarissa Martinelli Comim, Dra.

PALHOÇA

2018

F27 Fausto, Lílian de Souza Leite, 1987 -

Efeitos da dieta cetogênica na avaliação de parâmetros bioquímicos e clínicos da distrofia muscular de Duchenne: estudo pré-clínico / Lílian de Souza Leite Fausto. – 2018.

111 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof^ª. Clarissa Martinelli Comim

1. Nutrição. 2. Dieta cetogênica. 3. Distrofia muscular - Tratamento. I. Comim, Clarissa Martinelli. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 612.3

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

LÍLIAN DE SOUZA LEITE FAUSTO

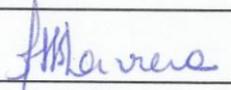
**EFEITOS DA DIETA CETOGENICA NA AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS DA Distrofia Muscular de Duchenne:
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

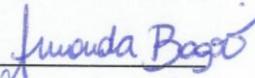
Esta tese foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Doutorado, para obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

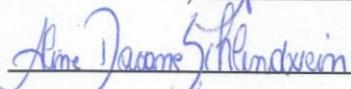
Palhoça (SC), 03 de maio de 2018.

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 03 de maio de 2018.

Doutora Clarissa Martinelli Comim (orientador)  _____

Doutora Alessandra Miguel Borges (avaliador externo - CEPON)  _____

Doutora Amanda Bagolin do Nascimento (avaliador externo – UFSC)  _____

Doutora Aline Daiane Schlindwein (avaliador interno)  _____

Doutor Maicon Roberto Kwiecinski (avaliador interno)  _____

(a conquista) Dedico aos meus pais. Uma retribuição por toda dedicação de vida.

(os resultados científicos) Dedico aos pacientes portadores de doenças raras, que esperanças novos rumos.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a **Deus**, na sua infinita bondade e imensa grandeza.

À minha **filha**, companheira da rotina, parceira da vivência e da jornada tripla que foi dividir sua mãe com a pesquisadora e nutricionista durante esses anos.

Ao meu **marido**. Sou grata pela parceria, paciência, amizade, amor e incentivo. Agradeço pela presença, pelas horas de conforto, pelo apoio e também por compartilhar todo esse momento.

Aos meus **pais**, com muito carinho, que realizam um sonho a cada nova conquista de suas filhas. Meus exemplos de vida. Agradeço pelo amor incondicional e pela dedicação integral. A distância é apenas física.

À minha **irmã**. Agradeço pela amizade, incentivo e “trocas de figurinhas”. A distância é apenas física.

De maneira especial, apresento os meus mais sinceros votos de agradecimento à **Professora Dra. Clarissa Martinelli Comim**. Agradeço, sobretudo, pelo respeito, pelo acolhimento, pela confiança depositada, pelas orientações científicas, pelas oportunidades e por todo o apoio necessário para a conquista de um objetivo tão almejado. Agradeço também pela disponibilidade de tempo e emoções, estendendo meu carinho aos seus filhos que compartilharam comigo uma verdadeira mãe.

Às novas **amigas**. De maneira especial, devo agradecer a **Viviane Freiburger**, a **Letícia Ventura** pela parceria, pelo conhecimento repassado, pelas contribuições durante as análises laboratoriais e pelas boas conversas. Agradeço também à **Marcieli Brugança, Karoliny dos Santos, Amanda Della Giustina, Regina Maldonado** pela cumplicidade, conselhos e incentivos durante o período de doutorado. Agradeço a todas pela boa companhia. Com vocês tudo se tornou mais humano.

Aos **alunos de Iniciação Científica**, companheiros de experimentos, que foram de grande contribuição para a execução de cada etapa. Me vi em cada um de vocês no

meu início de jornada acadêmica. Obrigada pelos esforços, Elaini Kruger, Eloisa Mariotti, Silvia Cozer, Maria Eduarda, Ricardo, Matheus Luchini, Daiane Bragagnolo e Paula.

Aos **professores**, agradeço pelo conhecimento transmitido. Dentre todos, destaco meu agradecimento ao Professor Daniel Fernandes e ao Professor Maicon Kwiecinski, responsáveis pelas correções e contribuições no projeto de qualificação – impulso fundamental para a reconstrução do projeto.

Apresento sempre o meu agradecimento à **Professora Dra. Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves Damasceno**. Uma inspiração para carreira acadêmica. Deixo registrado todo meu carinho pela professora que me iniciou na pesquisa científica.

Agradeço também o presente que ganhei durante essa jornada: fazer parte da **equipe de Nutrição** do Hospital Governador Celso Ramos. Ganhei maturidade profissional e pessoal, é verdade. Mas, ganhei, acima de tudo, companheiras para uma vida. Deixo meu agradecimento com muito carinho para cada uma de vocês.

Ao **PPGCS**, pelo apoio institucional. À **Marcieli Brugança**, em especial, pelo empenho e solicitude dos serviços prestados. Agradeço também à **Caroline** que deu continuidade na secretaria do Programa, sempre muito solícita. Faz toda diferença contarmos com profissionais competentes. Amplio meus agradecimentos à **Tayse Vieira** pelo apoio fraternal e institucional – ora amiga, ora profissional – esteve sempre presente de uma forma ou de outra durante esta jornada.

Ao **Programa de Bolsas Demanda Social (CAPES)** e **Unisul (Universidade do Sul de Santa Catarina)**, agradeço pelo período de bolsas concedidas.

The last but not the least... Aos **animais experimentais**, seres sencientes, em respeito às suas vidas, agradeço. *“Porque dão tudo sem pedir nada. Porque frente ao poder do homem que conta com armas, eles são indefensos” (Madre Teresa de Calcutá).*

“Nunca, jamais, desanimeis, embora venham ventos contrários.”
(Santa Paulina)

RESUMO

Introdução: A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma das distrofias musculares progressivas recessivas ligadas ao X, caracterizada pela degeneração progressiva do músculo esquelético e envolvimento multissistêmico, incluindo o sistema nervoso central (SNC). Estes processos têm um alto custo metabólico e estão associados a um processo oxidativo e inflamatório, bem como a disfunção de aprendizagem e memória. A dieta cetogênica (DCet) é um tratamento potencialmente eficaz para a epilepsia clinicamente refratária e outros distúrbios neurodegenerativos, apesar dos mecanismos pelos quais a DCet alcance a neuroproteção e/ou o controle da epilepsia ainda não sejam conhecidos. **Objetivo:** investigar os efeitos da DCet sobre parâmetros bioquímicos e clínicos em um modelo de camundongos com DMD. **Métodos:** camundongos adultos jovens (50 dias de idade) foram alimentados com DCet por 14 dias; grupos controles receberam uma dieta padrão pelo mesmo período. No 14^o dia de exposição às dietas, cada camundongo foi submetido a testes de avaliação de memória e comportamento. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados para avaliação bioquímica do estresse oxidativo e dos níveis dos biomarcadores inflamatórios. Peso corporal, consumo de ração e níveis de BDNF também foram avaliados. **Resultados:** Camundongos mdx+DCet ganharam menos massa ($0,2g \pm 2,49$) e apresentaram retenção de memória ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Houve redução do dano oxidativo no tecido muscular e SNC, e diminuição significativa nos níveis de citocinas ($p < 0,05$). Este protocolo aumentou o nível de BDNF do hipocampo e da atividade do complexo respiratório mitocondrial tanto no tecido muscular quanto no SNC, embora tenha diminuído apenas a atividade da creatina quinase no estriado. **Conclusão:** Pode-se inferir que o uso de DCet por 14 dias pode exercer efeitos protetores, melhorando a aprendizagem espacial e a função da memória, provavelmente através da atenuação do estresse oxidativo, resposta imune e aumento do nível de BDNF observado nesses animais.

Descritores: mdx. Dieta cetogênica. Suporte nutricional.

ABSTRACT

Introduction: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is one of the X-linked recessive progressive muscular dystrophies, characterized by progressive degeneration of skeletal muscle and multisystemic involvement, including the central nervous system (CNS). These processes have a high metabolic cost and are associated with an oxidative and inflammatory process, as well as learning and memory dysfunction. The ketogenic diet (DCet) is a potentially effective treatment for clinically refractory epilepsy and other neurodegenerative disorders, although the mechanisms by which DCet achieves neuroprotection and / or epilepsy control are not yet known.

Objective: to investigate the effects of DCet on biochemical and clinical parameters in a mouse model with DMD. **Methods:** Young adult mice (50 days old) were fed DCet for 14 days; control groups received a standard diet for the same period. On the 14th day of exposure to diets, each mouse was submitted to memory and behavior evaluation tests. After the behavioral tests, the animals were sacrificed for biochemical evaluation of oxidative stress and levels of inflammatory biomarkers. Body weight, feed intake and BDNF levels were also evaluated. **Results:** mdx+DCet mice had less mass ($0.2g \pm 2.49$) and presented memory retention ($p < 0.05$) in relation to the control group. There was reduction of oxidative damage in muscle tissue and CNS, and significant decrease in cytokine levels ($p < 0.05$). This protocol increased the level of hippocampal BDNF and mitochondrial respiratory complex activity in both muscle tissue and CNS, although it only decreased creatine kinase activity in the striatum. **Conclusion:** it can be inferred that the use of KD for 14 days protocol can exert protective effects improving spatial learning and memory function likely via attenuation of oxidative stress, immune response and increased BDNF level seen in these animals.

Keywords: mdx. Ketogenic diet. Nutritional Support.

LISTAS

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

ACA – Ácido acetoacético

ADP – Adenosina difosfato

AIN – Instituto Americano de Nutrição, do inglês: *American Institute of Nutrition*

AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

A β – Peptídeo β -amiloide

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês: *Brain-derived Neurotrophic Factor*

BHB – β -hidroxibutírico

BSA – Albumina de soro bovino, do inglês: *Bovine Serum Albumine*

Ca – Cálcio

CAT – Catalase

CDG – Complexo distrofina-glicoproteínas

CEUA – Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

CK – Creatina quinase

COOH – Radical carboxila

COX – Citocromo-oxidase

DC – Dieta controle

DCet – Dieta cetogênica

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

dL – Decilitro

DMD – Distrofia muscular de Duchenne

DMP – Distrofia muscular progressiva

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNPH – Dinitrofenilidrazina

DTNB – Ditiobis-2-nitrobenzoico-1,7

EDTA – Ácido diamino tetra-acético

EGTA – Ácido glicol éter diamino tetra-acético

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês: *Enzyme-linkedimmunosorbent assay*

EO – Estresse oxidativo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ERON – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

EUA – Estado Unidos da América

FADH₂ – Dinucleotideo de flavina e adenina reduzida

g – Grama

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GLUT – Transportador de glicose

GSH – Glutathiona reduzida

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

GSH-Rd – Glutathiona-redutase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HDL-c – Lipoproteína de alta densidade colesterol, do inglês: *High Density Lipoprotein cholesterol*

HIF1- α – Fator indutor de hipóxia, do inglês: *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

IG – Índice glicêmico

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

i-NOS – NO-sintase induzível

IRS – Receptor de insulina

Kb – Kilobyte

Kcal – Quilocalorias

kDa – Kilodalton

Kg – Quilograma, símbolo no Sistema Internacional de medidas: kg

L – Litro

LaNEX – Laboratório de neurociências experimental

LDL-c – Lipoproteína de baixa densidade colesterol, do inglês: *Low Density Lipoprotein cholesterol*

LPS – Lipopolissacarídeo

LTD – Depressão de longo prazo, do inglês: *Long-term Depression*

LTP – Potenciação de longo prazo, do inglês *Long-term Potentiation*

MCT – Ácidos monocarboxílicos

MDA – Malondialdeído

mdx – Modelo animal de distrofia muscular com mutação no cromossomo X, do inglês: *X-linked muscular dystrophy*

mg – miligrama

MIA – Morte indolor assistida

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato

NGF – Fator de crescimento de nervo, do inglês *Nerve Growth Factor*

NH₂ – Radical amino

NK – Células exterminadoras naturais, do inglês: *Natural killer*

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO[•] – Óxido nítrico

NT-3 – Neurotrofina 3

NT-4 – Neurotrofina 4

OH[•] – Radical hidroxil

PBS – Solução salina tamponada com fosfato, do inglês: *Phosphate buffered saline*

QI – Quociente de inteligência

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

SBNeC – Sociedade brasileira de neurociências e comportamento

SDF-1 α – Fator derivado de células do estroma-1 α , do inglês: *Stromal cell-derived factor 1 α*

SH – Grupo sulfidríla

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SOD – Superóxido-dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBIG – Tratamento de baixo índice glicêmico

TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos, do inglês: *Tricarboxylic cycle acid*

Th – Linfócitos T *helpers*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa, do inglês: *Tumor Necrosis Factor alpha*

Trk β – Tirosina-quinase β

UI – Unidades internacionais

UNESC – Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês: *Vascular endothelial growth factor*

wt – *Wild type*

Lista de figuras

Figura 1 – Desenho esquemático de sequência e tempo do protocolo experimental	47
Figura 2 – Caixa de esquiva passiva para camundongos (<i>step down</i>)	48
Figura 3 – Caixa para avaliação da habituação em campo aberto (<i>open field</i>)	49
Figura 4 – Teste de esquiva inibitória	57
Figura 5 – Teste de habituação em campo aberto	58
Figura 6 – Níveis de TNF- α no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	59
Figura 7 – Níveis de IL-1 β no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	61
Figura 8 – Níveis de IL-6 no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	63
Figura 9 – Níveis de IL-10 no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	65
Figura 10 – Níveis de mieloperoxidase no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	67
Figura 11 – Níveis de peroxidação lipídica no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	69
Figura 12 – Níveis de carbonilação de proteínas no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	71
Figura 13 – Níveis de tióis livres no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	73
Figura 14 – Atividade do complexo I no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	75
Figura 15 – Atividade da creatina quinase em tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	77

Figura 16 – Níveis de BDNF em tecido cerebral de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet	79
Figura 17 – Proposta de mecanismo de ação da DCet em modelo animal de DMD.	82

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas em estudo, por porção de 100g.....	46
Tabela 2 – Média de massa corporal e ganho ponderal por grupo.....	55
Tabela 3 – Dados descritivos de consumo de ração e valor nutricional por animal por dia.....	56

Lista de quadro

Quadro 1 – Variáveis de estudo, natureza e proposta de utilização.....	53
Quadro 2 – Resumo dos resultados do estudo.....	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1.1 Distrofia muscular de Duchenne	19
1.1.2 Processo inflamatório.....	23
1.1.3 Estresse oxidativo e metabolismo energético.....	26
1.1.4 Fator neurotrófico derivado do cérebro	31
1.1.5 Memória e aprendizado.....	33
1.1.6 Dieta cetogênica	35
1.1.7 Modelo animal de DMD	41
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 TIPO DE ESTUDO	44
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	44
3.3 ANIMAIS.....	45
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	45
3.5 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS APLICADAS	47
3.5.1 Aferição da massa corporal e consumo de ração	47
3.5.2 Memória e aprendizado	48
3.5.2.1 Esquiva inibitória	48
3.5.2.2 Habituação ao campo aberto (<i>open field</i>).....	48
3.5.3 Coleta de material biológico	49
3.5.4 Determinações bioquímicas	50
3.5.4.1 Determinação dos níveis TNF- α , IL-1 β IL-6 e IL-10	50

3.5.4.2 Ensaio da mieloperoxidase	51
3.5.4.3 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	51
3.5.4.4 Medida do dano oxidativo em proteínas.....	52
3.5.4.5 Conteúdo total de tióis livres	52
3.5.4.6 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	52
3.5.4.7 Quantificação dos níveis do BDNF	53
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	53
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISES DOS DADOS	54
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	54
4. RESULTADOS	55
4.1 MASSA CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO	55
4.2 MEMÓRIA E APRENDIZADO	56
4.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO	58
4.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	68
4.5 METABOLISMO ENERGÉTICO	74
4.6 QUANTIFICAÇÃO DO BDNF	78
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÃO.....	96
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	96
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICES	109
ANEXO	111

1. INTRODUÇÃO

As distrofias musculares progressivas (DMP) são miopatias primárias geneticamente determinadas que sob a denominação genérica de doenças neuromusculares, agrupam-se em diferentes afecções decorrentes do acometimento primário da unidade motora¹.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma das DMP ligadas ao cromossomo X, tem caráter recessivo e se expressa sintomaticamente em membros masculinos da família. Ocorre em 1 a cada 3.600 nascimentos vivos do sexo masculino, sendo a doença genética fatal mais comum em crianças². Caracteriza-se por uma fraqueza muscular progressiva e debilitante que resulta da ausência da proteína distrofina. Esta inexistência promove o aumento da fragilidade da membrana da fibra muscular durante a contração, resultando em ciclos repetidos de necrose e regeneração e a eventual substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo fibroso e adiposo³.

Os primeiros sintomas normalmente começam na infância, entre 3 e 5 anos, quando se iniciam as alterações funcionais devido à fraqueza muscular, tais como dificuldade de deambular, pular e correr, além de quedas frequentes⁴. Durante a progressão da doença, surge insuficiência respiratória ocasionada pelo comprometimento muscular, ocasionando infecções respiratórias de repetição, que na maioria dos casos, levam ao óbito⁵. Além da hipoventilação, a perda óssea, desnutrição e obesidade estão entre as complicações clínicas e/ou doenças associadas mais frequentes⁴.

Além do sistema músculo-esquelético, a DMD também se manifesta no sistema nervoso central (SNC), resultando em perturbações significativas da função neuronal⁶. A ausência de distrofina pode afetar a plasticidade sináptica, migração, diferenciação, excitabilidade neuronal e conduzir à morte do neurônio⁷. Tais anormalidades cerebrais podem ajudar a explicar o comprometimento cognitivo apresentado por pacientes com DMD, que somam 30% dos indivíduos diagnosticados, prevalência maior do que a população em geral, que possui taxa de aproximadamente 1%^{8,9}.

Neste contexto, dentro do processo fisiopatológico da DMD, sabe-se que o estresse oxidativo (EO) e a inflamação crônica estão envolvidos no transcurso da

degeneração músculo-esquelético, na disfunção neuronal e no comprometimento neurocognitivo^{10,11}. O EO está associado a alterações no metabolismo energético mitocondrial em camundongos mdx (*x-linked muscular dystrophy mouse*) tanto em músculo-esquelético quanto em tecido encefálico¹², bem como o processo inflamatório está associado à exacerbação da lesão muscular na DMD¹³. Estudos mostram que tanto as reações inflamatórias quanto o EO participam de processos degenerativos envolvidos com disfunção cognitiva em doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla e epilepsia. Todos culminando em algum grau de disfunção cognitiva¹²⁻¹⁴.

Embora um progresso significativo tenha sido alcançado no avanço científico sobre a DMD, ainda não há cura. A corticoterapia é o tratamento medicamentoso padrão utilizado atualmente, sendo estes os únicos agentes farmacológicos com benefícios documentados, mesmo associados a vários efeitos adversos, incluindo nutricionais. Neste caso, terapias não medicamentosas que visam minimizar a progressão da doença, tomam significativa importância^{15,16}.

Desde 1921, a dieta cetogênica – composta por baixo teor de carboidratos, 10% de proteínas e teor elevado de gorduras – tem sido utilizada com êxito para o tratamento de epilepsia infantil refratária por alcançar os efeitos antiepilépticos^{17,18} e neuroprotetores^{19,20,21}. Além disso, este tipo de dieta foi capaz de aumentar o estado antioxidante mitocondrial de camundongos pela regulação da biossíntese de glutathiona reduzida (GSH)²²; retardou a progressão da miopatia mitocondrial em modelos animais²³; inibiu o dano oxidativo e apresentaram melhora na bioenergética mitocondrial em tecido encefálico de modelos animais e protegeu de sequelas neurodegenerativas^{22,24}. Além disso, pesquisadores mostraram que houve modulação do processo inflamatório em ratos submetidos a injeções de lipopolissacarídeos (LPS- *E. coli*) com redução da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) no tecido encefálico²⁵. Em pacientes, o uso desta terapêutica apresentou efeitos benéficos em crianças com diagnóstico de autismo²⁶.

No contexto das dietas hiperlipídicas, Radley-Crabb e colaboradores (2011; 2015)^{27,28} apresentaram dados que indicam que a dieta rica em gordura pode satisfazer melhor as necessidades energéticas de camundongos mdx, reduzindo os danos e melhorando a função muscular, com benefícios demonstrados pelo aumento significativo da capacidade de execução de exercícios voluntários e redução significativa da necrose miofibrilar.

Dessa forma, para uma patologia sistêmica como a DMD, não se espera que a nutrição seja a única abordagem de tratamento, mas recomendações dietéticas mais precisas poderiam auxiliar no manejo da doença e retardar a progressão dos danos junto com outras terapias. Com uma severa deficiência de distrofina, mudanças sutis na dieta podem não superar qualquer porção significativa do insulto celular, mas é possível que mudanças consideráveis na composição dietética possam alterar a gravidade da doença. Assim, o objetivo deste estudo é verificar o impacto da dieta cetogênica no processo fisiopatológico da DMD.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Distrofia muscular de Duchenne

Em 1868, a DMD foi descrita pela primeira vez pelo neurologista francês Guillaume Duchenne (1806-1875) como sendo a perda progressiva dos movimentos, afetando inicialmente os membros inferiores e posteriormente os superiores, com pseudo hipertrofia progressiva dos músculos afetados e aumento significativo do tecido conjuntivo e adiposo. Em 1987, o gene envolvido foi mapeado, localizando-se no braço curto do cromossomo X (Xp21), responsável pela codificação da distrofina, uma proteína envolvida na estabilidade da membrana celular^{29,30}.

A DMD é considerada, portanto, uma doença genética recessiva, caracterizando-se como uma distrofinopatia ligada ao sexo, na qual diferentes tipos de mutações (deleções, 65%; duplicações, 6-10%; mutações de ponto ou micro-rearranjos, 10%) no gene Xp21 são evidenciáveis em dois terços dos casos^{1,15,31}.

O gene da distrofina é o segundo maior gene humano, abrangendo cerca de 2,5 milhões de pares de bases (1% do cromossomo X e 0,1% do genoma humano) e codifica sete isoformas de proteínas diferentes – localizadas no músculo, córtex, cerebelo, retina e células e gliais³². É composto por, pelo menos, 79 éxons que codificam um ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de 14 Kb e uma sequência de aminoácidos que sugere uma estrutura em forma de bastonete e um peso molecular de 427 kDa^{33,34}.

A expressão do transcrito da distrofina de comprimento completo é controlada por três promotores regulados independentemente, dos quais o nome reflete o

principal local de expressão: cérebro (C), músculo (M) e Purkinje (P). Os promotores C expressam unidades em neurônios corticais e no hipocampo, enquanto que, os promotores P se expressam na camada de células de Purkinje cerebelar e, também, em células do músculo esquelético. O promotor M resulta em altos níveis de expressão nos músculos esqueléticos e cardiomiócitos e, em níveis mais baixos, em células gliais³³. Além da distrofina de comprimento total encontrada nos neurônios centrais e musculares, as isoformas truncadas também estão localizadas no sistema nervoso periférico (SNP) e central, incluindo Dp71, Dp116, Dp140 e Dp260^{32,35}.

Em 65% dos casos a doença está associada a mutações do tipo deleção, na qual levam a uma perda da expressão da proteína distrofina por adição de códons de término, que param prematuramente a transcrição do RNA mutante e que interrompem, assim, a síntese da distrofina em todo seu comprimento, resultando numa perda grave de massa muscular^{15,33,36}.

Nas fibras musculares, a distrofina é expressa na superfície interna da membrana plasmática, associada a um complexo de proteínas e glicoproteínas transmembrana (complexo distrofina-glicoproteínas – CDG), possui domínios semelhantes à α -actinina e à β -espectrina – presentes no citoesqueleto – e é composta por quatro regiões separadas com base em sequência homóloga e na capacidade de ligação de proteínas: domínio de ligação do radical amino(NH₂-terminal) de actina; domínio de haste central; domínio rico em cisteína; e, domínio terminal carboxila (COOH) ligado à matriz extracelular pelas proteínas transmembranas^{32,36}.

No músculo saudável, o CDG é essencial à integridade e estabilidade da membrana muscular, ligando a actina do citoesqueleto à matriz celular e promovendo a estabilidade do sarcolema. A distrofina encontra-se presente de forma mais concentrada na junção músculo-tendínea, fornecendo reforço mecânico para a superfície da membrana durante o processo de contração muscular. Sua ausência, no entanto, acarreta alterações no sarcolema que sofre pequenos rompimentos provocando maior permeabilidade ao influxo de íons cálcio (Ca²⁺), ocasionando necrose segmentar da fibra e perda da propriedade contrátil. A regeneração das fibras se torna menos frequente com a progressão da doença e são eventualmente substituídas por tecido adiposo e conjuntivo, colaborando para um músculo pseudo-hipertrofico^{30,33}. A análise histológica do músculo fetal distrófico

mostra alterações não específicas, incluindo a variação no tamanho das fibras, focos de necrose e regeneração e hialinização^{33,37}.

A distrofina é predominantemente expressa no músculo esquelético e cardíaco, porém, no SNC, é abundante em regiões de densidades pós-sinápticas de neurônios piramidais da rede subsináptica especializada do citoesqueleto (principalmente, no córtex hipocampal e amígdala; com menor intensidade em tálamo, hipotálamo e neocórtex; de modo fraco, em cerebelo e estriado), que são áreas críticas para a transmissão sináptica e plasticidade neuronal³⁸.

Além das lesões musculares esqueléticas, a DMD associa-se a um declínio cognitivo, independente da deficiência muscular ou ambiente clínico. Os *déficits* de quociente de inteligência (QI) em pacientes afetam tanto as habilidades de linguagem receptiva e expressiva, como alterações na compreensão auditiva, conhecimento fonológico e de linguagem, bem como atraso de aquisição de leitura^{8,9}.

Salam e colaboradores³⁹ sugeriram que o declínio da função cognitiva em pacientes com DMD esteja associado a níveis aumentados do peptídeo β -amiloide (A β). Os mesmos autores relataram a associação de altos níveis plasmáticos desse peptídeo em casos de síndrome de *down* com maior risco de ocorrência da doença de Alzheimer, neuropatologias e demências. Embora estudos mostrem um declínio cognitivo associado à DMD, estas disfunções ainda precisam ser melhor elucidadas e apresentam-se variáveis em grau de intensidade, provavelmente devido às diferentes expressões genéticas da proteína distrofina⁶. Mutações distais que afetam as isoformas mais curtas da distrofina têm sido associadas a um fenótipo cognitivo mais grave⁴⁰, especificamente as mutações que afetam Dp140 e Dp71, considerando que mutações no gene da região promotora inicial (promotores C) são compatíveis com o funcionamento intelectual típico³⁵.

Assim, a história natural da doença não tratada mostra uma evolução clínica previsível, embora um tanto variável em gravidade. De toda forma, a DMD é uma doença incapacitante e a expectativa de vida não passa da terceira década, com aproximadamente 80% dos casos de óbitos relacionados às complicações respiratórias, enquanto 20% são decorrentes de cardiomiopatias dilatadas⁴¹.

O diagnóstico clínico das distrofinopatia é sugerido pelo histórico genético, pela dosagem sérica de enzimas específicas de células musculares que, em altos

níveis, sinalizam lesões musculares com extravasamento de seu conteúdo citoplasmático (creatina quinase (CK) – comumente acima de 10.000 UI/L; creatinina fosfoquinase sérica – 10 a 50 vezes acima do normal, entre outras) e, se necessário, por biópsia muscular (imunohistoquímica ou por *western blot*) em um terço dos pacientes, nos quais não se consegue identificar a mutação. Para diagnóstico pré-natal, a análise molecular é a mais segura^{1,33,37}. Os sinais mais frequentes são atraso motor ou uma marcha anormal (42%), dificuldade para correr ou levantar-se do chão (20%) e frequência de quedas ou caminhadas nas pontas dos pés (30%) nos meninos afetados⁴. À medida que a doença evolui a fraqueza dos músculos glúteo médio e mínimo resultam em inclinação da pelve quando a criança se mantém em bipedestação, assumido um aspecto típico devido ao excesso de movimento em cintura pélvica, a denominada marcha miopática ou anserina. Sinais menos frequentes incluem atraso no desenvolvimento global (5%) e desenvolvimento da fala (3%)⁴². Ocorrem, principalmente, entre três a cinco anos de idade, progredindo de modo relativamente rápido, de tal forma que por volta dos 12 anos estão dependentes de cadeiras de rodas. A idade média de diagnóstico de meninos com DMD sem uma história familiar é de aproximadamente quatro anos e dez meses³⁷.

Sem tratamento curativo, a qualidade de vida e conforto do paciente pode ser melhorada através de fisioterapia e de tratamentos médicos³³. A fisioterapia motora e respiratória continua sendo um dos pilares do tratamento, sendo indicado o mais precocemente possível, tendo como objetivos prevenção/controle de contraturas dos membros inferiores; capacitar a criança para adquirir domínio sobre seus movimentos; equilíbrio e coordenação geral; retardar a fraqueza da musculatura da cintura pélvica e escapular; corrigir o alinhamento postural; evitar a fadiga; desenvolver a força contrátil dos músculos respiratórios e o controle da respiração pelo uso correto do diafragma; prevenir o encurtamento muscular precoce para prevenir complicações; e, conseqüentemente, melhorar qualidade de vida⁴¹.

Atualmente, a terapia baseada em corticoesteroides, que foi sugerida pela primeira vez em 1974⁴³, é considerada padrão ouro com objetivo de atrasar a progressão da doença e melhorar a função e força muscular em crianças com DMD tratadas a partir de 6 meses a 2 anos de idade. Os corticosteroides são os únicos agentes farmacológicos com benefícios documentados, mesmo associados a vários

efeitos adversos (ganho de peso, perturbações do sistema nervoso, sintomas gastrointestinais, distúrbios metabólicos e osteoporose). Os dois corticosteroides usados principalmente no tratamento de DMD são a prednisona/prednisolona e o deflazacort, um derivado de oxazolina de prednisolona, administrado por dois regimes comuns: diários e intermitentes. Os três protocolos mais comuns são de 0,75 mg/kg/dia de prednisona, 0,9 mg/kg/dia de deflazacort, e 0,75 mg/kg/dia de prednisona durante 10 dias, com pausas de 10 dias^{15,16}.

O tratamento com glicocorticoides, drogas imunossupressoras, é padrão de cuidados para pacientes com DMD e tem papel terapêutico benéfico nas DMP. Tanto a imunossupressão pode atrasar a progressão da lesão muscular, como os efeitos podem refletir na melhora da resposta imunológica de células inflamatórias que se infiltram no músculo danificado^{44,45}.

1.1.2 Processo inflamatório

A inflamação é uma resposta protetora que envolve células do hospedeiro, vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores e é destinada a eliminar a causa inicial da lesão celular, bem como as células e tecidos necróticos que resultam da lesão original e iniciar o processo de reparo⁴⁶. Embora a inflamação tenha uma função protetora (diluindo, destruindo ou neutralizando os agentes nocivos, promovendo cura e/ou reparo nos sítios de lesão), a reação inflamatória e esse processo subsequente de reparo podem, contudo, causar danos consideráveis, lesando também os tecidos normais⁴⁶.

O processo inflamatório caracteriza-se por um evento que estabelece relação entre várias reações, como o aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, exsudação de fluido, acúmulo de leucócitos e macrófagos, formação de tecido de granulação e reparo tecidual. Durante o processo inflamatório, monócitos diferenciam-se em macrófagos e cumprem papéis fisiológicos importantes e participam na fase final do processo inflamatório agudo, fagocitando patógenos, detritos celulares ou contribuindo para o reparo tecidual através da liberação de citocinas que induzem revascularização ou recrutamento de fibroblastos com formação da matriz extracelular⁴⁷.

A permanência do agente lesivo leva a um processo inflamatório crônico, no qual se observa destruição tecidual e tentativa simultânea de reparo. Na inflamação

crônica o tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose. Através da secreção de substâncias atraentes, como citocinas e quimiocinas, o primeiro tipo celular a migrar para o local de inflamação são os neutrófilos, cuja principal função também é fagocítica⁴⁸.

Outra via de ação neutrofílica é mediada por grânulos secretados no meio extracelular, pelo processo de degranulação. Existem três classes de grânulos liberados por estas células: primários, secundários e terciários. Os primários, também conhecidos como grânulos azurófilos, contêm entre outros mediadores importantes (defensinas, elastase neutrofílica, proteína de aumento da permeabilidade bacteriana e as catepsinas G), a mieloperoxidase (MPO), que além de sua atividade microbida na resposta à infecção bacteriana, apresenta atividade oxidativa e inflamatória⁴⁹. A MPO é uma enzima produzida por neutrófilos, monócitos e macrófagos, e sua atividade pode ser usada para quantificar a magnitude da inflamação associada à degeneração muscular em distrofias musculares⁵⁰.

Os mediadores da resposta inflamatória são variados e derivam tanto de precursores plasmáticos quanto de células, incluindo produtos de clivagem de precursores, produtos de cascatas de ativação, substâncias pré-formadas, radicais livres de oxigênio, óxido nítrico (NO^{*}) e derivados do ácido araquidônico^{46,48}.

As citocinas são glicoproteínas extracelulares, pleiotrópicas (diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células), tendo função autócrina ou parácrina. Geralmente, são formadas por células no local da lesão e por células do sistema imunológico em cascata, onde uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas⁵¹.

A IL-1 β e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) têm sido responsabilizados por mecanismos pró-inflamatórios em várias doenças e embora se liguem a distintos receptores, elas dividem participações nos mecanismos patogênicos⁴⁸. Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α são capazes de ativar células endoteliais e conseqüentemente promover a marginação e migração de neutrófilos para uma área inflamada. Ambos induzem a produção de fatores de crescimento endotelial e possuem atividade angiogênica. De maneira sinérgica e mediada através do hipotálamo, atuam como pirogênicos endógenos e estimulam a secreção do fator de liberação da corticotropina, que por sua vez, estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico pela hipófise, induzindo a produção de glicocorticoides pelas

glândulas adrenais. A ativação de eixo hipotálamo-hipófise-adrenal possui efeitos anti-inflamatórios, visto que os glicocorticoides suprimem a produção de IL-1 β e TNF- α ^{51,52}.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação e/ou manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células *natural killer* (NK). Também é responsável pela ativação de astrócitos e microglia, e regula a expressão de neuropeptídeos após lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração⁵¹.

Já a interleucina IL-10 é produzida tardiamente no processo de ativação por linfócitos T *helpers* TH2, linfócitos T CD8, monócitos, queratinócitos e células B ativadas. É originalmente denominada como fator inibidor da síntese de citocinas, por possuir capacidade de inibir a produção de citocinas por linfócitos T ativados. Por outro lado, a IL-10 também possui efeito direto sobre os mastócitos, as células T e as células B, além de promover a produção de anticorpo pelas células B. Ou seja, inibem a ação das citocinas IL-1 β e TNF- α , além de estimular a produção endógena de outras citocinas anti-inflamatórias^{52,53}.

Na DMD, a lesão muscular é exacerbada por um processo inflamatório crônico, do qual participam citocinas e demais células do sistema imunológico. Dentre elas, destacam-se os mastócitos que se acumulam no sítio da lesão, liberando mediadores como TNF- α , IL-1 β e IL-10⁵³. No músculo distrófico, macrófagos produzem níveis elevados de interleucinas e enzima arginase, que converte arginina em ornitina e ureia, aumentando o processo inflamatório. No camundongo mdx, observa-se a presença de macrófagos no tecido muscular já na fase inicial da doença e parecem desempenhar um papel alterado no músculo distrófico, diferente das lesões agudas, onde macrófagos entram no local após ocorrer a lesão. No estudo realizado por Mehuron e colaboradores⁵⁴, foram avaliados parâmetros de citocinas em pacientes com tipos diferentes de distrofia, sendo sete deles com DMD. O estudo mostrou que nos pacientes com DMD ocorreu aumento dos níveis de IL-1 β e IL-10 quando comparados ao grupo controle, e concluiu que todos os grupos apresentaram um aumento nos parâmetros de proteção ao EO e a presença de processo inflamatório. Hodgetts e colaboradores⁵⁵ apresentaram em seu estudo um aumento dos níveis de TNF- α durante a necrose do músculo gastrocnêmio em camundongos mdx. Além disso, a eficiência no reparo do músculo esquelético em camundongos mdx demonstrou-se ser dependente do

bloqueio da produção de TNF- α local. Esta alteração também foi encontrada no soro de pacientes com DMD um aumento de nos níveis de TNF- α , quando comparado com o grupo controle³⁹.

Portanto, a inflamação apresenta papel crucial no desenvolvimento da DMD⁵⁶. Por consequência das alterações da membrana celular causadas pela ausência da proteína distrofina, ocorre uma série de distúrbios fisiológicos, devido a uma resposta de defesa do organismo após um dano celular, culminando em um quadro crônico de inflamação no tecido muscular e encefálico⁵⁷. Somado a isso, o tecido adiposo acumulado no músculo pode levar às alterações metabólicas, uma vez que este não é meramente um tecido inerte dedicado para armazenamento de energia, funcionando como um órgão endócrino, metabolicamente ativo, devido à sua capacidade para secretar hormônios, fatores teciduais e citocinas⁵⁸.

Nesse contexto, o processo de inflamação muscular, característica proeminente da distrofinopatia, pode esgotar os ciclos de degeneração e regeneração da fibra muscular, provocando a substituição das fibras musculares por tecido conjuntivo e adiposo⁵⁶. A fibrose é normalmente considerada a consequência mais deletéria de progressão da doença em crianças com DMD e resulta de uma interação funcional complexa entre tipos de células residentes e infiltrado inflamatório, fornecendo uma fonte adicional de espécies reativas ao oxigênio (ERO) que podem contribuir para o agravamento da patologia^{53,50}.

1.1.3 Estresse oxidativo e metabolismo energético

A formação de ERO *in vivo* constitui um processo contínuo e fisiológico, ocorre via ação catalítica de enzimas e cumpre funções biológicas relevantes quando produzido em proporções adequadas. No entanto, o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros – condição conhecida como EO – conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, causando lesão celular por inativação enzimática, peroxidação lipídica ou modificação do ácido desoxirribonucleico (DNA)⁵⁹.

Em condições fisiológicas normais do metabolismo celular aeróbio, a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons é a principal fonte geradora de ERO. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, ocorre

redução tetravalente de O_2 , com aceitação de quatro elétrons, formando duas moléculas de água e liberando energia. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase, que controla a geração excessiva de ERO. No entanto, de 2 a 5% do oxigênio metabolizado neste processo são reduzidos de forma univalente, dando origem ao radical superóxido (O_2^{\cdot}) pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental; ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação; ao radical hidroxil (OH^{\cdot}) pela reação de Fenton e Haber-Weiss, quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre; e, também, pode haver geração de espécie reativa de nitrogênio, o peroxinitrito (ONOO), por meio da reação com o radical livre NO^{\cdot} ⁶⁰.

A cadeia respiratória é o estágio final do metabolismo que produz energia nos organismos aeróbios, formada por quatro complexos proteicos (I, II, II-III e IV) e dois componentes transportadores de elétrons: a coenzima Q, que transporta elétrons do complexo I e II ao complexo II-III; e, o citocromo c, que transporta elétrons do complexo II-III ao complexo IV. A função global da cadeia respiratória é a oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina reduzida ($FADH_2$), provenientes de outras vias metabólicas, bem como o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de uma série de transportadores para o aceitador final, o oxigênio⁶¹.

Em síntese, os complexos I, III e IV funcionam como uma bomba de prótons. Estes íons acumulam-se no espaço intermembranar, criando uma diferença de potencial eletroquímico, utilizado pela adenosina trifosfato (ATP) sintase na formação de ATP, a partir de adenosina difosfato (ADP). O complexo I contribui significativamente para a produção de energia na mitocôndria, pois é responsável pela transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. O complexo II é denominado de succinato-ubiquinona, onde a ubiquinona oxirredutase é formada pela succinato desidrogenase, enzima do ciclo de Krebs, que gera $FADH_2$ e três subunidades hidrofóbicas. O complexo III transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O último complexo IV é responsável pela doação de quatro elétrons para a molécula de oxigênio (O_2) que se liga aos prótons do meio e converte-se em água⁶¹.

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP, bem como o dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e consequente morte celular.

Como forma de proteção, a célula possui um sistema de defesa que atua basicamente em duas linhas: uma como detoxificadora do agente antes que ocorra a lesão, constituída por GSH, superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; e, a outra linha tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. A enzima SOD por sua vez, é responsável pela conversão do O_2^{\cdot} em H_2O_2 , o qual, através da ação da CAT é convertido em oxigênio e água. O desequilíbrio desse processo, ou seja, quando a concentração de SOD estiver menor do que a concentração de superóxido, teremos o EO, pela conversão do H_2O_2 em OH^{\cdot} ⁶².

Outra importante fonte geradora de ERO são as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato reduzida (NADPH oxidase), que na sua própria função primária de proteínas transmembrana, transferem elétrons para o oxigênio molecular. A NADPH oxidase melhor caracterizada é a fagocítica, presente em macrófagos e neutrófilos, sendo um complexo proteico multimérico com componentes na membrana celular e no citoplasma: duas proteínas transmembrana (subunidade menor: p22phox; subunidade maior: gp91phox), que formam o citocromo b558-oxidase e são formadoras do sítio catalítico da enzima; três proteínas citoplasmáticas (p47phox, p67phox, p40phox – phox de “*phagocyteoxidase*”); e uma proteína G regulatória. Unidades homólogas à subunidade gp91phox formam a família Nox (de “*Nonphagocytic NADPH oxidase*”), constituída atualmente por sete membros (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2)^{10,63}.

Em camundongos mdx, há um aumento da expressão de subunidades da NADPH oxidase e aumento da produção de ERO por esse complexo enzimático na musculatura esquelética^{10,53}. Sugere-se, portanto, que a NADPH oxidase seja um importante contribuinte para a patologia no músculo esquelético, com perda de massa muscular e envelhecimento na musculatura esquelética, onde já foram identificadas neste tecido as isoformas Nox4 e Nox2, além das subunidades p22phox, p47phox e p67phox¹⁰.

As NADPH oxidases são ativadas e reguladas por diversos fatores, como forças mecânicas, hormônios e citocinas, dentre os quais se destacam a trombina, o fator de crescimento derivado de plaqueta, o TNF- α , a lactosilceramida, a IL-1 e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada. Esta última aumenta a produção de

ERO e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) e a expressão de Nox4 no endotélio humano⁶³.

Músculos distróficos parecem ser mais suscetíveis ao EO por resposta antioxidante insuficiente ou, ainda, por reações oxidantes exacerbadas, nas quais os processos que levam à lesão e morte de músculo excedem a capacidade regenerativa, promovendo infiltração de células inflamatórias, agravando os danos e interferindo na sinalização de células que podem promover a reparação NADPH oxidase, mitocôndrias, dissociação da enzima NO-sintase induzível (i-NOS) e demais fatores envolvidos^{10,53}.

Destacam-se, ainda, os tecidos com elevadas exigências de energia, como o cérebro, que contêm um grande número de mitocôndria e, por conseguinte, são mais susceptíveis aos efeitos de redução do metabolismo energético aeróbico. A alteração na função mitocondrial pode influenciar na excitabilidade neuronal, incluindo produção de ATP, oxidação de ácidos graxos, controle de apoptose e de necrose, regulação do ciclo de aminoácidos, biossíntese de neurotransmissores e regulação da homeostase do Ca citosólico. É nesta organela que ocorre a produção primária das ERO, tornando-a vulnerável ao dano oxidativo^{12,14}.

Com o intuito de identificar os danos causados pelas ERO e a eficácia da defesa antioxidante, comumente são usados biomarcadores sanguíneos do balanço *redox*. Eles são capazes de avaliar o dano oxidativo em estruturas lipídicas, através da lipoperoxidação e avaliar o dano oxidativo a proteínas, através dos compostos carbonílicos e sulfidrílicos. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Como consequência, ocorre perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular⁵¹.

A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos^{64,65}. Assim como na formação dos ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória⁵⁸. As proteínas também são alvos das ERO e causam modificação em sua estrutura, provocando perda da função e fragmentação das estruturas proteicas,

resultando na proteína carbonil. Seu conteúdo é, atualmente, usado como marcador de oxidação, e suas alterações de concentrações estão sendo utilizadas na identificação de doenças degenerativas e processos inflamatórios⁶⁵.

Algumas situações que geram ERO também podem auxiliar os neutrófilos e macrófagos na defesa do organismo, pois contém atividade bactericida pela degradação oxidativa de lipídios e proteínas. Por outro lado, a ERO pode ter efeito prejudicial quando possui produção excessiva, causando oxidação celular, considerada a fase inicial de inúmeras patologias cardíacas, pulmonares, vasculares e neoplasias⁵¹.

Estudos clínicos vêm demonstrando o papel do EO em processos neurodegenerativos, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, acidente vascular encefálico, depressão^{66,67} e DMP^{11,68}. Em estudo experimental com modelo animal, Comim e colaboradores¹¹ observaram redução da peroxidação lipídica (corpo estriado) e da peroxidação proteica (cerebelo e córtex pré-frontal), aumento da atividade da SOD (cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) e redução da atividade da CAT (estriado) em camundongos mdx, sugerindo um possível papel antioxidante da SOD em relação à peroxidação lipídica e de proteínas.

Nesse contexto, em revisão Tidball e colaboradores⁵³ evidenciaram que as numerosas características da fisiopatologia da DMD podem ser causados ou exacerbados por perturbações na produção de ERO sugerindo que os tratamentos com antioxidantes podem ter um efeito terapêutico. No entanto, os ensaios clínicos iniciais, utilizando tratamento com vitamina E não resultaram em melhora clínica em pacientes com DMD, embora a falha dessas tentativas possa ser atribuível ao tratamento em estado mais avançado da doença. Da mesma forma, o tratamento de pacientes com DMD com selênio, um cofator para a GSH-Px, não produziu nenhuma melhora na função muscular, bem como nenhuma melhora funcional significativa foi observada em pacientes com DMD tratados com SOD⁵³.

Tidball e colaboradores⁵³ explicaram que muitas razões podem estar subjacentes à incapacidade destes tratamentos antioxidantes no intuito de desacelerar a progressão da DMD, sugerindo em primeiro lugar que o EO, talvez, possa não ser um fator crucial na fisiopatologia. Outra hipótese descrita é que tratamentos sistêmicos com os antioxidantes podem ser muito amplos e insuficientemente direcionados para tecidos específicos para fornecer melhorias clínicas, uma vez que a estequiometria das ERO é mais importante na determinação

de um balanço *redox* fisiológico ou patológico das células, comparado com apenas a presença ou ausência destes antioxidantes. Além disso, os antioxidantes podem também assumir papel não desejado causando lesão tecidual. Por exemplo, a SOD é um antioxidante, mas atua na conversão da dismutase para formar H_2O_2 , que possui alta citotoxicidade⁶⁹.

Assim, os antioxidantes têm múltiplas funções, complexidade e imprevisibilidade da bioquímica de ERO *in vivo*, sendo necessário um conhecimento mais mecanicista dos papéis das ERO na distrofinopatia, uma vez que a distrofina é expressa não só nos músculos, mas também, em sinapses inibitórias centrais no cerebelo, hipocampo, amígdala e no córtex cerebral⁷⁰ – regiões importantes na formação da memória em humanos e roedores, além do giro cingulado, corpo mamilar e tálamo anterior^{71,72}.

1.1.4 Fator neurotrófico derivado do cérebro

Durante o processo de aprendizagem e formação de memória, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) atua em diversas funções no cérebro adulto. Expresso abundantemente no hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral, o BDNF – pequena proteína dimérica que funciona por meio de ligação de alta afinidade com o seu receptor, tirosina-quinase β (Trk β) – desempenha um papel importante na sobrevivência, manutenção e crescimento de vários tipos de neurônios^{73,74}.

O BDNF destaca-se entre todas as neurotrofinas pelos altos níveis de expressão no cérebro e seus potentes efeitos sinápticos. No SNC de mamíferos, os principais representantes da família das NT incluem ainda o fator de crescimento de nervo (NGF) e as neurotrofinas NT-3 e NT-4. Estas proteínas são conhecidas por estarem presentes em estágios específicos do crescimento e sobrevivência neuronal como a divisão celular, diferenciação e axogênese e também em processos de morte neuronal^{74,75}.

Uma das características mais importantes da síntese de BDNF é a elaboração de várias isoformas funcionalmente ativas, como pro-BDNF e m-BDNF. Entre as funções mais importantes do pro-BDNF, pode-se mencionar a promoção da apoptose e sua influência negativa sobre o remodelamento neuronal. Devido à redução do número de neurônios e à deterioração da função sináptica, esses

processos contribuem para a depressão de longo prazo (LTD). Em contraste, o m-BDNF apoia os processos de desenvolvimento de neurogênese e gliogênese, crescimento de neurites, arborização dendrítica e formação de coluna dendrítica. O efeito fisiológico do m-BDNF está relacionado principalmente à manutenção da força sináptica e à diminuição da excitabilidade dos interneurônios GABAérgicos do hipocampo, aumentando a potenciação a longo prazo (LTP). Assim, a função fisiológica do m-BDNF está ligada ao aprimoramento dos processos de desenvolvimento, bem como aos processos na idade adulta que exigem maior atividade cerebral e apoiam a transmissão de estímulo eficiente no sistema sináptico, modulando os processos de cognição, memória e aprendizado⁷⁴.

É proposto que a perda de suporte neurotrófico endógeno para grupos de neurônios específicos pode levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Ainda não está claro se os neurônios maduros são dependentes da presença de suporte neurotrófico derivado de marcadores, embora várias observações mostrem que certas populações neuronais dentro do SNC adulto requeiram a presença de fatores neurotróficos para manter sua estrutura e função. O BDNF tem ações de promoção da sobrevivência numa variedade de neurônios do SNC, incluindo neurônios hipocámpais e corticais, neurônios colinérgicos e neurônios dopaminérgicos nigros. Além disso, como neuromodulador, o BDNF pode regular a força sináptica e é importante para os mecanismos hipocámpais de aprendizagem e memória⁷⁶. Portanto, a expressão aumentada de BDNF tem reflexo positivo no aumento da cognição e estas propriedades funcionais do BDNF aumentaram o interesse na sua utilização como um potencial agente terapêutico para doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a doença de Huntington e, mais recentemente, as DMP.

Portanto, os fatores neurotróficos são essenciais na regulação da geração, diferenciação e proliferação de neurônios e na manutenção da plasticidade neuronal. Assim, o BDNF, além do seu papel na sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento, ativa os caminhos de sinalização que modificam rapidamente as sinapses locais e também têm efeitos em longo prazo na transcrição genética⁷⁶.

Em estudos pré-clínicos, a redução ou supressão dos níveis de BDNF no hipocampo prejudicou o desempenho do aprendizado e da memória em animais^{11,72}, sendo que a expressão excessiva de BDNF resgatou esse defeito⁷⁶. Em camundongos mdx, Comim e colaboradores⁷⁷ identificaram uma diminuição nos

níveis de BDNF no estriado, além de uma tendência de redução nos níveis dessa neurotrofina na região do córtex pré-frontal, do cerebelo, hipocampo e córtex. Os autores relacionaram que os baixos níveis de BDNF podem estar associados à deficiência de distrofina e contribuindo, em parte, no armazenamento e restauração de memória. Em humanos, Comim e colaboradores⁶⁸, em uma amostra de 24 pacientes, destacaram também a primeira evidência do envolvimento dos baixos níveis de BDNF nas DMP.

Nesse contexto, a deficiência de distrofina em estruturas encefálicas como o hipocampo, está relacionada aos prejuízos na retenção de memória e atrasos nas tarefas de aprendizagem.

1.1.5 Memória e aprendizado

Tanto a aprendizagem como a memória são propriedades fundamentais do SNC. Conceitualmente, a memória compreende a aquisição, consolidação, armazenamento e a evocação de informações, podendo ser definida como o registro da representação de informações adquiridas através de experiências⁷⁸. Enquanto a aprendizagem pode ser definida como uma mudança relativamente duradoura do comportamento, de uma forma sistemática, ou não, adquirida pela experiência, pela observação e pela prática motivada⁷⁹.

O processo de aprendizado é caracterizado pela aquisição de informações do ambiente. A formação tem início no hipocampo pela ativação de receptores de glutamato do tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) que possibilitam a despolarização da célula com ativação em sequência dos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Essas informações dão origem às memórias através de um processamento para formação, consolidação e posterior evocação⁸⁰.

Uma das teorias da consolidação da memória postula que o armazenamento e a evocação de memórias recentes dependem do hipocampo enquanto que, em estágios posteriores, o hipocampo interage com regiões neocorticais, onde as conexões córtico-corticais se desenvolvem progressivamente e, direcionam a estocagem e a lembrança das memórias remotas⁸¹.

Quanto ao tempo que permanecem armazenadas, as memórias são ditas de curta duração, com duração de poucas horas; de longa duração, com permanência de horas ou dias; ou, ainda, memórias remotas, que são as memórias de longa

duração que persistem por muitos meses ou anos. As memórias de longa duração necessitam de síntese de proteína, o que não ocorre na memória de curta duração^{80,81}.

De qualquer forma, não é possível medir memórias em forma direta. Mas, é possível avaliá-las medindo o desempenho em testes de evocação e, nos animais, a evocação se expressa através de mudanças comportamentais⁸⁰. A habituação envolve a depressão da transmissão sináptica e essa forma de aprendizagem pode ser ilustrada pelo reflexo de flexão de um membro frente a um estímulo tátil, que se habitua a repetidos e inócuos estímulos. Sugere-se que essa habituação seja devida à redução funcional na eficiência sináptica, nas vias dos neurônios motores que tenham sido repetidamente estimulados⁸².

Já a sensibilização envolve um aumento da transmissão sináptica, após a ocorrência de estímulos aversivos. O organismo aprende a reagir de forma mais vigorosa a um estímulo específico. Da mesma forma que a habituação, a sensibilização envolve uma memória de curto prazo (duração de alguns minutos) e uma de longo prazo (com duração de dias ou semanas). A sensibilização envolve a facilitação heterossináptica: o estímulo sensibiliza um grupo de interneurônios que formam sinapses com os neurônios sensoriais⁸².

Deficiências cognitivas ocorrem em aproximadamente um terço dos pacientes com DMD, destacando o papel da distrofina no SNC. O QI médio de meninos diagnosticados com DMD é 85, enquanto 30% têm um QI inferior a 70. Estes *déficits* mentais não parecem ser progressivos (ao contrário dos sintomas musculares) e relacionados com a gravidade da distrofia muscular, apesar de suas causas ainda permanecerem desconhecidas⁷⁰.

Em um estudo com 20 pacientes, de 07 a 14 anos, os resultados indicaram que problemas na memória de curto prazo são as mais aparentes, sugerindo *déficits* cognitivos específicos. A capacidade de aprendizagem foi significativamente pior quando se considerou o efeito combinado dos testes cognitivos entre os meninos com DMD⁸³.

Outros estudos relataram transtorno de inteligência com alto comprometimento da memória, especialmente a longo prazo. *Déficit* de atenção também foi relatado com dificuldades de aprendizagem em aritmética, escrita e leitura. Em crianças afetadas com DMD também foram observados transtornos afetivos, problemas depressivos e medos hipocondríacos⁸⁴.

Em estudos pré-clínicos, Muntoni e colaboradores (1991)⁸⁵ fizeram o primeiro relato do *déficit* cognitivo em camundongos mdx, associado à retenção deficiente de memória com longos atrasos em certas tarefas de aprendizagem e alternância espacial. O comprometimento cognitivo foi posteriormente caracterizado por Vaillend e colaboradores (1995)⁸⁶, que descreveram que camundongos mdx não apresentaram prejuízo na aquisição de tarefas ou na memória de procedimentos, mas possuíram uma menor capacidade de armazenamento do aprendizado recente, com atrasos em certas tarefas de aprendizagem⁶.

Portanto, com um déficit cognitivo caracterizado, intervenções terapêuticas têm recebido interesse crescente como forma de melhorar ou preservar o desempenho cognitivo.

1.1.6 Dieta cetogênica

A dieta cetogênica foi idealizada em 1924 pelo Dr. Russell Wilder na Clínica Mayo, em Rochester, Minnessota nos Estados Unidos da America (EUA) e, popularizada pelo Hospital Johns Hopkins, em Baltimore, EUA. Foi amplamente utilizada para reduzir crises de epilepsia, mas com a chegada de medicamentos anticonvulsivos na década de 1940, caiu em desuso gradualmente. Em 1994, a dieta ressurgiu como último recurso no tratamento de epilepsia de difícil controle de Charlies Abrahams. Após a falha de vários antiepilépticos e até mesmo de recursos cirúrgicos, a dieta cetogênica funcionou e Charlie tornou-se livre das crises. Neste mesmo ano, a Fundação Charlie para Terapias Cetogênica foi fundada para fornecer informações sobre a terapia dietética para pessoas com epilepsia e outros distúrbios neurológicos^{15,73,89}.

Além da sua importante utilidade para epilepsia pediátrica resistente aos fármacos, a dieta cetogênica tem tido sua abordagem nutricional amplamente utilizada para perda de peso⁹⁰. Tradicionalmente, uma dieta com baixo teor de gordura é prescrita para redução da gordura corporal em pacientes obesos com ou sem risco de doença cardiovascular. No entanto, uma meta-análise em 23 estudos controlados envolvendo 1141 pacientes obesos, relatou que a dieta testada desempenhou efeitos favoráveis na saúde cardiovascular⁹¹. Em particular, a dietoterapia cetogênica está associada a reduções significativas no plasma de triglicerídeos, glicose em jejum, hemoglobina glicada, insulina plasmática, proteína

C-reativa, pressões arteriais sistólica e diastólica, massa corporal total, circunferência abdominal, bem como aumentos significativos na lipoproteína de alta densidade colesterol (HDL-c), sem alterações significativas na lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDL-c)^{90,92}.

A dieta cetogênica foi desenvolvida para criar e manter um estado de cetose através de um protocolo original com alto teor de gordura, quantidade adequada de proteína e níveis mínimos de carboidratos. A baixa ingestão de carboidratos fisiologicamente provoca um estado metabólico de aumento da cetogênese hepática, o que resulta em níveis séricos elevados dos principais corpos cetônicos ácido acetoacético (ACA), β -hidroxibutírico (BHB) e acetona, devido à quebra de ácidos graxos^{93,94}.

Como a glicose é um nutriente necessário para o SNC, assim como para os glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, leucócitos e outros tecidos, a glicemia deve ser mantida em todos os momentos para manter suas funções fisiológicas. Durante o início de jejum, a glicose é obtida a partir do glicogênio pela ação dos hormônios glucagon e epinefrina, mas esses estoques são esgotados dentro de 24 horas. Nesse momento, a glicose deve ser sintetizada novamente utilizando a proteína como um substrato. O músculo e outras proteínas são estimulados para liberação de substratos para a gliconeogênese pela ação dos hormônios catabólicos epinefrina, tiroxina e glucagon. Nesse processo de gliconeogênese, os aminoácidos liberados são transportados para o fígado para deaminação e o esqueleto de carbono é utilizado para refazer a glicose. O substrato de aminoácido mais comum para esta atividade é a alanina, pois a alanina desaminada torna-se piruvato⁹⁵.

É importante observar que a gordura não é um substrato para gliconeogênese. Por isso, durante o jejum ou inanição, além da glicose e da proteína da quebra do músculo, é necessária uma fonte de energia segura. A melhor fonte é a gordura que está armazenada nos adipócitos e é utilizada primeiramente pelos músculos, incluindo o músculo cardíaco para produzir ATP. A liberação destes macronutrientes armazenados necessita que a insulina sérica seja mantida em nível baixo e que os hormônios anti-insulínicos (glucagon, cortisona, epinefrina e hormônio do crescimento) sejam aumentados. Os hormônios anti-insulina ativam a enzima lipase hormônio-sensível na membrana dos adipócitos, a qual cliva os triglicerídeos armazenados, liberando ácido graxo e glicerol da célula de gordura. Os ácidos graxos deslocam-se para o fígado, ligados à albumina sérica e entram

facilmente na célula hepática. Já no interior da célula, os ácidos graxos usam o sistema de transporte carnitina aciltransferase para entrar nas mitocôndrias hepáticas.

Uma vez dentro da mitocôndria, os ácidos graxos são habitualmente convertidos em acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Quando os níveis de ácidos graxos são elevados e excedem a capacidade metabólica do ciclo do TCA, o acetil-CoA é desviado para a cetogênese. Dois acetil-CoA podem combinar-se através de uma enzima para produzir tiolaseacetil-CoA-reductase, o qual é um precursor para a síntese de ACA e BHB. A acetona, outro corpo cetônico principal, é produzida principalmente a partir de descarboxilação espontânea de ACA e, pode ser eliminado como um substrato volátil através dos pulmões e dos rins. No sangue, ACA e BHB são transportados a partir do lúmen vascular para o espaço intersticial do cérebro, até as células gliais e neurônios, pelos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT). O MCT-1 é o principal transportador responsável localizado no endotélio vascular. Já nos neurônios, tanto ACA e BHB são transportados diretamente para dentro da mitocôndria e, em seguida, convertidos em acetil-CoA por meio de várias etapas enzimáticas. BHB é convertido em ACA através desidrogenase-D-β hidroxibutirato e ACA sofrem uma conversão subsequente para acetoacetil-CoA através de uma enzima transferase de succinil-CoA. Finalmente, acetoacetil-CoA-tiolase é convertido em acetil-CoA em duas porções de acetil-CoA que, em seguida, entra no ciclo do TCA^{21,95}.

Portanto, à medida que aumentam as concentrações séricas de cetonas durante o jejum, o SNC começa a utilizar cetonas como fonte de energia. Como o encéfalo está consumindo combustível diferente da glicose, diminui a demanda da proteína muscular para gliconeogênese, reduzindo dessa forma a taxa de catabolismo muscular⁹⁶.

Atualmente, existem três formas de dieta cetogênica em uso: dieta cetogênica tradicional (com oferta de triglicerídeos de cadeia média ou longa); dieta modificada de Atkins; e, o tratamento de baixo índice glicêmico (TBIG)^{88,89}. A dieta de Atkins permite maior liberdade de consumo de carboidratos e não restringe significativamente a ingestão de proteínas em comparação com o dieta cetogênica clássica. O TBIG fundamenta-se em uma adesão dietética de alimentos com índices glicêmicos (IG) baixos. O IG é um valor que descreve a capacidade de um carboidrato após absorvido de elevar a glicemia sérica. Curiosamente, TBIG não

induz a um estado de cetose tão relevante quando comparado com dieta cetogênica clássica ou Dieta de Atkins^{14,89}.

Já na abordagem tradicional, o paciente é induzido ao jejum de 24 a 72 horas até que a cetonúria seja estabelecida. A partir deste momento a ingestão calórica é retomada em uma razão de 4:1 (kcal de gordura/kcal de proteínas e carboidrato na dieta). Porém, outras proporções menores como 3:1 e 2:1 também são protocolos utilizados. Para crianças, a dieta é calculada para que 75% das quilocalorias sejam provenientes de lipídeos. A proteína é calculada para fornecer ingestão apropriada para o crescimento (cerca de 1g/kg/dia) e os carboidratos são adicionados para compensar a porção calórica restante. É também recomendado o uso de um suplemento múltiplo de vitaminas/minerais e Ca extra para assegurar que a dieta seja nutricionalmente completa^{87,97}.

A dieta deve ser realizada por indicação e com acompanhamento profissional, preferencialmente em centro especializado, com equipe multidisciplinar (composta, no mínimo, de um nutricionista e de um neurologista), visto que se torna necessário um acompanhamento rigoroso durante a sua introdução e manutenção. É papel do nutricionista realizar um plano dietético adequado quanto ao peso, altura e idade do paciente, bem como elaborar um cardápio variado que esteja de acordo com as necessidades calóricas e com a proporção adequada de macronutrientes^{97,98}.

Embora o mecanismo de ação da dieta ainda não seja totalmente compreendido até o momento, este é um tratamento já estabelecido para epilepsia refratária. O seu efeito benéfico na epilepsia tem sido relacionado às alterações no mecanismo neuronal, pelo qual os corpos cetônicos comportam-se como um neurotransmissor inibitório, produzindo assim efeito anticonvulsivo. Os corpos cetônicos fornecem substrato alternativo à glicose para utilização de energia e, no cérebro em desenvolvimento, também constituem elementos essenciais para a biossíntese de membranas celulares e lipídios. O mecanismo neuroprotetor mais relevante de ação da dieta cetogênica envolve uma redução na produção de ERO da cadeia respiratória mitocondrial, o que diminui o EO e, conseqüentemente, a lesão neuronal⁸⁹.

Ruskin e Masino (2012)⁹⁹ em um estudo de revisão descreveram que a dieta cetogênica protegeu contra a neurodegeneração induzida por convulsão e sequelas relacionadas em modelo animal. A dieta cetogênica também apresentou efeitos neuroprotetores contra a lesão isquêmica; dano hipoglicêmico e lesão espinhal e

cerebral traumática; além de melhorar os *déficits* cognitivos e do movimento relacionados com a lesão cerebral traumática e lesão na coluna vertebral, respectivamente. Os efeitos positivos da alimentação cetogênica foram encontrados ainda em modelos de esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Além disso, a aplicação direta de corpos cetônicos também foi benéfica em modelos animais de doença de Parkinson e doença de Alzheimer.

Ahola-Erkkilä e colaboradores (2010)²³ mostraram resultados nos quais a dieta cetogênica pode induzir a biogênese mitocondrial, retardando a progressão de miopatias mitocondriais e reduzindo a quantidade de fibras citocromo-oxidase (COX) negativas no músculo quando administrado pré-sintomaticamente. No experimento, a dieta apresentou efeito protetor no músculo esquelético de camundongos (C57BL/6) alimentados com dieta cetogênica, nos quais não apresentaram autofagia induzida quando comparados com o grupo controle e mostraram níveis de aminoácidos livres no soro semelhantes como os camundongos *wild type* (wt), indicando inibição do catabolismo proteico. Os autores concluíram que uma dieta rica em gordura tem múltiplos efeitos positivos sobre a miopatia mitocondrial de início tardio em murinos, retardando a progressão da doença, regulando negativamente o catabolismo proteico associado à miopatia, restaurando e normalizando a homeostase dos níveis lipídicos hepáticos e, assim, a síntese de corpos cetônicos. Neste estudo, os resultados sugerem fortemente que o tipo de fonte de energia pode modificar consideravelmente o metabolismo energético do músculo esquelético deficiente na cadeia respiratória.

Dupuis e colaboradores (2015)²⁵ modularam o processo inflamatório em ratos *Wistar* submetidos a injeções de LPS (*E. coli*) com redução da expressão de IL-1 β no tecido encefálico, revelando propriedades anti-inflamatórias da dieta cetogênica mostrado por uma modulação da resposta de febre e um decréscimo nos níveis de IL-1 β no plasma e no cérebro. Os níveis de TNF- α no sangue também foram menores no grupo submetidos a dieta cetogênica em comparação com os controles. Estas propriedades podem contribuir para o efeito da dieta cetogênica no campo das distrofinopatias, nas quais a inflamação contribui para a prematuridade das alterações no SNC, devendo ser exploradas para entender melhor as propriedades anti-inflamatórias da dieta.

Xu e colaboradores (2010)¹⁰⁰ ao avaliarem as habilidades cognitivas e motoras no envelhecimento de ratos isogênicos, observaram que a função cognitiva

apresentou melhora com a dieta cetogênica nos ratos mais velhos. Nos ratos idosos, a cetose induziu a angiogênese e aumentou a densidade capilar equivalente à observada após a exposição à hipóxia em ratos jovens. Os autores especulam que a dieta cetogênica revitaliza a unidade neurovascular nos ratos mais velhos ajudando a apoiar a função cognitiva. Assim, a cetose induzida por dieta pode melhorar o processo de adaptação à hipóxia por elevação do HIF1- α e aumento da densidade capilar.

Apesar dos benefícios estabelecidos da dieta cetogênica na literatura científica, não foram encontrados estudos científicos publicados até o momento sobre o efeito da dieta cetogênica nas DMP. No entanto, em um experimento em modelo animal de DMD, submetidos a um protocolo de exercício físico e alimentados com uma dieta hiperlipídica (16% de gordura, 19% de proteínas), Radley-Crabb e colaboradores²⁷ destacaram os benefícios potenciais de uma dieta rica em gordura no músculo esquelético distrófico, uma vez que a dieta hiperlipídica mostrou resultados positivos no modelo mdx para melhor atender as necessidades energéticas e reduzir a gravidade da distrofinopatia, bem como aumentar a capacidade de exercício voluntário dos animais.

Segundo os próprios autores, tais dados podem identificar que ajustes nutricionais podem abrandar a gravidade da doença, a progressão e/ou o desenvolvimento de complicações secundárias. Embora algumas alterações da doença possam ser atribuídas a diferenças na composição celular que resultam da gravidade dependente da idade, esses dados demonstraram também que há consequências metabólicas quanto à ingestão dietética que não satisfazem as exigências metabólicas alteradas pelo músculo distrófico, podendo exacerbar a patogênese da doença²⁷.

Radley-Crabb e colaboradores (2011; 2015)^{27,28} destacaram que a menos que as necessidades de energia e proteína de pacientes com DMD sejam satisfeitas, o benefício de intervenções terapêuticas não poderão ser plenamente compreendidos. Para os autores, essas observações sobre as inter-relações de crescimento, as taxas de síntese de proteínas, as necessidades de energia, a dieta e os níveis de atividade física têm inúmeras implicações para a compreensão da patologia de base dos músculos distróficos, especialmente no que diz respeito à susceptibilidade à necrose de miofibrilas, tanto em jovens como em adultos. Assim, estes dados começam a formar uma base para a compreensão das exigências de energia e

proteínas incorridas pela doença muscular, bem como a concepção e impacto de várias intervenções nutricionais em modelo animal ou humano de DMD, com o objetivo de proteger o músculo distrófico da necrose e ajudar a manutenção da massa muscular em diferentes estágios da doença.

Sabe-se que os nutrientes, individualmente, podem exercer efeitos positivos no músculo esquelético e uma combinação de elementos pode ainda atenuar os sinais e sintomas de algumas doenças neuromusculares. Por outro lado sabe-se também que os efeitos de uma dieta sobre a saúde estão relacionados com a relação geral e mútua dos diferentes macro e micronutrientes, em vez de cada componente particularizado. Desse ponto de vista, se reforça o grande interesse na proposta da dieta cetogênica na fisiopatologia da DMD.

Nesse contexto, a terapia nutricional e cuidados dietéticos se apresentam como uma abordagem de impacto substancial sobre o curso da doença, influenciando diretamente no estado nutricional e, conseqüentemente, na modulação do estado oxidativo e inflamatório do organismo, tornando-se essencial para melhorar a qualidade de vida do paciente. Para isso, estudos pré-clínicos em modelos animais tem sido uma estratégia útil para avançar na descoberta de tratamentos e/ou terapias para distrofinopatia.

1.1.7 Modelo animal de DMD

A tecnologia de camundongos geneticamente modificados mostra-se como uma valiosa ferramenta que permite identificar grandes avanços no entendimento da patologia de doenças neurodegenerativas. Pelo fato de o camundongo e o ser humano partilharem muitos dos mesmos genes, a capacidade de manipular o material genético do camundongo e analisar o impacto sobre o metabolismo e a função fisiológica tem sido inestimável para compreensão da saúde e da doença em seres humanos, sendo particularmente valiosos para o estudo de interações gene-dieta¹⁰¹.

Em murinos, a DMP foi inicialmente identificada em uma colônia de camundongos Bar Harbor 129/ReJ-dy/dy. Este modelo experimental foi bastante utilizado até a descoberta do defeito molecular das distrofias de Duchenne e Becker. Um segundo alelo dy surgido na colônia WK/ReJ foi, então, transferido para a linhagem de camundongo C57BL/6J¹⁰².

C57BL/6 é uma estirpe consanguínea bem conhecida e amplamente utilizada no desenvolvimento de modelos transgênicos e *knock out*. São amplamente utilizados em pesquisas e avaliações pré-clínicas apresentando facilidade em reprodução, uniformidade genética, economia, conveniência para experimentos em laboratórios e empregados como modelo *in vivo* no estudo de diversas áreas, tais como biologia cardiovascular, biologia do desenvolvimento, diabetes e obesidade, genética, imunologia, neurobiologia, oncologia e biologia comportamental^{103,104}.

O modelo murino da DMD, camundongo mdx, é caracterizado por uma total ausência da expressão da distrofina no músculo esquelético, ou seja, homólogos à DMD humana. A mutação da distrofina ocorre no éxon 23 e a inflamação do músculo esquelético inicia-se com três semanas de idade e atinge picos entre 08 e 16 semanas^{44,104}.

O camundongo mdx tem sido um recurso fundamental na exploração da fisiopatologia distrófica por permitirem a realização de estudos criteriosos com a utilização de agentes moduladores, capazes de modificar o curso da doença e possibilitar avanços no tratamento da DMD^{33,102}.

Nesse contexto científico, a dieta cetogênica tem despertado interesse e o seu uso tem se ampliado a partir da epilepsia intratável para outras doenças neurológicas. É notável a quantidade de artigos científicos publicados em periódicos abordando os mais diversos aspectos do uso da dieta cetogênica, desde suas indicações, métodos de utilização, principais efeitos adversos e custos envolvidos. Com isso, justifica-se a investigação dos potenciais efeitos terapêuticos dessa dietoterapia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da dieta cetogênica sobre parâmetros bioquímicos e clínicos em sistema nervoso central e músculo esquelético em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar os efeitos da dieta cetogênica sobre a massa corporal e ingestão alimentar em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne;

-Avaliar os efeitos da dieta cetogênica sobre a memória aversiva e de habituação em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne;

-Analisar os efeitos da dieta cetogênica sobre o perfil inflamatório no tecido encefálico e muscular esquelético em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne;

-Analisar os efeitos da dieta cetogênica sobre o estresse oxidativo no tecido encefálico e muscular esquelético em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne;

-Analisar os efeitos da dieta cetogênica sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase no tecido encefálico e muscular esquelético em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne.

-Avaliar os efeitos da dieta cetogênica sobre os níveis de BDNF em tecido encefálico em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo apresenta-se como pré-clínico com delineamento experimental.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

As etapas experimentais ocorreram no Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da referida universidade, bem como da unidade do *campi* de Tubarão-SC (Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos); e, Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina (UNESC).

As análises bioquímicas foram realizadas utilizando reagentes específicos por técnicas: ácido 2-tiobarbitúrico $\geq 98\%$, Sigma Aldrich[®]; dinitrofenilidrazina (DNPH); Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB); 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoic acid) $\geq 98\%$, Sigma Aldrich[®]; albumina bovina, $\geq 98\%$; kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de citocinas para camundongos, BioAssay Systems[®], USA; kit quantitativo colorimétrico de BDNF, BioAssay Systems[®], USA; kit quantitativo colorimétrico de corpos cetônicos, BioAssay Systems[®], USA; tiopental sódico, 10mg/kg, Thiopentax[®], Brasil. Todos os reagentes utilizados foram de grau de alta pureza.

Para avaliação da memória e habituação, foi utilizada a caixa de esQUIVA passiva para camundongos - *step down* (equipamento em alumínio de 2mm, chão de barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5mm, área interna de fuga com 260 mm x 100 mm, porta e frente em acrílico transparente, com alimentação 127/220V) e a caixa de teste campo aberto (equipamento em madeira MDF branca, 40 cm x 60 cm, chão demarcado com linhas pretas em 09 quadrantes, delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo a da frente em vidro transparente).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos adultos mdx e camundongos C57bl/6 (wt), na fase adulta (50 dias de vida). Os animais C57bl/6 *wild type* foram procedentes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); e, os animais mdx foram provenientes da Universidade de São Paulo (USP).

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno de dimensões adequadas, com maravalha, em ambiente climatizado ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, controlado por *timer*, recebendo água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o período de experimento.

O número de animais por grupo foi calculado em $n = 8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n / \text{grupo} = 2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$, para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%.

Considerando os testes comportamentais, é necessário $n \geq 10$ animais em cada grupo para identificar diferenças estatisticamente significativas e biologicamente relevantes entre o desempenho basal e os efeitos do tratamento. Esse tamanho amostral baseia-se em experiência prévia em estudos desta natureza.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ao completar 50 dias de vida, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: wt+DC, wt+DCet, mdx+DC, mdx+DCet e mantidos em jejum de 8 horas antes do início dos procedimentos. Após esse período, foram expostos a dois tipos de dieta por 14 dias^{21,25,105,106}: dieta cetogênica (DCet) ou dieta controle (DC).

Em relação às dietas ofertadas, foram utilizadas duas dietas com diferentes composições nutricionais: a DC, em *pellets*, com 22% de proteínas, 10% de gorduras totais e 68% de carboidratos (Nuvilab[®] CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brasil); a DCet, não peletizada, com 10% de proteínas, 90% de gorduras totais e 0,1% de carboidratos (PragSoluções[®], Brasil) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas em estudo, por porção de 100g

	Mínimo estimado¹	Dieta controle²		Dieta cetogênica³	
Calorias (kcal)	360	398		676	
	%	g	%	g	%
Proteínas	14	22	22,1	17,6	10,4
Lipídeos	10	4,5	10,2	67,2	89,5
Carboidratos	76	67,3	67,7	0,2	0,1

(1)AIN-93M¹⁰⁷. (2)Dieta controle = ração padrão. (3)Dieta cetogênica = ração teste(PragSoluções®).

Devido às diferenças de composição de macronutrientes, as rações apresentaram diferentes apresentações e texturas. Enquanto a ração padrão (DC) permite o processo de peletização por compactação de ingredientes a partir da transformação da dieta farelada, a ração teste (DCet) apresenta formulação hiperlipídica que afeta diretamente o processo de peletização, reduzindo a compactação.

A peletização define-se como um processo físico-químico adicionando-se vapor à ração farelada submetendo-a aos fatores temperatura, umidade e pressão por um tempo determinado, visando entre outros objetivos a gelatinização de amidos e a plastificação das proteínas. Neste processo, as formulações apresentam múltiplas possibilidades de peletização, porém alguns fatores são decisivos no tratamento como, por exemplo, a adição acima de 2% de gordura que interfere na qualidade dos *pellets*¹⁰⁸. Portanto, a dieta cetogênica com 90% de gordura na sua formulação, torna-se inviável a peletização, apresentando-se na textura característica de gorduras em temperatura ambiente (sólida pastosa).

A fim de minimizar o viés de acesso, ambas as dietas foram ofertadas da mesma forma, na grade. Ressalta-se que mesmo não peletizada, foi possível ofertar porções de dieta cetogênica na grade sem intercorrências, permitindo o acesso livre aos animais. Considera-se ainda destacar que a necessidade inata do camundongo de desgastar os dentes incisivos devido ao crescimento contínuo foi considerada pelo protocolo de curta duração da dieta (14 dias)¹⁰⁹.

No 14° e 15° dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, seguido de morte indolor assistida (MIA) no 15° dia (Figura 1).

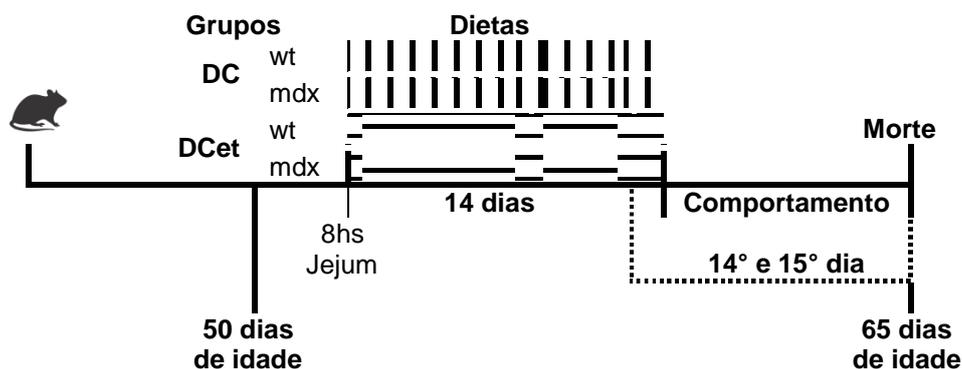


Figura 1 – Desenho esquemático de sequência e tempo do protocolo experimental

3.5 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS APLICADAS

3.5.1 Aferição da massa corporal e consumo de ração

A massa corpórea foi aferida duas vezes por semana durante o período de dietoterapia, no mesmo momento do dia por pesquisadores treinados utilizando balança digital. O controle de ganho de massa foi realizado pela variação simples (final – inicial) e pelo percentual de ganho de massa seguindo a fórmula: $\Delta\% = [(massa\ final - massa\ inicial / massa\ inicial) \times 100]$.

A quantidade de ração ofertada foi estimada pelo número de animais em cada caixa e considerando a quantidade média de ração consumida por animal por dia em aproximadamente 6g (+ 10% de perda)¹¹⁰. Os animais do mesmo grupo foram distribuídos aleatoriamente, separados por sexo, em $1 < n \leq 5$, pois o isolamento social modifica o perfil bioquímico e o padrão de consumo de modelo animal experimentais¹¹¹.

O cálculo final do consumo de ração foi realizado pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e o residual. O valor final foi uma média do consumo diário por animal por caixa, expresso em g/animal/dia.

3.5.2 Memória e aprendizado

3.5.2.1 Esquiva inibitória

A avaliação da memória por esquiva consistiu em duas etapas: treino e teste, realizadas em um intervalo de 24 horas para avaliar memória aversiva de longa duração. A avaliação foi realizada pelos mesmos pesquisadores utilizando-se de equipamento específico para tal avaliação: caixa de esquiva passiva. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma foi cronometrado. Esse período de tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as quatro patas), o animal recebeu um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém sem administração de choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória^{79,112}.



Figura 2 –
caixa de esquiva passiva para camundongos (*step down*)

Caixa de

3.5.2.2 Habituação ao campo aberto (*open field*)

A avaliação da habituação em campo aberto consistiu em duas etapas: treino e teste, realizadas em um intervalo de 24 horas, por dois pesquisadores capacitados utilizando-se de equipamento específico e técnica de observação. Na sessão do

treino, um animal por vez foi cuidadosamente colocado no quadrante posterior esquerdo por um dos pesquisadores, a partir do qual se observou o comportamento exploratório do ambiente livremente por 5 minutos. Na sessão teste, os animais foram novamente colocados individualmente na caixa exploratória para a mesma avaliação. Os números de cruzamentos através dos quadrantes (*crossing*: atividade motora) e o número de *rearings* (atividade exploratória, na qual o animal se posiciona sobre duas patas) foram avaliados em ambas as sessões^{79,112}.



Figura 3 – Caixa para avaliação da habituação em campo aberto (*open field*)

3.5.3 Coleta de material biológico

Imediatamente após a MIA por aprofundamento anestésico (aplicação intraperitoneal), foram retiradas amostras de estruturas: do tecido encefálico relacionadas com aprendizado e memória e onde apresentam maior expressão da distrofina⁶ (córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex total) por dissecação cirúrgica; do sangue, por punção cardíaca para avaliação da cetonemia; e, do tecido muscular (gastrocnêmio) com objetivo de controle por ser uma patologia neuromuscular também por dissecação cirúrgica. As amostras foram mantidas a 80°C negativos para análises bioquímicas subsequentes.

3.5.4 Determinações bioquímicas

3.5.4.1 Determinação dos níveis TNF- α , IL-1 β IL-6 e IL-10

Foram analisadas as concentrações das citocinas (TNF- α , IL-1 β IL-6 e IL-10) pelo método de ELISA e utilizando-se kits padronizados específicos, seguindo as recomendações do fabricante, com as dosagens sendo feitas em replicata.

Dessa forma, em resumo, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l anticorpo de captura diluído em *coating buffer* e incubadas sob refrigeração durante a noite para aderência do anticorpo. Após este período, os poços foram lavados por três vezes com 250 μ l de tampão. Posteriormente a placa foi bloqueada para evitar ligações inespecíficas com 100 μ l de solução de bloqueio (1% de albumina de soro bovino (BSA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, pH 7,2) e incubada 1 hora em temperatura ambiente. Terminado este prazo, os poços foram lavados novamente, como descritos acima.

Após o bloqueio foram adicionados 100 μ l das amostras diluídas 1:3 em reagente de diluição (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) e colocadas novamente em câmara úmida e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. As amostras foram plaqueadas em duplicata e colocado 100 μ l de solução de diluição em um poço para caracterização do branco. Após este período as placas foram lavadas como descrito previamente.

Após a lavagem, foi adicionado 100 μ l do anticorpo de detecção previamente diluídos em reagente de diluição (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) em cada poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Os poços foram lavados novamente, como descritos acima. Posteriormente foi adicionado 100 μ l de estreptoavidina-HRP por poço. A placa foi incubada no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, os poços foram lavados mais uma vez. Posteriormente 100 μ l da solução de substratos (reagente de cor A-H₂O₂ e reagente de cor B-OPD 1:1) foram adicionadas por poço, seguido da incubação de 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ l de H₂SO₄(2N) por poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm.

3.5.4.2 Ensaio da mieloperoxidase

A presença de neutrófilos nos tecidos foi medida indiretamente através da quantificação da atividade da enzima MPO. Para isso, os tecidos selecionados foram primeiramente homogeneizados em solução de tampão PBS-HTAB (100 μ L para cada 50 mg de tecido). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm x g a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente a 4000 rpm por mais 15 min. Pipetou-se 50 μ L de solução de homogeneização (PBS, ácido diamino tetra-acético (EDTA) 5 μ M, HTAB 0,5 %), 50 μ L do sobrenadante e 50 μ L de o-dianisidina 0,68 mg/mL (1 tablete de o-dianisidina 10 mg, 14,7 mL de água milli-q) em duplicata na placa de 96 poços. A placa foi incubada à 37°C na leitora por 15 min e após esse período foi adicionado 50 μ L de solução de H₂O₂. Repetiu-se o processo de incubação por mais 10 min a 37°C e seguiu para leitura em espectrofotômetro, a 460 nm. Para o branco só foram utilizados 200 μ L de tampão substrato. Para a determinação do valor da MPO, foi realizada uma curva padrão, utilizando-se concentrações pré determinadas, utilizando a equação: $y = 1,2358x + 0,252$. Onde y é a concentração de MPO em ng/mL e x o valor encontrado da reação final derivada da suspensão celular.

3.5.4.3 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A taxa de peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração das substâncias reativas ao TBARS. Para esta análise seguiu-se o protocolo descrito por Draper e Hadley (1990)⁷⁷. Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea que pode ser quantificado pela leitura em espectrofotômetro. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre 90 e 100°C. Uma alíquota de 100 μ L de tecido encefálico e muscular foi homogeneizada de 200 a 1000 μ L de uma solução de ácido tricloroacético (10%) - ácido tiobarbitúrico (0,067%), aquecido por 15 minutos em água fervente e resfriado em água com gelo, centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificar os TBARS em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 535nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de MDA. A concentração dos TBARS foi

determinada utilizando-se $1,56 \times 10^5 \times M^{-1}cm^{-1}$ como coeficiente de extinção molar de MDA. Os valores foram expressos em ng de TBARS/mL de tecido¹¹³.

3.5.4.4 Medida do dano oxidativo em proteínas

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado, espectrofotometricamente, pela medida de grupos carbonil conforme protocolo padrão descrito por Levine e colaboradores (1990)¹¹⁴. As amostras obtidas foram precipitadas em adição de ácido tricloroacético 20% e as proteínas dissolvidas com DNPH. A absorvância do conteúdo dos grupamentos carbonil foi lida espectrofotometricamente em 280 nm. A concentração de proteínas carboniladas foi expressa em nmol/miligrama de proteína¹¹⁴.

3.5.4.5 Conteúdo total de tióis livres

Para analisar os níveis de tióis livres, as amostras foram precipitadas com tricloroacético (10%), centrifugado e, o sobrenadante foi adicionado ao 5,5´ Ditiobis-2-nitrobenzoico-1,7 (DTNB) e tampão tris-HCl (30 mM, contendo 3 mM de EDTA, pH 8,9), gerando um derivado de coloração amarela e lido espectrofotometricamente a 412 nm. Essa técnica tem por objetivo avaliar o grupo sulfidril (SH) não oxidados. Os resultados foram expressos em tióis livres nmol/mg de proteína¹¹⁵.

3.5.4.6 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

Para a determinação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, a estrutura cerebral foi homogeneizada (1:10, p/v) em tampão, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 800xg por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a 80°C negativos para determinação da atividade enzimática.

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996)¹¹⁶ pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. E a atividade da CK foi determinada de acordo com a metodologia de Hughes (1962)¹¹⁷ e medida em 550 nm. A atividade do complexo foi expressa em nmol/min.g por proteína, enquanto a atividade de CK foi expressa em mg/proteína.

3.5.4.7 Quantificação dos níveis do BDNF

Os níveis de BDNF foram medidos por um kit ELISA sanduíche anti-BDNF, de acordo com as instruções do fabricante. Para esta análise, em resumo, as amostras foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato com 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo e 1 mM de ácido glicol éter diamino tetra-acético (EGTA). As placas de microtitulação de 96 poços (de fundo plano) foram revestidas durante 24 horas com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra e padrão de curva que varia entre 7.8 para 500 pg/ml de BDNF. Os poços foram em seguida lavados quatro vezes com diluentes de amostra, e um anticorpo de coelho anti-BDNF monoclonal diluído a 1:1000 em diluente da amostra foi adicionado a cada poço e incubado durante 3 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem, um anticorpo peroxidase anti-coelho conjugado (diluído a 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubado em temperatura ambiente durante 1 hora. A quantidade de BDNF foi determinada por absorvância a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e concentração de BDNF. A proteína total foi medida pelo método BCA, utilizando a BSA como um padrão.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo, natureza e proposta de utilização

(continua)

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Massa corporal	Dependente	Discreta	g \pm DP
Consumo de ração	Dependente	Contínua	g/dia/animal \pm DP
Memória aversiva	Dependente	Contínua	seg
Memória de habituação	Dependente	Discreta	números absolutos
Citocinas	Dependente	Contínua	pg/mL
Mieloperoxidase	Dependente	Contínua	DO/mg por proteína
TBARS	Dependente	Contínua	ng/mL
Carbonilação	Dependente	Contínua	nmol/mg
Tióis	Dependente	Contínua	nmol/mg
Metabolismo energético	Dependente	Contínua	nmol/min.g por proteína

(conclusão)

CK	Dependente	Contínua	nmol/min.mg por proteína
BDNF	Dependente	Contínua	pg/mL
Distrofina	Independente	Dicotômica	sim ou não
Dieta	Independente	Dicotômica	DC ou DCet

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISES DOS DADOS

Para análise estatística, foi utilizado o programa *Prism, GraphPad Software*. O teste de *Shapiro-Wilk* foi aplicado previamente para checar a normalidade dos dados. Os dados do teste de habituação ao campo aberto e das avaliações bioquímicas foram considerados paramétricos e expressos por média e desvio-padrão da média. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Tukey*. Comparações estatísticas entre dois fatores foram analisados pelo teste *t* para amostras pareadas. Os dados referentes ao teste de esQUIVA inibitória foram considerados não paramétricos e expressos em mediana e intervalo interquartil; as comparações estatísticas entre dois fatores foram realizadas pelo teste de *Mann-Whitney*. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Sul de Santa Catarina, conforme Registro 16.051.4.01IV.

4. RESULTADOS

4.1 MASSA CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO

As médias iniciais e finais de massa corporal estão descritas na tabela 2 e mostram o ganho ponderal durante o período de dietoterapia em todos os grupos.

Tabela 2 – Média de massa corporal e ganho ponderal por grupo

Grupos	Inicial (g)	Final (g)	Ganho de massa (final - inicial) (g)	Ganho ponderal (%)
wt+DC	22,4 ±2,48 ^A	23,5±2,54 ^B	1,4±2,40 ^{ac}	4
wt+DCet	17,8 ±4,01 ^A	19,7±3,43 ^B	1,9±2,54 ^{ab}	20
mdx+DC	14,9 ±2,15 ^A	18,8±1,85 ^B	3,8±3,00 ^b	36
mdx+DCet	18,8 ±3,53 ^A	19,0±3,00 ^A	0,2±3,49 ^c	4

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre a massa corporal final e inicial no mesmo grupo. Resultados apresentados como média±desvio-padrão (p<0,05). *ANOVA, pós-teste de *Tukey*.

Ao final dos 14 dias de dietoterapia experimental, todos os grupos apresentaram ganho de massa corporal, havendo diferença significativa entre essa variação no mesmo grupo exceto para os animais do grupo mdx+DCet (p=0,752). Entre os grupos foi significativa a diferença de ganho de massa entre os animais que receberam DC (p=0,004) e entre os animais mdx (p=0,0001).

Embora o grupo mdx+DC tenha apresentado o menor peso final entre os grupos, foram os animais que apresentaram o maior ganho de massa (3,8±3,00) durante o tratamento, enquanto os animais mdx+DCet mantiveram a média durante os 14 dias de dieta com menor variação (final - inicial) entre os grupos (0,2±3,49).

Entre o grupo de animais selvagens, observou-se que a dieta cetogênica (wt+DCet) promoveu ganho de massa em comparação à DC, sem diferenças estatísticas (p=0,059). Em contraste, com diferença estatisticamente significativa, os animais mdx apresentaram ganho de massa quando alimentados com DC, representando o maior percentual de ganho ponderal entre os grupos (p<0,001). Nenhum grupo apresentou média de perda de peso ponderal. Ressalta-se que não foi avaliada composição corporal e, portanto, não há distinção de composição de massa muscular ou tecido adiposo especificamente.

A média de consumo de ração e o valor calórico diário consumido estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Dados descritivos de consumo de ração e valor nutricional por animal por dia

Grupos	Consumo (g)	Valor calórico (kcal)	Carb (g)	Prot (g)	Lip (g)
wt+DC	4,4 ±9,17	18	11,87	3,88	0,79
wt+DCet	2,2 ±2,33	15	0,03	2,56	9,77
mdx+DC	3,5 ±5,23	14	9,50	3,10	0,64
mdx+DCet	1,8 ±1,57	12	0,02	2,19	8,37

Resultados apresentados como média±desvio-padrão ou média.

Durante os 14 dias de tratamento foi possível observar que os grupos que receberam DC apresentaram maior consumo de ração quando comparados aos que receberam DCet, sendo proporcional o consumo calórico apesar da maior densidade energética dessa última. Entre os animais mdx, aqueles alimentados com DC tiveram a maior média de consumo diário de ração (3,5±5,23). Os animais mdx+DCet apresentaram a menor média diária de consumo (1,8±1,57) entre os grupos, com ingesta calórica equivalente.

4.2 MEMÓRIA E APRENDIZADO

A memória e aprendizado foram avaliados através do teste de esquila inibitória, para avaliar o comprometimento da memória aversiva (Figura 4) e do teste de habituação em campo aberto, para avaliar a memória de habituação (Figura 5).

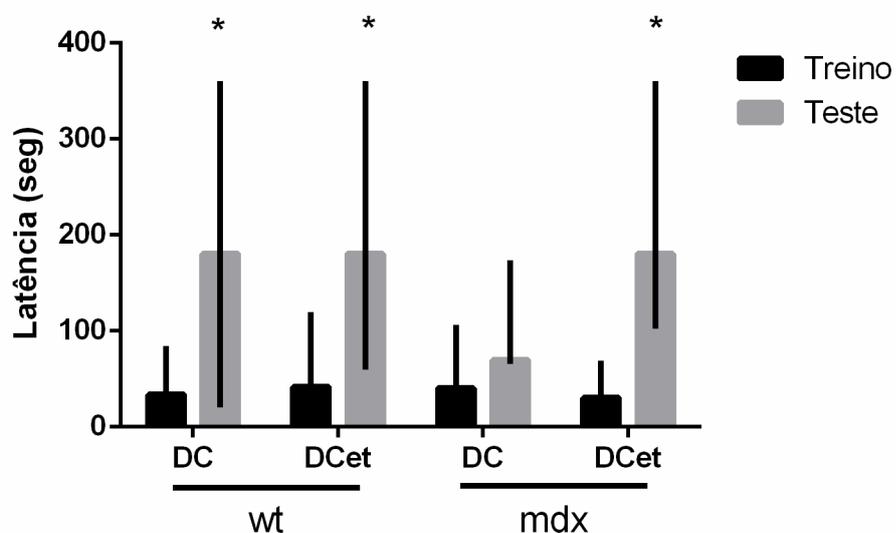


Figura 4 – Teste de esQUIVA inibitória

Os dados estão expressos em mediana e desvio interquartil. Teste *Mann Whitney* (* $p < 0,05$ vs. treino)

Na sessão de treino, não houve diferença no tempo de latência entre os grupos mdx e os grupos selvagens (wt). Observou-se, no entanto, que houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no tempo de latência entre o teste e o treino dos grupos de animais selvagens e do grupo mdx+DCet. Os animais mdx+DC não apresentaram diferenças significativas no tempo de permanência da plataforma após 24hs, sugerindo um comprometimento característico da memória aversiva de longa duração nesse modelo animal. Em contrapartida, o tratamento com dieta cetogênica foi significativo em contribuir com a retenção de memória tanto no modelo animal da doença (mdx+DCet), como nos animais selvagens (wt+DCet), comparando-se ao aprendizado retido pelo grupo controle (wt+DC).

Quanto ao teste de habituação ao campo aberto, na sessão de treino, não houve diferença no tempo de latência entre os grupos avaliados. Quando compara-se treino com o teste, houve uma diminuição significativa no número de *crossings* e *rearings* nos grupos wt+DC e wt+DCet, evidenciando uma retenção da memória de habituação. No grupo mdx+DC não houve uma diminuição significativa, demonstrando uma alteração na memória. Já nos animais mdx submetidos a dieta cetogênica, pode-se observar uma diminuição significativa do número de *crossings* e *rearings* na sessão de teste em relação aos treinos, ou seja, não houve alteração na memória de habituação nesses animais.

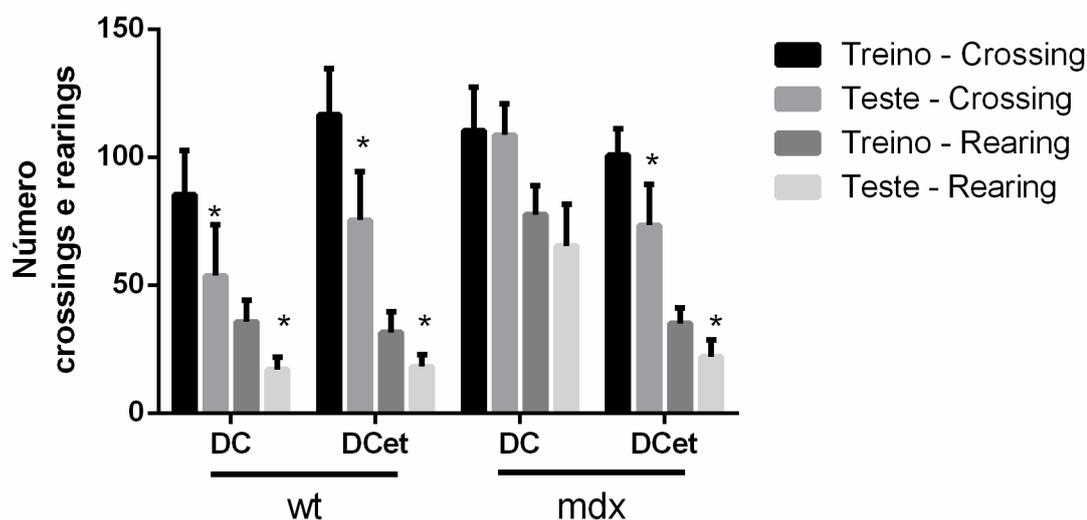


Figura 5 – Teste de habituação em campo aberto
Os dados estão expressos em média e desvio-padrão. ANOVA (* $p < 0,05$ vs. treino)

4.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os dados desta sessão demonstram os resultados obtidos nas avaliações dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Figuras 6 a 9) e da atividade de MPO através da figura 10.

A figura 6 apresenta os níveis de TNF- α nos tecidos analisados: cerebral (6A – 6E) e muscular (6F) por grupo e por tipo de dieta.

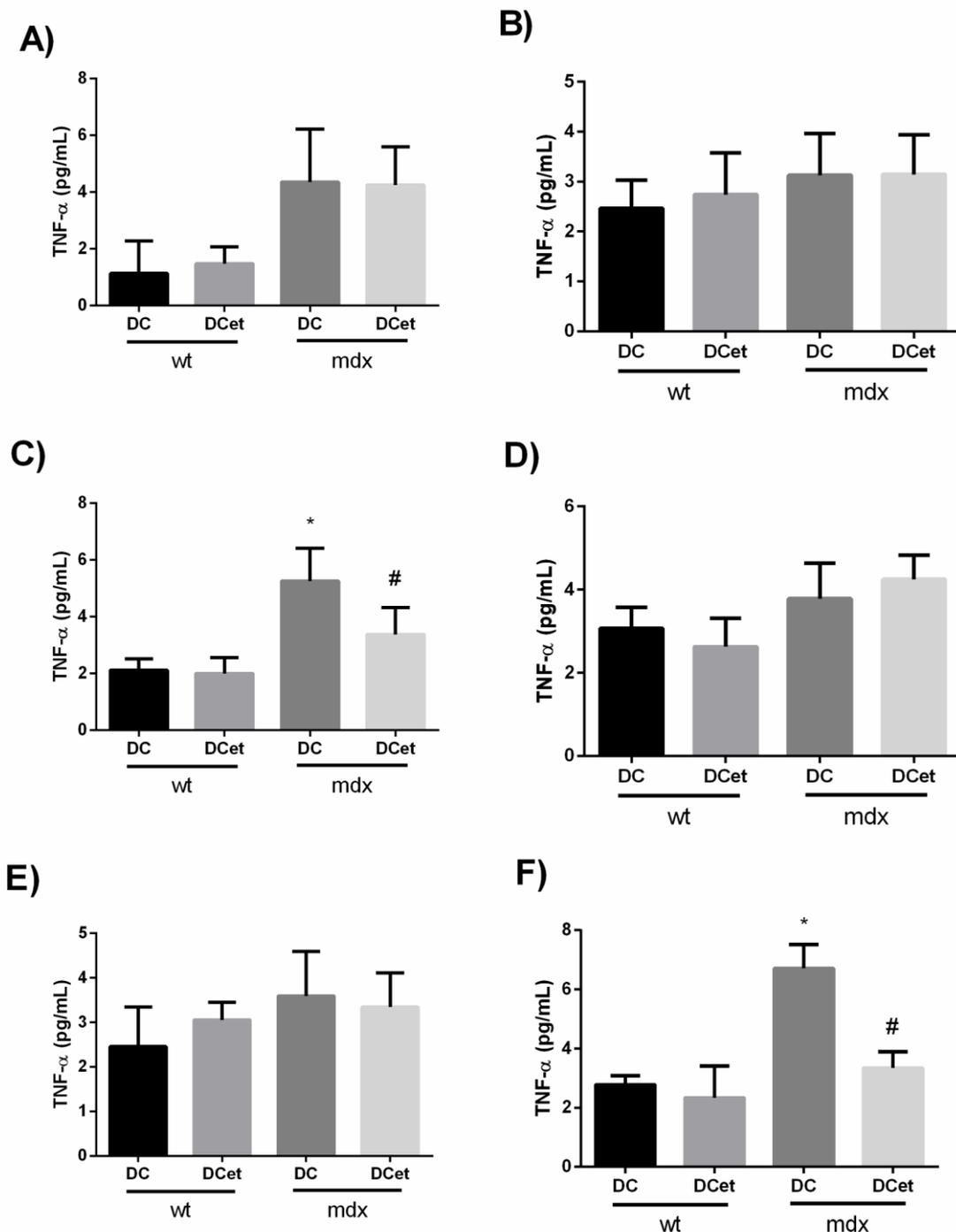


Figura 6 – Níveis de TNF- α no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC.

Pode-se observar um aumento significativo dos níveis de TNF- α nos animais mdx+DC comparados aos animais controles selvagens (wt+DC) especificamente nas regiões do hipocampo (6C) e no tecido muscular analisado (6F)., onde o aumento foi significativo.

Porém, com 14 dias de dietoterapia cetogênica (mdx+DCet) observou-se reduções significativas ($p < 0,05$) nas concentrações dessa citocina pró-inflamatória nas regiões afetadas (6C e 6F). Nas demais regiões analisadas, não houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos.

No que se refere aos níveis de IL-1 β , outro mediador pró-inflamatório, a figura 7 mostra a influência da dietoterapia nos tecidos cerebral (7A – 7E) e muscular (7F) por grupo de animal tratado.

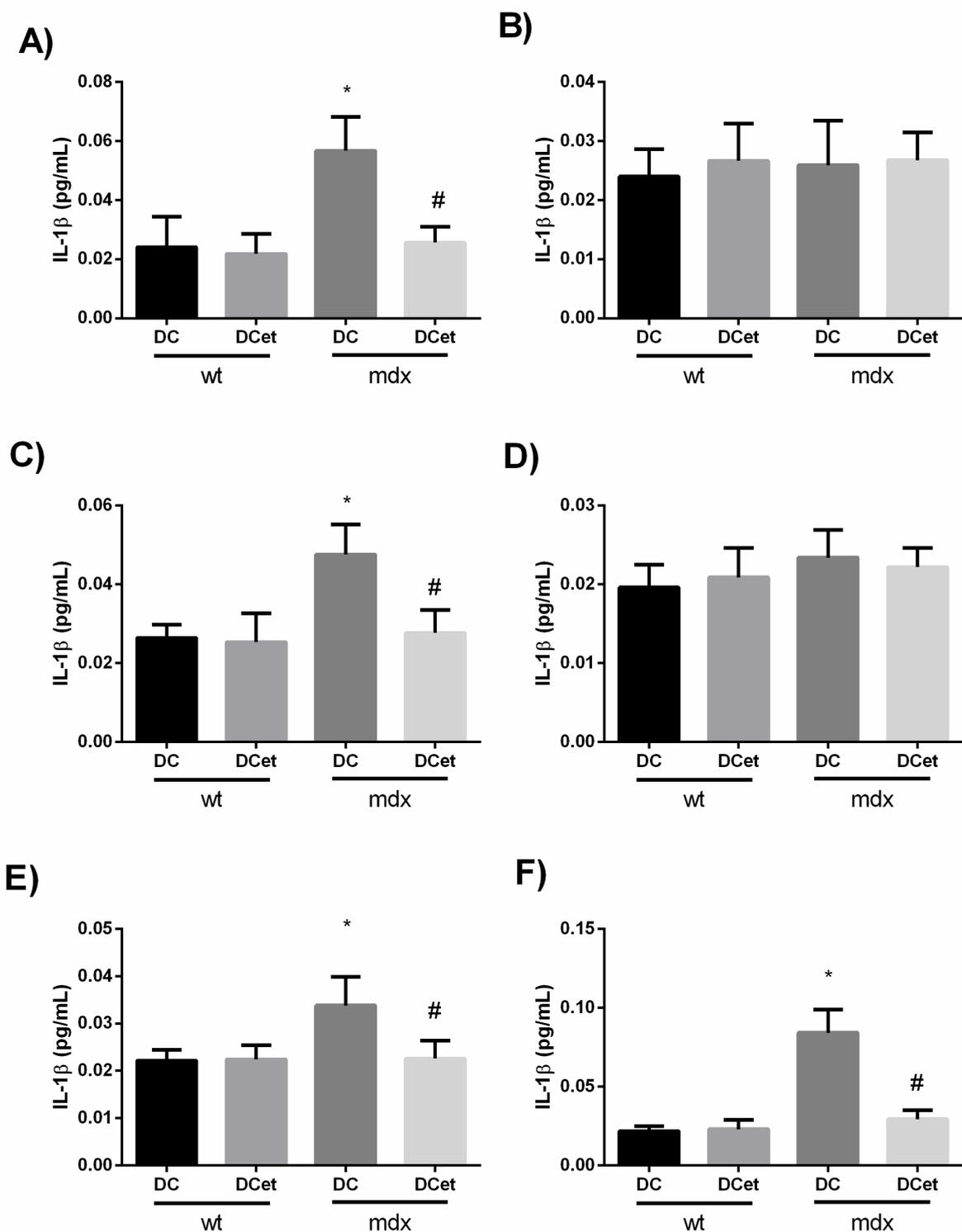


Figura 7 – Níveis de IL-1 β no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC.

Os níveis de IL-1 β apresentaram-se significativamente elevados nos animais mdx+DC em relação aos animais wt+DC nas regiões do pré-frontal (7A), hipocampo (7C), córtex (7E) e gastrocnêmio (7F).

Como mostrado na figura 7, a quantificação de IL-1 β após 14 dias de dieta cetogênica indicou uma redução significativa ($p < 0,05$) dessa interleucina no grupo mdx+DCet nas regiões afetadas (7A, 7C, 7E, 7F) quando comparados aos animais mdx+DC. Os níveis de IL-1 β não se apresentaram alterados no cerebelo e estriado, sugerindo que não houve prejuízo inflamatório significativo nessas regiões.

A figura 8 apresenta a análise de IL-6 nos tecidos cerebral (8A – 8E) e muscular (8F) dos animais por dieta por grupo.

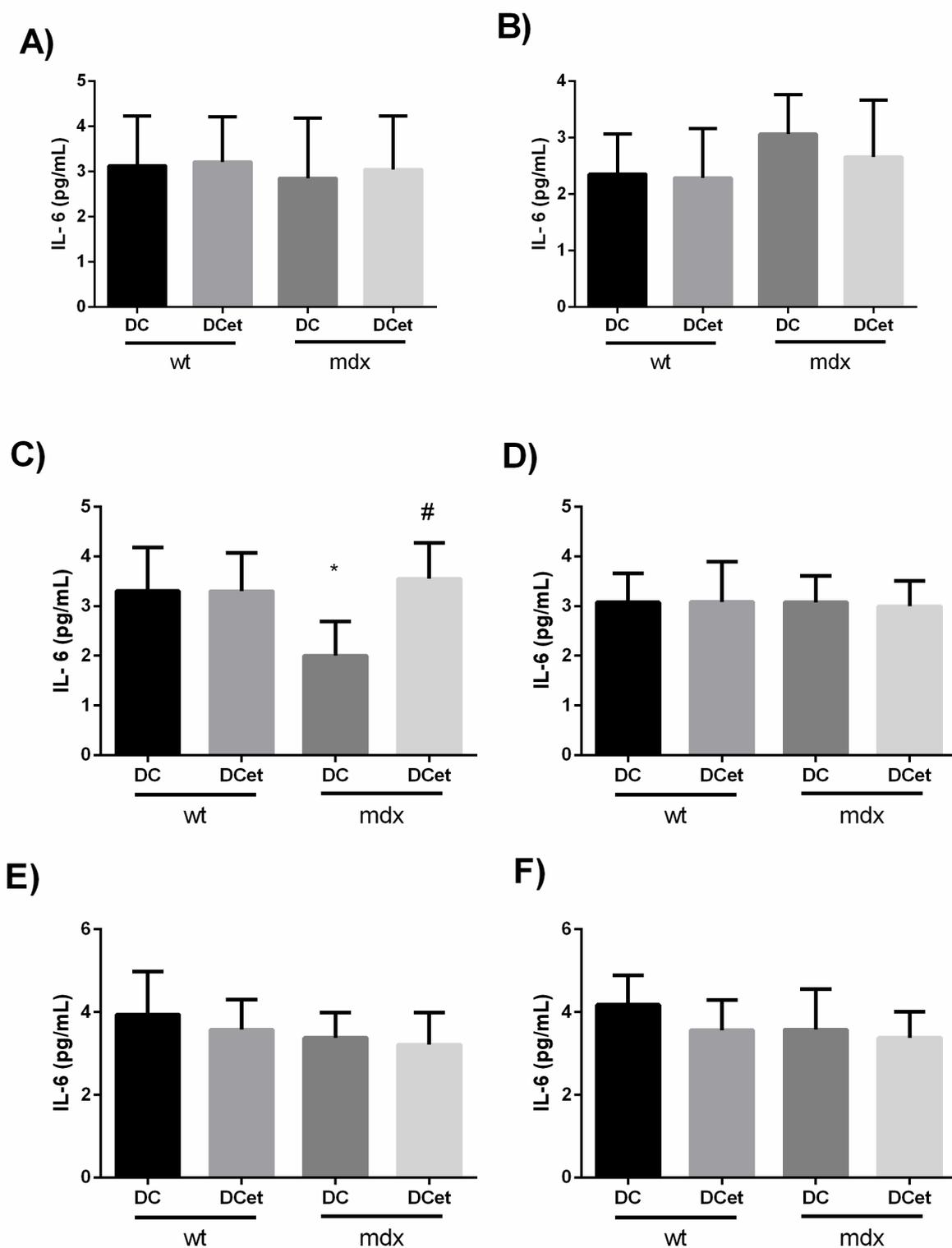


Figura 8 – Níveis de IL-6 no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC.

Os animais mdx+DC apresentaram níveis de IL-6 significativamente menores ($p < 0,05$) no hipocampo (8C) quando comparados com os animais controle wt+DC.

Após 14 dias de tratamento com dieta cetogênica, observou-se um aumento significativo dos níveis de IL-6 na região do hipocampo (8C) dos animais mdx+DCet em comparação com os animais mdx+DC. Nas demais áreas analisadas, incluindo o tecido muscular, não houve alterações significativas dessa citocina.

Para avaliar a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias, foram analisados os níveis de IL-10, expressos na figura 9, de acordo com os tecidos analisados: cerebral (9A – 9E) e muscular (9F).

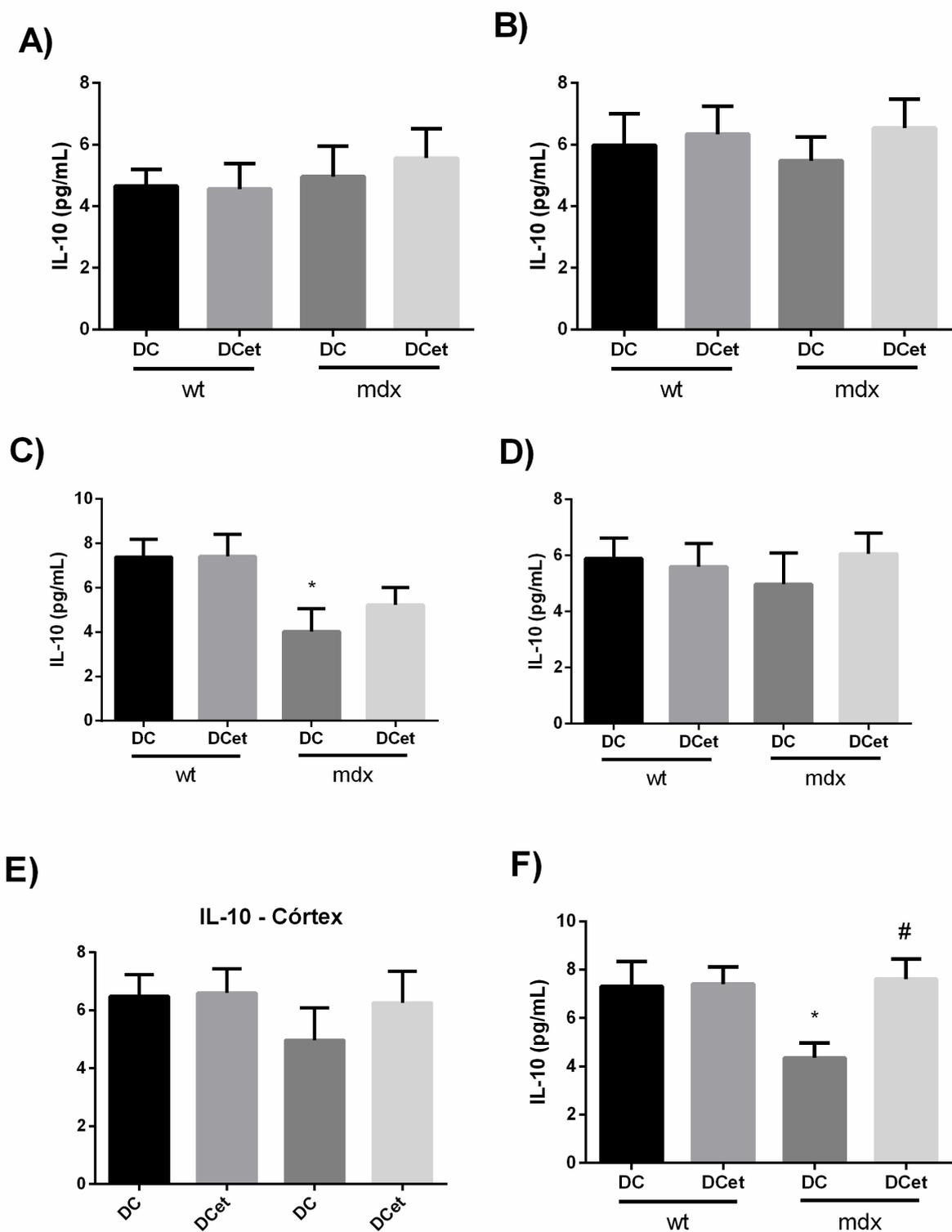


Figura 9 – Níveis de IL-10 no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC

No tecido cerebral, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de IL-10 nos animais mdx+DC em comparação ao grupo controle (wt+DC) somente no hipocampo (9C). Os níveis de IL-10 também foram estatisticamente inferiores no tecido muscular (9F) do mesmo grupo de animais não tratados (mdx+DC).

Em contrapartida, apenas no tecido muscular (9F) houve recuperação significativa dos níveis dessa citocina nos animais mdx+DCet quando comparados com os animais controle mdx+DC. No hipocampo, o aumento dos níveis de IL-10 pela dieta cetogênica não foi estatisticamente significativa, bem como nas demais regiões analisadas.

A figura 10 apresenta o resultado da análise de MPO no tecido cerebral (10A – 10E) e muscular (10F) por grupo e dietoterapia.

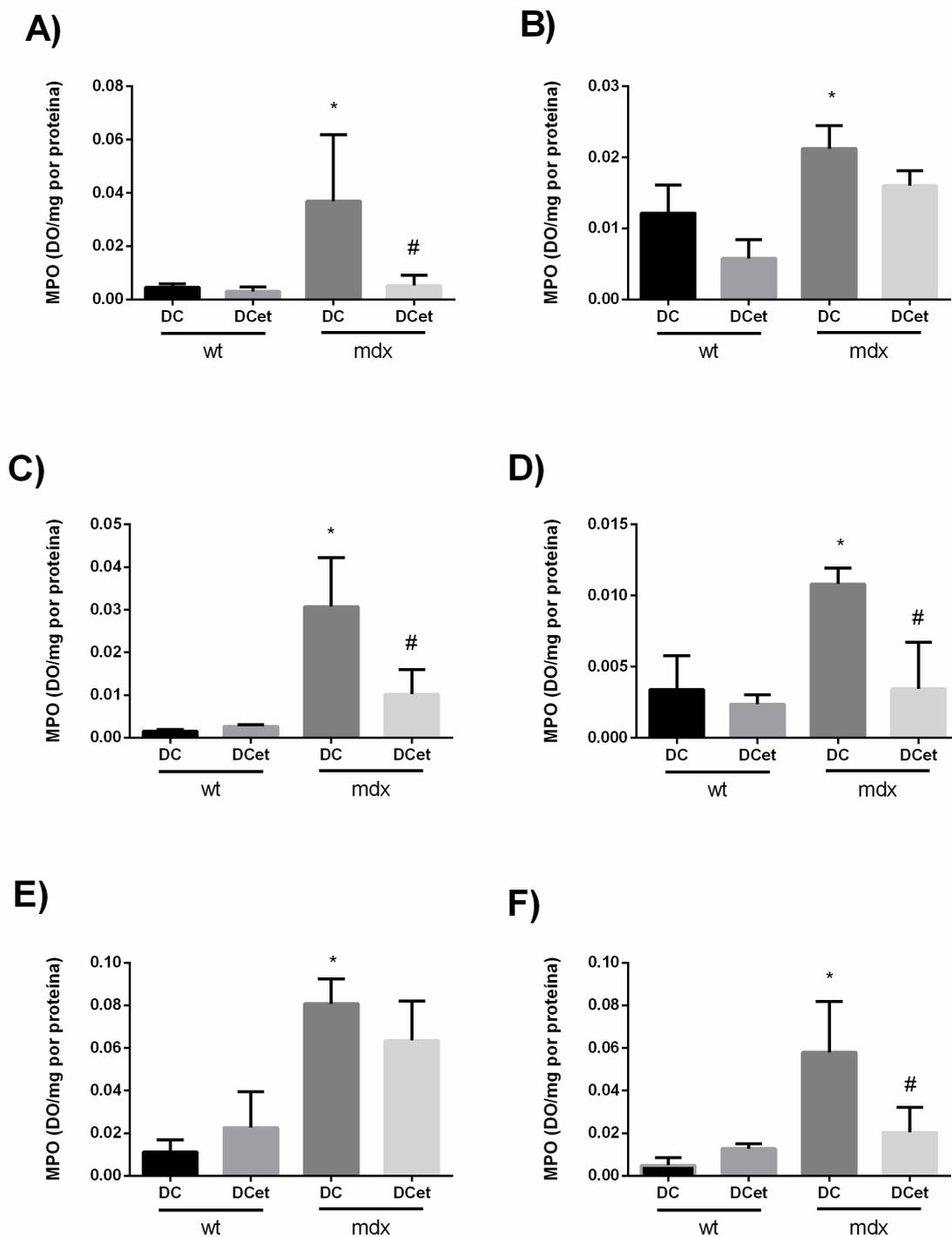


Figura 10 – Níveis de mieloperoxidase no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC

Pela figura 10 observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de MPO entre os animais mdx+DC em relação aos animais wt+DC em todos os tecidos, confirmando o perfil inflamatório nos animais mdx em relação aos seus controles. Os resultados demonstraram que a dietoterapia cetogênica apresentou importante atividade anti-inflamatória, caracterizada pela redução significativa ($p < 0,05$) da atividade da enzima MPO no córtex pré-frontal (10A), no hipocampo (10C), no estriado (10D) e no gastrocnêmio (10F) dos animais mdx+DCet em comparação aos animais mdx+DC. No cerebelo (10B) e córtex (10E) essa redução não foi significativa.

4.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Sabe-se que no processo fisiopatológico da DMD ocorre o desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade antioxidante, aumentando o dano e degeneração da fibra muscular e tecido neuronal. Para avaliação desse processo, foram realizadas também as análises da atividade de agentes antioxidantes por TBARS, carbonilação de proteínas e tióis livres, descritas nas figuras 11, 12 e 13, respectivamente.

A figura 11 apresenta a quantificação de lipídios peroxidados obtido em córtex pré-frontal (11A), cerebelo (11B), hipocampo (11C), estriado (11D), córtex (11E) e gastrocnêmio (11F).

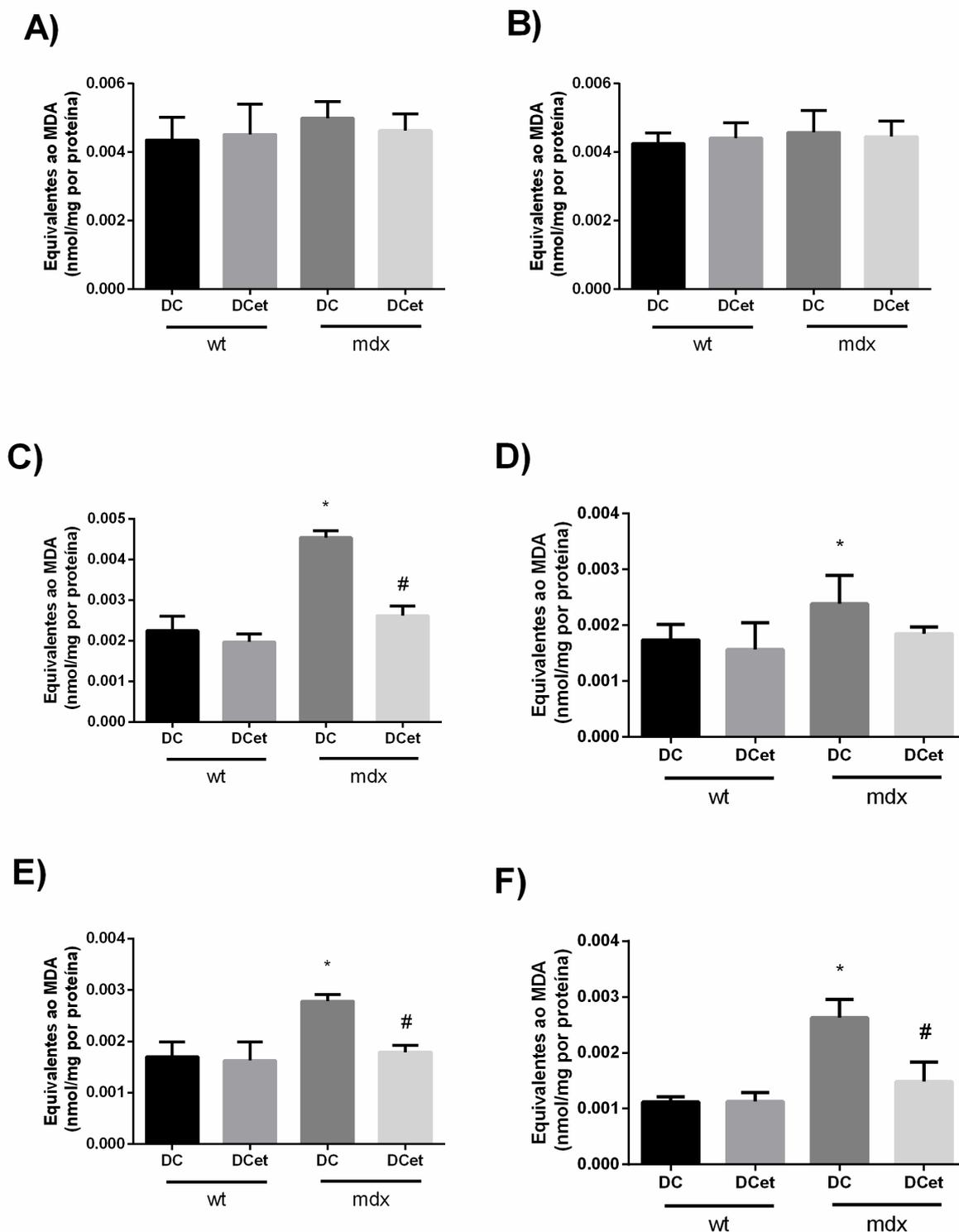


Figura 11 – Níveis de peroxidação lipídica no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet (A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC

Os níveis de peroxidação lipídica apresentaram-se estatisticamente ($p < 0,05$) mais elevados nos animais mdx (mdx+DC) em relação ao seu grupo controle (wt+DC) especificamente nas regiões do hipocampo (11C), estriado (11D), córtex (11E) e no tecido muscular (11F). Nas regiões C, E e F o tratamento pela dieta cetogênica promoveu redução significativa dos níveis de MDA. No estriado, a dietoterapia mostrou redução do dano aos lipídeos, porém, não significativa. Nas regiões do córtex pré-frontal (11A) e cerebelo (11B) não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos wt e mdx.

A figura 12 apresenta os resultados do dano à proteína identificado em córtex pré-frontal (12A), cerebelo (12B), hipocampo (12C), estriado (12D), córtex (12E) e gastrocnêmio (12F).

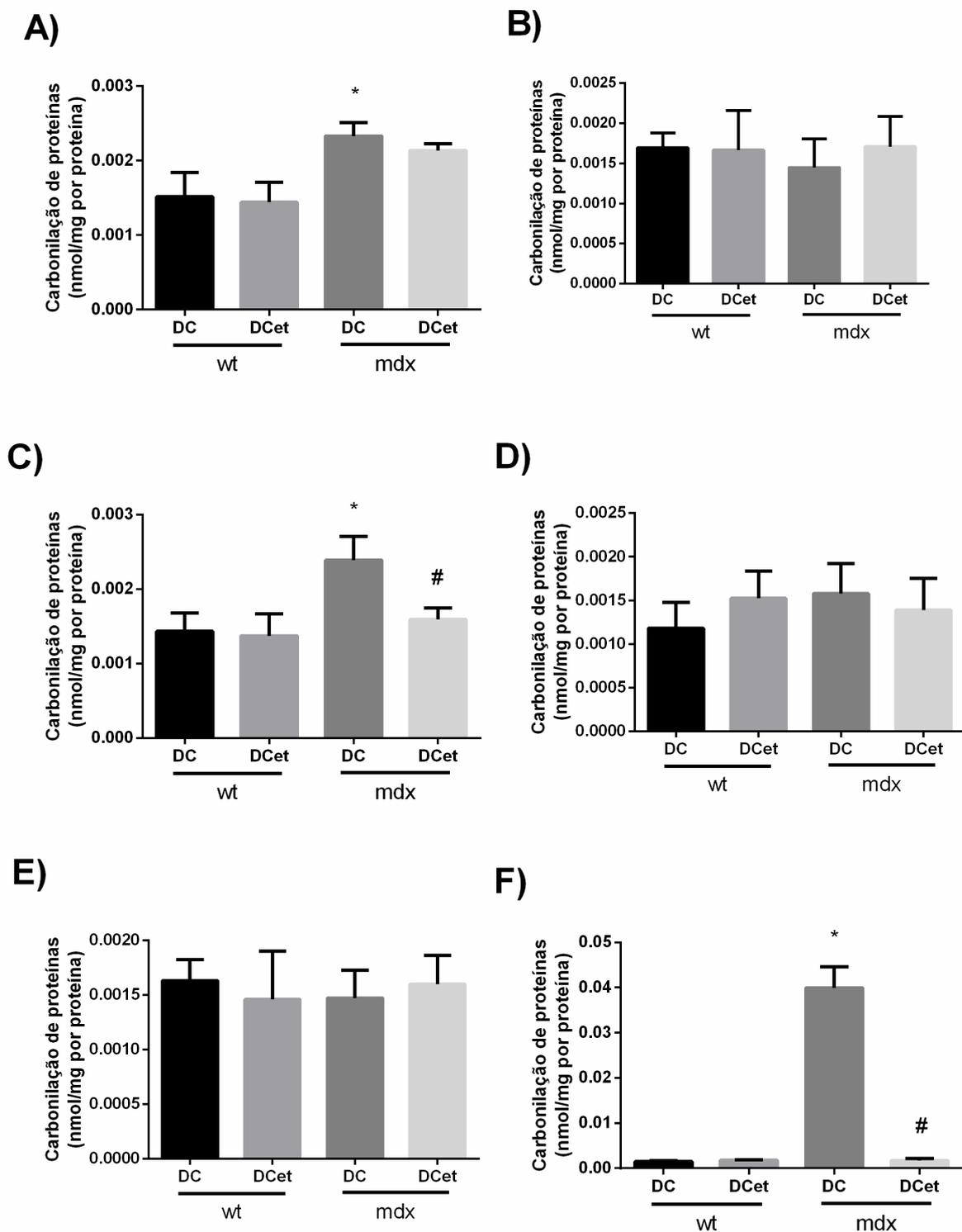


Figura 12 – Níveis de carbonilação de proteínas no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet (A) Cerebrocórtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Cerebrocórtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC

O dano oxidativo em proteínas apresentou níveis significativamente ($p < 0,05$) mais elevados na região do córtex pré-frontal (12A), hipocampo (12C) e tecido muscular (12F) dos animais mdx+DC quando comparados aos animais controle (wt+DC). A dieta cetogênica foi efetiva para reduzir significativamente a carbonilação de proteínas no hipocampo e tecido muscular ($p < 0,05$), enquanto na região pré-frontal essa redução não foi estatisticamente significativa. Nas demais estruturas (12B, 12D, 12E) não houve interferências significativas pela dieta cetogênica entre os grupos wt e mdx.

A figura 13 mostra os níveis de tióis livres obtido no tecido cerebral (13A – 13E) e muscular (13F) dos animais analisados.

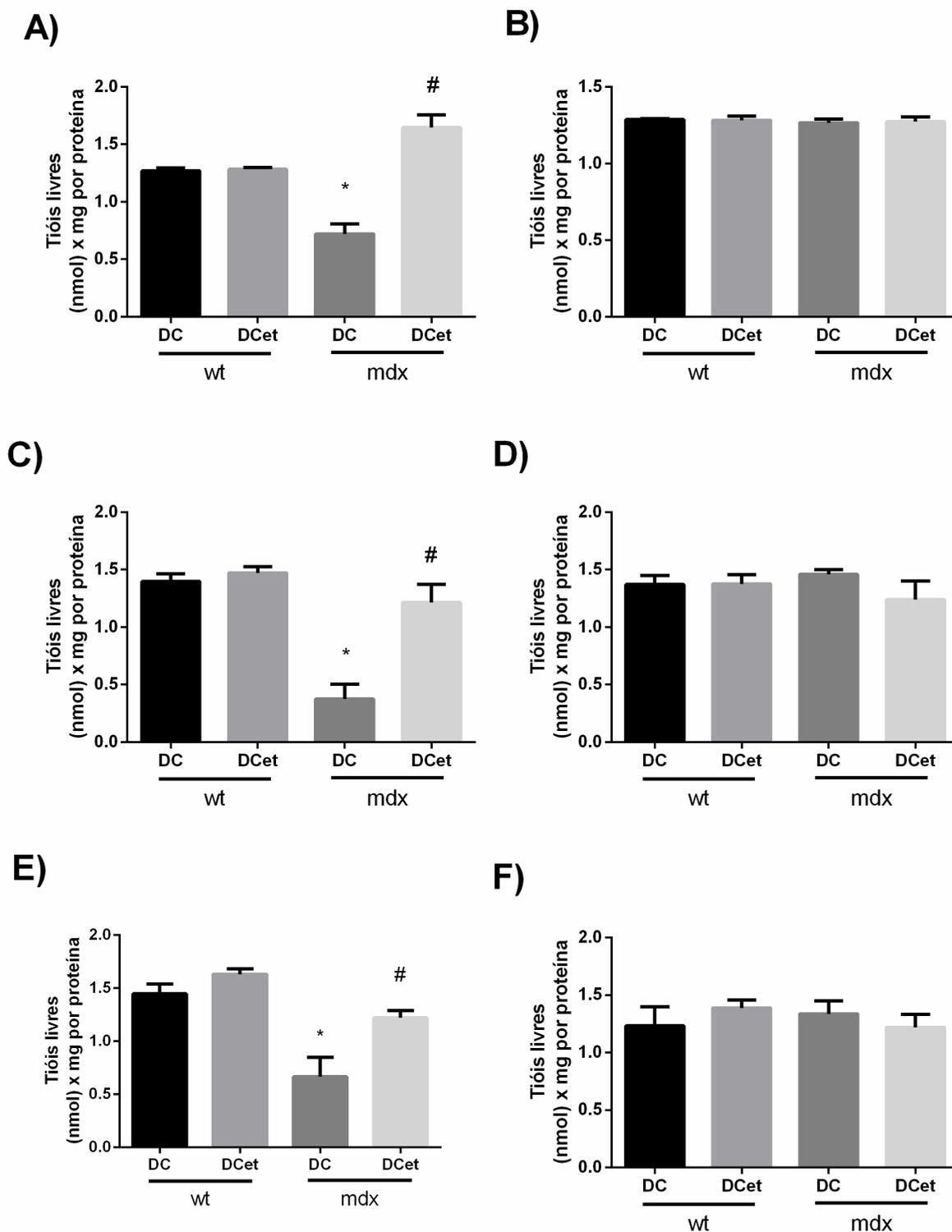


Figura 13 – Níveis de tióis livres no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC

Pela figura, observa-se que os animais mdx alimentados com dieta cetogênica (mdx+DCet) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade antioxidante quando comparados aos animais mdx+DC especificamente nas estruturas do córtex pré frontal (13A), hipocampo (13C) e córtex (13E). Nas demais estruturas (13B, 13D) não houve interferências significativas pela dieta cetogênica entre os grupos wt e mdx, inclusive no tecido muscular (13E), o qual apresentou níveis aumentados de proteínas tióis em todos os grupos.

4.5 METABOLISMO ENERGÉTICO

Para avaliar os efeitos da dieta cetogênica sobre o estágio inicial da cadeia respiratória, foi analisada a atividade do complexo respiratório I em tecido encefálico e músculo gastrocnêmio (Figura 14), além da creatina quinase (Figura 15) em tecido encefálico e músculo gastrocnêmio.

A figura 14 expõe os resultados da atividade do complexo I da cadeia respiratória em córtex pré-frontal (14A), cerebelo (14B), hipocampo (14C), estriado (14D), córtex (14E) e gastrocnêmio (14F).

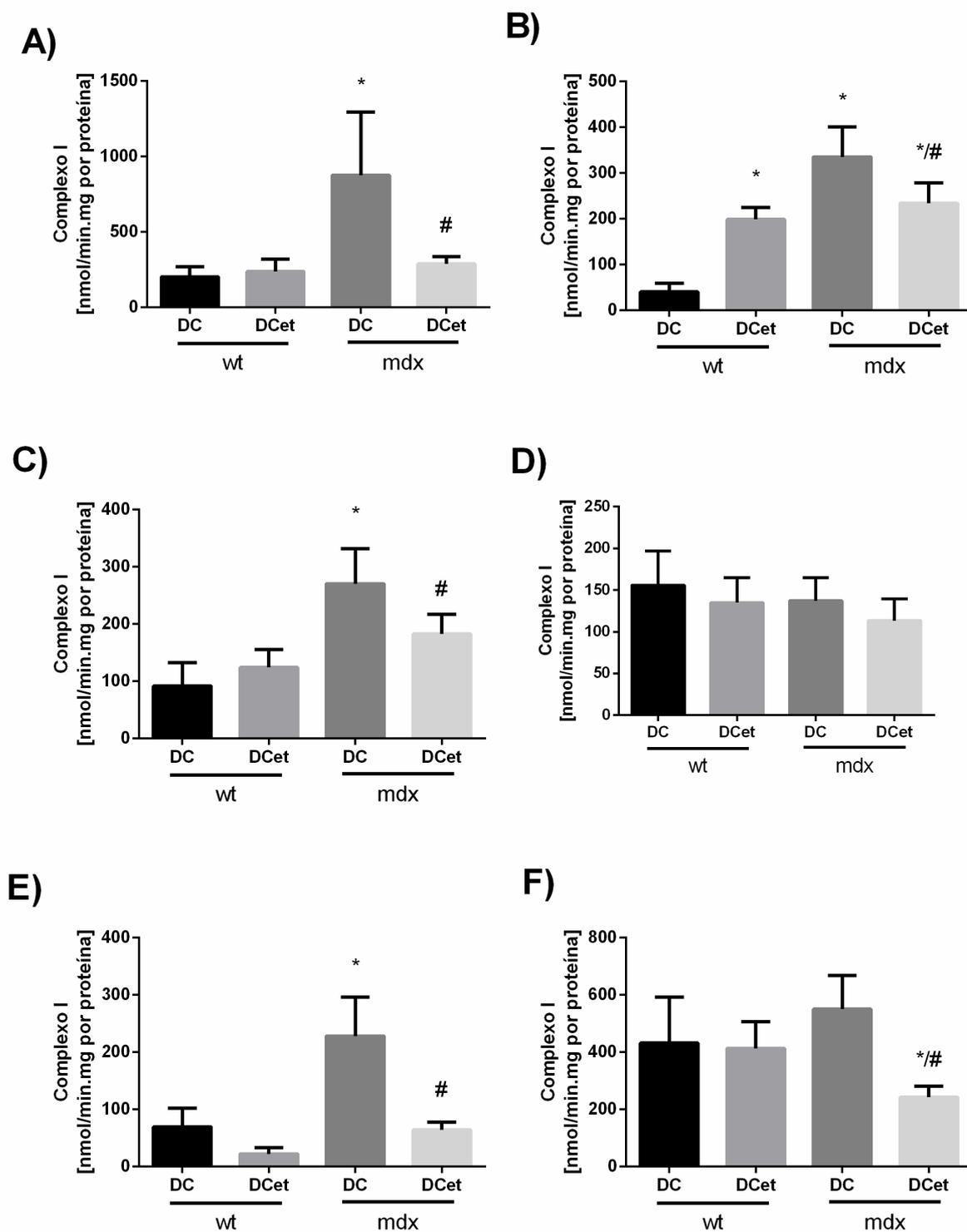


Figura 14 – Atividade do complexo I no tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet (A) CórteX pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) CórteX; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (*/#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e *wt+DCet ou #mdx+DC

Pela figura 14 observa-se que entre os animais selvagens, apenas no cerebelo (14B) houve alteração significativa ($p < 0,05$) entre o tipo de intervenção, com aumento da atividade enzimática do complexo I no grupo wt+DCet. Nessa mesma região, observa-se que a DCet exerce influência sobre a atividade enzimática tanto nos animais wt, quanto nos animais mdx.

Os animais mdx+DC apresentaram níveis mais significativamente ($p < 0,05$) elevados da atividade enzimática do complexo I em todos os tecidos analisados, com exceção do estriado (14D) e do músculo gastrocnêmio (14F). Contudo, a intervenção com a dieta cetogênica promoveu redução significativa ($p < 0,05$) na atividade deste complexo nos animais mdx (mdx+DCet), com exceção da região do estriado (14D), onde não houve qualquer alteração significativa entre os grupos, evidenciando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir nessa área analisada.

A figura 15 expõe os resultados da atividade da CK em córtex pré-frontal (15A), cerebelo (15B), hipocampo (15C), estriado (15D), córtex (15E) e gastrocnêmio (15F).

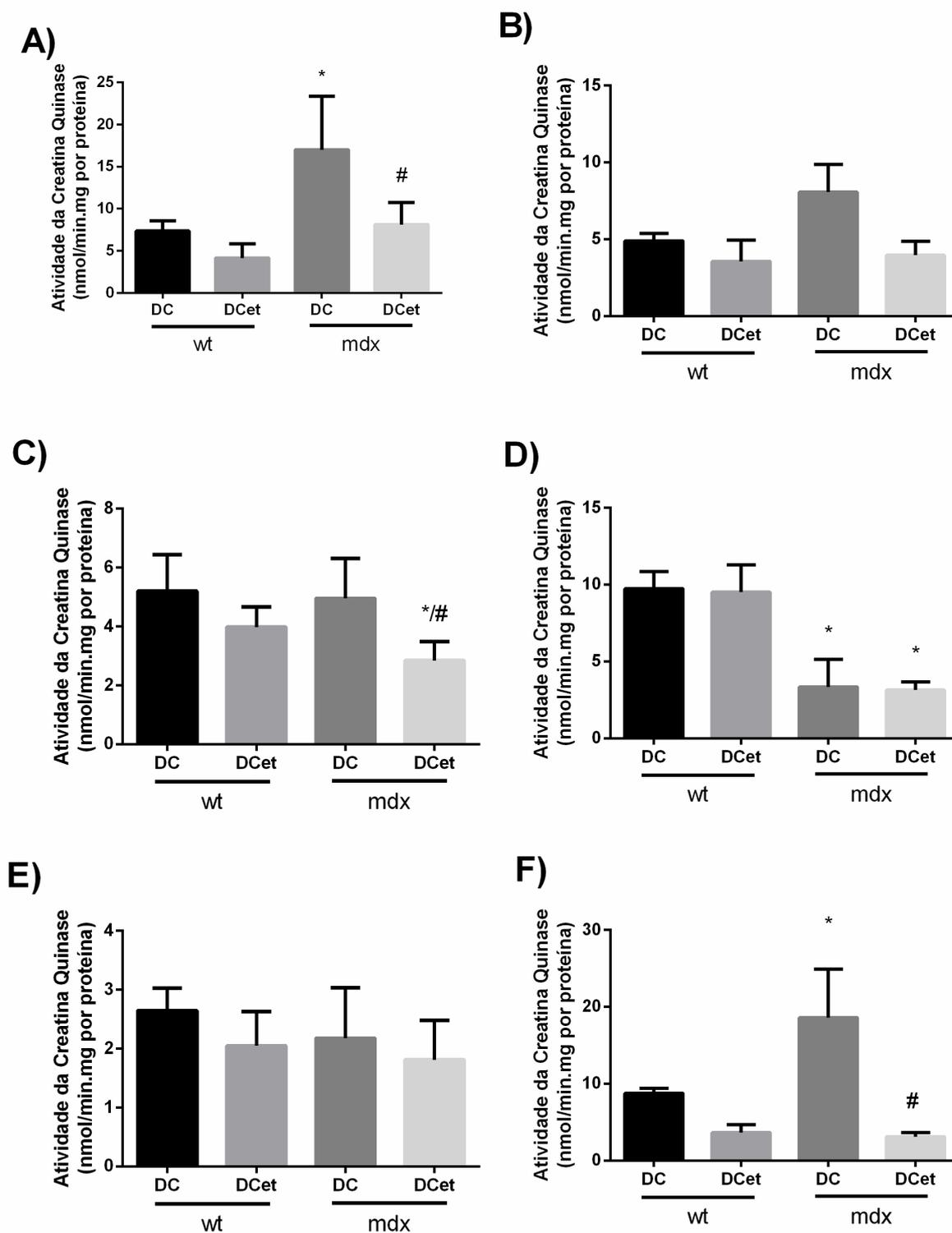


Figura 15 – Atividade da creatina quinase em tecido cerebral e muscular de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet (A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (*/#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e *wt+DCet ou #mdx+DC

Como visto pela figura 15, observou-se atividade da CK bastante heterogênea entre os tecidos analisados. No cerebelo (15B) e no córtex (15E) ficou evidenciado que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir nestas regiões do SNC, não havendo alterações significativas do parâmetro analisado.

Contudo, os camundongos mdx+DC exibiram maior atividade ($p < 0.05$) da CK do que os camundongos wt na mesma dieta, nas regiões do córtex pré-frontal (15A) e tecido muscular (15F). No estriado (15D), no entanto, os camundongos mdx independente da dieta apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da atividade enzimática quando comparados aos seus controles. No hipocampo (15C), essa redução foi observada apenas no grupo mdx+DCet, sendo significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao grupo wt+DCet e mdx+DC.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO BDNF

As quantificações do BDNF no tecido cerebral (Figura 16A – 16E) por grupo de animais tratados estão descritos a seguir.

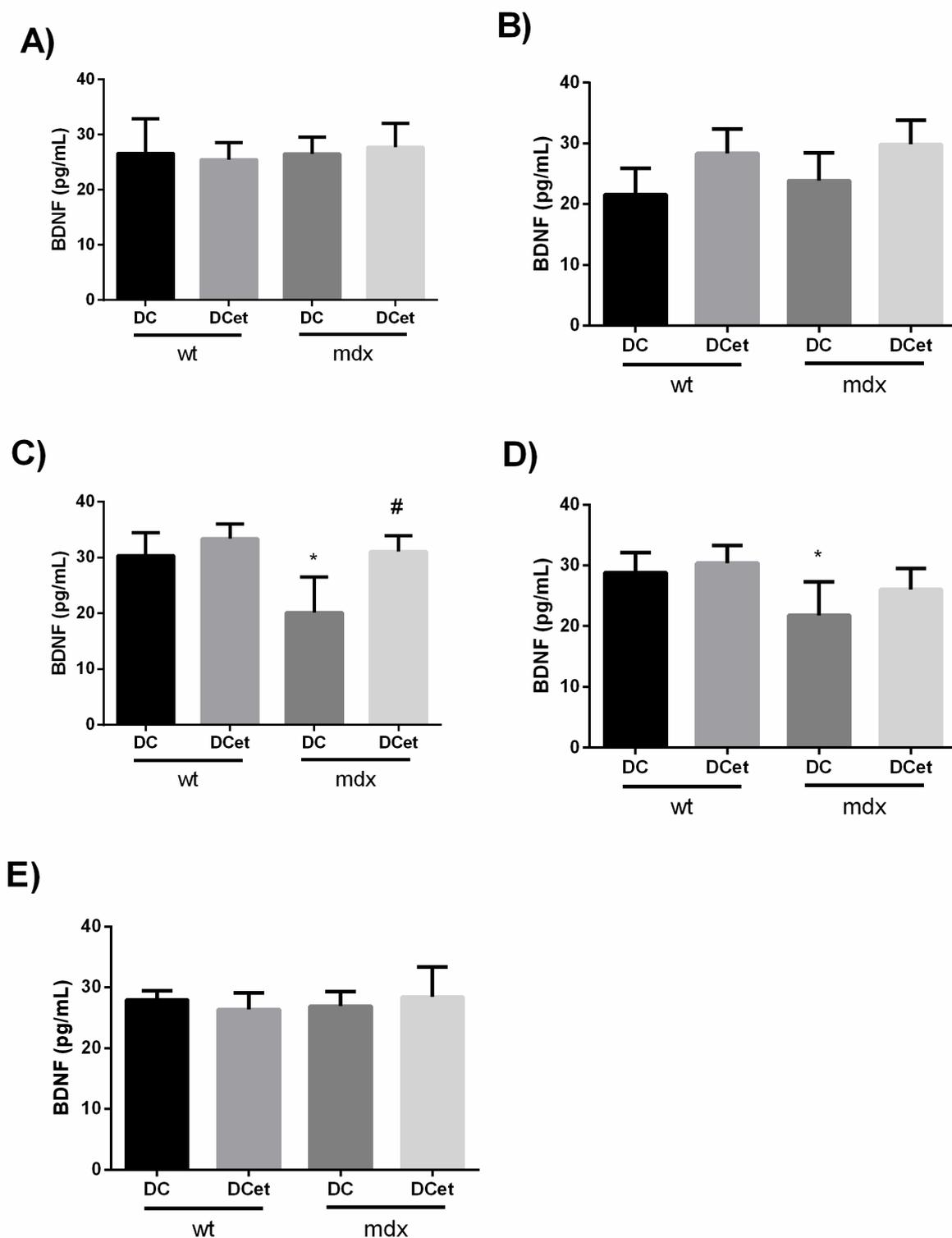


Figura 16 – Níveis de BDNF em tecido cerebral de camundongos (wt e mdx) tratados com DC e DCet

(A) Córtex pré-frontal; (B) Cerebelo; (C) Hipocampo; (D) Estriado; (E) Córtex; (F) Gastrocnêmio. Dados expressos em média e desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (#) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC

Nos animais mdx+DC, os níveis do BDNF foram significativamente menores ($p < 0,05$) no hipocampo (16C) e no estriado (16D) quando comparados com os animais controle wt+DC.

Após 14 dias de tratamento com dieta cetogênica, observou-se um aumento significativo da quantificação do BDNF na região hipocampal (16C) dos animais mdx+DCet em comparação com os animais mdx+DC. A mesma diferença não foi significativa na região do estriado. Nas demais regiões analisadas não houve alterações significativas entre os grupos.

Em síntese, o quadro 2 reúne os resultados descritos neste estudo.

Quadro 2 – Resumo dos resultados do estudo

	Pré-frontal	Cerebelo	Hipocampo	Estriado	Córtex	Gastrocnêmio
TNF-α			↓			↓
IL-1β	↓		↓		↓	↓
IL-6			↑			
IL-10			*			↑
MPO	↓	*	↓	↓	*	↓
TBARS			↓	*	↓	↓
Carbonilação	*		↓			↓
Tióis	↑		↑		↑	
Complexo I	↓	↓	↓		↓	↓
CK	↓		↓	*		↓
BDNF			↑	*		

(*) $p < 0,05$ entre mdx+DC e wt+DC. (↓ ou ↑) $p < 0,05$ entre mdx+DCet e mdx+DC.

5. DISCUSSÃO

Embora um progresso significativo tenha sido alcançado no avanço científico sobre a DMD, sabe-se que ainda não há cura para as alterações decorrentes da patologia. Neste contexto, o presente estudo evidencia que terapias não medicamentosas, como a dieta cetogênica, que visam minimizar a progressão da doença, tomam significativa importância no tratamento e exercem uma melhora na fisiopatologia da DMD.

Este estudo baseou a construção da hipótese a partir da teoria de que a distrofinopatia afeta as necessidades energéticas e proteicas de camundongos mdx, confirmada por estudos prévios de Radley-Crabb e colaboradores (2011; 2015)^{27,28}. Na ocasião, os autores concluíram que a oferta de uma dieta hiperlipídica (16% lipídeos, 19% de proteínas) pode atender melhor às necessidades energéticas dos camundongos mdx, reduzindo as alterações e melhorando a função muscular. Considerando o embasamento científico de que uma dieta hiperlipídica, apesar dos resultados promissores nos estudos citados, causa obesidade, afeta o metabolismo lipídico, glicêmico, promove hipercolesterolemia, bem como alterações no metabolismo central, entre outros efeitos agravantes indesejados na patologia de estudo e, somando as contribuições científicas na qual a dieta cetogênica (também hiperlipídica) tem emergido no tratamento de diferentes doenças neurodegenerativas, conduziu-se esta proposta de investigação, evidenciando o potencial sinérgico que provavelmente diversos mecanismos fisiológicos operam de forma coordenada.

Na figura 17, ilustra-se resumidamente a hipótese de mecanismo de ação da DCet sobre a modulação do metabolismo da DMD.

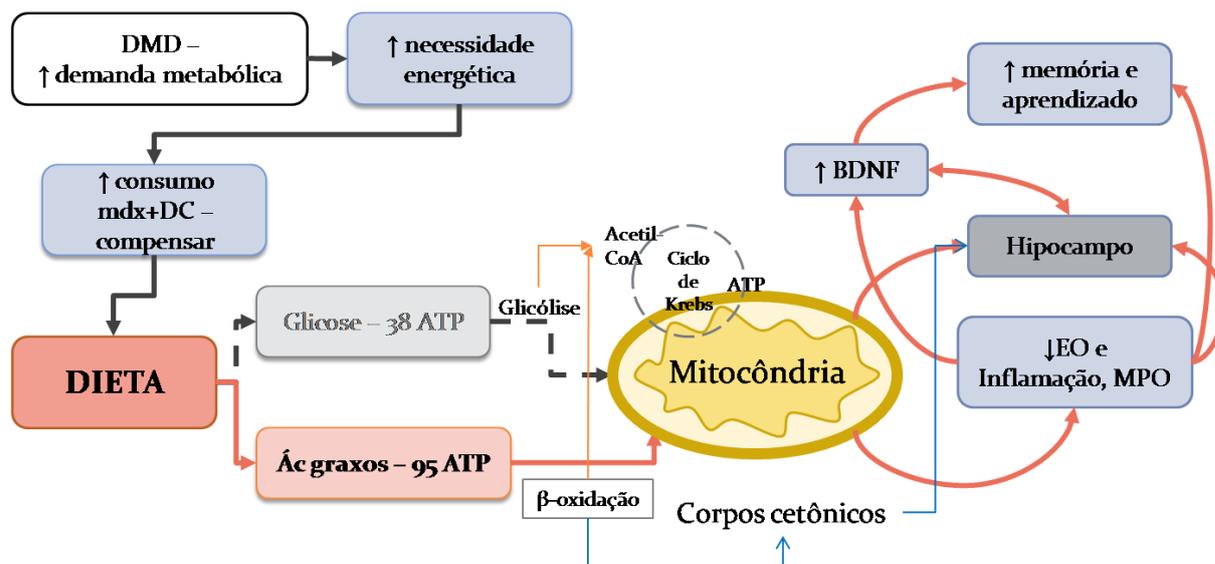


Figura 17 – Proposta de mecanismo de ação da DCet em modelo animal de DMD

Uma característica importante no estudo de nutrição experimental é o acompanhamento do ganho de massa corporal e ingesta alimentar pelo modelo animal em estudo. Este estudo mostrou que a dieta cetogênica promoveu maior ganho de massa no grupo de animais selvagens, comparado aos camundongos mdx. Igualmente, Hartman e colaboradores (2007)¹¹⁸ afirmaram que animais alimentados com uma dieta cetogênica podem ganhar peso menor do que aqueles alimentados com dieta controle. Ziegler e colaboradores (2002)¹¹⁹ e Vizuet e colaboradores (2013)¹²⁰, no entanto, observaram ganho de massa em ratos *Wistar* alimentados por oito semanas com dieta cetogênica em comparação a uma dieta controle, porém com redução da velocidade de crescimento a partir da segunda semana.

Neste estudo, embora os animais que receberam a dieta cetogênica tenham consumido uma quantidade menor de ração em gramas, em kcal esse consumo foi pouco variável entre os grupos, uma vez que a densidade energética (kcal/g) da ração cetogênica é maior comparada à ração controle. Uma dieta de alto teor calórico influencia o apetite e consequentemente diminui o consumo de alimentos^{121,122}, observado nos grupos wt+DCet e mdx+DCet.

É importante ressaltar que a relação entre o consumo de energia e o peso corporal não aumenta linearmente com o aumento do peso vivo¹²³. Além dessa relação indireta, o aumento no consumo energético não reflete obrigatoriamente para que haja aumento da adiposidade em função de uma dieta hiperlipídica¹²⁴.

Justificando, assim, a proporção inversa de alto consumo e baixo ganho de massa representada pelo grupo wt+DC.

O menor consumo de ração durante a primeira semana experimental também foi observado em ratos após lesão medular alimentados com dieta cetogênica. Contudo, no prazo de uma semana após a lesão, a ingestão de ração cetogênica foi similar ao consumo de ração padrão no grupo controle. Em duas semanas, o peso corporal de ambos os grupos havia retornado aos níveis pré-lesão e após 14 semanas de alimentação com dieta cetogênica, o peso corporal foi semelhante ao observado para ratos alimentados com dieta controle⁹⁴.

Translacionando para a pesquisa clínica, estes resultados sugerem que o paciente com DMD em dietoterapia cetogênica manteriam o controle de ganho de peso igual ao indivíduo sem a doença consumindo dieta padrão. Bem como, sugerem que pacientes distróficos consumindo dieta padrão não atingem suas necessidades nutricionais, compensando o consumo em maior quantidade ingerida e apresentando ganho de peso característico da evolução da doença que mostra obesidade em pacientes com DMD. Em um estudo transversal, Martigne e colaboradores (2011)¹²⁵ mostraram que 54% dos pacientes de 13 anos são obesos.

Na mesma linha de raciocínio, observa-se que a dieta cetogênica em relação a uma dieta normocalórica promoveria ganho de peso em indivíduos normais, baseado no grupo wt+DCet. Nesse caso, deve-se ressaltar não foi possível averiguar se o ganho de peso foi apenas de tecido adiposo, uma vez que não foi avaliado composição corporal. Dessa forma, pode-se considerar a possibilidade de manutenção de massa muscular.

As consequências para a composição corporal dependem também da composição da dieta. Outro fator de grande importância para o ganho de peso no wt+DCet, independentemente da ingestão calórica, pode ter sido o tipo de gordura utilizada na composição da dieta. De acordo com Buettner e colaboradores (2007)¹²⁶, as gorduras saturadas e monoinsaturadas são capazes de promover, de forma mais pronunciada, obesidade e resistência à insulina quando comparadas à gordura poli-insaturada, sendo estas capazes de gerar aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado¹²⁴. A banha de porco, mesmo tipo de gordura utilizado para composição da dieta cetogênica nesse estudo, apresenta alto teor de ácidos graxos monoinsaturados (42%) e saturados (39%) na sua

composição, sendo prevalente o ácido graxo monoinsaturado oleico, o poliinsaturado linoleico e os saturados palmítico e esteárico^{127,128}.

Considerando um estado metabólico alterado na DMD, deve-se supor que a partir desses resultados de massa corporal e de consumo que haja uma maior demanda metabólica nos animais mdx, na qual pode ser suprida pela fonte lipídica de energia, mas não pela via metabólica de carboidratos. Uma consideração importante já registrada por Radley-Crabb e colaboradores (2011)²⁷ é que, a menos que as necessidades energéticas basais da DMD sejam atendidas, os benefícios das intervenções terapêuticas não serão totalmente alcançados.

Clinicamente, a DMD é uma doença neurodegenerativa associada ao comprometimento progressivo da memória e da linguagem e é frequentemente acompanhado por sintomas comportamentais⁶, como ansiedade e depressão, além de *déficits* cognitivos e baixo desempenho acadêmico⁸⁴. A dieta cetogênica, uma dieta rica em gordura e pobre em carboidratos, tem sido um tratamento efetivo para a epilepsia intratável em crianças há décadas. Evidências crescentes mostram que a dieta cetogênica também tem um impacto positivo na cognição e no comportamento em várias doenças neurológicas^{20,129}.

Reconhecidamente, o processo de armazenamento da memória é dependente de uma série de eventos que evoluem com o tempo em diferentes regiões cerebrais⁷⁹, como os processos metabólicos que ocorrem especificamente no hipocampo para formação da memória de longa duração. Ou, ainda, a formação de memórias recentes, inicialmente dependentes de modificações nas conexões sinápticas hipocámpais. Sua armazenagem nesta região cerebral é, no entanto, limitada pelo tempo, já que danos ao lobo temporal, que inclui o hipocampo, interrompem a evocação de memórias recentes deixando as memórias remotas inalteradas⁸⁰.

Até o momento, este é o primeiro estudo pré-clínico que avalia o efeito de uma dieta cetogênica sobre o comportamento em um modelo animal de DMD. A partir dos resultados, o tratamento com dieta cetogênica foi claramente positivo na formação de memória em camundongos mdx. No teste de esquiwa inibitória, os camundongos mdx alimentados com dieta cetogênica assimilaram-se ao comportamento dos animais selvagens, com retenção de memória e aumento do tempo de latência. Além disso, os resultados com o teste campo aberto, usado como um teste padrão de atividade locomotora geral, avaliando memória contextual e de

habituação, mostraram que houve redução no número de *crossings* e da atividade exploratória (*rearings*) entre os animais nos dois grupos de dieta cetogênica, indicando que o tratamento com dieta cetogênica proporcionou melhoras cognitivas e de aprendizado.

Diferentes propostas de potenciais mecanismos terapêuticos da dieta cetogênica têm enriquecido a literatura científica quanto à memória e comportamento. Inicialmente, baseados nos conceitos de acidose, desidratação e aumento das concentrações de cetonas, a hipótese de ação neuroprotetora da dieta cetogênica no SNC permanece incerta, apesar de ser fortemente relacionada a um efeito antioxidante pela redução mecanicista na cascata de marcadores inflamatórios e $EO^{20,89}$.

Citam-se, ainda, como hipóteses de mecanismo de ação: uma atividade antiapoptótica pela supressão da expressão de fatores pró-apoptose, como clusterina e caspase-3¹³⁰; aumento da capacidade de tamponamento de Ca^{++} intracelular, aumentando a expressão hipocampal da proteína de ligação ao Ca^{++131} ; limitação da hiperexcitabilidade neuronal induzida por convulsões¹³⁰; e, aumento dos níveis do ácido gama-aminobutírico (GABA), causando hiperpolarização celular neuronal através do influxo rápido de íons cloreto (Cl^-)¹³². A neuroproteção por cetonas também pode ser relacionada com a regulação positiva do fator indutor de hipóxia (HIF1- α), um regulador conhecido de vários fatores neuroprotetores, tais como o BDNF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator derivado de células do estroma-1 α (SDF-1 α)⁹⁴.

Em ratos idosos, a cetose induziu angiogênese e aumentou a densidade capilar equivalente àquela observada após a exposição hipóxica em ratos jovens. É possível que a dieta cetogênica tenha revitalizado a unidade neurovascular em ratos mais velhos, ajudando a suportar a função cognitiva. Assim, a cetose induzida por três semanas de dieta pôde melhorar o processo de adaptação à hipóxia através de níveis elevados de HIF1- α e aumento da densidade capilar¹⁰⁰. A dieta cetogênica também se mostrou como uma estratégia promissora para melhorar o comprometimento da memória espacial causada pela hipóxia hipobárica em ratos após duas semanas de tratamento¹²⁹.

Nesse contexto, a dieta cetogênica tem se mostrado clinicamente eficaz e segura na melhora cognitiva e achados recentes apoiam que a cetose, induzida pela dieta ou pela administração de BHB, desempenha um papel protetor em vários

modelos: redução significativa dos níveis de peptídeos A β no cérebro de modelo animal de doença de Alzheimer¹³³; melhora do desempenho cognitivo sob condições normóxicas e hipóxicas de ratos idosos¹⁰⁰; melhora da incapacidade motora e do comprometimento cognitivo de um modelo animal de esclerose múltipla¹³; e, melhora do comprometimento da memória espacial causada pela exposição à hipóxia hipobárica em camundongos¹²⁹.

Os resultados positivos aqui descritos juntam-se aos achados de redução de marcadores inflamatórios e de EO também encontrados neste estudo, bem como a normalização dos níveis de BDNF, principalmente, na região hipocampal, evidenciando correlação entre si. Mais do que a melhora cognitiva, com esses resultados, é possível trabalhar com a hipótese de que a via de proteção da dieta cetogênica quanto ao potencial cognitivo não compartilha de nenhuma via comprometida pela DMD como, por exemplo, da expressão de distrofina no SNC, baseando-se no fato de que a dieta cetogênica promoveu resultados estatisticamente significativos sobre a memória e comportamento independente do modelo animal. Portanto, os experimentos apresentados neste estudo oferecem evidências de que mudanças dependentes do tratamento dietético se mostram como uma alternativa de intervenção de curto prazo para a DMD. Desta forma, estes achados sinalizam a dieta cetogênica como uma ferramenta promissora na melhora do dano cognitivo na DMD.

Neste contexto, o desequilíbrio entre a atividade pró e anti-inflamatória na DMD é um indicador da extensão da patologia. Há evidências científicas comprovadas que a dieta exerce papel fundamental no perfil inflamatório em diferentes patologias, bem como na DMD, na qual se observa uma discreta demanda de pesquisas científicas na área. Neste estudo, o tratamento com dieta cetogênica por 14 dias mostrou evidências anti-inflamatórias, promovendo reduções significativa nos níveis de IL-1 β , TNF- α e da atividade da MPO dos animais mdx, bem como aumentou os níveis de IL-6 e IL-10 no SNC e no músculo esquelético, respectivamente.

Os resultados do processo inflamatório neste estudo corroboram com a literatura, mostrando um comprometimento maior no músculo esquelético e SNC dos camundongos mdx e se suportam com os achados de Comim e colaboradores (2015)⁶⁸ que confirmaram níveis aumentados de IL-1 β e TNF- α e níveis reduzidos de

IL-10 em soro de pacientes adultos jovens com diagnóstico de DMD. Evidenciando, assim, um potente efeito supressor do processo inflamatório existente.

Destaca-se também o fato de que o hipocampo foi a região mais afetada pelas alterações da cascata de mediadores inflamatórios, com alterações significativas de todas as citocinas analisadas. Considerando que os processos de memória e aprendizado são produzidos principalmente no hipocampo, e essa região cerebral apresenta uma alta densidade de receptores para IL-1, constatou-se uma efetividade do tratamento com dieta cetogênica nessa região durante o processo neuroinflamatório ocasionado pela DMD.

O pré-tratamento com dieta cetogênica já foi associado à redução da resposta da IL-1 β no hipocampo quatro horas após injeção de LPS em ratos *Wistar*²⁵. Em contrapartida, os níveis de TNF- α não foram diferentes após o pré-tratamento com dieta cetogênica, suplementadas ou não com ômega 3, nas regiões do hipocampo^{25,120} e estriado¹²⁰ em ratos *Wistar* tratados com dieta cetogênica. Porém, em níveis séricos, Paoli e colaboradores (2015)⁹⁰ mostraram reduções significativas dos níveis de TNF- α em indivíduos acima do peso que seguiram protocolo de quatro semanas de dieta cetogênica sem suplementação de ácidos graxos poli-insaturados. As diferenças encontradas podem estar relacionadas aos diferentes períodos de tempo de administração da dieta, variando de 14 dias²⁵ a 8 semanas¹²⁰.

Com propriedades reconhecidamente anti-inflamatórias, a IL-10 mostrou maior regulação no sistema imune do tecido muscular de camundongos mdx, com aumento da sua expressão no músculo gastrocnêmio após tratamento com dieta cetogênica. No SNC, sua expressão regulatória não foi significativamente maior após o tratamento com dieta cetogênica em nenhum dos grupos. Uma vez que a sua deficiência ou expressão anormal é que está relacionada com o agravamento da resposta inflamatória¹³⁴ e que a característica mais marcante da DMD é a inflamação crônica que ocorre dentro do músculo, torna-se possível determinar o potencial terapêutico da dieta cetogênica na regulação da IL-10 no músculo distrófico.

Embora a IL-1 β e TNF- α sejam classicamente considerado como citocinas pró-inflamatória, a IL-6 pode ter efeitos pró ou anti-inflamatórios¹³⁵. Após a dietoterapia cetogênica, os níveis de IL-6 nos animais mdx deste estudo apresentaram aumento significativo no hipocampo, região importante na regulação das respostas cognitivas, enquanto sua expressão no músculo esquelético não apresentou alterações significativas entre os grupos. Vale ressaltar que este aumento

apresentado no grupo mdx+DCet não ultrapassou os níveis expressos no grupos controles.

Diversos tipos celulares, além de macrófagos e linfócitos, são responsáveis pela secreção de IL-6, como as células endoteliais, β -pancreáticas, hepatócitos, musculares esqueléticas e lisas, astrócitos e adipócitos. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica e exerce importantes funções na regulação de resposta imune, inflamação e hematopoiese, gerando uma variedade de respostas fisiológicas também relacionadas às funções endócrinas e metabólicas.

Em um único outro estudo relacionando IL-6 na região do hipocampo de camundongos mdx, após tratamento com o antidepressivo amitriptilina, também foi observado elevações significativas nos níveis de IL-6 no hipocampo em camundongos wt e mdx, além de níveis plasmáticos aumentados de IL-6 nos camundongos mdx após administração do antidepressivo¹³⁶. No entanto, alguns estudos mostraram que essa citocina já se apresenta elevada na DMD. Rufo e colaboradores (2011)¹³⁷ observaram níveis séricos aumentados de IL-6 tanto em pacientes com DMD como em camundongos mdx. Da mesma forma, Messina e colaboradores (2011)¹³⁸ descreveram maior expressão de IL-6 e TNF- α nos músculos distróficos de pacientes e aumento significativo com a idade.

O conjunto desses achados sugere que a IL-6 pode agir de formas distintas. Sabe-se que no músculo esquelético, altos níveis crônicos de IL-6 tornam-se prejudiciais ao músculo, enquanto a completa ausência de IL-6 dificulta a reparação muscular¹³⁵. Porém, no SNC um aumento dos níveis de IL-6 no hipocampo de camundongos mdx ainda é um dado contraditório e pouco investigado. Sabe-se que no camundongo mdx, a IL-6 e a inflamação muscular estão elevadas, evidenciando uma ligação entre si.

Destaca-se que a IL-6 é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, operação e queimadura. Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias⁵¹.

Uma hipótese para os níveis elevados de IL-6 encontrados no presente estudo é a sua associação à resistência insulínica, a qual leva ao aumento da síntese e armazenamento de triglicérides nos hepatócitos e exerce papel importante na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma doença

com alto potencial para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular, condições que promovem a ocorrência de dano hepático irreversível¹³⁹.

É possível que os animais mdx possuam maior vulnerabilidade hepática, tendo sido agravada com a restrição de carboidratos e superalimentação de lipídeos. Nesse caso, tornam-se imprescindíveis estudos futuros para a investigação de enzimas séricas específicas (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) liberadas do rompimento celular hepático, fornecendo informações da ocorrência, extensão, magnitude e curso (aguda ou crônica) da lesão¹³⁹.

Deve-se considerar que tanto nos tecidos periféricos quanto no SNC, existe uma correlação direta entre a produção de IL-6 e o tecido adiposo e que níveis cronicamente aumentados de IL-6 contribuem para a manutenção do estado de resistência à insulina, por inibição na transcrição do transportador de glicose 4 (GLUT-4) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1)¹⁴⁰, influenciando o peso corporal, a homeostase energética e a sensibilidade insulínica¹⁴¹.

Dessa forma, sugere-se que a IL-6 atue como um biomarcador para o monitoramento da neuroinflamação, resistência à insulina, dano hepático, bem como do tempo de protocolo de dieta cetogênica para prevenir esse quadro inflamatório em pacientes jovens com DMD.

Além disso, modelos experimentais sugerem o envolvimento de IL-6 e TNF- α no dano isquêmico cerebral, encontrando-se em níveis elevados após isquemia cerebral, podendo induzir uma reação inflamatória no SNC¹⁴². Em adultos, tem sido demonstrada a correlação entre os níveis de IL-6 e TNF- α no líquido e o prognóstico neurológico após isquemia cerebral aguda¹⁴³.

As correlações da IL-6 com a neuroinflamação contrapõem-se à redução da atividade da MPO, outro marcador inflamatório que apresentou redução significativa induzida pela dieta cetogênica com efeito sistêmico, atenuando o recrutamento e a degranulação dos neutrófilos intramuscular e no SNC dos camundongos mdx, reduzindo os efeitos inflamatórios deletérios.

Os mecanismos que conduzem às lesões do SNC na DMD ainda são desconhecidos. Entretanto, estas evidências são só sugerem que possa haver um processo neuroinflamatório no SNC durante o curso da doença, quanto enfatizam a dieta cetogênica como terapia promissora nos parâmetros analisados. Em conjunto, os achados deste estudo reportam um dos efeitos mais importantes da modificação

da doença⁸⁹ pela dieta cetogênica: seu papel anti-inflamatório por sinalização de citocinas e aumento da atividade da MPO tanto no SNC como no músculo esquelético em modelo animal de DMD.

No músculo distrófico, o estresse oxidativo é um fator potencialmente patogênico determinante na gravidade da doença^{11,39}. Considera-se que níveis alterados de ERO contribuam para os danos celulares nas DMP danificando direta e irreversivelmente macromoléculas, como proteínas e lipídios de membrana e DNA¹⁴⁴.

Sabe-se que os efeitos deletérios à membrana provocados pelo EO provocam a ruptura no sarcolema, aumento no influxo de Ca^{2+} , toxicidade celular e consequente degeneração muscular. A fim de diminuir estes danos, os tratamentos mais recentes têm estudado mecanismos que diminuam a lesão celular, aumentem a atividade antioxidante e melhorem a produção de ATP via mitocondrial^{68,144}. Nesse contexto, a dietoterapia cetogênica surge como possibilidade promissora de tratamento antioxidante *in vivo*, pelos resultados obtidos neste trabalho, reduzindo a oxidação de proteínas tióis, a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas.

Enquanto o dano oxidativo irreversível de proteínas e lipídios, medido pela carbonilação e peroxidação, respectivamente, tem sido mais estudado, tem havido pouca informação relacionada à oxidação da proteína tiol nas DMP¹⁴⁵. No presente estudo, foi observada elevação significativa dos parâmetros da atividade antioxidante pela GSH nas regiões do córtex pré-frontal, hipocampo e córtex, equiparando-se à atividade antioxidante representada nos grupos controles ou superior a essas, como expressado no pré-frontal. No músculo gastrocnêmio, no entanto, não foram observadas alterações significativas de atividade antioxidante pela GSH entre os grupos, especialmente nos animais mdx controle (mdx+DC). Porém, uma vez que a oxidação de proteínas tióis ocorra mais dramaticamente em miofibras fragmentadas associadas a áreas de necrose, é suposto que tenha ocorrido áreas menos pronunciada de mionecrose nos animais mdx controles, lesões essas que são mais expressivas em camundongos mdx mais velhos (3 meses)¹⁴⁵.

Com o aumento da atividade pela GSH após dietoterapia cetogênica, confirma-se o indicativo de atividade antioxidante também pela diminuição do dano lipídico e proteínas carboniladas nos camundongos mdx. A peroxidação lipídica teve diminuição significativa no SNC (especificamente no hipocampo e córtex) e no

músculo esquelético. Enquanto a maior diminuição de dano às proteínas carboniladas foi observada no músculo gastrocnêmio, além da região do hipocampo, única área do SNC com expressão significativa da diminuição da atividade oxidante.

Comim e colaboradores (2015)⁶⁸ demonstraram que o dano oxidativo, avaliado pelos ensaios de TBARS e proteína carboniladas, ocorreu em várias regiões cerebrais do camundongo mdx. Os níveis de TBARS foram diminuídos no estriado em comparação com o tipo selvagem. E os níveis de proteínas carboniladas foram diminuídos no cerebelo e pré-frontal também em comparação com o tipo selvagem⁶⁸. Nossas análises demonstraram resultados contraditórios no modelo controle mdx, porém com efetividade no tratamento pela dieta cetogênica em diminuir os danos oxidativos às proteínas.

Estudos prévios também mostraram aumento da atividade antioxidante em camundongos mdx após protocolo de exercício físico, porém sem interferência significativa da diminuição da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no hipocampo e córtex, estruturas que normalmente possuem maior concentração de distrofina¹⁴⁶(dados não publicados)¹⁴⁷. Dessa forma, torna-se imperativo sugerir a ação sinérgica de ambas as terapias não medicamentosas, somando os resultados promissores alcançados em cada estudo.

Embora os mecanismos subjacentes a tais efeitos permaneçam incertos, uma possibilidade é que a dieta cetogênica diminua a produção de ERO associado a vários tipos de estresse metabólico. Se comparado com o metabolismo da glicose, as cetonas geram menor estresse oxidativo no SNC, juntamente com uma maior saída de energia celular e capacidade antioxidante. Além disso, a cetose pode aumentar a GSH nas células do hipocampo e em geral diminuir produção de ERO mitocondrial⁹². Assim, parece que um mecanismo neuroprotetor proeminente da ação da dieta cetogênica envolve uma redução na produção de ERO mitocondriais, o que diminuiria o estresse oxidativo e a lesão potencialmente neuronal.

Além da produção de ERO, as mitocôndrias desempenham importante papel na homeostase do Ca citosólico, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lipídeos, colesterol, esteroides e nucleotídeos. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético, na via final comum de produção de ATP. Portanto, tecidos com atividade metabólica aeróbica intensa, como o cérebro e os músculos esquelético e cardíaco, apresentam altas concentrações dessa organela¹⁴⁸.

Considerando que o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial é o primeiro passo para a produção de energia, contata-se a partir dos resultados encontrados que camundongos mdx alimentados com dieta controle apresentaram atividade alterada do metabolismo energético com elevação da atividade desse complexo no córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo e córtex.

Deve-se considerar que embora os níveis de ATP no cérebro estejam normalmente elevados, alterações na função mitocondrial poderiam diminuir a produção de ATP¹². Além disso, o metabolismo oxidativo dos corpos cetônicos causa uma redução na utilização da glicose no SNC. A produção de ATP a partir da glicólise (a primeira fase de utilização de glicose) desempenha um papel privilegiado no controle de processos na membrana plasmática, incluindo a regulação dos canais potássio e o abastecimento das bombas de sódio acionadas por ATP. Considera-se, portanto, a possibilidade de que pelo metabolismo dos corpos cetônicos tenha ocorrido redução na produção de ATP glicolítico¹⁴⁹, representado pelo grupo mdx+DCet.

Assim, compreende-se que apesar da função mitocondrial alterada, a atividade do complexo I apresentou modulação após intervenção com a dieta cetogênica, regularizando sua atividade aos níveis dos grupos controles com redução da atividade, inclusive no músculo esquelético. Esses dados sugerem que a dieta cetogênica pode atuar para restabelecer os estoques de energia no SNC²⁴.

De acordo com Bough e colaboradores (2008)¹⁵⁰, a cetose crônica leva à biogênese mitocondrial no hipocampo, resultando em aumento dos estoques energéticos e, dessa forma, aumentando a capacidade de produção de ATP, com excesso de fosfato de alta energia estocado na forma de fosfocreatina. Ainda segundo esses autores, glutamato e glutamina, formados a partir do ciclo do ácido cítrico estimulado por cetonas, fornecem um importante estoque de energia secundário, o qual, juntamente à fosfocreatina, podem manter os níveis de ATP para momentos de necessidade, como a ocorrência de hiperexcitabilidade neuronal que leva às crises epilépticas. Esse processo resultaria em uma estabilização do potencial de membrana, o que, por sua vez, aumentaria a resistência ao insulto causador de crises.

Para avaliar a integridade da membrana muscular e pelo seu papel central no metabolismo dos tecidos de alta demanda energética, a atividade de CK também foi avaliada neste estudo. Os resultados demonstraram atividade contraditória da CK

entre os tecidos analisados, apresentando-se reduzida no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e músculo gastrocnêmio de animais mdx após intervenção com a dieta cetogênica em comparação aos animais mdx controles. Uma vez que a CK pode estar relacionada a uma demora na depleção de ATP, encontrá-la reduzida nos grupos mdx+DCet permite relacionar a uma capacidade diminuída de regeneração de ATP.

Em conjunto, os resultados do complexo I e CK avaliados neste trabalho, rebatem os resultados prévios de Tuon e colaboradores (2010)¹², no qual descreveram atividade reduzida do complexo I em todas as regiões do SNC citadas, inclusive no estriado, e aumento da atividade da CK no hipocampo, córtex pré-frontal, córtex e estriado de camundongos mdx.

No entanto, sabe-se que durante o processo de degeneração muscular, a atividade de CK encontra-se aumentada, além de ocorrer liberação desta para corrente sanguínea na ocorrência de morte celular³³. Assim, a redução da atividade da creatina CK nos animais mdx+DCet em córtex pré frontal, hipocampo, estriado e tecido muscular, pode indicar uma redução do processo de degeneração celular. Com isso, entende-se que o protocolo de dieta foi capaz de modular a parâmetros normais, quando comparados animais mdx+DC.

Dadas as reduções nos compostos de fosfato de alta energia encontrados neste estudo, existe a possibilidade de que a dieta cetogênica tenha sido insuficiente na oferta de proteínas. Assim, considera-se para futuras investigações um maior aporte de kcal proteicas, bem como a intervenção terapêutica com suplementação de creatina¹⁵¹.

O BDNF é considerado como o fator neurotrófico mais prevalente no SNC, responsável pela sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica e, portanto, um ponto-chave em doenças neurológicas⁷⁶. Para avaliar se os benefícios comportamentais e neuroprotetores da dieta cetogênica estão associados aos níveis de neurotrofinas no SNC, os níveis de BDNF foram avaliados neste estudo. Os resultados mostram que a depleção de BDNF nos animais mdx, previamente descrita por Comim e colaboradores (2009)¹¹ – único outro estudo que avaliaram os níveis de BDNF em modelo animal de DMD –, pode ser revertida no hipocampo com o tratamento com dieta cetogênica e mostra tendência para reversão no estriado, reforçando a hipótese de que a neuroproteção por cetonas pode estar relacionada

com a regulação positiva de fatores neurotróficos, tais como BDNF, VEGF e HIF-1 α ⁹⁴.

Em ratos Sprague-Dawley expostos à hipóxia hipobárica, o pré-tratamento com dieta cetogênica por duas semanas promoveu aumentados níveis de BDNF no hipocampo¹²⁹. Contudo, em estudo anterior, os níveis de BDNF, VEGF e SDF-1 α não apresentaram alterações em amostras de medula espinal de ratos Sprague-Dawley quando analisados no 14º dia de dieta cetogênica após lesão medular⁹⁴.

Apesar de um aumento não significativo nos níveis de BDNF no estriado neste estudo, deve-se considerar que essa é uma região altamente inervada pelas sinapses que liberam o BDNF e participa da distribuição da memória cortical juntamente com o cerebelo através de duas vias aferentes corticais principais. Assim, níveis diminuídos de BDNF nessa região relacionam-se às anormalidades comportamentais e no desempenho da memória, bem como podem estar relacionados com a atividade locomotora¹¹. Portanto, ressalta-se a importância de reverter os baixos níveis dessa neurotrofina no estriado especialmente na DMD.

Uma vez que os resultados deste estudo demonstraram uma tendência de aumento dos níveis de BDNF nos animais mdx+DCet em todas as regiões analisadas, parece relevante considerar a relação entre o protocolo de tempo e efeito da dieta cetogênica, supondo que há uma relação tempo-dependente da dieta: maior o tempo de tratamento, melhores os efeitos. No entanto, em um período mais prolongado de dietoterapia cetogênica, ratos *Wistar* alimentados por oito semanas com dieta contendo diferentes proporções de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 e ômega 3, apresentaram reduções significativas dos níveis de BDNF no estriado e mantiveram estáveis os níveis de BDNF no hipocampo¹²⁰.

Em poucos estudos publicados até o momento sobre o efeito da dieta cetogênica nos níveis de BDNF, observa-se ainda resultados contraditórios entre si, muito provavelmente devido às diferentes doenças de base analisadas em distintos modelos experimentais, bem como protocolos heterogêneos de tipo e tempo de dieta administrada. Em conjunto, os resultados expostos reforçam a importância da dieta cetogênica como indutor de alterações no SNC¹²⁰.

Embora as doenças neurodegenerativas e neuromusculares tenham patogênese e características diferentes, existem alguns mecanismos comuns que poderiam explicar os efeitos das dietas cetogênicas. É suposto que esses mecanismos forneçam uma fonte eficiente de energia para o tratamento de certos

tipos de doenças neurodegenerativas caracterizadas por hipometabolismo cerebral focal; diminuindo o dano oxidativo associado a vários tipos de estresse metabólico; aumentando as vias de biogênese mitocondrial; e aproveitando a capacidade das cetonas de contornar o defeito na atividade do complexo I implicado em algumas doenças neurológicas⁹².

Como limitações deste estudo citam-se: o tipo de gordura na dieta testada possui um perfil lipídico predominantemente saturado, sabidamente pró-inflamatório, e apesar dos efeitos positivos alcançados, sugerem-se estudos futuros com uma melhora qualitativa das gorduras na dieta cetogênica. Além disso, nessa primeira etapa de experimentação não foi avaliada composição corporal, impossibilitando a definição mais precisa entre ganho de massa magra ou tecido adiposo. Por último, citamos como uma importante limitação a falta da avaliação de cetonemia entre os grupos, a fim de conhecer os níveis séricos de corpos cetônicos após dietoterapia. Ciente da necessidade desses dados, recomenda-se enfaticamente a avaliação de cetonemia.

Apesar destas questões, o presente estudo objetivou fornecer um vínculo mais claro entre atividade neuroprotetora da dieta cetogênica e o metabolismo da DMD e validou ainda mais o campo emergente da dietoterapia em transtornos neurodegenerativos, especialmente no que diz respeito à DMD.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, a questão problema principal objetivava entender se as respostas inflamatórias e o EO em um modelo murino de DMD estariam relacionados à disfunção da memória em camundongos. Verificou-se que o comprometimento da aprendizagem e da memória está intimamente correlacionado com o aumento da expressão de citocinas e geração de ERO. Além disso, observamos que a dieta cetogênica diminuiu significativamente a disfunção de memória característica na fisiopatologia da DMD, bem como reduziu a inflamação do SNC e muscular em camundongos mdx, sugerindo que as intervenções dietéticas podem revelar-se clinicamente úteis no tratamento da DMD.

Os principais achados do presente estudo são: (1) primeiras evidências de que a dieta cetogênica exerce melhora na memória e comportamento de camundongos mdx; (2) os efeitos neuroprotetores da dieta cetogênica são mediados por uma redução da expressão de citocinas e EO; (3) tanto a inflamação quanto o EO estão associados à consolidação da memória no modelo mdx+DCet; e, (4) a dieta cetogênica exerce importantes efeitos na memória e aprendizado, mas não evita o processo inflamatório e oxidativo da DMD.

Em conjunto, estes achados sugerem que a dieta cetogênica pode modular as respostas adaptativas do SNC mediando o desempenho cognitivo no modelo animal de DMD. Embora sejam necessárias investigações futuras sobre os mecanismos subjacentes de ação, as evidências disponíveis sugerem que a dieta cetogênica é um regime que merece atenção como uma potencial terapia primária para doenças neurodegenerativas, especialmente a DMD.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Sobretudo, estes dados demonstram a eficácia da dieta cetogênica em um estudo pré-clínico de modelo animal de DMD e apoia a progressão em estudos clínicos em pacientes afetados pela distrofia.

É importante ressaltar que o panorama científico atual ainda não prevê protocolos específicos para tratamentos dietoterápicos com regime cetogênico, fato necessário para garantir um efeito benéfico na intervenção dietética a ser usado nos

estudos clínicos. Portanto, torna-se primordial auxiliar a definir protocolos de períodos de tempo, bem como a necessidade de um cronograma prolongado de tratamento ou mesmo a necessidade de exposição ao longo da vida para alcançar um efeito persistente nos músculos distróficos e SNC.

Vale enfatizar também que intervenções farmacológicas ou dietoterápicas não restauram a expressão de distrofina, mas direcionam e sinalizam as vias metabólicas para melhora das respostas imunes.

Assim, outro objetivo importante de estudos futuros será entender melhor as interações da dieta cetogênica com outras intervenções farmacológicas classicamente estabelecidas na DMD, para otimizar os protocolos sinérgicos de interação fármacos-nutrientes. Uma vez que a dieta cetogênica é uma terapia estabelecida em seres humanos, esses estudos podem ser traduzidos para o cenário clínico permitindo um melhor controle da doença em pacientes acometidos.

REFERÊNCIAS

1. Reed U. Doenças neuromusculares. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78:89–103.
2. Chung J, Smith AL, Hughes SC, Niizawa G, Abdel-Hamid HZ, Naylor EW, et al. Twenty-year follow-up of newborn screening for patients with muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. abril de 2016;53(4):570–8.
3. Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet*. 1984;66(1):17–40.
4. Santos NM, Rezende M de M, Terni A, Hayashi MCB, Fávero FM, Quadros AAJ, et al. Perfil clínico e funcional dos pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne assistidos na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). *Rev Neurociências*. 2006;14:015–22.
5. Caromano F. Características do portador de distrofia muscular de Duchene (DMD): revisão. Vol. 3, *Arq. ciências saúde UNIPAR*. 1999. p. 211–8.
6. Anderson JL, Head SI, Rae C, Morley JW. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*. 2002;125(Pt 1):4–13.
7. Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM, Banks GB, Gardner MK, et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(15):5723–8.
8. Uchino M, Hara A, Mizuno Y, Fujiki M, Nakamura T, Tokunaga M. System of Normal Controls and Patients with in the Central Nervous Duchenne Muscular Dystrophy. *Intern Med*. 1996;35(3):189–94.
9. Bushby K, Bourke J, Bullock R, Eagle M, Gibson M, Quinby J. The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Paediatr*. 2005;15(4):292–300.
10. Lawler JM. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol*. 2011;589(Pt 9):2161–70.
11. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Constantino LS, Petronilho F, Tuon L, et al. Oxidative variables and antioxidant enzymes activities in the mdx mouse brain. *Neurochem Int*. 2009;55(8):802–5.
12. Tuon L, Comim CM, Fraga DB, Scaini G, Rezin GT, Baptista BR, et al. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in mdx mouse brain. *Muscle Nerve*. 2010;41(2):257–60.
13. Kim DY, Hao J, Liu R, Turner G, Shi FD, Rho JM. Inflammation-mediated memory dysfunction and effects of a ketogenic diet in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(5).

14. Gomes TK de C, Oliveira SL de, Ataíde T da R, Filho EMT. O Papel da Dieta Cetogênica no Estresse Oxidativo Presente na Epilepsia Experimental. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2011;17(2):54–64.
15. Falzarano MS, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. *Molecules*. 2015;20(10):18168–84.
16. Wagner KR, Lechtzin N, Judge DP. Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(2):229–37.
17. Wang H-S, Lin K-L. Ketogenic diet: an early option for epilepsy treatment, instead of a last choice only. *Biomed J*. 2013;36(1):16–7.
18. Misiewicz Runyon A, So T-Y. The Use of Ketogenic Diet in Pediatric Patients with Epilepsy. *ISRN Pediatr*. 2012;2012:1–10.
19. Puchowicz MA, Zechel JL, Valerio J, Emancipator DS, Xu K, Pundik S, et al. Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23 de dezembro de 2008;28(12):1907–16.
20. Hallböök T, Ji S, Maudsley S, Martin B. The effects of the ketogenic diet on behavior and cognition. *Epilepsy Res*. julho de 2012;100(3):304–9.
21. David N. Ruskin, Tracey A.C.S. Suter, Jessica L. Ross and SAM. Ketogenic diets and thermal pain: dissociation of hypoalgesia, elevated ketones, and lowered glucose in rats. *J Pain*. 2013;100(2):130–4.
22. Jarrett SG, Milder JB, Liang LP, Patel M. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem*. 2008;106(3):1044–51.
23. Ahola-Erkkilä S, Carroll CJ, Peltola-Mjösund K, Tulkki V, Mattila I, Seppänen-Laakso T, et al. Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum Mol Genet*. 2010;19(10):1974–84.
24. Kristopher Bough P. Energy Metabolism as Part of the Anticonvulsant Mechanism of the Ketogenic Diet. *Epilepsia* 2008 Novemb ; 49(Suppl 8) 91–93 doi10.1111/j.1528-1167.2008.01846.x *Energy*. 2008;49(Suppl 8):91–3.
25. Dupuis N, Curatolo N, Benoist JF, Auvin S. Ketogenic diet exhibits anti-inflammatory properties. *Epilepsia*. 2015;56(7):e95–8.
26. Napoli E, Dueñas N, Giulivi C. Potential therapeutic use of the ketogenic diet in autism spectrum disorders. *Front Pediatr*. 2014;2(June):69.
27. Radley-Crabb HG, Fiorotto ML, Grounds MD. The different impact of a high fat diet on dystrophic mdx and control C57Bl/10 mice. *PLoS Curr*. 15 de novembro de 2011;3:RRN1276.
28. Radley-Crabb HG, Marini JC, Sosa HA, Castillo LI, Grounds MD, Fiorotto ML. Dystropathology increases energy expenditure and protein turnover in the Mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2014;9(2).

29. Wedhanto S, Paruhum Siregar U. Duchenne muscular dystrophy. *Curr Orthop*. 2007;57(9):298–300.
30. Moraes FM, Célia R, Campos DS, Medina-acosta E. Distrofia Muscular de Duchenne : relato de caso Duchenne Muscular Dystrophy : case report. *Rev Cient da FMC*. 2011;6(2):11–5.
31. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord*. 1991;1(1):19–29.
32. Chaustre DM, Chona WS. Distrofia Muscular de Duchenne. *Perspectivas Desde La Rehabilitación*. *Rev Fac Med*. 2011;19(1):45–55.
33. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol Rev*. 2002;82(2):291–329.
34. Claudia Y. Silva, Dora Janeth Fonseca, Heidi Mateus, Nora Contreras CMR. Distrofia muscular de Duchenne y Becker. Una visión molecular. *Acta Médica Colomb*. 2005;30(6):112–6.
35. Snow WM, Anderson JE, Jakobson LS. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: A review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(5):743–52.
36. Robert H Brown, Stephen C Cannon LPR. Doenças do nervo e da unidade motora. In: Eric Kandel, James Schwartz, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum AJH, organizador. *Princípios da Neurociências*. 5^o ed 2014. p. 272–96.
37. Brandsema J, Darras B. Dystrophinopathies. *Semin Neurol*. 6 de outubro de 2015;35(4):369–84.
38. Jung D, Pons F, Léger JJ, Aunis D, Rendon A. Dystrophin in central nervous system: a developmental, regional distribution and subcellular localization study. *Neurosci Lett*. 11 de março de 1991;124(1):87–91.
39. Abdel Salam E, Abdel-Meguid IE hsan, Shatla R, Korraa S. Evaluation of neural damage in Duchenne muscular dystrophy patients. *Acta Myol*. 2014;33(3):13–8.
40. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard E, Taylor CM, Welsh DA, et al. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry*. 2015;77(7):607–15.
41. Kinali M, Manzur AY, Muntoni F. Recent developments in the management of Duchenne muscular dystrophy. *Paediatr Child Health (Oxford)*. 2008;18(1):22–6.
42. Kornberg A, Yiu E. Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India*. 2008;56(3):236.
43. Drachman DB, Toyka K V, Myer E. Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet (London, England)*. 14 de dezembro de 1974;2(7894):1409–

- 12.
44. Martinez L, Ermolova N V, Ishikawa T-O, Stout DB, Herschman HR, Spencer MJ. A reporter mouse for optical imaging of inflammation in mdx muscles. *Skelet Muscle*. 2015;5:15.
45. Hussein MR, Hamed SA, Mostafa MG, Abu-Dief EE, Kamel NF, Kandil MR. The effects of glucocorticoid therapy on the inflammatory and Dendritic cells in muscular dystrophies. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(6):451–61.
46. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Kumar Abbas Aster. In: *Robbins Patologia Básica*. 9^o ed Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2013. p. 29–74.
47. Lima RR, Costa AMR, De Souza RD, Gomes-Leal W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev Para Med*. 2007;21(2):29–34.
48. Cruvinel W de M, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Silva NP da, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. agosto de 2010;50(4):434–47.
49. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*. 1 de julho de 2006;111(1):16–26.
50. Consalvi S, Mozzetta C. Preclinical Studies in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy with the Histone Deacetylase Inhibitor Givinostat. *Mol Med*. 2013;19(1):1.
51. Oliveira CMB de, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and Pain. *Brazilian J Anesthesiol*. março de 2011;61(2):255–65.
52. Stites DP, Terr AI PT. *Imunologia Médica*. 9^o ed. Imunologia Médica. 2000.
53. Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol*. 2007;102(4):1677–86.
54. Mehuron T, Kumar A, Duarte L, Yamauchi J, Accorsi A, Girgenrath M. Dysregulation of matricellular proteins is an early signature of pathology in laminin-deficient muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2014;4(1):14.
55. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord*. outubro de 2006;16(9–10):591–602.
56. Cruz-Guzmán ODR, Rodríguez-Cruz M, Escobar Cedillo RE. Systemic inflammation in duchenne muscular dystrophy: Association with muscle function and nutritional status. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
57. Ogura Y, Tajrishi MM, Sato S, Hindi SM, Kumar A. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol*. 1 de abril de 2014;2.

58. Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, Arumugam T V. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol*. 2012;165(2):313–27.
59. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*. dezembro de 1999;222(3):236–45.
60. Ribeiro SMR, Queiroz JH De, Pelúzo MDCG, Costa NMB, Matta SLP Da, Queiroz MELR De. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J*. 2005;21(3):133–49.
61. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia respiratória mitocondrial: Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. *Arq Med*. 2008;22(2–3):49–56.
62. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186:1–85.
63. Rabêlo L a., Souza VN De, Fonseca LJS Da, Sampaio WO. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(5):684–93.
64. Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther*. 1990;47(1):61–71.
65. Ross D MP. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *Membr lipid Oxid*. 1991;54:151–70.
66. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, R??us GZ, Vuolo F, Petronilho F, et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int*. 2009;54(5–6):358–62.
67. Wang C, Wu HM, Jing XR, Meng Q, Liu B, Zhang H, et al. Oxidative parameters in the rat brain of chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonia-like responses. *J Membr Biol*. 2012;245(11):675–81.
68. Comim CM, Mathia GB, Hoepers A, Tuon L, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, et al. Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87(3):1809–18.
69. Tidball JG. Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration. In: *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
70. Pilgram GSK, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol Neurobiol*. 2010;41(1):1–21.
71. El-Gaby M, Shipton OA, Paulsen O. Synaptic Plasticity and Memory: New Insights from Hippocampal Left-Right Asymmetries. *Neurosci*. 2014;21(5):490–502.
72. Kim T, Choi H, Chung Y. Treadmill exercise alleviates impairment of cognitive

- function by enhancing hippocampal neuroplasticity in the high-fat diet-induced obese mice. *J Exerc Rehabil.* 30 de junho de 2016;12(3):156–62.
73. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Diet-induced cognitive deficits: The role of fat and sugar, potential mechanisms and nutritional interventions. *Nutrients.* 2015.
 74. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol.* 16 de abril de 2018;38(3):579–93.
 75. Kandratavicius L, Monteiro MR, Silva RA do V, Leite JP. Neurotrofinas na epilepsia do lobo temporal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2010;16(1):7–12.
 76. Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem.* abril de 2008;105(1):1–17.
 77. Comim CM, Tuon L, Stertz L, Vainzof M, Kapczinski F, Quevedo J. Striatum brain-derived neurotrophic factor levels are decreased in dystrophin-deficient mice. *Neurosci Lett.* 2009;459(2):66–8.
 78. Izquierdo I, Fin C, Schmitz PK, Da Silva RC, Jerusalinsky D, Quillfeldt J a, et al. Memory enhancement by intrahippocampal, intraamygdala, or intraentorhinal infusion of platelet-activating factor measured in an inhibitory avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):5047–51.
 79. Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T. Short- and Long-Term Memory Are Differentially Regulated by Monoaminergic Systems in the Rat Brain. *Neurobiol Learn Mem.* maio de 1998;69(3):219–24.
 80. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo L a, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998;393(6686):635–6.
 81. Izquierdo I. Memórias. *Estud Avançados.* 1989;3(6):89–112.
 82. Sá CSC, Medalha. CC. Aprendizagem e memória—contexto motor. *Neuron.* 2009;9(3):103–10.
 83. Wicksell RK, Kihlgren M, Melin L, Eeg-Olofsson O. Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 2004;46(3):154–9.
 84. Di Filippo T, Parisi L, Roccella M. Psychological aspects in children affected by duchenne de boulogne muscular dystrophy. *Ment Illn.* 2012;4(1):21–4.
 85. Muntoni F, Mateddu A, Serra G. Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord.* 1991;1(2):121–3.
 86. Vaillend C, Rendon A, Misslin R, Ungerer A. Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in

- spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behav Genet.* novembro de 1995;25(6):569–79.
87. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist AG, Blackford R, et al. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia.* 2009;50(2):304–17.
 88. The Charlie Foundation. Introducing the diet. 2016. p. <https://www.charlifoundation.org/explore-ketogeni>.
 89. Masino SA, Rho JM. Mechanisms of Ketogenic Diet Action. 4^o ed. Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels MA and RWO, organizador. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* 2012. 1-28 p.
 90. Paoli A, Moro T, Bosco G, Bianco A, Grimaldi KA, Camporesi E, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (??-3) supplementation on some cardiovascular risk factors with a ketogenic mediterranean diet. *Mar Drugs.* 2015;13(2):996–1009.
 91. Santos FL, Esteves SS, da Costa Pereira A, Yancy Jr WS, Nunes JPL. Systematic review and meta-analysis of clinical trials of the effects of low carbohydrate diets on cardiovascular risk factors. *Obes Rev.* novembro de 2012;13(11):1048–66.
 92. Paoli A, Bianco A, Damiani E, Bosco G. Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014(2).
 93. Bough KJ, Rho JM. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2007;48(1):43–58.
 94. Streijger F, Plunet WT, Lee JHT, Liu J, Lam CK, Park S, et al. Ketogenic diet improves forelimb motor function after spinal cord injury in rodents. *PLoS One.* 2013;8(11):1–19.
 95. Mahan LK, Escott-Stump S. Os nutrientes e seu metabolismo. In: Krause Alimentos Nutrição e Dietoterapia. 12^o ed Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2010. p. 39–143.
 96. Mahan LK, Escott-Stump S. Terapia Nutricional para Distúrbios Neurológicos. In: Krause Alimentos Nutrição e Dietoterapia. 12^o ed Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2010. p. 1067–101.
 97. Reming VM. Terapia Nutricional par Distúrbios Neurológicos. In: Krause Alimentos Nutrição e Dietoterapia. 12^o ed 2010.
 98. Inuzuka-Nakaharada LM. Dieta cetogênica e dieta de Atkins modificada no tratamento da epilepsia refratária em crianças e adultos. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2008;14(2):65–9.
 99. Ruskin DN, Masino SA. The nervous system and metabolic dysregulation: Emerging evidence converges on ketogenic diet therapy. *Front Neurosci.*

2012;6(MAR):1–12.

100. Kui Xu, Xiaoyan Sun, Bernadette O. Eroku, Constantinos P. Tsipis, Michelle A. Puchowicz and JCL. Diet-Induced Ketosis Improves Cognitive Performance in Aged Rats. *Adv Exp Med Biol.* 2010;662:7–25.
101. Barbosa LF, De Medeiros MHG, Augusto O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim Nova.* 2006;29(6):1352–60.
102. Seixas SL, Lagrota-Candido J, Savino W, Quirico-Santos T. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. Vol. 55, *Arquivos de neuro-psiquiatria.* 1997. p. 610–7.
103. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim.* 2009;58(2):141–9.
104. Lessa TB, Abreu DK, Bertassoli BM, Ambrósio CE. Arquitetura comparativa dos pulmões de camundongos normais e afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne. *Pesqui Veterinária Bras.* 2015;35:56–60.
105. Dutton SBB, Sawyer NT, Kalume F, Jumbo-Lucioni P, Borges K, Catterall WA, et al. Protective effect of the ketogenic diet in Scn1a mutant mice. *Epilepsia.* 2011;52(11):2050–6.
106. Newell C, Bomhof MR, Reimer RA, Hittel DS, Rho JM, Shearer J. Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2016;7(1):37.
107. Reeves P, Nielsen F, Fahey GJ. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939–51.
108. Klein A. A torre de peletização e seus equipamentos [Internet]. Fatec Indústria de Nutrição e Saúde Animal Ltda. 2016 [citado 29 de março de 2018]. Available at: http://www.fatec.com.br/info_tecnicos_interna.php?id=14
109. Tramonte VLC, Lemke S. Formulações de rações. In: Vannucchi H, organizador. *Nutrição Experimental.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 24–5.
110. Tolazzi J da R, Doile RG, Bezerra AS. *Nutrição Experimental: Conceitos* ., *Discip Sci.* 2015;16:147–62.
111. Cancelliero KM, Costa D, Silva CA da. Isolamento social modifica o perfil bioquímico de ratos. *Rev bras Zootecias.* 2005;247–57.
112. Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, De-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem.* 6(6):600–7.

113. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–31.
114. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464–78.
115. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:425–41.
116. Cassina A, Radi R. Differential Inhibitory Action of Nitric Oxide and Peroxynitrite on Mitochondrial Electron Transport. *Arch Biochem Biophys.* abril de 1996;328(2):309–16.
117. HUGHES BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta.* setembro de 1962;7:597–603.
118. Hartman AL, Gasior M, Vining EPG, Rogawski MA. The Neuropharmacology of the Ketogenic Diet. *Pediatr Neurol.* 2007;36(5):281–92.
119. Ziegler DR, Araújo E, Rotta LN, Perry ML, Gonçalves C-A. A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J Nutr.* 2002;132(3):483–7.
120. Vizuete AF, De Souza DF, Guerra MC, Batassini C, Dutra MF, Bernardi C, et al. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. *Life Sci.* 2013;92(17–19):923–8.
121. Dos Santos B, Estadella D, Hachul ACL, Okuda MH, Moreno MF, Oyama LM, et al. Effects of a diet enriched with polyunsaturated, saturated, or trans fatty acids on cytokine content in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle of adult mice. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
122. Ribeiro G, Santos O. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. *Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab.* 2013;8(2):82–8.
123. Faria HG de. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. In: I Simpósio de bioterismo da Fiocruz - PE. Recife: Fiocruz; 2010. p. 16.
124. White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(5):339–45.
125. Martigne L, Salleron J, Mayer M, Cuisset J-M, Carpentier A, Neve V, et al. Natural evolution of weight status in Duchenne muscular dystrophy: a retrospective audit. *Br J Nutr.* 2011;105(10):1486–91.
126. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the

- metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007;15(4):798–808.
127. Fonseca H, Gutierrez LE. *Composição Em Ácidos Graxos De Óleos E Gorduras Vegetais*. Vol. 31, Anais da E.S.A. 1974.
 128. Philippi ST. *Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para decisão nutricional*. 2^o ed. São Paulo: Coronário; 2002. 135 p.
 129. Zhao M, Huang X, Cheng X, Lin X, Zhao T, Wu L, et al. Ketogenic diet improves the spatial memory impairment caused by exposure to hypobaric hypoxia through increased acetylation of histones in rats. *PLoS One*. 2017;12(3):1–16.
 130. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*. março de 2007;145(1):256–64.
 131. Noh HS, Kim YS, Choi WS. SUPPLEMENT - KETOGENIC DIET AND TREATMENTS Neuroprotective effects of the ketogenic diet. 2008;49(2001):120–3.
 132. Cheng CM, Hicks K, Wang J, Eagles DA, Bondy CA. Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and -67 expression. *J Neurosci Res*. 15 de julho de 2004;77(2):270–6.
 133. Van der Auwera I, Wera S, Van Leuven F, Henderson ST. A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2(1):28.
 134. Iyer SS, Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23–63.
 135. Kostek MC, Nagaraju K, Pistilli E, Sali A, Lai S, Gordon B, et al. IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not affect muscle function in the mdx mouse. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13(1):1.
 136. Manning J, Kulbida R, Rai P, Jensen L, Bouma J, Singh SP, et al. Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. 2014;10:1370–86.
 137. Rufo A, Fattore A Del, Capulli M, Carvello F, Pasquale L De, Ferrari S, et al. Mechanisms Inducing Low Bone Density in Duchenne. 2011;26(8):1891–903.
 138. Messina S, Vita GL, Aguenouz M, Sframeli M, Romeo S, Rodolico C, et al. Activation of NF- κ B pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. 2011;(8):16–23.
 139. Assunção SNF de, Boa Sorte NCA, Alves C de AD, Mendes PSA, Alves CRB, Silva LR. Inflammatory Cytokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Obese Children and Adolescents. *Nutr Hosp*. 16 de janeiro de 2017;35:78–83.

140. Oliboni L, Casarin JN, Chielle EO. Correlação entre a concentração sérica de interleucina-6 (IL-6) e biomarcadores de resistência insulínica em adultos jovens obesos. *Clin Biomed Res*. 2016;36(3):148–55.
141. Ashrafi G, Wu Z, Farrell RJ, Ryan TA. GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses. *Neuron*. fevereiro de 2017;93(3):606–615.e3.
142. Silveira RC, Procianoy RS. Lesões isquêmicas cerebrais no recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(1):S23–32.
143. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Uller-newen GM. Principles of interleukin (IL) -6-type cytokine signalling and its regulation 1. 2003;20:1–20.
144. Terrill JR, Pinniger GJ, Graves JA, Grounds MD, Arthur PG. Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol*. 2016;594(11):3095–110.
145. Terrill JR, Pinniger GJ, Graves JA, Grounds MD, Arthur PG. Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol*. 2016;594(11):3095–110.
146. Lidov HGW, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature*. 27 de dezembro de 1990;348(6303):725–8.
147. Hoepers A. Efeito Do Exercício Físico Aeróbio Sobre a Degeneração De Tecido Muscular E Neuronal Em Um Modelo Animal De Distrofia. Universidade do Sul de Santa Catarina; 2015.
148. Orth M, Schapira AHV. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet*. 2001;106(1):27–36.
149. Yellen G. Ketone bodies, glycolysis, and KATP channels in the mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsia*. 2008;49(suppl 8):80–2.
150. Bough K. Energy metabolism as part of the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsia*. novembro de 2008;49:91–3.
151. Tarnopolsky MA, Parise G. Direct measurement of high-energy phosphate compounds in patients with neuromuscular disease. *Muscle Nerve*. setembro de 1999;22(9):1228–33.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo relativo à tese

EFFECTS OF KETOGENIC DIET ON CENTRAL NERVOUS AND SKELETAL MUSCLE SYSTEM IN *mdx* MICE

Lilian L. Fausto¹, Matheus Luchinni¹, Letícia Ventura¹, Viviane Freiburger,¹Gislaine T. Rezzin², Clarissa M. Comim¹

¹*Research Group of Experimental Neuropathology, Laboratory of Experimental Neuroscience, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil;*

²*Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil;*

***Corresponding author:**

Clarissa M. Comim, Ph.D. Research Group of Experimental Neuropathology. Laboratory of Experimental Neuroscience, University of South Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil; E-mail: clarissamc@gmail.com; phone: +55 48 3621 – 3363

APÊNDICE B – Produção científica publicada durante o período do doutorado

ANEXO**ANEXO A – Parecer de aprovação da Comissão de Ética em
Pesquisa no Uso de Animais**