

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LAÍS LEITE FERREIRA**

**ANÁLISE DA AÇÃO DO CANABIDIOL NO MODELO EXPERIMENTAL DE  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**LAÍS LEITE FERREIRA**

**ANÁLISE DA AÇÃO DO CANABIDIOL NO MODELO EXPERIMENTAL DE  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutor(a) em Ciências pela Universidade  
Federal de Alfenas UNIFAL-MG  
Orientador: Profº Drº Angel Maurício Castro Gamero  
Coorientador: Profº Drº Túlio de Almeida Hermes

**ALENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Leite Ferreira, Laís.

Análise da ação do canabidiol no modelo experimental de distrofia muscular de Duchenne / Laís Leite Ferreira. - Alfenas, MG, 2024.

67 f. : il. -

Orientador(a): Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Angel Maurício Castro Gamero.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Canabidiol. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3. Camundongo mdx. 4. Mionecrose. 5. Músculo esquelético. I. Maurício Castro Gamero, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Angel, orient. II. Título.

LAÍS LEITE FERREIRA

ANÁLISE DA AÇÃO DO CANABIDIOL NO MODELO EXPERIMENTAL DE  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Aprovada em: 03 de julho de 2024

Prof. Dr. Túlio de Almeida Hermes  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Marisa Ionta  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Alexandre Ferro Aissa  
Instituição: Universidade Federal de São Paulo  
UNIFESP

Prof. Dr. Luís Henrique Rapucci Moraes  
Instituição: Universidade Professor Edson Antônio Velano  
UNIFENAS



Documento assinado eletronicamente por **Tulio de Almeida Hermes, Professor do Magistério Superior**, em 03/07/2024, às 18:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1264277** e o código CRC **C3E5B2C9**.

Dedico este trabalho a todas as crianças com Distrofia Muscular de Duchenne, em especial ao Enrico, que luta diariamente para uma estabilidade desta doença. Dedico, ainda, a minha família e amigos que estiveram comigo durante a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, sempre me iluminando, guiando, dando forças em situações de fraqueza e colocando sempre pessoas especiais na minha caminhada. Durante esses 4 anos de jornada, Deus sempre cuidou de tudo e de todos os detalhes. Aprendi a confiar e agradecer pelos redirecionamentos, não estive sozinha nessa caminhada.

Aos meus familiares, que mesmo de forma direta ou indireta, me ajudaram a realizar este trabalho e sempre me deram todo o suporte e forças para enfrentar todos os meus medos. Em especial ao meu esposo Jhonatan e meu filho Theo, que sempre acreditaram no meu potencial profissional e vivem e compartilham todos os meus sonhos.

Aos meus orientadores, Prof.º Maurício e Prof.º Túlio, pelo suporte, incentivos, dedicação e carinho, o que possibilitou a realização deste trabalho. Sou imensamente grata pela acolhida no momento que mais precisei, pelos ensinamentos diários e por me mostrarem o que é ciência. Por fim, vocês conseguiram restabelecer aquele brilho nos olhos, que perdi em algum momento dessa jornada. Sou Grata por tudo.

Não menos importante, aos alunos de graduação, pós-graduação e aos técnicos de laboratórios, que me ajudaram a desenvolver este trabalho com muito carinho.

A todos os mestres que tive o privilégio de encontrar em minha empreitada, que contribuíram para meu crescimento profissional.

Agradeço ao Programa de Biociências Aplicadas à Saúde (PPGB), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo projeto 402493/2021-4 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (bolsa de doutorado, FAPEMIG).

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

## RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio genético grave, ligada ao cromossomo X, que causa degeneração progressiva da musculatura esquelética. O canabidiol (CBD) exerce diversos efeitos benéficos, incluindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Diante do potencial ação benéfica do CBD, neste estudo verificamos o efeito *in vitro* do óleo de CBD *full spectrum* na viabilidade da fibra muscular distrófica e do efeito *in vivo* na hepatotoxicidade, mionecrose, inflamação e estresse oxidativo do modelo de DMD. Para análise *in vitro*, utilizou-se células distróficas de camundongos *mdx*, tratadas com CBD *full spectrum* e foi avaliada a viabilidade celular por MTT. Na análise *in vivo* utilizou-se duas linhagens de camundongos sendo uma C57BL/10 (BL10) e a outra linhagem de camundongo *mdx*, esta última dividida em três grupos, sendo o primeiro grupo tratado com salina (*mdxSAL*; n=7), o segundo grupo tratado com óleo de semente de uva (*mdxOU*; n=7) e o terceiro grupo tratado com óleo de CBD *full spectrum* (*mdxCBD*; n=7) 10mg/Kg durante 14 dias. Após o tratamento, foi analisado o biomarcador Creatina quinase (CK) pelo sangue, a histomorfometria dos hepatócitos e os níveis de glicogênio hepático, além da histopatologia dos músculos diafragma (DIA) e quadríceps (QUA), analisando fibras mionecróticas, processos inflamatórios e o estresse oxidativo. No estudo *in vitro*, óleo de CBD *full spectrum* produziu efeito citotóxico de maneira dose-dependente nas células musculares de camundongos distróficos. No estudo *in vivo*, o tratamento com óleo de CBD *full spectrum* aumentou o glicogênio hepático produzindo melhorias do fenótipo distrófico do camundongo *mdx*. Na análise dos músculos DIA e QUA, o tratamento com óleo de CBD *full spectrum*, preveniu o processo da mionecrose, reduzindo os níveis séricos de CK, a presença de núcleos centrais e marcação positiva ao IgG no tecido muscular distrófico. Preveniu a inflamação, reduzindo a área inflamatória, a presença de macrófagos e os níveis de NF-κB. Além disso, preveniu o estresse oxidativo, aumentando a ação antioxidante das moléculas CAT e GSH e evitou a instalação e exacerbação precoce do estresse oxidativo ainda em estágios iniciais da doença, com a diminuição da lipofuscina no músculo distrófico dos camundongos *mdx*. O tratamento com de óleo de CBD *full spectrum* demonstrou ser seguro e eficaz na redução dos parâmetros diretos e indiretos de avaliação da miopatia da DMD em estágio iniciais da doença. Os resultados indicam que o óleo de CBD *full spectrum* pode representar uma nova abordagem promissora para tratamento da DMD.

Palavras-Chave: Canabidiol; Distrofia muscular de Duchenne; Camundongo *mdx*; Mionecrose; Músculo esquelético.

## ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a serious genetic disorder, linked to the X chromosome, that causes progressive degeneration of skeletal muscles. Cannabidiol (CBD) exerts several beneficial effects, including anti-inflammatory and antioxidant properties. Given the potential beneficial action of CBD, in this study we verified the *in vitro* effect of full spectrum CBD oil on the viability of dystrophic muscle fiber and the *in vivo* effect on hepatotoxicity, myonecrosis, inflammation and oxidative stress in the DMD model. For *in vitro* analysis, dystrophic cells from *mdx* mice were used, treated with full spectrum CBD and cell viability was assessed by MTT. In the *in vivo* analysis, two mouse strains were used, one being C57BL/10 (BL10) and the other *mdx* mouse strain, the latter divided into three groups, the first group being treated with saline (*mdx*SAL; n=7), the second group treated with grape seed oil (*mdx*OU; n=7) and the third group treated with full spectrum CBD oil (*mdx*CBD; n=7) 10mg/Kg for 14 days. After treatment, the biomarker Creatine kinase (CK) was analyzed in the blood, histomorphometry of hepatocytes and hepatic glycogen levels, in addition to the histopathology of the diaphragm (DIA) and quadriceps (QUA) muscles, analyzing myonecrotic fibers, inflammatory processes and the oxidative stress. In the *in vitro* study, full spectrum CBD oil produced a cytotoxic effect in a dose-dependent manner in the muscle cells of dystrophic mice. In the *in vivo* study, treatment with full spectrum CBD oil increased liver glycogen, producing improvements in the dystrophic phenotype of *mdx* mice. In the analysis of DIA and QUA muscles, treatment with full spectrum CBD oil prevented the myonecrosis process, reducing serum CK levels, the presence of central nuclei and positive IgG staining in dystrophic muscle tissue. It prevented inflammation, reducing the inflammatory area, the presence of macrophages and NF- $\kappa$ B levels. Furthermore, it prevented oxidative stress, increasing the antioxidant action of CAT and GSH molecules and prevented the onset and early exacerbation of oxidative stress even in the early stages of the disease, with a decrease in lipofuscin in the dystrophic muscle of *mdx* mice. Treatment with full spectrum CBD oil has been shown to be safe and effective in reducing the direct and indirect assessment parameters of DMD myopathy in the early stages of the disease. The results indicate that full spectrum CBD oil may represent a promising new approach to treating DMD.

Keywords: Cannabidiol; Duchenne muscular dystrophy; *mdx* mouse; Myonecrosis; Skeletal muscle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Manifestações clínicas na DMD.....	16
Figura 2 -	Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG) .....	19
Figura 3 -	Proliferação, diferenciação e viabilidade celular de fibras musculares distróficas tratadas com CBD <i>Full Spectrum</i> e OU.....	40
Figura 4 -	Análise dos hepatócitos e níveis de glicogênio em camundongos <i>mdx</i> .	41
Figura 5 -	Análise de núcleos centrais dos músculos distróficos DIA e QUA.....	42
Figura 6 -	Análise das miofibras necróticas por IgG positivo nos músculos DIA e QUA e níveis séricos de CK.....	43
Figura 7 -	Análise do processo inflamatório dos músculos distróficos DIA e QUA.....	44
Figura 8 -	Análise dos níveis relativos de NF-KB dos músculos distróficos DIA e QUA.....	45
Figura 9 -	Análise dos níveis de Catalase e GSH dos músculos distróficos DIA e QUA.....	46
Figura 10 -	Análise dos grânulos lipofuscina nos músculos distróficos DIA e QUA.....	47
Figura 11 -	Análise dos níveis relativos de 4-HNE dos músculos distróficos DIA e QUA.....	48

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{m}$	Micrômetros
$\mu\text{M}$	Micromolar
2-AG	2-araquidonoilglicerol
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
AEA	Anandamida
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosine triphosphate
$\text{Ca}^{+2}$	Cálcio
CAT	Catalase
CB1	Receptor canabinoide tipo 1
CB2	Receptor canabinoide tipo 2
CBD	Canabidiol
CD4+	Linfócitos T auxiliares
CD8+	Linfócitos T citotóxica
CDG	Complexo distrofina-glicoproteínas
CK	Creatina quinase
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
Ctrl	Grupo controle
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DIA	Diafragma
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMEM	Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAAH	Amida hidrolase de ácidos graxos
$\text{Fe}^{+2}$	Ferro
$\text{Fe}^{+3}$	Ferro férrico
GPR55	Receptor 55 acoplado à proteína g

GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
HE	Hematoxilina e Eosina
HMGB1	Proteína 1 de caixa de grupo de alta mobilidade
HSPs	Proteínas de choque térmico
<u>IFN</u> γ	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
JNK	Quinase c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal
kDa	Kilodalton
LDH	Lactato desidrogenase
LOOH	Peróxido lipídico
MAGL	Monoacilglicerol lipase
<i>mdx</i>	Camundongo <i>mdx</i>
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide]
NADPH	Nicotinamida adenina-dinucleótido fosfato na sua forma reduzida
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical de Hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OU	Óleo de semente de uva
P2RX7	Purinoceptores
PAS	Ácido periódico-schiff
PMCA	Atpase de Ca <sup>+2</sup> da membrana plasmática
PPAR-γ	Proliferadores de peroxissoma gama
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
QUA	Quadríceps

RNA	Ácido ribonucleico
RNA	Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido dismutase
THC	$\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol
TLR	Receptores Toll-Like
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1
$\delta$	Receptores opióides delta
$\mu$	Receptores opióides mu

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DMD.....	16
2.2	ALTERAÇÕES GÊNICAS E FISIOPATOLOGIA DA DMD.....	17
<b>2.2.1</b>	<b>Instabilidade da membrana.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Mionecrose.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Inflamação crônica.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Estresse Oxidativo.....</b>	<b>22</b>
2.3	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS.....	24
<b>2.3.1</b>	<b>Canabidiol.....</b>	<b>25</b>
2.4	MODELO EXPERIMENTAL DA DMD.....	27
2.5	JUSTIFICATIVA.....	28
2.6	OBJETIVOS.....	28
<b>2.6.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
3.1	ANIMAIS.....	30
3.2	ESTUDO <i>IN VITRO</i> .....	30
<b>3.2.1</b>	<b>Análise da viabilidade celular.....</b>	<b>31</b>
3.3	ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	31
<b>3.3.1</b>	<b>Análise da creatina quinase sérica (CK).....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Análise histopatológica do fígado.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Análise histopatológica dos músculos QUA e DIA.....</b>	<b>33</b>
3.3.3.1	Análise de núcleo central e área de inflamação dos músculos por HE.....	33
3.3.3.2	Análise da degeneração celular por Imunofluorescência.....	33
3.3.3.3	Análise de macrófagos com por Imunofluorescência.....	33
3.3.3.4	Análise da Lipofuscina.....	34
3.3.3.5	Análise dos níveis de NF-KB, CAT e 4-HNE por Western Blotting.....	34
3.3.3.6	Dosagem de grupamentos sulfidríla – GSH.....	35
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	ANÁLISE DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO ÓLEO DE CBD <i>FULL SPECTRUM</i> NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE FIBRAS MUSCULARES DISTRÓFICAS.....	37
4.2	EFEITO DO ÓLEO DE CBD <i>FULL SPECTRUM</i> NO TECIDO HEPÁTICO DOS CAMUNDONGO <i>MDX</i> .....	37
4.3	EFEITO DO ÓLEO DE CBD <i>FULL SPECTRUM</i> NA MIONECROSE DO MÚSCULO DISTRÓFICO DOS CAMUNDONGOS <i>MDX</i> .....	38
4.4	EFEITO DO ÓLEO CBD <i>FULL SPECTRUM</i> NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DO MÚSCULO DISTRÓFICO DOS CAMUNDONGOS <i>MDX</i> .....	38
4.5	EFEITO DO ÓLEO CBD <i>FULL SPECTRUM</i> NO ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO DISTRÓFICO DOS CAMUNDONGOS <i>MDX</i> .....	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio genético grave, ligada ao cromossomo X, que causa degeneração progressiva da musculatura esquelética e afeta principalmente recém-nascidos do sexo masculino, com prevalência de 1 a cada 3.500-6000 meninos nascidos em todo o mundo (Duan *et al.*, 2021). O processo de diagnóstico geralmente começa na primeira infância, após a observação de sinais e sintomas sugestivos, como fraqueza, sinal de Gowers, dificuldade para subir escadas ou andar (Mercuri; Bönnemann; Muntoni, 2019). A progressão da doença pode ser rápida, tornando o indivíduo dependente de cadeiras de rodas e necessitando de ventilação assistida, devido à insuficiência respiratória ou cardíaca e óbito entre 20 e 40 anos de idade (Duan, 2021; Moxley *et al.*, 2010).

Na DMD ocorre mutação do gene que codifica a distrofina, que é uma proteína-chave que fornece estabilidade estrutural e integridade às membranas das fibras musculares. A falta dessa proteína produz maior suscetibilidade a lesões durante a contração, resultando em ciclos intermináveis de necrose e regeneração das miofibras, levando à fibrose, adipogênese e fraqueza muscular (Gao; McNally, 2015; Tulangekar *et al.*, 2021). Assim, tais danos podem favorecer o influxo descontrolado de cálcio intracelular, inflamação crônica, estresse oxidativo e a degeneração progressiva das miofibras (Klingler *et al.*, 2012).

Abordagens terapêuticas utilizadas estão voltadas para melhora da qualidade de vida com uma equipe multiprofissional, como fisioterapeutas, terapeutas ocupacional, fonoaudiólogos e entre outros. Além disso, o principal tratamento medicamentoso que retarda a progressão da doença é o uso de glicocorticoides (Guglieri *et al.*, 2022). No entanto, o uso prolongado desses medicamentos pode levar a diversos efeitos colaterais como o ganho de peso, retardo de crescimento, osteoporose, distúrbios de humor, insuficiência adrenal e outras preocupações de segurança que levam à baixa adesão às diretrizes práticas (Bello *et al.*, 2015; Bushby *et al.*, 2010; Macedo *et al.* 2020).

A investigação da fisiopatologia da DMD normalmente é utilizada o modelo experimental da linhagem de camundongos C57BL/10-DMD*mdx*, na qual possui mutação espontânea no gene da distrofina e é comparável à forma humana na DMD, sendo amplamente aceito pela literatura, principalmente para novas estratégias terapêuticas (Guiraud *et al.*, 2017).

O canabidiol (CBD) surge com um dos principais fitocanabinóides farmacologicamente ativos da *Cannabis sativa* que exerce diversos efeitos benéficos, incluindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Atalay; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2019). Um dos produtos mais comuns são os óleos de CBD, que estão disponíveis como produtos isolados de

CBD, de amplo espectro [incluindo todos os terpenos e canabinóides menores, exceto  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC)] ou de espectro total ou *full spectrum* (todos os terpenos e canabinóides menores com THC <0,3% do peso seco) (Odieka *et al.*, 2022). Segundo Berthold *et al.* (2023), a presença de 0,3% de THC aumenta a biodisponibilidade oral do CBD em ratos machos e fêmeas, indicando que produtos de *full spectrum* produzem maior eficácia do CBD devido a uma maior exposição disponível sistemicamente. Além disso, o CBD *full spectrum* vem demonstrando ser seguro em sua aplicação clínica (Patikorn *et al.*, 2023; Thurgur *et al.*, 2023). Iannotti e seus colaboradores (2019), realizaram o tratamento com CBD isolado em camundongos *mdx* e houve melhoras na atividade locomotora, reduziu a inflamação e restaurou a autofagia do músculo gastrocnêmio. Diante dessa potencial ação benéfica do CBD, neste estudo verificamos o efeito *in vitro* do óleo de CBD *full spectrum* na viabilidade da fibra muscular distrófica e o efeito *in vivo* na hepatotoxicidade e mionecrose do modelo de DMD.

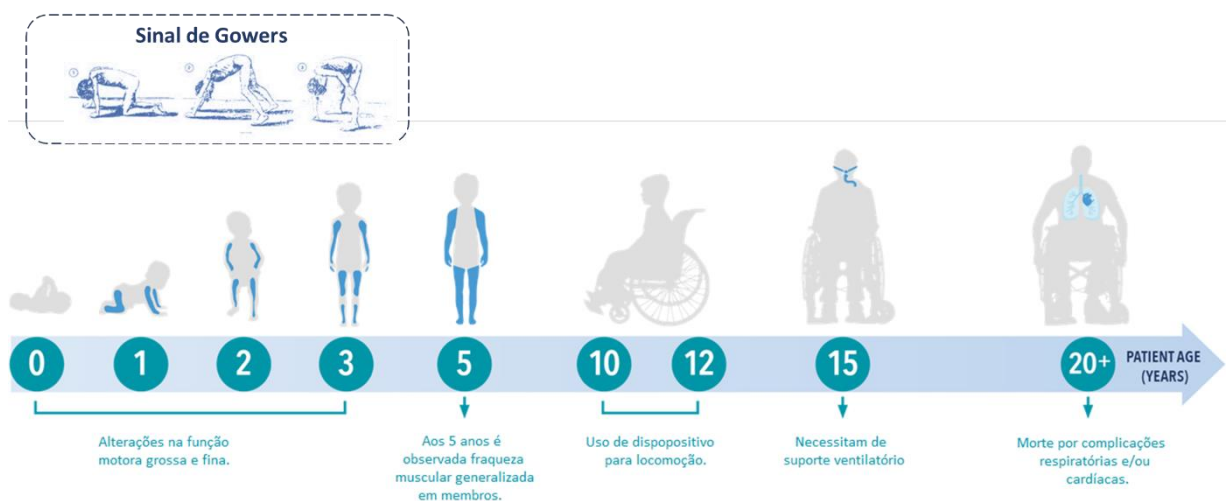
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA DMD

Os seus primeiros sintomas clínicos aparecem entre 3 e 4 anos com dificuldades para correr, saltar, levantar-se do chão (sinal de Gowers), dificuldade para pular ou subir escadas, quedas ou tropeções frequentes, marcha anormal (bamboleante ou andar com os dedos dos pés) e juntamente com hipertrofia da panturrilha (pseudo hipertrofia muscular, Figura 1). A progressão da doença pode ser rápida, tornando dependente de cadeiras de rodas entre 7-13 anos (Mercuri; Bönnemann; Muntoni, 2019). O estágio terminal da doença começa quando os pacientes necessitam de ventilação assistida e geralmente morrem na segunda ou terceira década por insuficiência respiratória ou cardíaca (Moxley *et al.*, 2010).

O encaminhamento imediato a um especialista neuromuscular, com a colaboração de um geneticista ou conselheiro genético, pode evitar atrasos no diagnóstico (Mirski; Crawford, 2014). O diagnóstico pode ser baseado no atraso do desenvolvimento e aumento das concentrações de enzimas séricas, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) ou creatina quinase (CK) (Ciafaloni *et al.*, 2009). Ocasionalmente, um aumento na concentração de ALT, AST e LDH, leva a um foco inadequado na disfunção hepática, atrasando o diagnóstico de DMD (Birnkrant *et al.*, 2018).

Figura 1- Manifestações clínicas na DMD



Fonte: adaptado de Van Dommelen *et al.*, (2020).

Apesar dos grandes avanços terapêuticos nos últimos 30 anos, não há cura para a DMD (Duan *et al.*, 2021). Embora a DMD afete principalmente os músculos cardíacos e esqueléticos, há também uma infinidade de manifestações e consequências secundárias, que requerem uma abordagem coordenada, multidisciplinar e centrada no paciente ao longo das diferentes fases da doença (Eagle *et al.*, 2007). Além de uma equipe principal de médicos com experiência em pacientes com DMD, enfermeiros, fisioterapeutas, fonoaudiólogos e nutricionistas são parceiros essenciais na prevenção e tratamento dos sintomas de pacientes com DMD. Além disso, psicólogos, terapeutas ocupacionais e assistentes sociais devem prestar assistência para abordar questões psicossociais, melhorar a participação e apoiar a realização dos objetivos de vida (Saito *et al.*, 2017).

## 2.2 ALTERAÇÕES GÊNICAS E FISIOPATOLOGIA DA DMD

A anormalidade genética da DMD é detectada no braço curto do cromossomo X (locus Xp21), responsável pela expressão de uma proteína composta por 3685 aminoácidos que integra o sarcolema da fibra muscular denominada distrofina (Dp427m, Monaco *et al.*, 1985; Yiu; Kornberg, 2015). O gene responsável pela produção da isoforma da proteína distrofina é o maior do genoma humano contendo 79 exons (Deconinck; Dan, 2007). Existem diferentes mutações que podem ocorrer no gene, sendo que em torno de 60 a 70% das mutações são deleções, de 5 a 15% são duplicações e 20% são mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções (Bladen *et al.*, 2015). Os éxons deletados tendem a ser agrupados na região do éxon 43 ao 55. Mutações nesses locais de foco ocorrem em aproximadamente 60-65% dos pacientes. Éxon 51 (taxa de mutação de 14%), éxon 53 (10,1%), éxon 45 (9%), éxon 43 (7,5%) e éxon 44 (7,1%) são os cinco principais éxons afetados (Bladen *et al.*, 2015).

O código de sequência para a expressão de distrofina é comandada pela atuação de diversos promotores presentes em alguns tipos celulares, como as células musculares, as células gliais, as células de Purkinje e as células de Schwann. O promotor muscular para a distrofina é bastante ativo nos músculos esqueléticos e cardíacos (Naidoo; Anthony, 2020). A expressão da distrofina muscular é regulada de acordo com as etapas do desenvolvimento. Nos músculos fetais, a distrofina é detectada no sarcolema depois da nona semana de gestação, aumentando progressivamente sua expressão nas junções neuromusculares e miotendinosas, na superfície das membranas dos túbulos T e junto à diversas junções celulares (Clerk; Strong; Sewry, 1992).

Quanto à organização molecular, a distrofina (427 kDa) é um dímero antiparalelo encontrada na face citoplasmática do sarcolema e associada à outras proteínas estruturais do

sarcolema (Ervasti, 2007). A distrofina possui quatro domínios sendo o primeiro relacionado com a  $\alpha$ -actina, o segundo ligado à espectrina, o terceiro à ancarina e o último a um complexo de proteínas unidas à laminina (Le *et al.*, 2018). A distrofina é uma proteína que faz parte do complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG, Figura 2) e interage com o sarcolema, citoesqueleto (microfilamentos de actina, filamentos intermediários, microtúbulos e outras proteínas estruturais relacionadas), além disso ela interage com proteínas de canal e proteínas de sinalização ou andaimes direta ou indiretamente (Gao; McNally, 2015).

O CDG é responsável pela estabilização do citoesqueleto das fibras musculares com a matriz extracelular e seus componentes podem ser divididos em três grupos: o extracelular ( $\alpha$ -Distroglicano), a transmembrana ( $\beta$ -Distroglicano, Sarcoglicano e Sarcospan) e o citoplasmático (Distrofina, Distrobrevina, Sintrofina e Óxido nítrico sintase neuronal) (Lapidos; Kakkar; McNally, 2004). No músculo saudável, a integridade do sarcolema é mantida através das ligações entre o citoesqueleto, o sarcolema e a matriz extracelular através do CDG e do complexo de integrina. Na DMD, a desmontagem do CDG enfraquece o sarcolema, que se torna altamente suscetível a danos por contração (Duan *et al.*, 2021).

A deficiência da distrofina resulta na perda da interação entre a actina e a matriz extracelular, que possuem funções mecânicas importantes e podem levar a amplas consequências nas funções das células musculares (Mokri; Engel, 1975; Deconinck; Dan, 2007), como à necrose intrínseca das miofibras (ou mionecrose), que por sua vez estimula a regeneração da fibra (Artsma-Rus; Putten, 2014). A ruptura do sarcolema também pode ser detectada pelo vazamento passivo de proteínas ou corantes circulantes, como albumina, imunoglobulina G (IgG), azul de Evans e vazamento de enzimas musculares, como CK do músculo para o sangue (Artsma-Rus; Putten, 2014; Tidball; Welc; Wehling-Henricks, 2018).

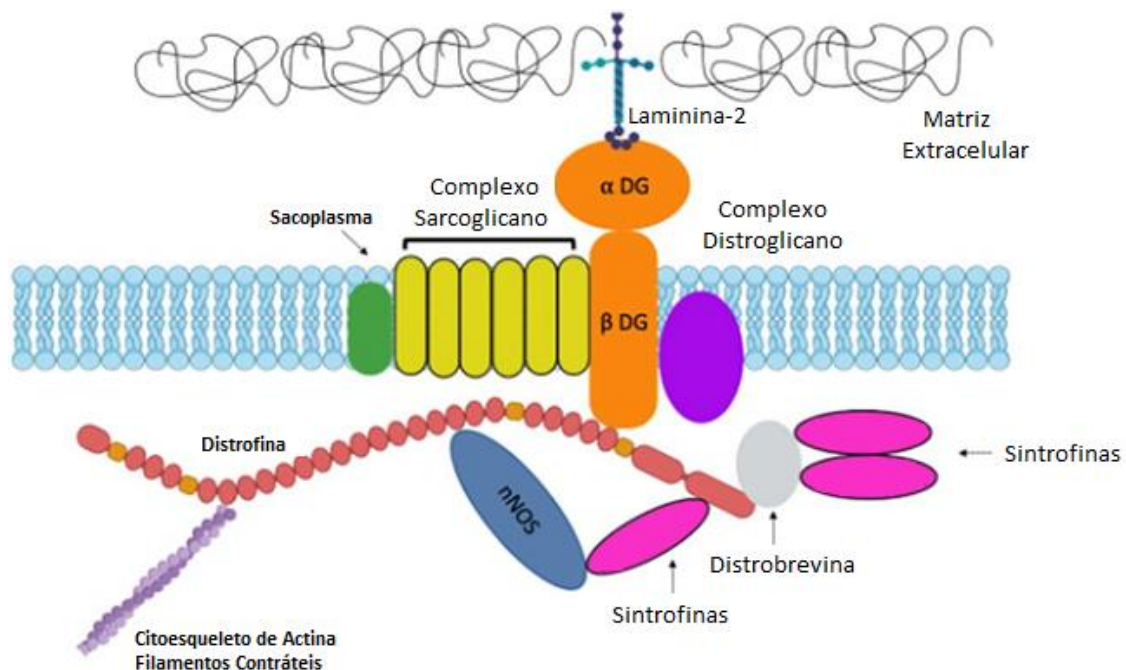
A progressão e o agravamento da DMD estão relacionados à fragilidade do sarcolema, assim como a eventos fisiopatológicos como o influxo anormal de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), a mionecrose, a inflamação crônica, estresse oxidativo e o comprometimento da regeneração (Espinosa; Henríquez-Olguín; Jaimovich, 2016).

### **2.2.1 Instabilidade da membrana**

A inexistência da ligação entre os meios intra e extracelular, decorrente da ausência da distrofina e das demais proteínas do CDG, torna o sarcolema mecanicamente instável (Mokri; Engel, 1998). A instabilidade mecânica faz com que os músculos se tornem susceptíveis à lesão durante os ciclos de contração e relaxamento. Em virtude desta fragilidade, ocorrem áreas de

descontinuidade do sarcolema permitindo a passagem de substâncias do meio extracelular para o meio intracelular, como o íon  $\text{Ca}^{+2}$ , e de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, como a enzima CK (Artsma-Rus; Putten, 2014). Com o aumento da permeabilidade do sarcolema ocorre um aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e a alteração da sua homeostase dentro do músculo (Culligan; Ohlendieck, 2002). Esta sobrecarga é também parcialmente causada pela entrada anormal de  $\text{Ca}^{+2}$  no sarcolema através dos canais de cálcio (canais ativados por estiramento, operados por armazenamento, controlados por voltagem e operados por receptores), bomba ATPase de  $\text{Ca}^{+2}$  da membrana plasmática (PMCA), trocador de sódio-cálcio e microrupturas no sarcolema (Culligan; Ohlendieck, 2002; Mercuri; Bönnemann; Muntoni, 2019).

Figura 2- Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG)



Fonte: Adaptado Kapan; Morgan (2022).

Legenda: Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG). Extracelular:  $\alpha$ -Distroglicano ( $\alpha$  DG); transmembrana:  $\beta$ -Distroglicano ( $\beta$  DG), Sarcoglicano e Sarcospan; citoplasmático: Distrofina, Distrobrevina, Sintrofina e Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

A progressão e o agravamento da DMD estão relacionados à fragilidade do sarcolema, assim como a eventos fisiopatológicos como o influxo anormal de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), a mionecrose, a inflamação crônica, estresse oxidativo e o comprometimento da regeneração (Espinosa; Henríquez-Olguín; Jaimovich, 2016).

O comportamento anormal do  $\text{Ca}^{+2}$  é observado na DMD em cultura de células distróficas de humanos e em modelo animal, na qual observa-se o excesso de  $\text{Ca}^{+2}$  nos miotúbulos, nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático, sendo os dois últimos os locais com maiores concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$  no sarcoplasma (Whitehead; Yeung; Allen, 2006). A concentração elevada de  $\text{Ca}^{+2}$  no músculo distrófico, ocorre disfunção mitocondrial, o que resulta em defeitos metabólicos e contribui diretamente para a morte muscular, desencadeando vias degradativas, como calpaína protease, fosfolipase A2 dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$  e necrose dependente de mitocôndria (Mareedu *et al.*, 2021; Culligan; Ohlendieck, 2002). O que pode promover a perda de massa muscular através do aumento da proteólise (Tidball; Spencer, 2000).

### 2.2.3 Mionecrose

Após a lesão de fibra muscular íntegra, pode ocorrer a degeneração localmente nas proximidades do dano, sendo denominado como necrose segmentar (Ciciliot; Schiaffino, 2010; Carpenter; Karpati, 1989). A necrose segmentar normalmente é resolvida através da ação de células satélites (células-tronco), residentes nos músculos que se fundem para regenerar a porção danificada da miofibra (Ciciliot; Schiaffino, 2010). As fibras musculares distróficas eventualmente perdem grande parte de sua capacidade regenerativa, possivelmente devido ao esgotamento do número de células satélites (Sacco *et al.*, 2010). Com os sucessivos ciclos de degeneração/regeneração na DMD, ocorrem geralmente as alterações na estrutura muscular com variação no tamanho das miofibras devido à fusão incompleta de miotubos em regeneração, levando à bifurcação das fibras, esgotamento progressivo da capacidade regenerativa de células satélites e substituição de tecido muscular por tecido fibroso e tecido adiposo, levando à fraqueza muscular (Ciciliot; Schiaffino, 2010).

Nos músculos saudáveis, as fibras têm tamanho aproximadamente semelhante, núcleos localizados periféricamente e quase nenhum tecido conjuntivo no perimísio e no endomísio, já os músculos de pacientes com DMD e modelos animais da doença, apresentam diâmetros altamente variáveis de suas miofibras com presença de nucleação central nas células musculares (Dubowitz; Sewry; Oldfors, 2013). Dependendo da idade e do grau de atividade física do indivíduo, algumas características são evidentes nos músculos como o aglomerados de fibras necróticas com células inflamatórias basofílicas em seu interior, sarcoplasma fragmentado, fibras hipercontraídas densamente coradas, infiltração celular leve ou grave, grupos de pequenas fibras musculares arredondadas em estágio inicial de regeneração ou normalmente espalhadas por fibras saudáveis de tamanho médio e hipertróficas (Morgan *et al.*, 2018).

As características primárias da mionecrose são identificados em tecido muscular e amostras de biofluidos como sangue e urina (Grounds *et al.*, 2020). No músculo, um dos métodos utilizados para caracterização da morte necrótica é a captação de IgG, devido a perda da integridade da membrana plasmática, que influenciam também a liberação de padrões moleculares associados a danos e a captação de proteínas plasmáticas (Bencze *et al.*, 2019). Biomarcador clássico no sangue (plasma), amplamente utilizado para DMD é a enzima CK, que está elevada em pacientes e em modelos experimentais na DMD (roedores e cães), no entanto pode ser altamente variável (Dowling *et al.*, 2019).

#### 2.2.4 Inflamação crônica

A inflamação, em condições normais, é necessária para a recuperação do tecido após a lesão. No entanto, na DMD, onde há lesão crônica devido à membrana muscular instável, a inflamação torna-se crônica e superativada em todo o músculo (Chen *et al.*, 2005).

A instabilidade da membrana causada pela deficiência de distrofina leva à liberação contínua de conteúdo citoplasmático, em particular, padrões moleculares associados a danos, Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) que são ligantes de receptores *toll-like* (TLRs), purinoceptores (P2RX7) e outros receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em células musculares e imunológicas (Henriques-Pons *et al.*, 2014). Após a ativação dos ligantes, as cascatas de sinalização do PRR iniciam a resposta imune e isto leva à infiltração de uma ampla gama de células imunes, incluindo linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, que posteriormente medeiam a degradação sequencial e a regeneração fibrótica do músculo (Evans *et al.*, 2009).

A liberação contínua de DAMPs, incluindo proteína 1 de caixa de grupo de alta mobilidade (HMGB1), adenosina trifosfato (ATP), ácido ribonucléico (RNA) de fita simples ssRNA, ácido hialurônico e proteínas de choque térmico (HSPs), em resposta aos ciclos contínuos de dano e regeneração em músculos distróficos, prolonga a ativação e recrutamento de células imunológicas, induzindo um estado inflamatório crônico e isso leva à formação de tecido adiposo e conjuntivo, limitando permanentemente a contração muscular (Kharraz *et al.*, 2014).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na progressão da doença na DMD (Rosenberg *et al.*, 2015). Existem dois tipos de classes de macrófagos no músculo, M1 (pró-inflamatória) e M2 (anti-inflamatória). Os macrófagos M1 são estimulados por citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) e

contribuem para a lise muscular aumentando a produção de óxido nítrico (Evans *et al.*, 2009). Macrófagos M2, que são estimulados por citocinas produzidas por células Th2, como interleucina (IL) IL-4 e IL-10, promovem o reparo tecidual inibindo a inflamação e a citotoxicidade do M1 e induzindo a proliferação de células satélites (Evans *et al.*, 2009). Há um número maior de macrófagos M1 na DMD inicial, provavelmente contribuindo para o dano muscular e para o ambiente pró-inflamatório, enquanto os macrófagos M2 são abundantes na fase de regeneração da DMD (Duan *et al.*, 2021).

Na DMD, diversas vias de sinalização estão desreguladas, promovendo a inflamação. Os principais impulsionadores da inflamação crônica na DMD incluem a via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), a quinase c-Jun NH2-terminal (JNK) e os fatores reguladores do interferon (IRFs) (Tulangekar; Sztal, 2021). Estes são ativados por citocinas como o TNF- $\alpha$  e a IL-6, que subsequentemente iniciam a via dependente da resposta primária de diferenciação mieloide a jusante 88 (MyD88). Isso, por sua vez, ativa as quinases I $\kappa$ B (IKKs) e as quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e, em última análise, regula positivamente as vias de sinalização do NF- $\kappa$ B (Herbelet *et al.*, 2020). O NF- $\kappa$ B é uma família de fatores de transcrição nuclear que atuam na inflamação, na imunidade, proliferação celular e diferenciação do tecido (Oeckinghaus; Ghosh, 2009). O aumento da atividade do NF- $\kappa$ B, através do estresse mecânico, é um fator chave para a degeneração muscular e supressão da regeneração muscular na DMD, que ocorrem no início do processo da doença e precedem a perda da função muscular, além disso, podem apresentar inflamação desproporcional e influenciar no bloqueio da diferenciação dos mioblastos em miotúbulos (Forbes, 2014; Hu; Blemker, 2015).

### 2.2.5 Estresse Oxidativo

Outra condição importante que influencia na evolução da DMD é o estresse oxidativo, gerado pela grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Terrill *et al.*, 2013). Normalmente, quando a produção de EROs é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio, no entanto, em condições de exaustão, é criado um estado de estresse oxidativo, levando a danos no sistema biológico (Kim *et al.*, 2013).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) representam um grupo de radicais de oxigênio instáveis e moléculas com fortes propriedades oxidantes. Uma vez formadas, as EROs podem ser convertidas em outras espécies oxidativas, sendo os mais comuns o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (Sareila *et al.*, 2011; Zorov *et al.*,

2014). A forma reduzida do oxigênio molecular o  $O_2^{\cdot-}$  é a primeira classe das EROs, formada a partir da transferência incompleta de elétrons do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (Trachootham *et al.*, 2008). Esta molécula não consegue atravessar facilmente as membranas celulares, ficando normalmente confinada na matriz mitocondrial, o que pode sofrer dismutação espontaneamente ou por ação da enzimática Superóxido dismutase (SOD), levando à formação do  $H_2O_2$  que ao contrário do  $O_2^{\cdot-}$ , possui a capacidade de atravessar facilmente as membranas biológicas (Ward; Prosser; Lederer, 2014). Uma vez o  $H_2O_2$  formado, é também potencialmente perigoso, pois a partir da oxidação de metais de transição que se encontram livremente disponíveis na célula, como o ferro ( $Fe^{+2}$ ), pode produzir os  $OH^{\cdot}$  (Reação de Fenton) (Barreiros; David, 2006). O  $O_2^{\cdot-}$  pode reduzir ferro férrico ( $Fe^{+3}$ ) para  $Fe^{+2}$ , o que sugere desempenhar dois papéis na produção de  $OH^{\cdot}$  (reação de Haber-Weiss, Barreiros; David, 2006). O  $OH^{\cdot}$  causa danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), às proteínas e membranas celulares do núcleo e mitocôndria, além disso os lipídios podem ser oxidados por ele e podem iniciar uma reação em cadeia com radicais livres que danificam a membrana gerando no final um peróxido lipídico (LOOH), causando um dano à membrana e a produção de subprodutos, tais como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Barreiros; David, 2006; Forman; Zhang; Rinna, 2009).

O sistema antioxidante é composto por enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) e substâncias protetoras não enzimáticas, algumas atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radiculares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os (Powers, 2014). A ação antioxidante pode acontecer em várias etapas, o  $H_2O_2$  é convertido pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (Choi *et al.* 2016) e é então reduzido à água ( $H_2O$ ) pela glutathione peroxidase (GPx) ou CAT. A GPx reduz  $H_2O_2$  e outros hidroperóxidos à água pela oxidação da glutathione reduzida (GSH) à forma Glutathione Oxidase (GSSG). A CAT é uma proteína expressa ubiquamente localizada nos peroxissomos e é capaz de reduzir o  $H_2O_2$  eficientemente (Nordgren *et al.*, 2014). Esta reação é catalisada pela enzima Glutathione Redutase (GR), que utiliza a Nicotinamida Adenina-dinucleótido Fosfato na sua forma reduzida (NADPH) como cofator, transformando a GSSG novamente em GSH (Wang; Ballatori, 1998).

No músculo distrófico, o estresse oxidativo tem sido considerado um dos mecanismos primários da degeneração muscular, ao invés de ser um efeito secundário deste processo (Espinosa-Diez *et al.*, 2015). Além disso, a produção elevada de EROs nos músculos pode contribuir fortemente para a progressão da doença e pode levar à capacidade de exaustão das

células miogênicas da DMD, potencializando o processo de danos celular (Whitehead *et al.*, 2006).

Abordagens terapêuticas, portanto, focam nas diferentes etapas da fisiopatologia da DMD e essas abordagens podem ser amplamente divididas entre aquelas que visam a restauração da produção da distrofina e aquelas que tentam reduzir as consequências secundárias da deficiência da distrofina, principalmente o estresse oxidativo (Bushby *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2020).

### 2.3 ESTRATÉGIAS TEREPÊUTICAS

Apesar dos grandes avanços terapêuticos nos últimos 30 anos, não existe tratamento curativo para a DMD. No entanto, uma abordagem médica, cirúrgica e de reabilitação multidisciplinar direcionada aos sintomas da DMD pode alterar o curso natural da doença, melhorando a longevidade e a qualidade de vida (Mercuri; Bönnemann; Muntoni, 2019). O manejo musculoesquelético requer abordagens na manutenção da amplitude de movimento, extensibilidade muscular, mobilidade torácica, manutenção da deambulação, prevenir contraturas e deformidades fixas, otimizar a função respiratória e manter a integridade da pele (Birnkranz *et al.*, 2018).

Os glicocorticosteróides, como o deflazacort ou a prednisona, são o padrão atual de tratamento e o mais utilizado para pacientes com DMD (Bushby *et al.*, 2004). O mecanismo exato pelo qual os glicocorticosteróides retardam a progressão da doença na DMD não está totalmente elucidado, uma vez que a ativação do receptor de glicocorticoide tem efeitos pleiotrópicos (Quattrocchi *et al.*, 2021). No entanto, tem sido sugerido que os glicocorticosteróides diminuem a inflamação e aumentam a massa muscular total e a força em pacientes com DMD através da estimulação de fatores de crescimento semelhantes à insulina, diminuição da produção de citocinas, diminuição da reação linfocitária, aumento da proliferação de mioblastos e regulação positiva de moléculas sinérgicas (Angelini; Peterle, 2012). Além disso, os glicocorticosteróides desempenham um papel numa vasta gama de efeitos adversos associados a este tratamento, incluindo hipertensão, retenção de líquidos, ganho de peso e atrofia da pele (Jaisser; Farman, 2016).

Nesse sentido, a busca por novas abordagens de medicina complementar e alternativa, que possam contribuir para a melhora do fenótipo distrófico, são necessárias e entre estas, destacam-se as terapias que apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Verhaart; Aartsma-Rus 2019). Vários produtos naturais têm potencial farmacológico, especialmente no tratamento de inflamação e estresse oxidativo como de origem vegetal os

flavonoides, terpenos, quinonas, catequinas e alcaloides, atuando em vários moduladores inflamatórios e oxidativos (Suntar *et al.*, 2020).

Atualmente, abordagens terapêuticas emergentes incluindo terapia de transferência gênica usando vetores de vírus adeno-associados e agentes de salto de exon também estão sendo utilizadas (Patterson *et al.* 2023). Ambas as abordagens demonstraram ser relativamente seguras, entretanto, além de serem terapias de alto custo, estudos ainda devem ser realizados para determinar o grau de imunogenicidade e validar potenciais efeitos adversos significativos (Elangkovan *et al.*, 2021; Patterson *et al.*, 2023; Bez Batti Angulski *et al.*, 2023).

Delandistrogene moxeparvec (SRP-9001) ou Elevidys é uma terapia de transferência genética experimental projetada para expressão direcionada da proteína distrofina SRP-9001, uma distrofina encurtada que retém domínios funcionais importantes da proteína do tipo selvagem (Mendell *et al.*, 2023). Segundo Mendell *et al.* (2024) o Delandistrogene moxeparvec está sendo bem tolerada, com um perfil de segurança favorável, promovendo as melhorias funcionais e sustentadas por 4 anos, no entanto, ainda encontra-se na fase de estudos.

### 2.3.1 Canabidiol

O canabidiol (CBD) é um dos principais fitocanabinóides farmacologicamente ativos da *Cannabis sativa*, que exerce uma série de efeitos benéficos, incluindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Atalay; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2019). O CBD é um dos extratos mais abundantes de *Cannabis sativa*, que possui múltiplos bioativos e amplo benefícios à saúde sem propriedades psicoativas. Um dos produtos mais comuns é o óleo de CBD, que está disponível como produto isolado de CBD, de amplo espectro (incluindo todos os terpenos e canabinóides menores, exceto  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC)) ou de espectro total ou *full spectrum* (todos os terpenos e canabinóides menores com THC <0,3% do peso seco) (Odieka *et al.*, 2022). Segundo Berthold *et al.* (2023), a presença de 0,2% de THC aumenta a biodisponibilidade oral do CBD em ratos machos e fêmeas, indicando que produtos de *full spectrum* apresentam maior eficácia do CBD devido a uma maior exposição disponível sistemicamente. Além disso, o CBD *full spectrum* vem demonstrando ser seguro em sua aplicação clínica (Patikorn *et al.*, 2023; Thurgur *et al.*, 2023).

Estudos sugerem que o mecanismo molecular do CBD está amplamente relacionado ao sistema endocanabinoide humano (Mouslech; Valla, 2009). O sistema endocanabinoide humano possui dois receptores canabinóides principais, sendo eles o tipo 1 (CB1) e o tipo 2 (CB2). Os ligantes endógenos desses receptores são chamados de endocanabinóides

anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), ambos derivam do ácido araquidônico (Fagundo *et al.*, 2013). A concentração de endocanabinoides é regulada pelas enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), que atuam degradando AEA e 2-AG, respectivamente (Luchicchi *et al.*, 2012).

O CBD pode atuar por meio de mecanismos dependentes e independentes de receptores canabinóides e demonstra atividade agonista mínima (e afinidade muito baixa) para CB1 e CB2 (Pertwee, 2008). Além disso, mecanismos de ação independentes de CB1 e CB2 para CBD também foram identificados, incluindo o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- $\gamma$ ) (Hind; England; O'Sullivan., 2016; Esposito *et al.*, 2011), receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) (De Petrocellis *et al.*, 2011), receptor 55 acoplado à proteína G (GPR55) (Ryberg *et al.*, receptores 5-Hidroxitriptamina (5-HT) (Ledgerwood *et al.*, 2011) e receptores opióides mu ( $\mu$ ) e delta ( $\delta$ ) (Kathmann *et al.*, 2006).

Muitos dados recentes sugerem que o CBD desempenha eficiente capacidade antioxidante (Baeri *et al.* 2020; Mabou Tagne *et al.* 2019; Chen *et al.* 2016). O CBD demonstrou reduzir o metabolismo oxidativo em leucócitos polimorfonucleares (Mabou Tagne *et al.* 2019) e células do núcleo pulposo tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen *et al.* 2016) e, além disso, reduz os parâmetros de estresse oxidativo em células pancreáticas envelhecidas (Baeri *et al.* 2020). O CBD atenua a produção neural de EROs após o tratamento com cloreto de cádmio, de maneira semelhante à vitamina E (acetato de  $\alpha$ -tocoferol) (Branca *et al.*, 2019), e as evidências também sugerem que é mais neuroprotetor do que o ascorbato e o  $\alpha$ -tocoferol contra a toxicidade do glutamato (Hampson *et al.*, 1998).

No músculo esquelético a administração crônica de CBD causa um aumento considerável nos níveis de SOD<sub>2</sub> nos ratos submetidos à dieta rica em gordura, associado à prevenção da geração de produtos de peroxidação lipídica (Bielawiec *et al.*, 2021). Da mesma maneira, o tratamento com CBD foi capaz de atenuar o estresse oxidativo-nitrosativo no tecido miocárdico e restaurar o conteúdo de GSH e a atividade de SOD em camundongos diabéticos (Rajesh *et al.*, 2010). O CBD também demonstrou reduzir o estresse nitrosativo no tecido cardíaco após lesão cardíaca induzida por doxorubicina em ratos, promovendo uma redução no NF- $\kappa$ B, ligante Fas, caspase-3 e TNF- $\alpha$ ) no tecido cardíaco após administração de doxorubicina (Fouad *et al.*, 2013). No estudo de Iannotti *et al.* (2019), evidenciou o potencial efeito do CBD nas características patológicas da DMD, reduzindo inflamação, restaurando a autofagia funcional e melhorando positivamente a função muscular de camundongos *mdx*.

Considerando que o estresse oxidativo está presente ainda nos estágios iniciais da doença em pacientes e camundongo distróficos (Nakae *et al.* 2004), o uso do CBD pode ser

uma tentativa viável de atenuar o impacto da produção excessiva de EROs no tecido muscular distrófico e melhorar outros marcadores de lesão muscular como a mionecrose e a inflamação dos camundongos *mdx*.

#### 2.4 MODELO EXPERIMENTAL DA DMD

Para investigar a fisiopatologia e testar métodos terapêuticos na DMD, considerando as questões financeiras, éticas e fenotípicas, o modelo experimental que melhor se enquadra nas investigações pré-clínicas para a DMD é o camundongo *mdx*, da linhagem C57BL/10-DMD*mdx* (Manning; O'Malley, 2015). O camundongo *mdx* possui mutação pontual espontânea no exon 23, que interrompe a produção de distrofina de comprimento total no gene da distrofina, o que pode ser comparável à forma humana da DMD e vem sendo amplamente aceita pela literatura, principalmente para novas estratégias terapêuticas (Guiraud *et al.*, 2017).

Morfologicamente, os músculos do camundongo *mdx* não apresentam alteração imediatamente após o nascimento. A patologia muscular é identificada no *mdx* após o desmame, durante a terceira semana de vida, e o pico a doença varia entre 8-16 semanas de idade, um período caracterizado pela presença de focos de necrose, fibras recém-regeneradas com núcleo central e altas concentrações plasmáticas da enzima CK (Evans *et al.*, 2009), aproximadamente 80% das miofibras em camundongos *mdx* adultos são fibras regeneradas (Grounds *et al.*, 2008). Em camundongos *mdx*, ambos os sexos são afetados e as fibras musculares são capazes de se regenerar sucessivamente após a degeneração durante a maior parte da vida do animal (Turk *et al.*, 2005).

Os músculos do *mdx* carecem de expressão de distrofina e apresentam características histopatológicas semelhantes à DMD, no entanto, ao contrário dos pacientes com DMD, os camundongos *mdx* têm um fenótipo mais brando, uma expectativa de vida quase normal, apenas déficits motores mínimos e com pouca fibrose muscular, com exceção do músculo diafragma (DIA) (Grounds *et al.* 2008). O músculo DIA mostra uma patologia severa com extensa substituição de fibras musculares por tecido conjuntivo fibroso, assemelhando-se mais à patologia grave da DMD (Grounds *et al.* 2008). Em relação aos músculos dos membros desses animais, o intenso ciclo de necrose miofibrilar começa por volta dos 21 dias de vida, embora no músculo quadríceps (QUA) seja ainda mais precoce, entorno dos 16 de dias de vida (Grounds *et al.* 2008). Segundo Howard *et al.* (2021), os níveis de expressão gênica de quimiocinas e receptores de quimiocinas aumentaram dramaticamente nos músculos QUA com 4 semanas de idade e no DIA possuem aumento pequeno com 8 a 20 semanas.

Sendo assim, o músculo DIA e músculos QUA são mais susceptíveis ao dano, apresentando maior infiltrado inflamatório, grande número de fibras com núcleo central, extensa mionecrose e aumento no estresse oxidativo, sendo este fator preponderante na determinação dos músculos e das estratégias experimentais que envolvem o camundongo *mdx* (Kim *et al.*, 2013; Grounds *et al.*, 2008; Haslett *et al.* 2005; Lucas; Galettis; Schneider, 2013).

## 2.5 JUSTIFICATIVA

A DMD é uma doença grave, progressiva e de perda muscular que leva a dificuldades de movimentos. Apesar dos grandes avanços terapêuticos, não há cura para a DMD. No entanto, abordagens terapêuticas vêm sendo investigadas para alterar o curso natural da doença, melhorando a qualidade de vida e a longevidade. O CBD é um fitocanabinoide que vem demonstrando diversos benefícios anti-inflamatório e antioxidante, além disso o CBD isolado, já demonstrou redução significativa nos marcadores de lesão do músculo distrófico e melhora positiva na função muscular de camundongos *mdx*. Entretanto, ainda não há estudos demonstrando a ação do CBD *full Spectrum* no processo de mionecrose, na inflamação e no estresse oxidativo em camundongo *mdx*, em períodos iniciais da doença. O CBD *full Spectrum* produz maior eficácia devido a uma maior exposição disponível sistemicamente, pois a presença do THC aumenta a biodisponibilidade. Sendo assim, se faz necessário esta investigação.

## 2.6 OBJETIVOS

### 2.6.1 Objetivo geral

Avaliar a possível ação benéfica do CBD *full spectrum* no tecido muscular distrófico de camundongos *mdx*.

### 2.6.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- a) avaliar a dose-resposta *in vitro* do tratamento de CBD *full spectrum* em células musculares distróficas;

- b) investigar o possível efeito tóxico do tratamento com CBD *full spectrum* no tecido hepático de camundongos *mdx* (reserva de glicogênio e hepatotoxicidade);
- c) analisar o efeito do CBD *full spectrum* na mionecrose de camundongos *mdx*, através de marcadores diretos (IgG-intracelular e células com núcleo centralizado no tecido muscular) e indiretos (nível sérico de CK e glicogênio hepático);
- d) analisar efeito do CBD *full spectrum* no processo inflamatório no tecido muscular de camundongos *mdx* (níveis totais de NF-  $\kappa$ B, determinação de área inflamatória e quantificação de macrófagos);
- e) analisar o efeito do CBD *full spectrum* no estresse oxidativo no tecido muscular de camundongos *mdx* (níveis totais 4-HNE e Catalase, contagem de grânulos de lipofuscina e determinação do GSH total).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos das linhagens *mdx*(C57BL/10-DMD*mdx*) e C57BL/10ScSnJ (linhagem precursora dos *mdx*) (Collins; Morgan, 2003). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas no biotério do Departamento de Anatomia da UNIFAL-MG com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração Nuvilab CR-1 e água. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi desenvolvido após ser aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA#0035/2022-UNIFAL-MG) (ANEXO 1).

#### 3.2 ESTUDO *IN VITRO*

Para o cultivo celular utilizou-se músculos do membro pélvico de 10 camundongos da linhagem *mdx*, com 28 dias de vida. Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose de isoflurano 3% em oxigênio 100%. Os músculos foram prontamente isolados e transportados em meio de cultivo DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA), complementado com glicose e bicarbonato de sódio em concentrações específicas de 3,6mg/ml (solução A).

Após a retirada dos tecidos musculares, eles foram dissociados no fluxo laminar. A suspensão resultante, contendo fragmentos musculares, foi adicionada à solução A acrescida de penicilina (60 µg/ml) e colagenase IV (1,73mg/ml) (solução B). Esta suspensão foi mantida sob agitação contínua por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Concluída a etapa de agitação, a suspensão foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 200g.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e à solução B acrescentou-se tripsina (25mg/ml) e DNase (0,1%). A suspensão foi mantida sob agitação por 1 hora e 30 minutos a 37°C, seguida por nova centrifugação a 4°C por 20 minutos a 200g. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso na solução A, acrescido de 10% de soro bovino fetal, 10% de soro equino fetal, penicilina (60 µg/ml) e glutamina (1 mg/ml) (Choi *et al.*, 2021).

As células resultantes foram inoculada em placas de 96 poços, previamente revestidas com gelatina 2% (CAS 900-70-8 G9391), com uma densidade de 150 células por 100 µl. O

desenvolvimento e a diferenciação dos mioblastos foram monitorados ao longo de 6 dias, sendo fotografados a cada 3 dias por meio do sistema de captura de imagens Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), acoplado a um microscópio invertido (Opton) utilizando a objetiva de 4x. As imagens foram analisadas através do software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss).

### 3.2.1 Análise da viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular do mioblasto diferenciado frente ao tratamento com CBD *full spectrum* (ANEXO 2), foi utilizada a metodologia de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Para isso, as células já plaqueadas e diferenciadas foram tratadas com CBD na concentração de 18,75 – 300  $\mu$ M por um período de 24 horas. Etanol 0,1% foi utilizado como veículo de diluição do CBD *full spectrum* e como controle para diminuição de viabilidade (Etanol 25%). Juntamente foi estudado também a viabilidade celular frente ao tratamento de óleo de semente de uva (OU), na concentração de 0,3125 - 2,5 % (v/v). O grupo controle (Ctrl) sem tratamento também foi analisado. Para ambas as avaliações, decorrido o tempo de 24 horas, o tratamento foi retirado e adicionado à solução de MTT (em uma concentração final de 0.45 mg/ml), por um período de 4 horas. Terminado o período de incubação com MTT, a solução foi retirada e os cristais de formazan foram diluídos em DMSO. A leitura foi realizada por espectrofotômetro, medindo absorbância em 570 nm, utilizando o equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments).

### 3.3 ESTUDO *IN VIVO*

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/10 (BL10; n=7) e da linhagem *mdx* divididos em 3 grupos: grupo tratado com salina (*mdxSAL*; n=7), o grupo tratado com óleo de semente de uva (*mdxOU*; n=7) e o grupo tratado com óleo de CBD *full spectrum* (*mdxCBD*; n=7).

No décimo quarto dia de vida pós-natal, antes de iniciar os ciclos de degeneração/regeneração muscular nos camundongos *mdx*, eles foram pesados e tratados diariamente por 14 dias com 10mg/Kg de CBD *full spectrum* (Certificate Code: AR-21-CC-590562; CCBD1-Eurofins, Portugal) (ANEXO 2) diluído em OU (CAS:8024-22-4, SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA) (ANEXO 3) e aplicado 50ul por meio de injeções via intraperitoneal (IP) (Campos; Guimaraes, 2008).

Após 24 horas do último tratamento os animais foram anestesiados através da administração por via IP de uma solução na proporção de 0,2 ml de cetamina (92mg/kg) (Ketamina®) para 0,1ml de xilasina (9,2mg/kg) (Dopaser®) e em seguida foram coletados o sangue através da punção cardíaca e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M com pH 7,4. Além disso, foram coletados os fígados e os músculos DIA e QUA para análise morfológica.

### **3.3.1 Análise da creatina quinase sérica (CK)**

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no ventrículo esquerdo, em seguida foram centrifugadas (Centrífuga Refrigerada Multifuge X1R) a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para determinar a atividade da CK. O kit Bioclin Crystal Kinetic CK, foi utilizado para análise das absorbâncias das amostras, que foram lidas a 25°C utilizando o Espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS 10 UV Scanning UV/Visible com comprimento de onda de 340 nm (Matsumura *et al.*, 2009).

### **3.3.2 Análise histopatológica do fígado**

Os fígados foram coletados e fixados em paraformaldeído tamponado a 10% por um período de 48 horas. Após esse período, as amostras foram desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em polímero. Em seguida, foram feitos cortes com 7µm de espessura e foram montadas as lâminas. Para a análise utilizou-se 2 cortes de cada animal.

A histomorfometria dos hepatócitos foi analisada por imagens feitas pelo microscópio de luz com objetiva 40x da marca ZEISS- Scope A1 no software AxioVision V4.8.2.0., através de lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). A quantificação da área dos hepatócitos foi realizada pelo software Image-Pro Plus 6.3® (Novaes *et al.*, 2012).

A análise quantitativa do glicogênio hepático foi analisada por imagens obtidas pelo microscópio de luz com objetiva 20x da marca ZEISS- Scope A1 no software AxioVision V4.8.2.0., através de lâminas coradas pelo método do Ácido Periódico-Schiff (PAS) (Fu; Campbell-Thompson, 2017). A quantificação da distribuição de glicogênio hepático foi analisada a partir de um método computacional baseado na segmentação por cores, utilizando o software Image-Pro Plus 6.3®. Os resultados foram reportados em percentual de hepatócitos PAS+.

### 3.3.3 Análise histopatológica dos músculos QUA e DIA

Após a eutanásia, os músculos QUA e DIA foram retirados, congelados em nitrogênio, sendo randomicamente direcionados, um lado para secção (obtenção de cortes histológicos em criostato (Leica CM1520), para montagem de lâminas (8 µm de espessura) e utilizadas para coloração com HE e imunofluorescência) e o outro lado direcionado para o Western Blotting e dosagem de GSH Total.

#### 3.3.3.1 Análise de núcleo central e área de inflamação dos músculos por HE

Para análise das fibras musculares regeneradas (fibras com núcleos centrais, Torres; Duchen, 1987) e das fibras normais (fibras nucleadas periféricas) dos músculos QUA e DIA, as lâminas foram coradas por HE e analisada por imagens obtidas pelo microscópio ZEISS- Scope A1 no software AxioVision V4.8.2.0. A contagem de número de fibras com núcleo central e com núcleo periférico foi utilizando o programa ImageJ 1.54d e posteriormente foi expresso em porcentagem em relação ao número total de fibras. Foram delimitadas também, as áreas de infiltrados inflamatórios em relação a área total do músculo.

#### 3.3.3.2 Análise da degeneração celular por Imunofluorescência

A análise do processo de degeneração dos músculos QUA e DIA foi realizada com a incubação da IgG por imunofluorescência. Os cortes foram pré-incubados por 30 min com 5% de albumina de soro bovino em PBS, seguida por uma incubação de 1 hora com anticorpo conjugado de isotiocianato de fluoresceína IgG (Goat anti-mouse IgG, FITC conjugated; E-AB-101, Elabscience, Hermes *et al.*, 2016). Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS 3x por 5 minutos e as lâminas montadas TBST + Glicerol (1:4). O número de fibras musculares positivas para IgG foi expresso como uma porcentagem do número total de fibras musculares contadas em cada seção de todos os grupos experimentais. Os cortes foram analisados em microscópio óptico de fluorescência ZEISS Scope A1 conectado a uma câmera de vídeo Axion 503 Color.

#### 3.3.3.3 Análise de macrófagos por Imunofluorescência

As lâminas foram incubadas com anticorpo F4/80 para detecção de macrófagos. Os músculos foram fixados em formalina 9% por 20 segundos, lavados com TBS-T 0,1M 3x por 5 minutos e bloqueados com BSA 3% diluído em TBS-T por 1 h. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados por 30 minutos com anti-F4/80 (ab90247, Abcam) 1:400, overnight, à 4 °C. Posteriormente lavados em TBS-T 0,1M 3x por 5 minutos e incubados com o anticorpo secundário Texas Red-conjugado anti-rat (1:1000, ab119986, Abcam) por 1 hora, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em TBS-T 0,1 M 3x por 5 minutos e as lâminas montadas TBST + Glicerol (1:4).

As lâminas foram visualizadas em microscópio invertido de fluorescência e realizadas a contagem das áreas em  $\mu\text{m}^2$ , contendo a marcação do F4/80 com o auxílio do software ImageJ®.

#### 3.3.3.4 Análise da Lipofuscina

A lipofuscina é auto fluorescente e as secções transversais dos músculos QUA e DIA foram montadas diretamente em meio de montagem TBST + Glicerol (1:4), para fluorescência, sob lamínula. Os cortes foram analisados em microscópio óptico de fluorescência ZEISS Scopq A1 conectado a uma câmera de vídeo Axion 503 Color. O número total de grânulos de lipofuscina foi determinado em relação à área total do corte pela sua espessura (número de lipofuscina/ $\mu\text{m}^3$ ).

#### 3.3.3.5 Análise dos níveis de NF-KB, CAT e 4-HNE por Western Blotting

Para a quantificação das proteínas pelo método de Western Blotting, os animais dos grupos experimentais foram eutanasiados como descrito previamente. Os músculos QUA e DIA removidos e cortados em pequenos pedaços, homogeneizados imediatamente em 2ml de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Kinematica Ag) operado em velocidade máxima por 30 segundos.

Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford. As amostras do extrato proteico foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de

ditiotreitól 100mM, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 30 µg de proteína foram aplicadas em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA).

A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 3% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10µg de anticorpo primário: anticorpo NF-KB (SAB5700046, Sigma-Aldrich); e/ou monoclonal antiCatalase (SAB5700937, Sigma-Aldrich); e/ou anticorpo policlonal anti-4HNE (AB46545, Abcam), diluído em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário (anti-rabbit IgG Peroxidase, AB6721, Abcam) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (XB340773, Thermo Fisher Scientific) por 5 minutos, e o sinal fluorescente foi capturado pelo sistema GeneGnome XRQ (Syngene, Frederick) e o software ImageJ foi usado para quantificar as intensidades das bandas

Para a normalização dos dados obtidos foi realizado o controle interno através da incubação das amostras com o anticorpo policlonal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (anti-GAPDH, SAB4300645, Sigma-Aldrich). O protocolo consiste na reutilização das membranas utilizadas para detecção das demais marcações. Para tanto, as referidas membranas foram lavadas com TBS-T (solução basal) 3 vezes, por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com 10 mL de Stripping Buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5; β-Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1 hora, à 60°C. Após esse período, as membranas foram reequilibradas e lavadas com TBS-T. A seguir foram incubadas com 10µg do anticorpo primário GAPDH e 2,5µg do anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG Peroxidase labeled), seguindo o protocolo acima descrito. A quantificação da densitometria óptica foi verificada por meio do software GeneSys.

### 3.3.3.6 Dosagem de grupamentos sulfidríla – GSH

As amostras homogeneizadas do QUA e DIA utilizadas para o método de Western Blotting foram utilizadas para dosagem do GSH. Foi realizada a leitura da absorbância pelo espectrofotômetro, utilizando-se o equipamento espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS 10 UV Scanning UV/Visible. Na análise utilizou-se 100 µL da amostra, acrescidos de 100 µL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), em seguida foi realizada a primeira leitura a 412 nm (A1). Após esta leitura foi adicionado 20 mL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e então realizada uma nova leitura (A2), a 412 nm, após 15 minutos de reação, para determinação de grupamentos sulfidrila não protéicos (GSH). A concentração de grupamentos sulfidrila (tiol) foi dada por  $(A1-A2) \times 1,57$ . A concentração de proteínas foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina do soro bovino para estabelecimento.

#### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A análise estatística para comparação direta entre médias dos grupos foi realizada por ANOVA, seguida do teste de comparações estatísticas múltiplas entre grupos, sendo o Bonferroni para as análises do estudo *in vitro* e teste Tukey para o estudo *in vivo*.  $P \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DO EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO ÓLEO DE CBD *FULL SPECTRUM* NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE FIBRAS MUSCULARES DISTRÓFICAS.

As células musculares distróficas de camundongos *mdx* apresentaram uma progressão típica de proliferação para diferenciação e fusão em miotubos espessos e ramificados (Figura 3 A). A viabilidade celular avaliada por MTT das células distróficas mostrou que o grupo Etanol 25% (60,9%), Veículo (15,3%) e os grupos de tratamento com CBD de 37,5 $\mu$ M (34,9%), 75  $\mu$ M (58,0%), 150  $\mu$ M (69,6%) e 300  $\mu$ M (84,0%), foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular comparado ao Ctrl (Figura 3 B). O grupo CBD *full spectrum* demonstrou ter efeito citotóxico nas células musculares distróficas de maneira dose-dependente, sendo 18,75 $\mu$ M (10,9%), 37,5 $\mu$ M (23,1%), 75 $\mu$ M (50,4%), 150 $\mu$ M (64,1%) e 300 $\mu$ M (81,2%) comparado ao Veículo, significativamente (Figura 1B). A dose de CBD 18,75  $\mu$ M, demonstrou ser a melhor dose e houve diferença significativa em relação às demais doses 37,5 $\mu$ M (30,7%), 75 $\mu$ M (55,3%), 150 $\mu$ M (67,6%) e 300 $\mu$ M (83,0%).

O tratamento com OU não demonstrou ter efeito citotóxico nas células musculares distróficas comparado ao Ctrl e ao Veículo (Figura 3 C). O grupo de controle de morte como Etanol 25% houve redução significativa da viabilidade celular comparado ao Ctrl (60,91%), Veículo (53,85%), OU 0,3125% (61,70%), OU 0,625% (60,42%), OU 1,25% (60,98%) e OU 2,5% (60,98%).

### 4.2 EFEITO DO ÓLEO DE CBD *FULL SPECTRUM* NO TECIDO HEPÁTICO DOS CAMUNDONGO *MDX*

Verificou-se que não houve alteração das áreas dos hepatócitos dos grupos avaliados (Figura 4 A e B), o que não demonstrou efeito citotóxico mudando a morfologia do hepatócito. A quantitativa do glicogênio hepático por PAS+ reduziu significativamente no grupo *mdxSAL* (49,2%) em relação ao grupo BL10 (Figura 4 A e C). O grupo *mdx* tratado com CBD *full spectrum* demonstrou aumento significativo de glicogênio hepático em relação ao grupo *mdxSAL* (39,1%). Não houve diferença significativa do glicogênio hepático no grupo *mdxCBD* em relação ao grupo *mdxOU*. O CBD *Full Spectrum* demonstrou restaurar o armazenamento de glicogênio no fígado.

#### 4.3 EFEITO DO ÓLEO DE CBD *FULL SPECTRUM* NA MIONECROSE DO MÚSCULO DISTRÓFICO DOS CAMUNDONGOS *MDX*

A análise de núcleos centrais demonstrou que o grupo *mdxSAL* aumentou significativamente comparado ao BL10 tanto no DIA (98,1%; Figura 5 A e C) quanto no QUA (98,9%; Figura 5 B e D). O grupo *mdxOU* apresentou diminuição significativa de núcleos centrais somente no músculo DIA (58,4%), comparado ao grupo *mdxSAL*. O grupo *mdx* tratado com CBD *full spectrum* reduziu significativamente o total núcleos centrais nos músculos DIA (Figura 3 A e C) e no QUA (Figura 3 B e C) comparado aos grupos *mdxSAL* (92,1% e 65,3%, respectivamente) e *mdxOU* (58,4% e 24,7%, respectivamente).

A análise de IgG-positivas nas fibras musculares apresentou aumento significativo dos grupos *mdxSAL* quando comparado ao grupo BL10, tanto no DIA (99,2%; Figura 6 A e C) quanto no QUA (98,7%; Figura 6 B e D). O grupo *mdxOU* demonstrou redução significativa das miofibras necróticas positivas à marcação de IgG somente no músculo QUA comparado ao grupo *mdxSAL* (67,2%). Após o tratamento com CBD *full spectrum* no camundongos *mdx*, observou-se redução significativa da marcação positiva de IgG no músculo DIA e no QUA em relação aos grupos, *mdxSAL* (91,7% e 87,3%, respectivamente) e *mdxOU* (88,5% e 61,5%, respectivamente).

Os níveis de CK sérico foram estatisticamente maiores no grupo *mdxSAL* (92,5%) em relação ao grupo BL10 (Figura 6 E). O grupo *mdxCBD* demonstrou redução significativa em relação ao grupo *mdxSAL* (61,8%). Não foram encontradas alterações significativas no grupo *mdxOU* em comparação aos grupos grupo *mdxSAL* e *mdxCBD*.

O CBD *Full Spectrum* demonstrou prevenir o processo de mionecrose nos músculos DIA e QUA.

#### 4.4 EFEITO DO ÓLEO CBD *FULL SPECTRUM* NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DO MÚSCULO DISTRÓFICO DOS CAMUNDONGOS *MDX*

A análise de macrófagos mostrou um aumento significativo do grupo *mdxSAL* no DIA (99,9%, Figura 7 A e C) e QUA (99,9%, Figura 7 B e D) em comparação com o grupo BL10. O grupo *mdxCBD* apresentou área de macrófagos significativamente reduzida no músculo DIA e no QUA em comparação com o grupo *mdxSAL* (99,0% e 89,5%, respectivamente) e no músculo QUA quando comparado com o grupo *mdxOU* (85,8%).

Na análise da área inflamatória, o grupo *mdxSAL* apresentou aumento significativo na área inflamatória do músculo DIA (97,8%, Figura 5 A e E) e do QUA (98,0%, Figura 5 B e F) em comparação com o grupo BL10. No entanto, o grupo *mdxCBD* teve a área inflamatória significativamente reduzida no músculo DIA e no QUA em comparação com o grupo *mdxSAL* (59,1% e 63,8%, respectivamente) e o grupo *mdxOU* (49,2% e 62,8%, respectivamente).

O nível de NF- $\kappa$ B no grupo *mdxSAL* aumentou no DIA (69,7%, Figura 8 A) e no QUA (72,4%, Figura 8 B) em comparação com o grupo BL10. O grupo *mdxOU* apresentou diminuição significativa nos níveis de NF- $\kappa$ B apenas no DIA (53,4%) em comparação com o grupo *mdxSAL*. O grupo *mdxCBD* apresentou uma redução significativa no nível de NF- $\kappa$ B no músculo DIA e no QUA em comparação com o grupo *mdxSAL* (63,7% e 65,7%, respectivamente).

O CBD *Full Spectrum* demonstrou prevenir o processo inflamatório nos músculos DIA e QUA.

#### 4.5 EFEITO DO ÓLEO CBD *FULL SPECTRUM* NO ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO DISTRÓFICO DOS CAMUNDONGOS *MDX*

A análise dos níveis da CAT no grupo *mdxSAL* não demonstrou diferença significativa no músculo DIA (Figura 9 A) e no QUA (Figura 9 B) comparado ao grupo BL10. O grupo *mdxOU* apresentou aumento significativo dos níveis de CAT apenas no QUA em comparação com o grupo BL10 (72,8%) e *mdxSAL* (68,8%). O grupo *mdxCBD* apresentou aumento significativo nos níveis da CAT no DIA em comparação com o grupo BL10 (87,3%), *mdxSAL* (70,1%) e *mdxOU* (72,8%). Além disso, o grupo *mdxCBD* apresentou aumento significativo nos níveis da CAT no QUA em comparação com o grupo BL10 (71,5%) e *mdxSAL* (67,4%).

A análise dos níveis de GSH no grupo *mdxSAL* não demonstrou diferença significativa nos músculos DIA (Figura 9 C) e QUA (Figura 9 D) comparado ao grupo BL10. O grupo *mdxCBD* apresentou aumento significativo no nível de GSH no QUA em comparação com o grupo BL10 (87,3%) e *mdxSAL* (70,1%).

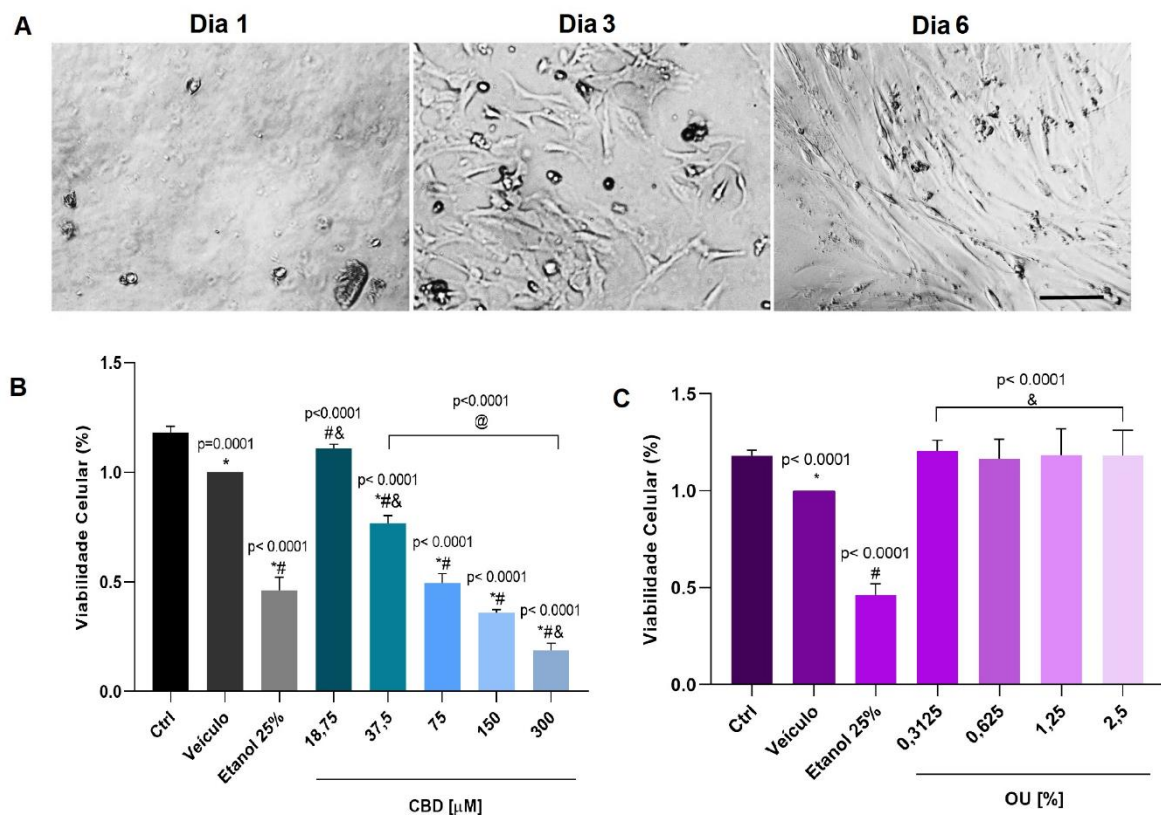
Os grânulos de lipofuscina autofluorescentes no grupo *mdxSAL* apresentaram um aumento significativo no músculo DIA (95,6%, Figura 10 A e C) e no QUA (97,1%, Figura 10 B e D) comparado ao grupo BL10. O grupo *mdxOU* apresentou diminuição significativa nos grânulos de lipofuscina apenas no DIA (54,7%) em comparação com o grupo *mdxSAL*. O grupo *mdxCBD* apresentou redução significativa nos grânulos de lipofuscina no DIA e no QUA em

comparação com o grupo *mdx*SAL (84,5% e 41,0%) e *mdx*OU (65,7% e 52,5%), respectivamente.

Os níveis de 4-HNE não apresentaram diferenças significativas entre os grupos dos músculos do DIA e do QUA (Figura 11 A e B, respectivamente).

O CBD *Full Spectrum* demonstrou prevenir o estresse oxidativo nos músculos DIA e QUA.

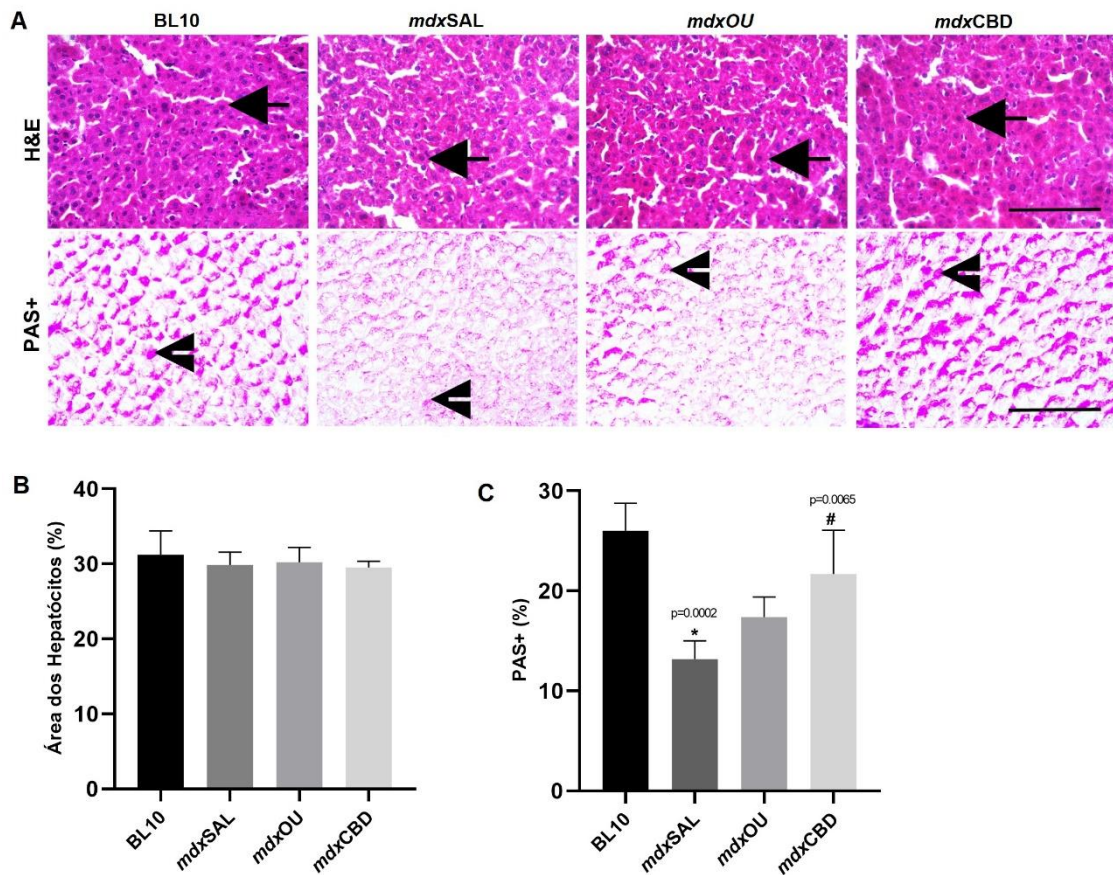
Figura 3 - Proliferação, diferenciação e viabilidade celular de fibras musculares distróficas tratadas com CBD *Full Spectrum* e OU



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A: Desenvolvimento de células musculares distróficas de camundongos *mdx* por 6 dias; B: Viabilidade celular por ensaio MTT em células de camundongos *mdx* tratados com CBD; C: Viabilidade celular por MTT em células de camundongos *mdx* tratados com OU. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. \*: diferença do grupo Ctrl; #: diferença do grupo Veículo; &: diferença em relação ao Etanol 25%; @: diferença do CBD 18,75  $\mu$ M. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

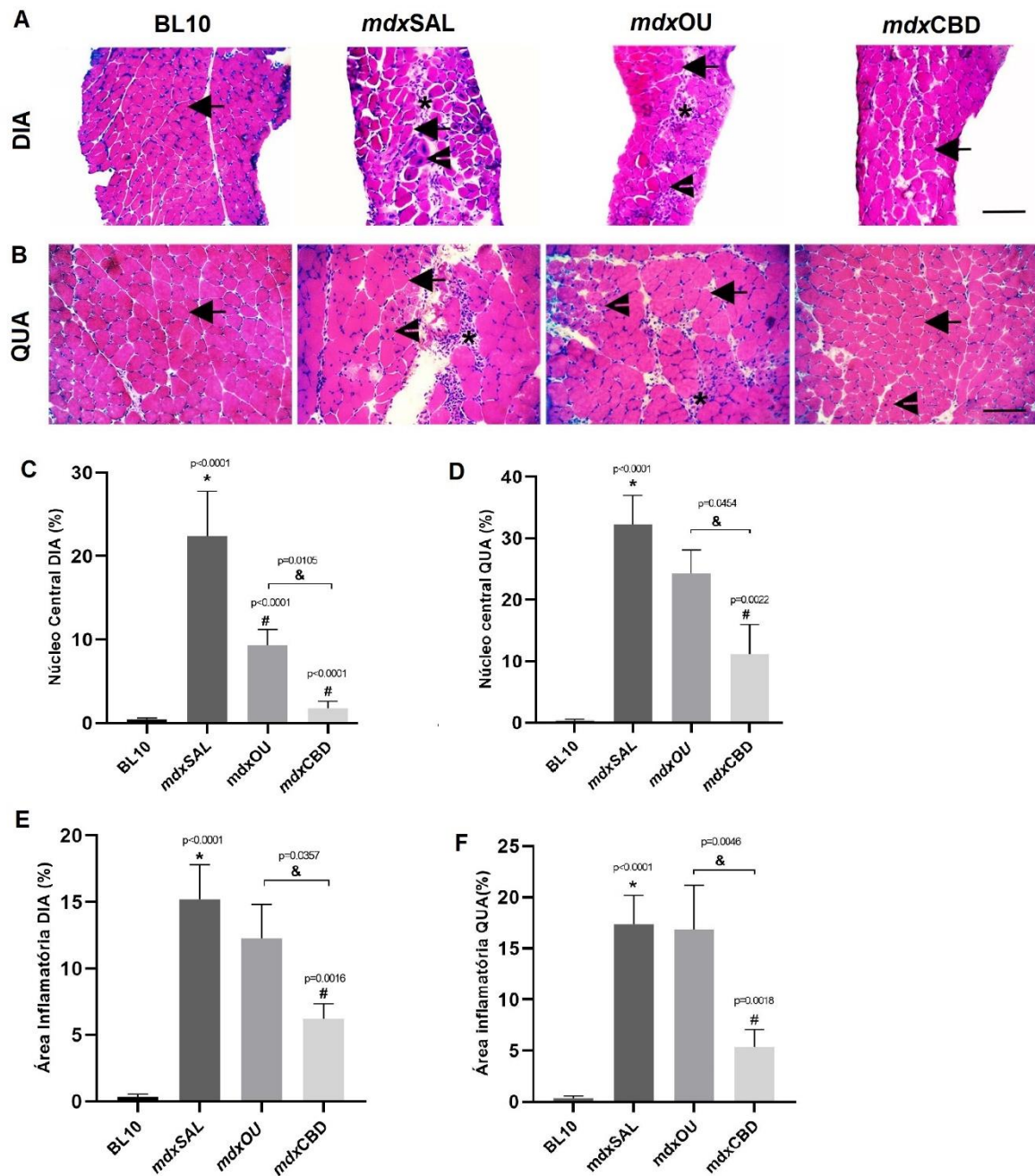
Figura 4 - Análise dos hepatócitos e níveis de glicogênio em camundongos *mdx*



Fonte: Autora (2024)

Legenda: A: Secções transversais do fígado para análise da área dos hepatócitos coradas por HE; B: Análise quantitativa da área total dos Hepatócitos; C: Análise quantitativa do glicogênio hepático corado por PAS+. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo *mdxSAL*. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

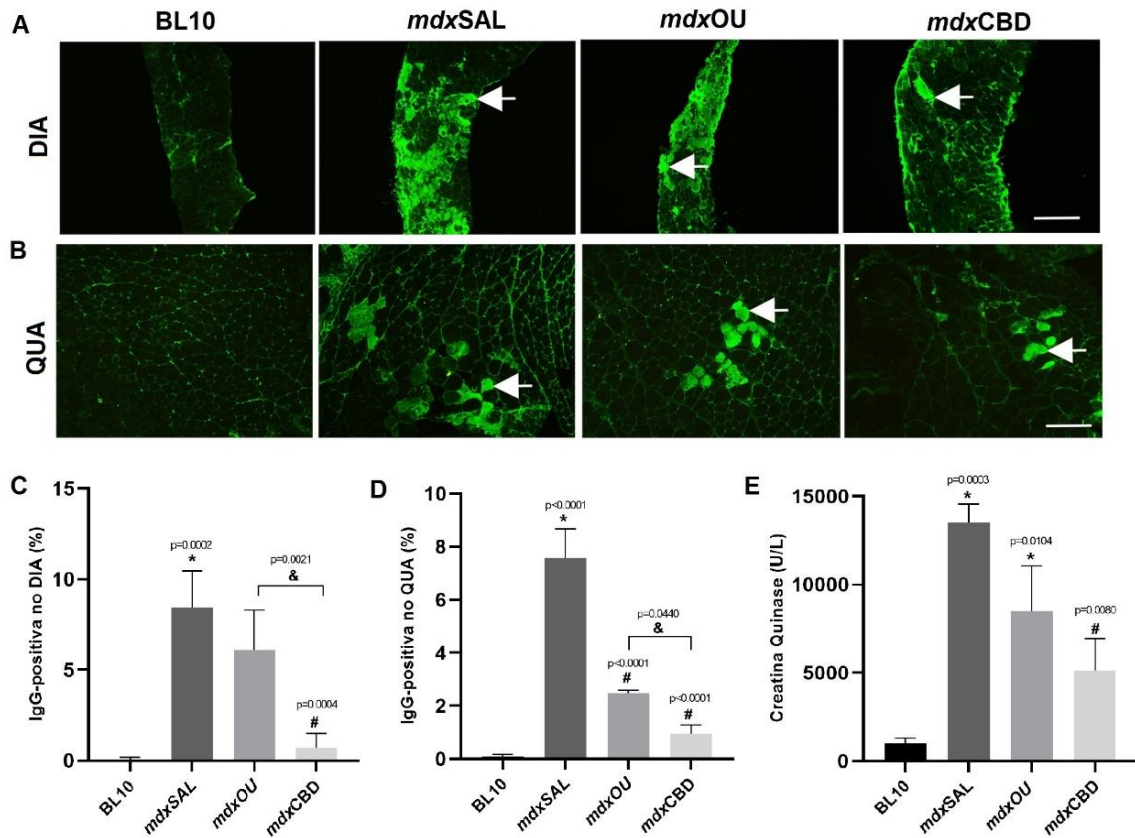
Figura 5 - Análise de núcleo central e área inflamatória dos músculos DIA e QUA



Fonte: Autora (2024)

Legenda: A: Cortes transversais do músculo DIA coradas por HE, mostrando fibras com núcleos centrais (cabeça de seta), núcleos periféricos (seta) e área inflamatória (asterisco); B: Cortes transversais do músculo QUA coradas por HE, mostrando fibras com núcleos centrais (cabeça de seta), núcleos periféricos (seta) e área inflamatória (asterisco); C: Análise quantitativa de núcleo central do músculo DIA; D: Análise quantitativa de núcleo central do músculo QUA; E: Análise quantitativa área inflamatória do músculo DIA; F: Análise quantitativa área inflamatória do músculo QUA. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo *mdxSAL*. &: diferença de *mdxOU*. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

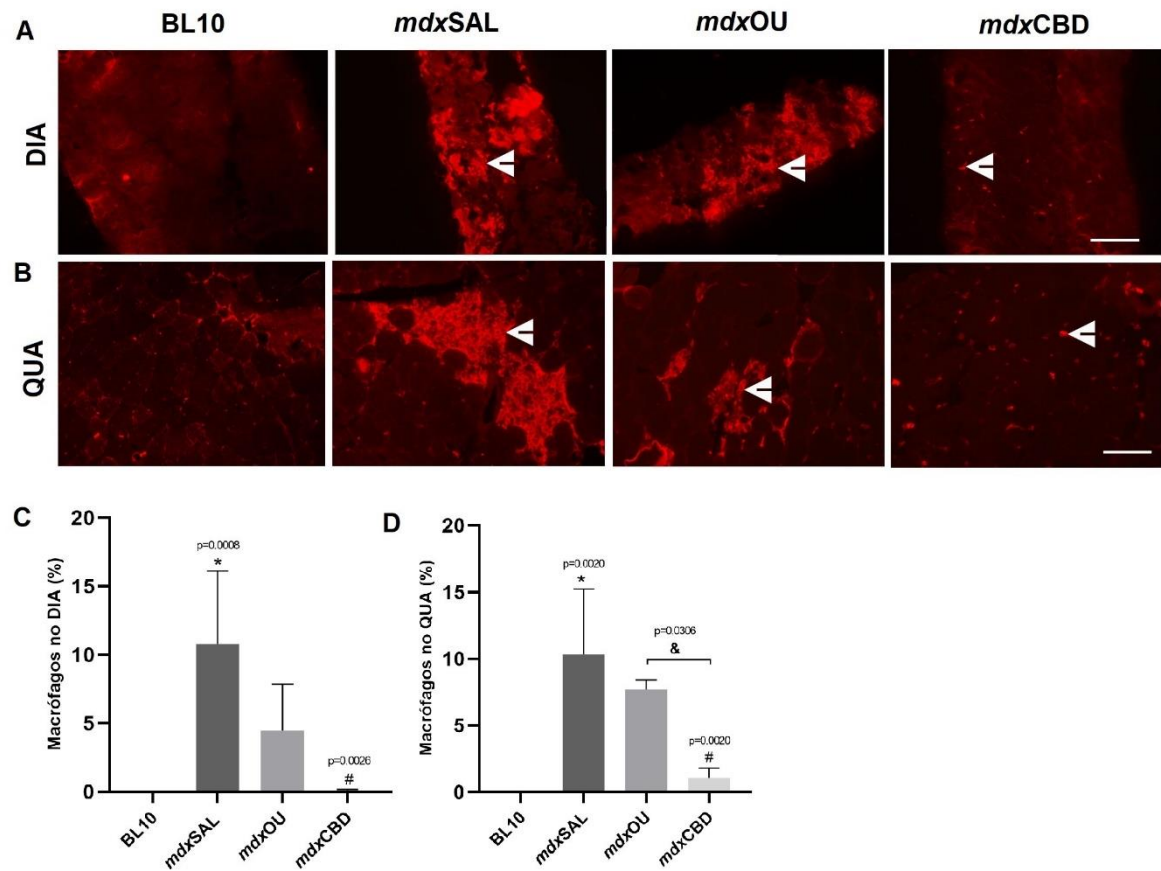
Figura 6 - Análise das miofibras necróticas por IgG positivo nos músculos DIA e QUA e níveis séricos de CK.



Fonte: Autora (2024)

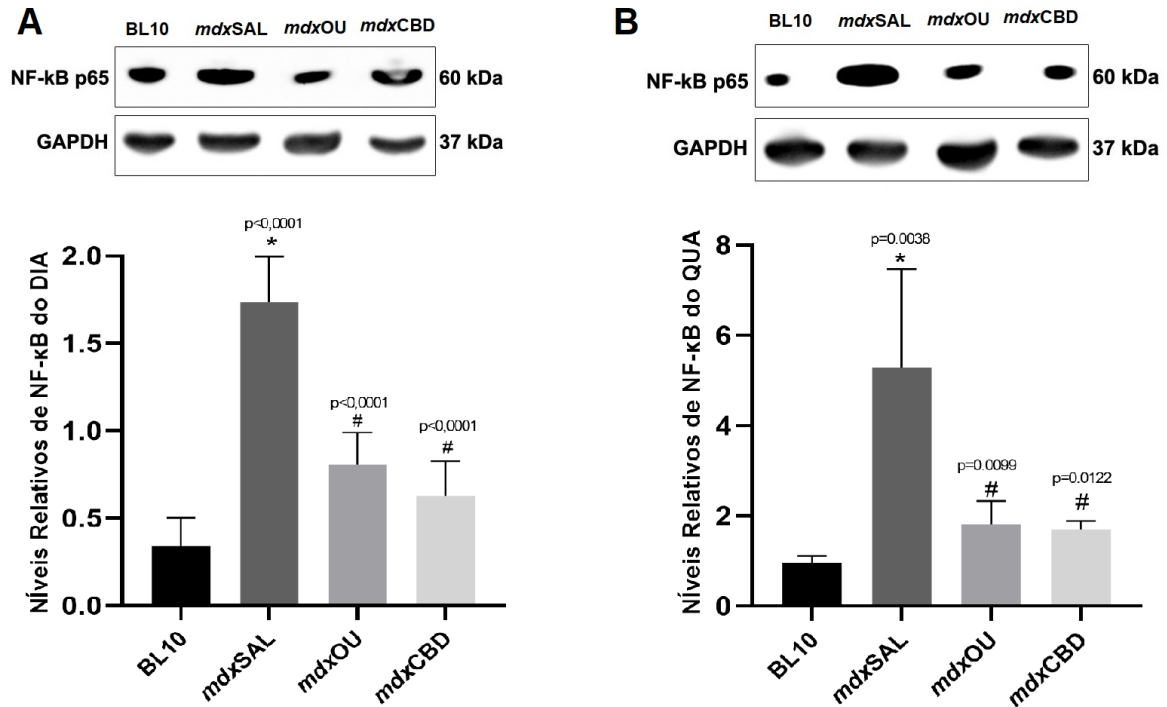
Legenda: A: Fibras musculares incubadas com de IgG e analisada por imunofluerência, sendo IgG-positiva (seta branca) do músculo DIA; B: Fibras musculares incubadas com de IgG e analisada por imunofluerência, sendo IgG-positiva (seta branca) do músculo QUA; C: Análise quantitativa da porcentagem de fibras mionecróticas no músculo DIA; D: Análise quantitativa da porcentagem de fibras mionecróticas no músculo QUA; E: Níveis séricos de CK. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo *mdxSAL*. &: diferença de *mdxOU*. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

Figura 7 - Análise do processo inflamatório dos músculos DIA e QUA



Fonte: Autora (2024).

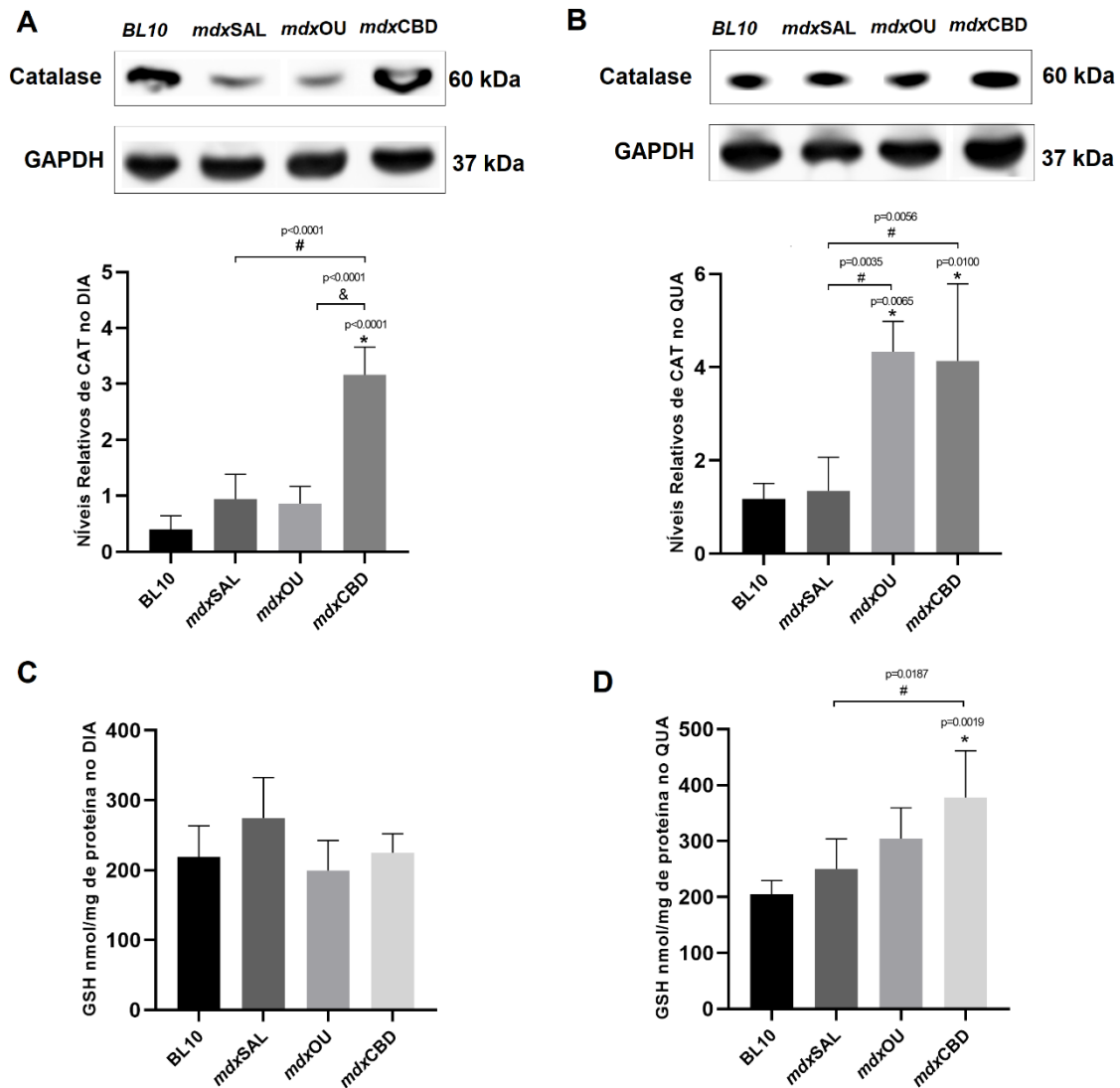
Legenda: A: Fibras musculares com marcação de macrófagos por F4/80 (ponta de seta branca) no músculo DIA analisado por imunofluorescência; B: Fibras musculares com marcação macrófagos por F4/80 (ponta de seta branca) no músculo QUA analisado por imunofluorescência; C: Análise quantitativa de imunofluorescência por F4/80 do músculo DIA; D: Análise quantitativa de imunofluorescência por F4/80 do músculo QUA. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo *mdxSAL*. &: diferença de *mdxOU*. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

Figura 8 - Análise dos níveis relativos de NF- $\kappa$ B dos músculos DIA e QUA

Fonte: Autora

Legenda: A: Níveis relativos de NF- $\kappa$ B por Western Blotting do músculo DIA; B: Níveis relativos de NF- $\kappa$ B por Western Blotting do músculo QUA. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo *mdxSAL*. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

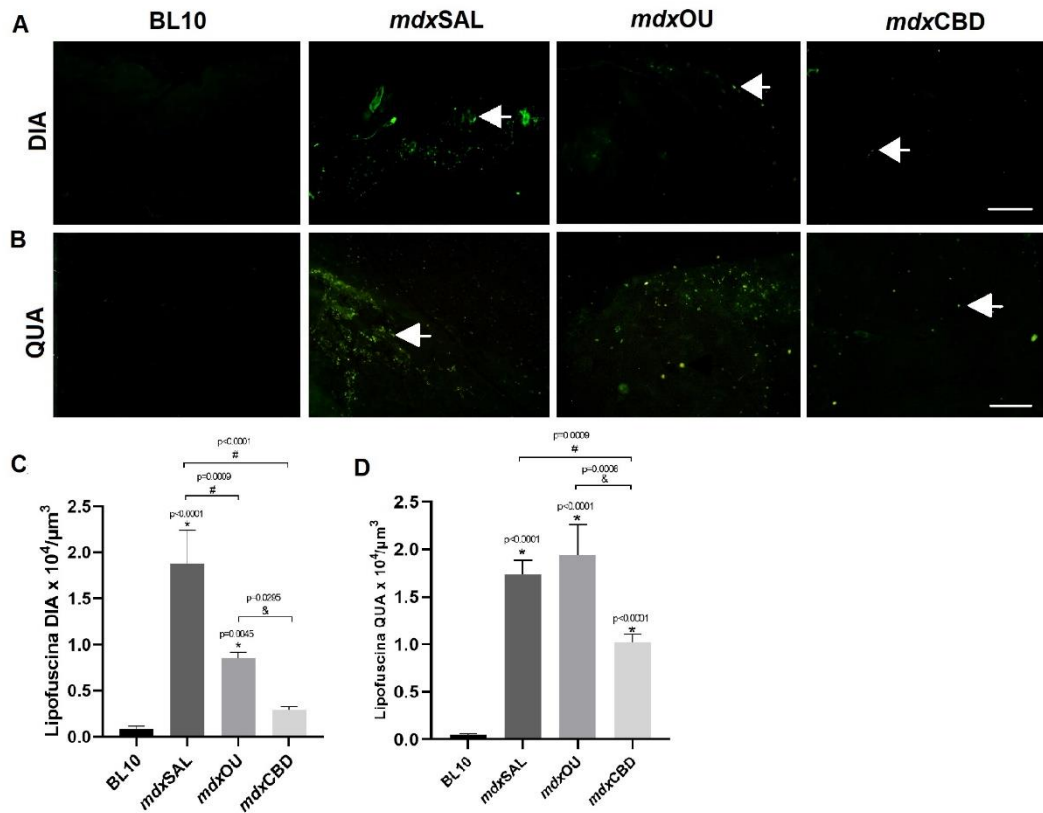
Figura 9 - Análise dos níveis de Catalase e GSH total dos músculos DIA e QUA



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A: Níveis relativos de CAT no músculo DIA; B Níveis relativos de CAT no músculo QUA; C: Níveis de GSH no músculo DIA; D: Níveis de GSH no músculo QUA. BL10: tipo selvagem C57BL/10; mdxSAL: grupo tratado com solução salina; mdxOU: grupo tratado com OU; e o mdxCBD: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo mdxSAL. &: diferença de mdxOU. A barra de escala é 100 $\mu$ m.

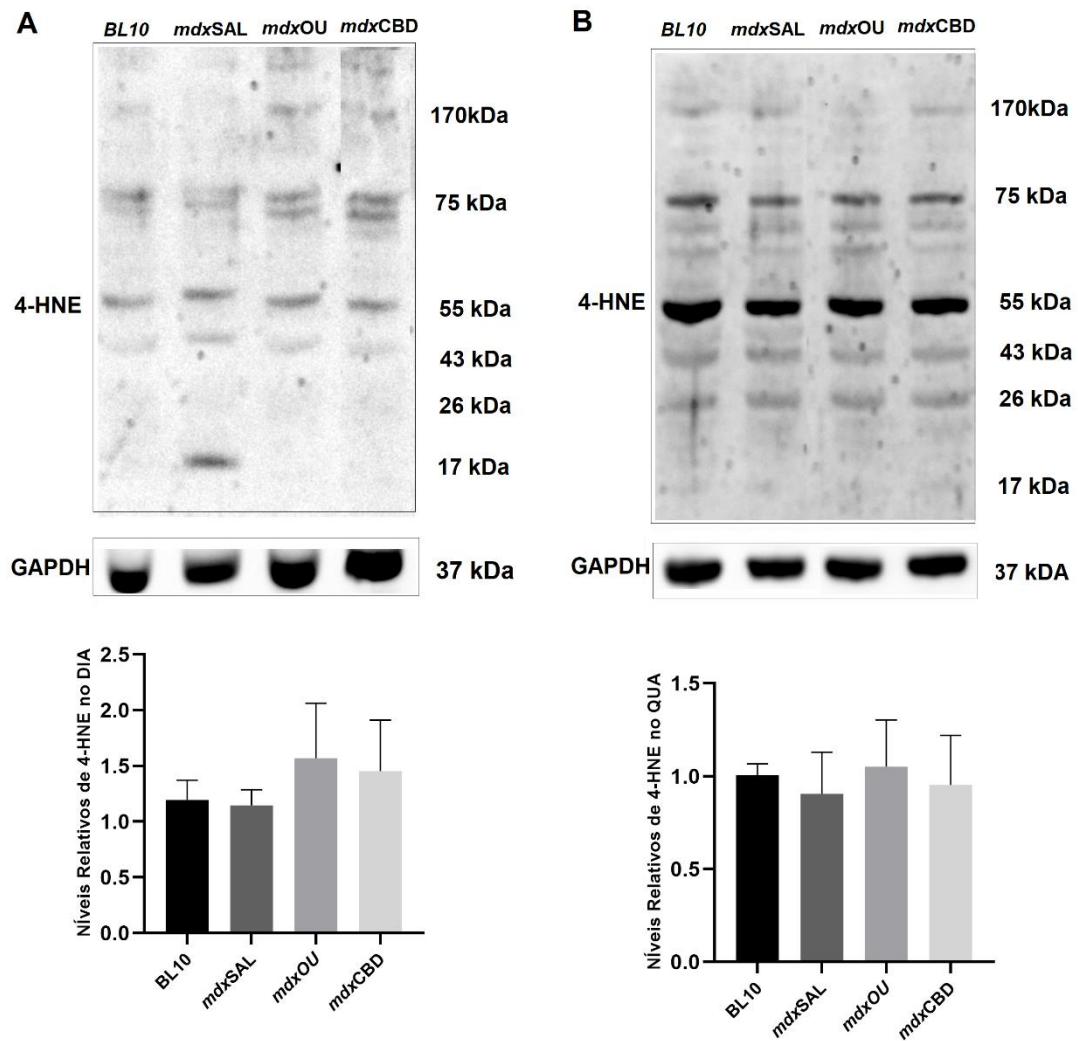
Figura 10 - Análise dos grânulos lipofuscina dos músculos distróficos DIA e QUA



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A: Fibras musculares com presença de grânulos de lipofuscina por autofluorescência (ponta de seta branca) no músculo DIA; B Fibras musculares com presença de grânulos de lipofuscina por autofluorescência (ponta de seta branca) no músculo QUA; C: Análise quantitativa da lipofuscina do músculo DIA; D: Análise quantitativa da lipofuscina do músculo QUA. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD *Full Spectrum*. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. \*: diferença do grupo BL10. #: diferença do grupo *mdxSAL*. &: diferença de *mdxOU*. A barra de escala é 100μm.

Figura 11 - Níveis relativos de 4-HNE dos músculos distróficos DIA e QUA



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A: Níveis relativos de 4-HNE no músculo DIA; B Níveis relativos de 4-HNE no músculo QUA. BL10: tipo selvagem C57BL/10; *mdxSAL*: grupo tratado com solução salina; *mdxOU*: grupo tratado com OU; e o *mdxCBD*: grupo tratado com óleo CBD Full Spectrum. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 4 DISCUSSÃO

No estudo *in vitro* foi demonstrado que as diferentes concentrações do óleo de CBD *full spectrum* produziram um efeito citotóxico de maneira dose-dependente nas células musculares de camundongos distróficos devido a expressiva redução da atividade mitocondrial (teste de MTT; Stoddart, 2011). Segundo Pagano *et al.* (2020), doses acima de 2  $\mu\text{M}$  de CBD isolado podem inibir a viabilidade celular em células humanas saudáveis. Já no estudo de Soundara Rajan *et al.* (2017), foi demonstrado que as células humanas orais estromais mesenquimais sofreram uma redução na viabilidade com doses de CBD isolado acima de 10  $\mu\text{M}$ . Em outro estudo, o CBD isolado demonstrou ser citotóxico nas células neuronais SH-SY5Y, com concentração efetiva de 40  $\mu\text{M}$  e os óleos de CBD *full spectrum* não tiveram efeito na viabilidade celular em concentrações de CBD superiores a 1,2  $\mu\text{M}$  (Urasaki *et al.* 2020). Estes dados reforçam nossos achados sobre o potencial de citotoxicidade do CBD *full spectrum* de acordo com o tipo celular e a dose utilizada para o tratamento. Contrapondo a ação do CBD *full spectrum* na célula distrófica, foi observado que doses altas de OU não influenciaram a atividade metabólica celular, no presente estudo. Em um estudo com modelo experimental de enxaqueca, Woodman *et al.* (2022) constataram que inclusão de extrato de semente de uva como suplemento dietético pode oferecer uma opção terapêutica complementar segura, além de ser capaz de ativar os receptores endocanabinóides. Além disso, o OU possui propriedades benéficas à saúde que são detectadas principalmente por estudos *in vitro*, como propriedades anti-inflamatórias, cardioprotetoras, antimicrobianas e anticancerígenas, podendo interagir com vias celulares e moleculares (Garavaglia *et al.* 2016; Miller *et al.* 2018). Sendo assim, a utilização do OU como veículo de diluição para o óleo de CBD, como realizado no estudo *in vivo*, mostra-se vantajosa.

O modelo de DMD, o camundongo *mdx*, apresenta intenso estresse oxidativo e inflamação exacerbada nas suas 3 a 4 semanas de vida, que contribuem consideravelmente com a mionecrose (Fairclough, Bareja e Davies 2011). Assim, no presente estudo iniciou-se o tratamento com CBD *full spectrum* nas primeiras semanas de vida do animal buscando intervir nos estágios iniciais da doença.

Os efeitos biológicos multidirecionais do CBD estão sendo elucidados em vários modelos pré-clínicos, incluindo suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Burstein, 2015; Pellati *et al.* 2018). O tratamento com 10mg/kg de óleo CBD *full spectrum* por 14 dias não causou hepatotoxicidade no modelo distrófico. Colaborando com este resultado, o estudo de Li, Zagorski e Kaminski (2023), demonstrou pouca alteração no tecido hepático nos

conjuntos de dados de genes e vias em uma concentração de CBD igual ou inferior a 10  $\mu$ M. Além disso, o óleo de CBD *full spectrum* foi capaz de reestabelecer o armazenamento de glicogênio hepático dos camundongos *mdx*. O metabolismo do glicogênio, segundo Stapleton (2014), é defeituoso em camundongos distróficos, onde existe um aumento do glicogênio muscular esquelético e uma redução da quantidade de glicogênio hepático, além disso, apresenta intolerância à glicose. O glicogênio é importante para fornecer glicose como fonte de ATP para eventos que requerem energia, como contração muscular e manipulação de cálcio e todo o processo de regeneração muscular (Ørtenblad *et al.* 2011). Sendo assim, o aumento do glicogênio hepático colabora com nossos resultados na melhoria do fenótipo distrófico do camundongo *mdx* frente ao tratamento precoce com óleo de CBD *full spectrum*.

A fragilidade da fibra muscular aos danos causados pela ausência da distrofina no músculo distrófico é evidenciado pelo processo de necrose, incluindo a perda da integridade da membrana plasmática com a liberação de padrões moleculares associados a danos, captação de proteínas plasmáticas e alteração na morfologia celular com nucleação central (Shin *et al.* 2013). Trabalhos anteriores avaliam a extensão da necrose miofibrilar por meio de marcadores intracelulares como IgG positivo e o corante Evans Blue (Briguet *et al.*, 2004; Marques *et al.* 2007; Mâncio *et al.*, 2017). O óleo CBD *full spectrum* produziu efeitos positivos neste estudo, demonstrando importante ação preventiva da degeneração do músculo distrófico do modelo *mdx*. Iannotti *et al.* (2018) realizaram o tratamento com CBD isolado em camundongos *mdx* de 34 semanas e observaram redução de núcleos centrais e áreas inflamatórias no músculo gastrocnêmio. Esses dados reforçam a evidência que o CBD pode agir nos processos de mionecrose tanto precocemente quanto tardiamente nos músculos distróficos. Este achado é sustentado ainda por outros estudos que associam o potencial preventivo de terapias frente a mionecrose, reduzindo os níveis séricos de CK, a presença de núcleos centrais e marcação positiva ao IgG no tecido muscular distrófico (Hermes *et al.* 2019; Mâncio *et al.* 2017; Macedo *et al.* 2020).

A degeneração muscular em pacientes com DMD está intimamente associada a uma resposta inflamatória prolongada e, embora isso seja importante para estimular a regeneração, acredita-se que a inflamação também exacerbe o dano muscular (Tulangekar; Sztal, 2021). A contribuição de cada subtipo de macrófagos para a patogênese da DMD ainda não está clara, no entanto, o equilíbrio entre as populações de macrófagos M1 e M2 continua a ser um fator crítico para reduzir processos inflamatórios crônicos e maximizar o potencial regenerativo do músculo (Evans *et al.*, 2009). O NF- $\kappa$ B está envolvido em vários mecanismos relacionados à progressão da distrofia (Apolinário *et al.* 2015). Estudos vem demonstrando que a inibição de

NF- $\kappa$ B leva à regeneração muscular em vários modelos de mionecrose em camundongos *mdx* (Apolinário *et al.*, 2015). As intervenções que inibem os processos inflamatórios em modelos de DMD reduzem significativamente o dano muscular e a gravidade da patologia (Messina *et al.* 2006), além disso o NF- $\kappa$ B ativado amplifica ainda mais a liberação de EROs e proteínas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) (Peterson *et al.*, 2011). Neste estudo, demonstramos que a diminuição dos macrófagos e dos níveis de NF- $\kappa$ B pelo uso do CBD *full Spectrum* foi acompanhada pela efetiva redução do processo inflamatório e do estresse oxidativo no músculo distrófico do modelo *mdx*. Este achado está de acordo com Silvia *et al.* (2019), que demonstraram que o CBD pode reduzir a atividade do NF- $\kappa$ B .

A geração das EROs é subsequente ao dano ao sarcolema e está fortemente associado à mionecrose e à inflamação (Tidball; Welc; Wehling-Henricks, 2018) e o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio, mas quando em excesso o organismo não consegue controlar e gera o estado de estresse oxidativo (Kim *et al.*,2013). O GSH total foi consideravelmente reduzido nas doenças rapidamente progressivas DMD e segundo Spassov *et al.* (2011), demonstraram diminuição do conteúdo de GSH e GSSG nos músculos mastigatórios dos camundongos *mdx*. Dorchie *et al.* (2009) demonstraram que os antioxidantes naturais preveniram o dano oxidativo, restauraram o conteúdo de GSH e protegeram contra a patologia distrófica nos modelos experimentais de DMD. A CAT é uma enzima com ação antioxidante que catalisa a quebra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> com uma taxa de renovação extremamente alta e sua expressão é aumentada em fibras musculares altamente oxidadas (Powers *et al.* 2011). Não há muitos estudos elucidando o papel do CBD nos níveis de CAT, mas sabe-se que o CBD estimula o receptor PPAR  $\gamma$ , que coopera com o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e demonstra suas propriedades citoprotetoras ao se ligar à região específica dos genes que codificam as proteínas antioxidantes CAT, Mn-SOD e heme-oxigenase-1 (HO-1) (Jítčá *et al.*, 2023). Segundo O'Sullivan *et al.* (2016) a atividade direta do CBD no receptor PPAR $\gamma$  demonstra propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além disso aumenta a ação do AEA e 2-AG, que também são agonistas do PPAR $\gamma$ , que possuem efeitos no equilíbrio das EROs e na inflamação. Neste estudo, identificamos que o CBD *full Spectrum* produziu efeitos positivos na ação antioxidante das moléculas CAT e GSH no músculo distrófico dos camundongos *mdx*.

Alguns marcadores do estresse oxidativo como adutos de proteínas 4-HNE e grânulos de lipofuscina (Hermes *et al.*, 2020) foram avaliados neste estudo. O 4-HNE é gerado em condições que ocorre a peroxidação lipídica e altera a permeabilidade e a integridade da membrana. Estudos demonstram que as doses repetidas de CBD, produzem efeitos

antioxidantes e reduzem as modificações lipídicas e proteicas (Wang *et al.*, 2017; Atalay *et al.*, 2020). No estudo de Wang *et al.* (2017), houve uma redução na peroxidação lipídica do fígado após lesão hepática induzida pelo álcool com o tratamento de CBD isolado em camundongo C57BL/6J. Já em nosso modelo, não observamos diferenças significativas.

A Lipofuscina é um biomarcador do envelhecimento e do estresse oxidativo crônico. Se destaca como um produto da lesão oxidativa de macromoléculas celulares por radicais livres derivados do oxigênio e íon metálico redox-ativo (Sohal; Brunk, 1989; Brunk; Terman 2002). No músculo distrófico, a Lipofuscina é identificada em humano na idade entre 2 a 7 anos e em camundongos *mdx* ocorre muito mais cedo, 4 semanas após o nascimento, quando a degeneração primária das miofibras deficientes em distrofina está no auge (Nakae *et al.*, 2004). Segundo Terrill *et al.* (2013), aos 3 meses de idade, o nível de lipofuscina aumenta significativamente (duas a três vezes) nos músculos dos camundongos *mdx*, em comparação com os controles e há pouca manifestação da doença em camundongos adultos jovens. No estudo de Hermes *et al.* (2020), investigou o efeito do Tempol nos níveis de lipofuscina em camundongos com 28 dias e verificou redução dos números de grânulos de lipofuscina. Assim como também constatamos a ação do óleo de CBD *full spectrum* na diminuição da lipofuscina no tecido muscular dos camundongos distróficos estudados, evidenciamos a instalação e exacerbação precoce do estresse oxidativo ainda em estágios iniciais da doença no modelo experimental, preventivamente controlada pelo tratamento proposto.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no exposto, é possível dizer que o tratamento com óleo de CBD *full spectrum* apresentou efeito citotóxico dose-dependente para a fibra muscular distrófica. No entanto, no modelo experimental *mdx*, o tratamento com óleo de CBD *full spectrum* na dose proposta e período estudado demonstrou ser seguro e eficaz na redução dos parâmetros diretos e indiretos de avaliação da miopatia. Os resultados indicam que o óleo de CBD *full spectrum* pode representar uma nova abordagem promissora para tratamento da DMD.

## REFERÊNCIAS

- AARTSMA-RUS, A.; PUTTEN, M. Assessing functional performance in the *mdx* mouse model. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. 85, n. 1, p. 51303, 2014.
- ANGELINI, C.; PETERLE, E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 31, n. 1, p. 9, 2012.
- APOLINÁRIO, L. M. *et al.* Long-term therapy with omega-3 ameliorates myonecrosis and benefits skeletal muscle regeneration in *mdx* mice. **The Anatomical Record**, v. 298, n. 9, p. 1589-1596, 2015.
- ATALAY, S.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 1-21, 2019.
- BAEERI, M. *et al.* Cannabinoids as anti-ROS in aged pancreatic islet cells. **Life sciences**, v. 256, n. 1, p. 117969, 2020.
- BARREIROS, A. L. B. S.; J. M. DAVID J. M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 9, n.1 p. 113-123, 2006.
- BELLO, L. *et al.* Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne Natural History Study. **Neurology**, v. 85, n. 12, p. 1048-1055, 2015.
- BENCZE, M. *et al.* Immunolabelling myofiber degeneration in muscle biopsies. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 154, p. e59754, 2019.
- BERTHOLD, E. C. *et al.* Comparative Pharmacokinetics of Commercially Available Cannabidiol Isolate, Broad-Spectrum, and Full-Spectrum Products. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 48, n. 4, p. 427-435, 2023.
- BEZ BATTI ANGULSKI, A. *et al.* Distrofia muscular de Duchenne: Mecanismo da doença e estratégias terapêuticas. **Fronteiras na Fisiologia**, v. 14, p. 1183101, 2023.
- BIELAWIEC, P. *et al.* Attenuation of oxidative stress and inflammatory response by chronic cannabidiol administration is associated with improved n-6/n-3 PUFA ratio in the white and red skeletal muscle in a rat model of high-fat diet-induced obesity. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1603, 2021.
- BIRNKRANT, D. J. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 3, p. 251-267, 2018.
- BLADEN, C. L. *et al.* The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. **Human Mutation**, v. 36, n. 4, p. 395-402, mar. 2015.
- BRANCA, J. J. V. *et al.* Cannabidiol protects dopaminergic neuronal cells from cadmium. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, p. 4420, 2019.

BRIGUET, A. *et al.* Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 10, p. 675-682, 2004.

BRUNK, U.; TERMAN, A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 611-619, 2002.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1377-1385, 2015.

BUSHBY, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77-93, 2010.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, p. 223-230, 2008.

CARPENTER, S.; KARPATI, G. Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 48, n. 2, p. 154-170, 1989.

CHEN, J. *et al.* Protective effect of cannabidiol on hydrogen peroxide-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 3, p. 2321-2327, 2016.

CHEN, Y. W. *et al.* Early onset of inflammation and later involvement of TGF $\beta$  in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, n. 6, p. 826-834, 2005.

CHOI, K. H. *et al.* Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 429-457, 2021.

CHOI, M. H. *et al.* Oxidative stress-mediated skeletal muscle degeneration: molecules, mechanisms, and therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 6842568, 2016.

CIAFALONI, E. *et al.* Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). **The Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 3, p. 380-385, 2009.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 8, p. 906-914, 2010.

CLERK, A.; STRONG, P. N.; SEWRY, C. A. Characterisation of dystrophin during development of human skeletal muscle. **Development**, v. 114, n. 2, p. 395-402, 1992.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165-172, 2003.

CULLIGAN, K. G.; OHLENDIECK, K. Abnormal Calcium Handling in Muscular Dystrophy. **Basic Appl Myol**, v. 12, n. 4, p. 151-162, 2002.

DE PETROCELLIS, L. *et al.* Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479-1494, 2011.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatric Neurology**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2007.

DORCHIES, O. M. *et al.* Protection of dystrophic muscle cells with polyphenols from green tea correlates with improved glutathione balance and increased expression of 67LR, a receptor for (-)-epigallocatechin gallate. **Biofactors**, v. 35, n. 3, p. 279-294, 2009.

DOWLING, P. *et al.* Emerging proteomic biomarkers of X-linked muscular dystrophy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 8, p. 739-755, 2019.

DUAN, D. *et al.* Duchenne muscular dystrophy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2021.

DUBOWITZ, V.; SEWRY, C. A.; OLDFORS, A. **Muscle Biopsy: a Practical Approach: Expert Consult; Online and Print**. Elsevier Health Sciences, 2013.

EAGLE, M. *et al.* Managing Duchenne muscular dystrophy—the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. **Neuromuscular Disorders**, v. 17, n. 6, p. 470-475, 2007.

ELANGKOVAN, Nertiyani; DICKSON, George. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 8, n. s2, p. S303-S316, 2021.

ERVASTI, J. M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 2, p. 108-117, 2007.

ESPINOSA, A.; HENRÍQUEZ-OLGUÍN, C.; JAIMOVICH, E. Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. **Cell Calcium**, v. 60, n. 3, p. 172-179, 2016.

ESPINOSA-DIEZ, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 6, n. 1, p. 183-197, 2015.

ESPOSITO, G. *et al.* Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e28668, 2011.

EVANS, N. P. *et al.* Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 88, n. 6, p. 502-522, 2009.

FAGUNDO, A. B. *et al.* Modulation of the endocannabinoids N-arachidonylethanolamine (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on executive functions in humans. **PLoS One**, v. 8, n.6, e66387, 2013.

FAIRCLOUGH, R. J.; BAREJA, A.; DAVIES, K. E. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 11, p. 1101-1113, 2011.

FORBES, S. C., *et al.* Magnetic resonance imaging and spectroscopy assessment of lower extremity skeletal muscles in boys with Duchenne muscular dystrophy: a multicenter cross sectional study. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e106435, 2014.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2009.

FOUAD, A. A. *et al.* Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 347-357, 2013.

FU, D. A.; CAMPBELL-THOMPSON, M. Periodic acid-Schiff staining with diastase. **Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Methods and Protocols**, p. 145-149, 2017.

GAO, Q. Q.; MCNALLY, E. M. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1223–1239, 2015.

GARAVAGLIA, J. *et al.* Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, p. NMI. S32910, 2016.

GROUNDS, M. D. *et al.* Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. **Disease Models & Mechanisms**, v. 13, n. 2, p. dmm043638, 2020.

GROUNDS, M. D. *et al.* Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 1, p. 1-19, 2008.

GUGLIERI, M. *et al.* Efficacy and safety of vamorolone vs placebo and prednisone among boys with Duchenne muscular dystrophy: a randomized clinical trial. **JAMA Neurology**, v. 79, n. 10, p. 1005-1014, 2022.

GUIRAUD, S. *et al.* Identification of serum protein biomarkers for utrophin based DMD therapy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 43697, 2017.

HAMPSON, A. J. *et al.* Cannabidiol and (–)  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8268-8273, 1998.

HASLETT, J. N. *et al.* The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. **Mammalian genome**, v. 16, n. 1, p. 739-748, 2005.

- HENRIQUES-PONS, A. *et al.* Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of dystrophin-deficient skeletal and heart muscle. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 10, p. 2604-2617, 2014.
- HERBELET, S. *et al.* Anti-inflammatory and general glucocorticoid physiology in skeletal muscles affected by Duchenne muscular dystrophy: Exploration of steroid-sparing agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4596, 2020.
- HERMES, T. A. *et al.* Beneficial cilostazol therapeutic effects in *mdx* dystrophic skeletal muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 2, p. 259-267, 2016.
- HERMES, T. de A. *et al.* Tempol treatment shows phenotype improvement in *mdx* mice. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215590, 2019.
- HERMES, T. de A. *et al.* Tempol improves redox status in *mdx* dystrophic diaphragm muscle. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 6, p. 289-297, 2020.
- HIND, W. H.; ENGLAND, T. J.; O'SULLIVAN, S. E. Cannabidiol protects an in vitro model of the blood–brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR $\gamma$  and 5-HT $1A$  receptors. **British journal of Pharmacology**, v. 173, n. 5, p. 815-825, 2016.
- HOWARD, Z. M. *et al.* Early inflammation in muscular dystrophy differs between limb and respiratory muscles and increases with dystrophic severity. **The American Journal of Pathology**, v. 191, n. 4, p. 730-747, 2021.
- HU, X.; BLEMKER, S. S. Musculoskeletal simulation can help explain selective muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 52, n. 2, p. 174-182, 2015.
- IANNOTTI, F. A. *et al.* Effects of non-euphoric plant cannabinoids on muscle quality and performance of dystrophic *mdx* mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1568-1584, 2019.
- JAISSER, F.; FARMAN, N. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 1, p. 49-75, 2016.
- JÎTCĂ, George *et al.* Cannabidiol: Bridge between Antioxidant Effect, Cellular Protection, and Cognitive and Physical Performance. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 485, 2023.
- KHARRAZ, Y. *et al.* Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- KIM, J. H. *et al.* Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2013.
- KLINGLER, W., *et al.* The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 31, n. 3, p. 184–195, 2012.

- KUZNETSOV, A. V. *et al.* Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient *mdx* mouse. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 183, n. 1, p. 87-96, 1998.
- LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circulation Research**, v. 94, n. 8, p. 1023-1031, 2004.
- LE, S. *et al.* Dystrophin as a molecular shock absorber. **ACS Nano**, v. 12, n. 12, p. 12140-12148, 2018.
- LEDGERWOOD, C. J. *et al.* Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 286-294, 2011.
- LI, J.; ZAGORSKI, J. W.; KAMINSKI, N. E. Establishment of a point of departure for CBD hepatotoxicity employing human HepaRG spheroids. **Toxicology**, v. 488, p. 153469, 2023.
- LUCAS, C. J.; GALETTIS, P.; SCHNEIDER, J. (2018). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477-2482, 2018.
- LUCHICCHI, A.; PISTIS, M. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. **Molecular Neurobiology**, v. 46, n. 2, p. 374- 392, 2012.
- MABOU TAGNE, A. *et al.* A novel standardized Cannabis sativa L. extract and its constituent cannabidiol inhibit human polymorphonuclear leukocyte functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1826-1833, 2019.
- MACEDO, A. B. *et al.* Photobiomodulation Therapy for Attenuating the Dystrophic Phenotype of *Mdx* Mice. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 1, p. 200–207, 2020.
- MÂNCIO, R. D. *et al.* Vitamin E treatment decreases muscle injury in *mdx* mice. **Nutrition**, v. 43, p. 39-46, 2017.
- MANNING, J.; O'MALLEY, D. What has the *mdx* mouse model of duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 36, n. 2, p. 155–167, 2015.
- MAREEDU, S. *et al.* Abnormal calcium handling in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms and potential therapies. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 647010, 2021.
- MARQUES, M. J. *et al.* Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, v. 35, n. 3, p. 349-353, 2007.
- MATSUMURA, C. Y. *et al.* Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of *MDX* mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal

stability. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, v. 39, n. 2, p. 167-176, 2009.

MENDELL, J. R. *et al.* Expression of SRP-9001 dystrophin and stabilization of motor function up to 2 years post-treatment with delandistrogene moxeparvovec gene therapy in individuals with Duchenne muscular dystrophy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1167762, 2023.

MENDELL, J. R. *et al.* Long-term safety and functional outcomes of delandistrogene moxeparvovec gene therapy in patients with Duchenne muscular dystrophy: a phase 1/2a nonrandomized trial. **Muscle & Nerve**, v. 69, n. 1, p. 93-98, 2024.

MERCURI, E.; BÖNNEMANN, C. G.; MUNTONI, F. Muscular dystrophies. **The Lancet**, v. 394, n. 10213, p. 2025-2038, 2019.

MESSINA, S. *et al.* Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in *Mdx* mice. **Experimental Neurology**, v. 198, n. 1, p. 234-241, 2006.

MILLER, E. J. *et al.* Effects of grape seed extract, lutein, and fish oil on responses of canine lens epithelial cells in vitro. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 7, p. 770-778, 2018.

MIRSKI, K. T.; CRAWFORD, T. O. Motor and cognitive delay in Duchenne muscular dystrophy: implication for early diagnosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 5, p. 1008-1010, 2014.

MOKRI, B.; ENGEL, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. **Neurology**, v. 25, n. 12, p. 1111–1120, 1975.

MOKRI, B.; ENGEL, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. **Neurology**, v. 51, n. 1, p. 1-1-a, 1998.

MONACO, A. P. *et al.* Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. **Nature**, v. 316, n. 6031, p. 842-845, 1985.

MORGAN, J. E. *et al.* Necroptosis mediates myofibre death in dystrophin-deficient mice. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3655, 2018.

MOUSLECH, Z.; VALLA, V. Endocannabinoid system: an overview of its potential in current medical practice. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 30, n. 2, p. 153- 179, 2009.

MOXLEY III, R. T. *et al.* Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. **Journal of Child Neurology**, v. 25, n. 9, p. 1116–1129, 2010.

NAIDOO, M.; ANTHONY, K. Dystrophin Dp71 and the neuropathophysiology of Duchenne muscular dystrophy. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 3, p. 1748-1767, 2020.

- NAKAE, Y. *et al.* Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and *mdx* mice. **Journal of molecular histology**, v. 35, n. 1, p. 489-499, 2004.
- NORDGREN, M.; FRANSEN, M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. **Biochimie**, v. 98, p. 56-62, 2014.
- NOVAES, R. D. *et al.* Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 1, p. 62-70, 2012.
- ODIEKA, A. E. *et al.* The medicinal natural products of *Cannabis sativa* Linn.: A review. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1689, 2022.
- OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. 1–14, 2009.
- ØRTENBLAD, N. *et al.* Role of glycogen availability in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> kinetics in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 3, p. 711-725, 2011.
- O'SULLIVAN, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 12, p. 1899-1910, 2016.
- PAGANO, S. *et al.* Biological effects of Cannabidiol on normal human healthy cell populations: Systematic review of the literature. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110728, 2020.
- PATIKORN, C. *et al.* Efficacy and safety of cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of animal intervention studies. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023.
- PATTERSON, G. *et al.* Duchenne muscular dystrophy: Current treatment and emerging exon skipping and gene therapy approach. **European Journal of Pharmacology**, p. 175675, 2023.
- PELLATI, F. *et al.* *Cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- PERTWEE, R.G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199–215, 2008.
- PETERSON, J. M. *et al.* Peptide-based inhibition of NF-κB rescues diaphragm muscle contractile dysfunction in a murine model of Duchenne muscular dystrophy. **Molecular Medicine**, v. 17, p. 508-515, 2011.
- POWERS, S. K. *et al.* Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 2, p. 941, 2011.

POWERS, S. K. Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy? **Sports Medicine**, v. 44, p. 155-165, 2014.

QUATTROCELLI, M. *et al.* Mechanisms and clinical applications of glucocorticoid steroids in muscular dystrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 8, n. 1, p. 39-52, 2021.

RADLEY, H. G.; GROUNDS, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in *mdx* mice. **Neurobiology of Disease**, v. 23, n. 2, p. 387-397, 2006.

RAJESH, M. *et al.* Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 25, p. 2115-2125, 2010.

RYBERG, E. *et al.* The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092-1101, 2007.

SACCO, A. *et al.* Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in *mdx/mTR* mice. **Cell**, v. 143, n. 7, p. 1059-1071, 2010.

SAITO, T. *et al.* Study of Duchenne muscular dystrophy long-term survivors aged 40 years and older living in specialized institutions in Japan. **Neuromuscular Disorders**, v. 27, n. 2, p. 107-114, 2017.

SAREILA, O. *et al.* Nox2 complex-derived ROS as immune regulators. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n.8, p. 2197-2208, 2011.

SHIN, J. *et al.* Wasting mechanisms in muscular dystrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2266-2279, 2013.

SILVA, R. L. *et al.* DMH-CBD, a cannabidiol analog with reduced cytotoxicity, inhibits TNF production by targeting NF- $\kappa$ B activity dependent on A2A receptor. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 368, p. 63-71, 2019.

SOHAL, R. S.; BRUNK, U. T. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 266, p. 17-26; discussion 27, 1989.

SOUNDARA RAJAN, T. *et al.* Cannabidiol activates neuronal precursor genes in human gingival mesenchymal stromal cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1531-1546, 2017.

SPASSOV, A. *et al.* Increased oxidative stress in dystrophin deficient (*mdx*) mice masticatory muscles. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 6, p. 549-552, 2011.

STAPLETON, D. I. *et al.* Dysfunctional muscle and liver glycogen metabolism in *mdx* dystrophic mice. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e91514, 2014.

STODDART, Martin J. Cell viability assays: introduction. **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols**, p. 1-6, 2011.

SUNTAR, I. *et al.* Natural products, PGC-1 $\alpha$ , and Duchenne muscular dystrophy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 5, p. 734-745, 2020.

TERRILL, J. R., *et al.* Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 17, p. 4149-4164, 2013.

THURGUR, H. *et al.* Feasibility of a cannabidiol-dominant cannabis-based medicinal product for the treatment of long COVID symptoms: A single-arm open-label feasibility trial. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2024.

TIDBALL, J. G.; WELC, S. S.; WEHLING-HENRICKS, M.. Immunobiology of inherited muscular dystrophies. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 4, p. 1313, 2018.

TORRES, L. F. B.; DUCHEN, L. W. The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse: morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**, v. 110, n. 2, p. 269-299, 1987.

TRACHOOTHAM, D. *et al.* Redox regulation of cell survival. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TULANGEKAR, A.; SZTAL, T. E. Inflammation in duchenne muscular dystrophy—exploring the role of neutrophils in muscle damage and regeneration. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1366, 2021.

TURK, R. *et al.* Muscle regeneration in dystrophin-deficient *mdx* mice studied by gene expression profiling. **BMC genomics**, v. 6, p. 1-15, 2005.

URASAKI, Y. *et al.* Potency assessment of CBD oils by their effects on cell signaling pathways. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 357, 2020.

VAN DOMMELEN, P. *et al.* Early developmental milestones in Duchenne muscular dystrophy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1198-1204, 2020.

VERHAART, I. E. C.; AARTSMA-RUS, A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 7, p. 373-386, 2019.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-356, 1998.

WANG, Y. *et al.* Cannabidiol attenuates alcohol-induced liver steatosis, metabolic dysregulation, inflammation and neutrophil-mediated injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12064, 2017.

WARD, C. W.; PROSSER, B. L.; LEDERER, W. J. Stretch-induced mechanical activation of ROS/RNS signaling in striated muscle. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 6, p. 929-936, 2014.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Proceedings of the Australian Physiological Society**, v. 33, n.1, p. 111-117, 2006.

WOODMAN, S. E.; ANTONOPOULOS, S. R.; DURHAM, Paul L. Inhibition of nociception in a preclinical episodic migraine model by dietary supplementation of grape seed extract involves activation of endocannabinoid receptors. **Frontiers in Pain Research**, v. 3, p. 809352, 2022.

YIU, E. M.; ANDREW, J. Kornberg. Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pediatrics and Child Health**, v. 51, n. 8, p. 759-764, mar. 2015.

ZOROV, D. B. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-50, 2014.

## ANEXO 1

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **ANÁLISE DA AÇÃO DO CANABIDIOL NO MODELO EXPERIMENTAL DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.**, registrada com o nº **0035/2022**, sob a responsabilidade de **Tulio de Almeida Hermes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/11/2022 a 31/10/2025**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/10-dmdmdx	28	14	14	Centro multidisciplinar para investigação biológica (cemib)
Roedor / C57bl/10sccr	28	14	14	Centro multidisciplinar para investigação biológica (cemib)

Alfenas, 13 de Outubro de 2022

**Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira**  
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

## ANEXO 2



**Client:** MEDKAYA  
Rua João de Ruão,  
3060-179, Cantanhede  
PORTUGAL

**Certificate Code:** AR-21-CC-590562-01  
**Page Number:** Page 1 of 1  
**Reported On:** 29/09/2021  
**PO reference:** 1040349  
**Reported By:** Hanin Bashir  
Analytical Services Manager

## Certificate of Analysis

Sample number	444-2021-00124633	Received on	27/09/2021
Your sample code	21-AQV-140	Analysis started on	28/09/2021
Your sample reference	MedKaya 3000mg CBD Full Spectrum / 30 ml / LTSP 0921		
Additional information	-	Production date	15/09/2021
Storage condition	Ambient	Product Code	30TINC3000
Matrix	CBD oil	Lot Number	LTSP 0921

Test Code	Analyte	Results	Units	LOQ	Method Ref.
CCBD1	Cannabichromene (CBC)	0.2719	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabichromenic Acid (CBCA)	0.0036	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabicyclol (CBL)	0.0228	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabidiol (CBD)	10.6506	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabidiolic Acid (CBDA)	0.0463	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabidivarin (CBDV)	0.2062	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabidivarinic Acid (CBDVA)	<0.0025	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabigerol (CBG)	0.6708	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabigerolic Acid (CBGA)	<0.0025	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabinol (CBN)	0.0112	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Cannabinolic Acid (CBNA)	<0.0025	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Tetrahydrocannabinolic Acid (THCA)	<0.0025	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Tetrahydrocannabivarin (THCV)	<0.0025	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Tetrahydrocannabivarinic Acid (THCVA)	<0.0025	%	0.0025 %	CBD001
CCBD1	Total CBD (CBD+(CBDA X 0.877))	10.6912	%		CBD001
CCBD1	Total THC (THC+ (THCA x 0.877))	0.1534	%		CBD001
CCBD1	Δ8- Tetrahydrocannabinol (Δ8 -THC)	<0.005	%	0.005 %	CBD001
CCBD1	Δ9- Tetrahydrocannabinol (Δ9 -THC)	0.1534	%	0.0025 %	CBD001

Opinions and interpretations within this report are outside our accreditation scope.

Pass/Fail criteria or other comments where shown are based on specifications agreed with client or Eurofins general limits and do not take in to account measurement of uncertainty, unless stated

Unless otherwise stated, all results are expressed on a sample as received basis.

This certificate of analysis shall not be reproduced except in full, without the written permission of the laboratory.

**Key:** cfu colony forming units

< denotes less than  
> denotes greater than  
- estimated value



0342

**Eurofins Food Testing UK Limited**

28-32 Brunel Road  
Westway Estate  
Acton  
W3 7XR

T +44 20 8222 6070

F +44 20 8222 6080

www.eurofins.co.uk

Registered Office:  
i54 Business Park  
Valiant Way  
Wolverhampton  
WV9 5GB  
Regd in England No: 5009315

## ANEXO 3

1

## SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA



## CERTIFICADO DE ANÁLISE

<b>Insumo:</b>	Oleo De Semente Uva	<b>Data de Análise:</b>	12-01-2023
<b>Lote Interno:</b>	22L15-B056-099396	<b>Lote Fabricante:</b>	76/02
<b>Data de Fabricação:</b>	01-12-2022	<b>Data de Validade:</b>	01-06-2024
<b>Origem:</b>	Brasil	<b>Procedência:</b>	Brasil
<b>Condições de Armazenamento:</b>	Temperatura Ambiente	<b>Ordem de Fracionamento:</b>	099396

<b>DCB:</b>	-	<b>DCI:</b>	-
<b>CAS:</b>	8024-22-4	<b>Peso Molecular:</b>	-
<b>Fórmula Molecular:</b>	-		
	-		
	-		
<b>Observações:</b>	<b>Parte Utilizada:</b>	Óleo de semente	<b>Nome Científico:</b> Vitis vinifera

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Líquido transparente, amarelo a amarelo esverdeado, com odor característico.	Conforme		Fabricante
Densidade relativa *	0,908 - 0,926	0,917	g/cm <sup>3</sup>	Fabricante
Índice de acidez	<= 2,0	0,06	mg KOH/g	Fabricante
Índice de iodo	118 - 138	129	cgI/g	Fabricante
Índice de peróxido	<= 10,0	0,2	meq/kg	Fabricante
Índice de saponificação	188 - 194	191	mg KOH/g	Fabricante
Umidade	<= 0,3	Isento	%	Fabricante


\* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

## Conclusão:

Aprovado  (X)  
Reprovado  ( )

  
Farmacêutico Responsável  
João Paulo Sartin Mendes  
CRF-GO: Nº 7.355  
Fagron Services Brasil

  
Farmacêutico Responsável  
Victória Almeida  
CRF-SP: Nº 104.102  
Fagron Brasil  
SAT: (11) 4785-5600

  
Farmacêutico Responsável  
Amanda R. Victorino  
CRF-SP: Nº 50.836  
Fagron Distribution Brasil  
SAT: (11) 5186-4840

Fim do Documento