



Programa de Pós-Graduação em  
**Ciências da Saúde**  
Mestrado e Doutorado - UNISUL  
**JAIME AMADOR SOARES**

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE  
O COMPROMETIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM UM MODELO  
ANIMAL DE DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA 1D**

**PALHOÇA  
2015**

**JAIME AMADOR SOARES**

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE  
O COMPROMETIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM ANIMAIS COM  
DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA 1D**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Clarissa M. Comim, Dra.

**PALHOÇA**

**2015**

**JAIME AMADOR SOARES**

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE  
O COMPROMETIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM ANIMAIS COM  
DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA 1D**

**Esta Dissertação foi julgada adequada  
pelo Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde - Mestrado, para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.**

Palhoça, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015

---

Orientadora: Profa. Clarissa M. Comim, Dra.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof. Daniel F. Martins, Dr.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Profa. Patrícia Alves Reis, Dra.  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Dedico esta dissertação a todas as pessoas portadoras de Distrofia Muscular Congênita. E as pessoas que me deram a vida: Cenilda Amador Soares e Erasmo Severo Soares (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os professores do PPGCS-UNISUL, em especial a minha orientadora Professora Doutora Clarissa Martineli Comim pela forma como conduziu o processo de construção deste estudo com imensa dedicação, respeito, profissionalismo e generosidade em todas etapas.

Agradeço aos meus amigos Andre Cremonezi, Anjor Mujica, Yu Tao e Diórgenes de Moraes Alves pelo apoio fundamental.

Agradeço aos colegas do Instituto Federal do Paraná por todo incentivo e ajuda.

Agradeço ao meu grande amor Cintia Vieira, por todo o apoio e incentivo, pela paciência ilimitada que teve em todos os momentos destes dois anos.

E, por fim, agradeço imensamente às minhas amigas e filhas Tábatta e Gabriela por todo amor incondicional e por me fazer superar obstáculos desta vida.

## RESUMO

Distrofia Muscular Congênita do tipo 1D é caracterizada por uma hipoglicosilação da proteína  $\alpha$ -Distroglicana ( $\alpha$ -DG), e isto pode estar fortemente implicada em um aumento da degeneração do tecido muscular esquelético e no desenvolvimento anormal do sistema nervoso central, levando ao comprometimento cognitivo. No entanto, a fisiopatologia do envolvimento do encéfalo ainda não está clara. O exercício físico de baixa intensidade é conhecido por diminuir alguns parâmetros associados à degeneração muscular em modelos animais de outras formas de distrofias musculares progressivas. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade sobre o envolvimento cognitivo e estresse oxidativo em tecido encefálico e do músculo gastrocnêmio. Foram utilizados camundongos machos adultos, homozigotos (KO), heterozigotos (HT) e selvagens (WT). Ao completarem 28 dias de vida, foram submetidos a um protocolo de exercício físico de baixa intensidade por 8 semanas. Vinte quatro horas após o último dia de treinamento, os animais foram submetidos ao teste de esQUIVA inibitória e ao teste de campo aberto, para avaliação da memória aversiva e de habituação, respectivamente. As estruturas encefálicas do estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e córtex e o músculo gastrocnêmio foram retirados para avaliação da carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica e atividade da catalase e superóxido dismutase. Verificou-se o protocolo de exercício físico de baixa intensidade reverteu a alteração na memória aversiva e de habituação. O aumento da carbonilação de proteínas em estriado, córtex pré-frontal e hipocampo bem como a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e hipocampo também foram revertidas pelo protocolo utilizado nos camundongos KO treinados em comparação aos não treinados. Já na avaliação da atividade antioxidante, o protocolo utilizado aumentou a atividade da catalase em hipocampo e córtex dos animais KO treinados quando comparados aos não treinados. No gastrocnêmio foi verificado que o uso do protocolo estudado diminuiu a carbonilação de proteínas e a peroxidação lipídica e aumentou a atividade da catalase e da superóxido dismutase. Em conclusão, pode-se inferir que a utilização de um protocolo de exercício de baixa intensidade durante 8 semanas foi capaz de reverter o dano cognitivo e diminuir o estresse oxidativo em tecido encefálico e no músculo gastrocnêmio de animais com DMC1D.

**Palavras-chave:** camundongos *Large<sup>myd</sup>*; memória; estresse oxidativo; sistema nervoso central.

## ABSTRACT

Congenital Muscular Dystrophy type 1D is characterized by a hipoglicosilação of  $\alpha$ -dystroglycan protein ( $\alpha$ -DG), and this can be strongly implicated in an increase of the degeneration of skeletal muscle tissue and abnormal development of the central nervous system, leading to cognitive impairment. However, the pathophysiology of brain involvement is still unclear. The low-intensity exercise is known to decrease some parameters associated with muscular degeneration in animal models of other forms of progressive muscular dystrophies. The objective of this study was to analyze the effects of aerobic exercise protocol of low intensity on cognitive involvement and oxidative stress in brain tissue and the gastrocnemius muscle. It were used adult male, homozygous (KO), heterozygous (HT) and wild (WT) mice. To complete 28 days of life, they underwent a physical exercise protocol of low intensity for 8 weeks. Twenty four hours after the last day of training, animals were submitted to inhibitory avoidance test and open field test to evaluate the aversive and habituation memory, respectively. The structures of the brain striatum, prefrontal cortex, hippocampus and cortex and gastrocnemius muscle were taken for evaluation of protein carbonylation, lipid peroxidation and activity of catalase and superoxide dismutase. There was low-intensity exercise protocol reversed the change in aversive memory and habituation. The increase in protein carbonylation in striatum, prefrontal cortex and hippocampus and lipid peroxidation in the prefrontal cortex and hippocampus were also reversed by the protocol used in the trained KO mice in comparison to nontrained. In the evaluation of the antioxidant activity, the protocol used increased catalase activity in hippocampus and cortex of the animals trained KO compared to untrained. The gastrocnemius was found that the use of the study protocol decreased the protein carbonylation and lipid peroxidation and increased activity of catalase and superoxide dismutase. In conclusion, it can be inferred that the use of low intensity exercise protocol for 8 weeks was able to reverse the cognitive damage and reduce oxidative stress in brain tissue and in the gastrocnemius muscle of animals with DMC1D.

**Keywords:** Large<sup>myd</sup> mice; memory; oxidative stress; central nervous system.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA** – Análise de variância teste estatístico

**ATP** – Trifosfato de adenosina

**BDNF** – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

**CAT** – Catalase

**CEUA** – Comitê de Ética em Pesquisa do Uso de Animais

**DMC** – Distrofia Muscular Congênita

**DMC1D** – Distrofia Muscular Congênita tipo 1D-Gene LARGE

**DMD** – Distrofia Muscular de Duchenne

**DMP** – Distrofia Muscular Progressiva

**DMS** – Distrofia Miotônica de Steinert

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DNPH** – Dinitrofenilidrazina

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio

**GFAP** – *Glial Fibrillary Acidic Protein*

**GSH** – Glutathione peroxidase

**GSSG** – Glutathione redutase

**HT** – Camundongos heterozigotos

**KO** – Camundongos LARGE nocautes

**LaNEX** – Laboratório de Neurociências Experimental

**LARGE** – Like-acetilglucosaminiltransferase

**MIA** – Morte Indolor Assistida

**SBNeC** – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SOD** – Atividade de Superóxido Dismutase

**TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

**UNISUL** – Universidade do Sul de Santa Catarina

**USP** – Universidade de São Paulo

**WT** – Camundongos selvagens (*wild-type*)

**α-DG** – Alfa-distroglicana

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Grupos experimentais.....                                                                                                                             | 22 |
| Figura 1 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a memória aversiva e de habituação de camundongos.....                          | 26 |
| Figura 2 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de camundongos.....                | 28 |
| Figura 3 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre avaliação da carbonilação de proteínas em tecido encefálico de camundongos..... | 30 |
| Figura 4 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a peroxidação lipídica em tecido encefálico em camundongos.....                 | 31 |
| Figura 5 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a atividade da catalase em tecido encefálico de camundongos.....                | 32 |
| Figura 6 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a superóxido dismutase em tecido cerebral de camundongos.....                   | 34 |

## SUMÁRIO

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                              | 10 |
| 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO                                           | 11 |
| 1.1.1 Distrofias Musculares Progressivas                          | 11 |
| 1.1.2 Distrofias Musculares Congênitas                            | 12 |
| 1.1.3 Distrofia Muscular Congênita 1D                             | 13 |
| 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO                                            | 15 |
| 1.3 EXERCÍCIO FÍSICO                                              | 17 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                               | 20 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                                | 20 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                         | 20 |
| <b>3. MÉTODOS</b>                                                 | 21 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDO                                                | 21 |
| 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS                                         | 21 |
| 3.3 ASPECTOS ÉTICOS                                               | 21 |
| 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL                                          | 21 |
| 3.4.1 Grupos experimentais                                        | 22 |
| 3.4.2 Protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade | 22 |
| 3.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS                                           | 23 |
| 3.5.1 Mensurações de Estresse Oxidativo                           | 23 |
| 3.5.2 Dosagens de Proteínas                                       | 24 |
| 3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS                                        | 24 |
| 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS                                         | 25 |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                              | 26 |
| 4.1 MEMÓRIA AVERSIVA E DE HABITUAÇÃO                              | 26 |
| 4.2 ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO                    | 27 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM TECIDO ENCEFÁLICO   | 29 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TECIDO ENCEFÁLICO        | 31 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE EM TECIDO ENCEFÁLICO       | 32 |
| 4.6 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM TECIDO CEREBRAL          | 33 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                                               | 35 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>                                               | 40 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                | 41 |
| <b>ANEXO</b>                                                      | 52 |

## 1. INTRODUÇÃO

As Distrofias Musculares Progressivas (DMP) descrevem um conjunto de patologias clínicas e geneticamente heterogêneas, com características comuns como atrofia muscular progressiva, perda de força muscular, deformidades ósseas e padrão progressivo de degeneração<sup>1,2</sup>. A Distrofia Muscular Congênita do tipo 1D (DMC1D) é caracterizada por uma hipoglicosilação da proteína  $\alpha$ -dystroglicana ( $\alpha$ -DG), devida ao funcionamento anormal do gene *LARGE*. Acomete os músculos esqueléticos associado a atrofia e perda das fibras musculares e da função. A hipoglicosilação da proteína  $\alpha$ -DG também está fortemente implicada no desenvolvimento anormal do sistema nervoso central (SNC), levando ao comprometimento cognitivo em pacientes<sup>3,4</sup> e em modelo animal<sup>5,6</sup>. Várias estratégias terapêuticas foram propostas a fim de reduzir a progressão das DMP, incluindo a implantação de um programa de exercícios físicos de baixa intensidade<sup>7</sup>. Entretanto, não existem estudos definitivos sobre a implementação da prática de exercícios físicos neste grupo populacional<sup>8</sup>.

O exercício físico tem sido citado na literatura como um fator importante para o bem-estar e para a qualidade de vida por diminuir o estresse oxidativo e promover a neurogênese<sup>9</sup>. Estudos demonstram que protocolos de exercício físico de baixa intensidade são capazes de diminuir a progressão de alguns tipos de distrofias, como a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)<sup>10,11</sup>. Um estudo verificou que, utilizando um protocolo de exercício físico de baixa intensidade, houve uma diminuição do dano oxidativo em músculo esquelético em camundongos MDX (modelo animal para DMD)<sup>12</sup>. No entanto, no modelo animal de DMC1D, o camundongo *LARGE<sup>myd</sup>*, não há dados científicos que esclareça os efeitos do exercício físico nas alterações no músculo esquelético ou no SNC. Recentemente, foi demonstrando que a glicosilação anormal da  $\alpha$ -DG pode afetar o processo de armazenamento da memória, causando comprometimento da memória e do aprendizado<sup>6</sup> além de um aumento do dano oxidativo em tecido encefálico<sup>5</sup> em animais *LARGE<sup>myd</sup>*.

Neste contexto, o foco deste estudo é verificar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade sobre o comprometimento do SNC em animais *LARGE<sup>myd</sup>*. A hipótese é que o protocolo de exercício de baixa intensidade seja capaz de diminuir ou reverter o dano cognitivo e o estresse oxidativo em tecido

em tecido encefálico sem alterar o padrão fisiopatológico dos músculos esqueléticos, ou seja, sem aumentar a progressão da doença em tecido muscular.

A DMC1D é uma patologia considerada incurável e debilitante. Atualmente os meios para amenizar as progressivas alterações musculares e cerebrais incluem as práticas de Fisioterapia como os alongamentos têndino-musculares e os exercícios físicos ativos e muitas vezes ativos assistidos. O exercício físico regular de baixa intensidade é recomendado para melhorar o desempenho fisiológico do músculo esquelético além de diminuir o estresse oxidativo nos tecidos, promover neurogênese e melhorar as capacidades cognitivas. No entanto, em indivíduos que são acometidos pelas DMP, o uso de exercícios tem sido discutido de forma controversa; não existe atualmente um protocolo seguro e eficaz para manter a força e a função muscular e que não proporcione riscos de danos ao músculo distrófico. Para os pacientes com DMP, o exercício físico precisa ser de baixa intensidade para diminuir a progressão da degeneração muscular. Sabendo que o camundongo LARGE<sup>myd</sup> é o modelo para o estudo da DMC1D e apresenta intenso comprometimento do SNC e que a prática de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade diminui o estresse oxidativo em músculo esquelético em outros modelos animais de DMP, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade sobre estresse oxidativo em tecido encefálico e no gastrocnêmio e sobre a memória e o aprendizado em animais LARGE<sup>myd</sup>. Os dados obtidos com este estudo poderão elucidar o papel do exercício físico aeróbio de baixa intensidade como prática regular no tratamento da DMC1D a fim de contribuir para desacelerar o processo de degeneração e no entendimento da fisiopatologia envolvida no processo.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Distrofias Musculares Progressivas

As DMP formam um grupo heterogêneo de doenças, geneticamente determinadas, que se caracterizam clinicamente por intensa variabilidade do fenótipo e anátomo-patologicamente pelo padrão distrófico inespecífico. Possuem como característica, miopias primárias, com curso invariavelmente progressivo,

perda da massa muscular e hipotonia muscular, ocasionadas pela degeneração do tecido muscular esquelético. Clinicamente apresentam variabilidade nas manifestações quanto a herança genética, idade de início da sintomatologia, musculatura atingida, e velocidade da evolução e manifestação da doença<sup>13,14</sup>.

Atualmente existem mais de 40 tipos de DMP classificadas, associadas a uma alteração genética que irá interferir funcionalmente no complexo de glicoproteínas da membrana celular pela modulação e/ou ausência de uma determinada proteína, levando ao aparecimento dos sinais e sintomas característicos de cada tipo de DMP, ou seja, o defeito genético irá alterar a função de uma determinada proteína do complexo de glicoproteínas, modificando sinais fisiológicos, ancoragem de proteínas associadas e alterando vias de sinalizações importantes, levando a morte da célula<sup>2,15</sup>. Neste estudo, o foco será a Distrofia Muscular Congênita 1D (DMC1D), causada pela ausência do gene *LARGE* responsável pela glicosilação da  $\alpha$ -distroglicana ( $\alpha$ -DG)<sup>16,17</sup>.

### **1.1.2 Distrofias Musculares Congênitas**

As Distrofias Musculares Congênitas (DMC), também conhecidas como distroglicanopatias, são patologias predominantemente de herança autossômica recessiva, com suas manifestações clínicas advindas na infância. Se apresenta como a distrofia mais prevalente, acometendo 1 a cada 3.500 nascidos vivos. O quadro clínico envolve diferentes manifestações incluindo histórico de poucos movimentos no período intrauterino, hipotonia ao nascimento, distúrbios respiratórios, apneia, progressiva hipotrofia muscular, atrofia muscular, deformidade músculo-esqueléticas e atraso no desenvolvimento motor<sup>18-20</sup>.

Foi descrita pela primeira vez em meados dos anos 60, porém o primeiro caso diagnosticado foi em 1972. Ao exame de biópsia muscular é observada a presença de miopatia distrófica, com alteração das fibras musculares, desenvolvimento anormal do tecido conjuntivo e a substituição do tecido muscular esquelético por tecido adiposo e fibrótico. Os déficits podem se restringir a musculatura ou ainda afetar o SNC. Alguns estudos envolvendo pacientes evidenciaram alterações estruturais com extensa anormalidades da substância branca e diminuição da massa cerebral, indicativo de um defeito de migração

neuronal<sup>4</sup> com associação a um atraso cognitivo e deficiência intelectual em 70% dos portadores de distroglicanopatias<sup>20-22</sup>.

Para as DMC serem diagnosticadas é preciso uma equipe de especialistas com experiência na área de genética e de neurologia. Estudar o histórico familiar com riqueza de detalhes e realizar diagnóstico molecular são fundamentais para definir o tipo de DMC. Além disso, é necessário realizar testes genéticos, biópsia muscular, ressonância magnética do encéfalo e do músculo e determinação da atividade da expressão da proteína creatina quinase em plasma sanguíneo, uma vez que nesses pacientes se mostram aumentados<sup>23</sup>.

A DMC foi associada a mutações em genes responsáveis por codificar enzimas glicosiltransferases<sup>22</sup>. Deleções de alguns genes já foram reconhecidas como causadores das distroglicanopatias como POMT1, POMGnT1, FKTN e LARGE<sup>24</sup>. O gene LARGE recebe esta denominação por possuir 660Kb do ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico<sup>22</sup> e deleções deste gene estão relacionadas a uma hipoglicosilação da proteína  $\alpha$ -DG. Esta é uma proteína altamente glicosilada sendo importante para as interações célula/matriz extracelular e na migração das células neuronais<sup>24</sup>. Pacientes que apresentam deleções no gene LARGE recebem o diagnóstico de DMC1D, conhecida como a mais prevalente entre as DMC<sup>25</sup>.

### **1.1.3 Distrofia Muscular Congênita 1D**

A DMC1D é caracterizada por uma hipoglicosilação da proteína  $\alpha$ -DG, sendo fortemente implicada como tendo um papel causal no aumento da permeabilidade da membrana celular durante o potencial de ação. Ela é responsável, junto com outras proteínas do complexo de glicoproteínas, pela permeabilidade da membrana celular. Uma hipoglicosilação da  $\alpha$ -DG é associada a um influxo excessivo de cálcio para o citoplasma causando contração excessiva e ruptura da fibra e da membrana celular, resultando em um processo inflamatório crônico, aumento do estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético com diminuição da produção de ATP (trifosfato de adenosina), resultando em morte celular<sup>26</sup>. Nos músculos esqueléticos, leva a uma perda das fibras musculares, ocasionando degeneração progressiva e perda da função muscular. No SNC, é associada a anomalias como deficiência intelectual grave<sup>24</sup>. Exames de ressonância magnética de pacientes com

DMC1D mostram extensas anormalidades na substância branca e sutis mudanças estruturais indicando alterações na migração neuronal<sup>3,4</sup>. Pacientes portadores de DMC1D demonstraram alterações cognitivas importantes, progressiva deterioração nas habilidades motoras adquiridas e significativo declínio em funções linguísticas, evidenciando o envolvimento predominante das funções cognitivas<sup>27</sup>. Estudos neuropatológicos em pacientes demonstraram emaranhados neurofibrilares em várias regiões do cérebro, especialmente no hipocampo<sup>28</sup>. Sabe-se que a migração neuronal é determinante no período de formação do cérebro dos mamíferos. Defeitos nessa migração e na desorganização da laminação cortical e da sua arquitetura podem estar envolvidos no atraso mental e nas dificuldades de aprendizagem<sup>29</sup>. O papel das diferentes proteínas envolvidas na migração neuronal e organização cerebral durante o desenvolvimento ainda não está muito claro. Assim, parece que a ruptura da lâmina basal, causada pela perda de interação entre a hipoglicosilação da  $\alpha$ -DG e o seu ligante, desempenha um papel na patogênese do envolvimento do SNC e consequentemente nas alterações cognitivas na DMC1D, visto que ocorrem em maior frequência em hipocampo e córtex cerebral<sup>30</sup>.

O modelo animal de DMC1D é o camundongo  $LARGE^{myd}$ , mutação da raça C57BL desenvolvido no laboratório *Jackson* Estados Unidos em 1963 para investigar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no processo patológico desta distroglicanopatia. Apresenta uma deleção genética nos éxons 4-6, gene que codifica glicosiltransferase da proteína  $\alpha$ -DG<sup>31</sup>. Estudos indicam que por ter uma glicosilação deficiente, pode haver uma degeneração celular mecânica ocasionando uma ruptura na ligação distroglicana-laminina, uma vez que há um aumento da interação com o domínio N-terminal da proteína  $\alpha$ -DG<sup>32</sup>.

Camundongos homozigotos  $LARGE^{myd}$  apresentam DMC1D com intenso comprometimento do tecido muscular esquelético, coração, retina e Sistema Nervoso Periférico (SNP) e SNC<sup>33</sup>. Alterações no SNC, anormalidades morfológicas no giro denteado<sup>34</sup>, migração neuronal deficitária principalmente em córtex cerebral e cerebelo<sup>35,36</sup>, aumento da expressão de Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) pelos astrócitos e grave embotamento eletrofisiológico no potencial de longo prazo (LTP) no hipocampo<sup>35</sup>, são características apresentadas por este modelo animal. A LTP no hipocampo é uma forma de plasticidade que se acredita ser fundamental para o processo de aprendizagem e formação de memória<sup>35,36</sup>. Recentemente verificou-se que animais  $LARGE^{myd}$  apresentam comprometimento da memória e do

aprendizado<sup>6</sup>, diminuição dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), alterações no metabolismo energético e dano oxidativo em tecido encefálico<sup>5</sup>.

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Sob condições fisiológicas normais, o oxigênio é metabolizado no organismo onde 95 a 98% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons. Sendo que, os 2 a 5% restantes, são utilizados na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)<sup>37</sup>. A molécula de oxigênio pode aceitar quatro elétrons para ser reduzida a duas moléculas de água, como pode, também, ser reduzida por um elétron por vez, levando a produção de ERO<sup>38</sup>. O tecido encéfalo é particularmente vulnerável à produção de ERO, uma vez que metaboliza 20% do oxigênio total do corpo e possui uma quantidade limitada de capacidade antioxidante. Em situações em que a geração de ERO excede a capacidade de defesa antioxidante, surge a situação de estresse oxidativo, levando à degradação da membrana, disfunção celular e apoptose. ERO são considerados radicais livres ou moléculas/ânions reativos contendo átomos de oxigênio como o radical hidroxil, o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o peróxido nitrito. Eles podem causar dano celular por inativação enzimática, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e modificação do DNA. O Estresse oxidativo pode ser resultado do aumento da produção de ERO, diminuição da defesa antioxidante ou a incapacidade de reparar o dano oxidativo<sup>39</sup>.

A defesa antioxidante é a capacidade de interromper reações de óxido-redução, realizada através de enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH) e glutathione redutase (GSSG), onde estão localizadas em diferentes compartimentos celulares. Porém há também antioxidantes não enzimáticos, como algumas vitaminas (A, E, C betacaroteno), oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio etc.), bioflavonoides, entre outros<sup>40,41</sup>.

O estresse oxidativo em pacientes e modelos animais é bem conhecido por contribuir para a degeneração neuronal no processo de envelhecimento, bem como em doenças neurodegenerativas, tais como a Esclerose Lateral Amiotrófica<sup>42</sup>, Doença de Alzheimer<sup>43</sup>, Doença de Parkinson<sup>44</sup>, Depressão Maior<sup>45</sup> entre outras. O

estresse oxidativo e o aumento de geração de ERO são considerados como prováveis mecanismos relacionados como o gatilho da desregulação homeostática, apoptose da membrana e núcleos celulares das fibras musculares e consequente atrofia muscular em doenças neuromusculares<sup>46</sup>. No músculo distrófico, o estresse oxidativo é um fator patogênico que pode contribuir significativamente para potencializar as graves alterações celulares associadas a degeneração<sup>47,48</sup>.

Em camundongos LARGE<sup>myd</sup> verificou-se o aumento da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e um aumento da carbonilação de proteínas no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex<sup>5</sup>. Outros modelos animais de DMP como os camundongos MDX apresentam estresse oxidativo em tecido encefálico<sup>49</sup>. Estudos reportam a presença de estresse oxidativo em músculo esquelético de pacientes com DMD e em camundongos MDX<sup>50,51</sup>. Os níveis elevados de estresse oxidativo também provocam perda de massa muscular e aumento da resposta inflamatória, interferindo no processo de regeneração celular<sup>52</sup>. Estudos recentes evidenciaram que pacientes com DMD e Distrofia Miotônica de Steinert (DMS) apresentam uma diminuição da atividade da SOD em soro quando adultos. Estes níveis são associados a uma diminuição da funcionalidade global na DMD<sup>53</sup>. Um estudo identificou em pacientes portadores de DMD estresse oxidativo em seis proteínas oxidadas incluindo duas proteínas mitocondriais, ligando assim o estresse oxidativo à disfunção mitocondrial<sup>54</sup>. Os mecanismos pró e antioxidantes podem ser correlacionados com a gravidade das DMPs e pode influenciar as co-morbidades relativas às patologias distróficas. Embora a relação entre a inflamação, lesão muscular e fraqueza é clara, o estresse oxidativo elevado tem sido proposta como um mecanismo de forte contribuição para a degeneração celular nas DMP<sup>55</sup>.

Alterações no complexo de glicoproteínas causam uma inflamação crônica. Esta inflamação crônica pode estar envolvida no estresse oxidativo, levando a um significativo dano celular e necrose. Portanto, o estresse oxidativo está envolvendo na fisiopatologia das DMP<sup>56-58</sup>. Ciclos repetidos de dano e reparo celular, característicos na maioria das DMP, levam a um aumento de fibrose e perda da função celular<sup>56</sup>.

### 1.3 EXERCÍCIO FÍSICO

Na literatura encontra-se que o exercício físico pode ser um agente de promoção do bem-estar, qualidade de vida e também um importante recurso terapêutico para a manutenção da saúde, prevenção e tratamento de patologias<sup>9</sup>. Define-se exercício físico como toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem por objetivo a melhoria e a manutenção de um ou mais componentes da aptidão física<sup>59-60</sup>. O exercício físico quando prescrito e executado adequadamente melhora as capacidades fisiológicas dos músculos como massa e força muscular<sup>61</sup>, previne e auxilia no tratamento de doenças metabólicas<sup>62</sup>, reduz a adiposidade corporal<sup>63</sup>, controla a hipertensão arterial sistêmica<sup>64</sup>, melhora o perfil lipídico<sup>62</sup> e aumenta a capacidade funcional<sup>65</sup>.

A neurociência tem atualmente voltada a sua atenção a análise dos efeitos benéficos da prática regular do exercício físico. Desta maneira tem sido verificado seu efeito neuroprotetor e terapêutico em diversas doenças neurodegenerativas. Neste contexto, estudos suportam uma associação entre níveis altos de atividade física e baixos índices de transtornos psiquiátricos. No tratamento da depressão, estudos clínicos randomizados controlados sugerem efeitos positivos da prática regular de exercício físico, semelhantes ao observado com intervenções psicoterapêuticas<sup>66</sup>. Outro estudo mostrou que a prática regular de exercício físico de baixa intensidade na modalidade caminhada em esteira foi eficaz como tratamento coadjuvante em pacientes com diagnóstico de transtorno depressivo leve e moderado<sup>67</sup>. Em doenças neurodegenerativas, o papel do exercício físico também é descrito. Um estudo randomizado com 30 pacientes com diagnóstico de doença de Parkinson em estágio inicial, foram submetidos a um protocolo de exercício físico de baixa, média e alta intensidade em esteira por 24 sessões ao longo de 8 semanas. Os indivíduos do grupo de média e baixa intensidade apresentaram um aumento na velocidade de marcha, comprimento de passo, amplitude de movimento e melhora na capacidade de sentar<sup>68</sup>. Já em pacientes com diagnóstico de Alzheimer, um estudo avaliou o efeito do exercício físico moderado do tipo caminhada. Após 16 semanas, houve melhora na função cognitiva e na capacidade funcional<sup>69</sup>.

Em modelos animais, tem sido demonstrado que a prática regular de exercício físico melhora a função cognitiva, neuroquímica, mitocondrial e oxidativa do SNC, induzindo neuroplasticidade, facilitando os processos neurogenerativos,

neuroadaptativos e neuroprotetores<sup>61</sup>. Um estudo utilizando um protocolo de exercício físico na esteira antes da indução da Doença de Alzheimer em animais, foi capaz de prevenir o déficit cognitivo, as alterações no potencial a longo prazo e reduziu as concentrações e depósito de  $\beta$ -amilóide no hipocampo<sup>71</sup>. Os roedores são os principais modelos animais de estudo para os paradigmas do exercício físico nas funções cerebrais e seus mecanismos. Os resultados do uso de protocolos de exercício físico no tecido encefálico são muito controversos, mas geralmente demonstram ganhos na plasticidade sináptica e na função cognitiva com exercícios de intensidade moderada e baixa<sup>72</sup>. Acredita-se que exercícios moderados aumentam a cognição, sendo que recentemente foi demonstrado que o cérebro é responsivo à atividade física regular<sup>73-74</sup>. Neste sentido, foi demonstrado que o exercício físico intenso não altera as atividades das enzimas antioxidantes no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal 24 horas após o exercício<sup>75</sup>.

A corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e obriga o animal a correr em uma velocidade constante, de acordo com as configurações de treinamento físico do experimento como tempo, duração, velocidade<sup>73</sup> e inclinação<sup>77-78</sup>. A corrida em esteira é geralmente selecionada devido às maiores respostas do metabolismo aeróbio do que a natação<sup>79</sup>, pois esta é caracterizada por relativa inatividade das patas traseiras<sup>80</sup>. O treinamento de intensidade controlada em esteira induz alguns dos maiores e mais consistentes efeitos do treinamento físico<sup>81-82</sup>.

Poucos estudos na literatura científica apoiam a realização de exercícios físicos em pacientes com doenças neuromusculares, pois existe um alto risco de exacerbação dos sintomas<sup>11,83</sup>. Por questões éticas, poucos estudos são realizados em seres humanos. Assim sugere-se que estudos com o propósito de verificar os efeitos do exercício físico aeróbio nas DMP devem ser realizados inicialmente com modelos animais<sup>84</sup>. Neste cenário, o modelo animal de DMD, o camundongo MDX, têm sido utilizados em diferentes protocolos de exercício físico. No entanto, nenhum estudo tem sido realizado com camundongos LARGE<sup>myd</sup> afim de verificar o efeito do exercício físico sobre o processo degenerativo celular tanto em músculo esquelético quanto em tecido encefálico.

Entre os efeitos do exercício físico citados acima, ele também é responsável por aumentar a produção de ERO pelo acréscimo do consumo de oxigênio mitocondrial nos tecidos. O dano oxidativo cerebral é um mecanismo etiopatológico

comum de apoptose e da neurodegeneração<sup>72</sup>. O exercício físico em modelo animal, quando realizado em alta intensidade, foi associado a indução de dano e lesão celular. Há evidências de aumento de produção de ERO e diminuição de defesa antioxidante endógena e eventualmente dano celular<sup>62,10</sup>. O modelo de exercícios extenuantes e de alta intensidade pode induzir a perda da capacidade motora e dano celular, exacerbando as manifestações características das distroglicanopatias<sup>85-88</sup>. Já o uso de protocolos de exercício físico de baixa intensidade tem mostrado resultados animadores. Após um protocolo de exercício físico de baixa intensidade, 2 vezes por semana, durante 8 semanas em esteira, animais MDX apresentaram significativa diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade de enzimas antioxidantes<sup>12</sup>. O exercício físico quando praticado de forma moderada e de baixa intensidade, aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e, portanto, deve ser considerado um antioxidante<sup>85</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade sobre as alterações no sistema nervoso central em animais com Distrofia Muscular Congênita 1D.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade sobre a memória aversiva e memória de habituação.

Avaliar as alterações provocadas por um protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade sobre a carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica em tecido encefálico e músculo gastrocnêmio.

Verificar os efeitos ocasionados por um protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade sobre a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em tecido encefálico e músculo gastrocnêmio.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo foi classificado como sendo do tipo experimental utilizando um modelo animal<sup>89</sup>.

#### 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos homozigotos, nocautes para o gene LARGE; camundongos heterozigotos, que possuem 50% da deficiência do gene LARGE e camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 provenientes do biotério da Universidade de São Paulo - USP/SP com 28 dias, pesando entre 25-30g, mantidos sob temperatura e umidade controladas ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 60 a 80% de umidade). Os animais foram acondicionados em 5 animais por caixa residência em ciclo claro escuro de 12 horas (06:00 às 18:00), com livre acesso a ração e água filtrada. Os experimentos foram conduzidos entre às 8h e às 17h, após aclimação dos animais para o laboratório. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério Experimental do Laboratório de Neurociência Experimental – LaNEX na UNISUL.

#### 3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais e a da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) para o cuidado e o uso de animais de laboratório. A Imobilização do animal foi utilizada somente durante os procedimentos necessários aos respectivos modelos animais, bem como para os tratamentos descritos para os diferentes grupos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL (Protocolo nº 13.035.4.08.IV) (Anexo A).

#### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

### 3.4.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, cada grupo foi composto por 15 animais e o número total de 90 animais para este estudo.

Quadro 1 – Grupos experimentais

|                                                                                                      |                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1º grupo experimental</b><br>15 animais Homozigotos<br>LARGE <sup>myd</sup> (KO)<br>Não treinados | <b>2º grupo experimental</b><br>15 animais Homozigotos LARGE <sup>myd</sup><br>(KO)<br>Treinados |
| <b>3º grupo experimental</b><br>15 animais Heterozigotos (HT)<br>Não treinados                       | <b>4º grupo experimental</b><br>15 animais Heterozigotos (HT)<br>Treinados                       |
| <b>5º grupo experimental</b><br>15 animais Selvagens (WT)<br>Não treinados                           | <b>6º grupo experimental</b><br>15 animais Selvagens (WT)<br>Treinados                           |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Este projeto utilizou dez animais para os testes comportamentais e cinco animais para as análises moleculares, para conseguir tamanho amostral significativo, mesmo com a eventual perda de animais durante a execução dos experimentos. Esse projeto de pesquisa utilizou o máximo de estruturas de um único animal para as análises moleculares a fim de se reduzir à quantidade de animais utilizados.

### 3.4.2 Protocolo de exercício físico aeróbico de baixa intensidade

Os animais do grupo exercício foram submetidos a um protocolo de treinamento de exercício físico de baixa intensidade durante 8 semanas com o treinamento sendo realizado duas vezes por semana em uma esteira com velocidade e tempo programados e adaptados para este fim, a uma velocidade média de 9 metros por minuto durante 30 minutos<sup>12</sup>. Os animais do grupo não treinado, não realizaram nenhum tipo de exercício físico, permanecendo em suas caixas moradia durante o período do experimento, porém foram transportados

durante os horários de treino e testes, para o mesmo local em que os animais do grupo exercícios, permanecendo em suas respectivas caixas residentes.

Vinte e quatro horas após o último dia de exercício, 10 animais por grupo foram submetidos a testes comportamentais para avaliar memória através dos testes de Memória de Habituação (Teste de Campo Aberto) e Memória Aversiva (Esquiva Inibitória). Os testes foram realizados entre as 8h e às 16h em uma sala devidamente preparada para este fim. Durante os experimentos, os animais foram transportados para a sala de comportamento 30 minutos antes dos testes para aclimação. Os testes comportamentais foram realizados pelo mesmo avaliador, “cego” para os grupos experimentais. Os outros 5 animais (por grupo) serão mortos pelo método de Morte Indolor Assistida (MIA) para a retirada do córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e córtex que foram isolados para posterior análise e acondicionadas em tubos plásticos congelando-se a -80°C. Também foi retirado o músculo gastrocnêmico para ser utilizado como parâmetro dos efeitos do protocolo de exercício sobre o musculo esquelético.

### 3.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

#### 3.5.1 Mensurações de Estresse Oxidativo

**Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):** como índice de peroxidação lipídica foi medido a concentração de TBARS tecidual cerebral durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito<sup>91</sup>. Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,067%, fervidas por 15 minutos, e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm através do espectrofotômetro.

**Medida do dano oxidativo em proteínas:** o dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito<sup>92</sup>. Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas em adição de ácido tricloroacético 20% e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). O conteúdo dos grupamentos carbonil foi medido pela absorbância em 370 nm através do espectrofotômetro.

**Atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT):** a atividade das enzimas antioxidantes foi aferida conforme previamente descrito<sup>93</sup>. A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm através do espectrofotômetro e a atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito.

### 3.5.2 Dosagens de Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão<sup>94</sup>.

## 3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

**Esquiva Inibitória:** consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma foi cronometrado. Esse período de tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram 1,5 horas para medir memória de curta duração e 24 horas para memória de longa duração<sup>95,96</sup>.

**Habituação ao Campo Aberto:** embora seja ainda de difícil definição, o termo “atividade exploratória” é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente

natural. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de deslocamento no espaço e movimentos passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade, uma vez que esse comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como a autolimpeza corporal (*grooming*), defesa e reações sexuais. Foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em nove quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorarão livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltarão para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de *rearings* foram avaliados em ambas as sessões. *Crossing*: atividade motora; *Rearings*: atividade exploratória<sup>97</sup>.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise do teste de habituação de campo aberto e para as análises bioquímicas, os dados foram expressos por média e erro padrão da média. A análise estatística dos dados da habituação ao campo aberto foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via para analisar a diferença entre os grupos e o teste t de *Student* para amostras pareadas para analisar a diferença entre treino e teste dentro de um mesmo grupo. Quando o valor de F foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. As análises bioquímicas foram realizadas utilizando ANOVA de uma via com *post hoc* Tukey e ANOVA de duas vias com *post hoc* Bonferroni. As análises do teste de esquia inibitória foram realizadas através dos testes de Mann-Whitney e Wilcoxon. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

Nesta sessão serão apresentados os dados obtidos nas avaliações decorrentes dos efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade sobre a memória aversiva e de habituação e sobre o estresse oxidativo em tecido encefálico de animais LARGE<sup>myd</sup>.

### 4.1 MEMÓRIA AVERSIVA E DE HABITUAÇÃO

A **Figura 1** expõe os resultados obtidos após a aplicação de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a memória aversiva (**Figura 1A**) e de habituação (**Figura 1B**).

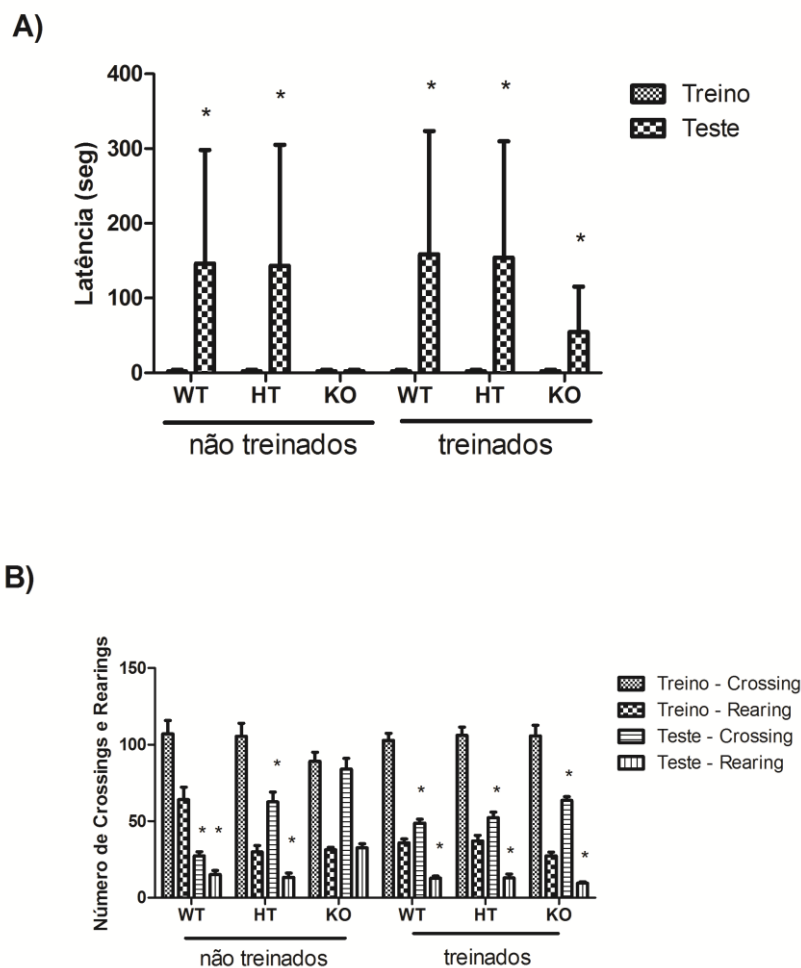


Figura 1 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a memória aversiva e de habituação de camundongos

Na **Figura 1A**, observa-se os resultados da avaliação da memória aversiva através do teste de esquia inibitória. No grupo de animais que não foram treinados, não houve diferença estatística no tempo de latência entre treino e teste no grupo de animais KO, demonstrando comprometimento da memória aversiva ( $p>0,05$ ). Já no grupo de animais treinados, houve diferença estatística no tempo de latência entre treino e teste ( $p<0,05$ ) nos animais KO, demonstrando que o protocolo de exercício físico de baixa intensidade, por oito semanas, foi capaz de reverter o comprometimento da memória aversiva. Nos outros grupos experimentais não houve comprometimento da memória aversiva entre os animais treinados e não treinados.

Os resultados da avaliação da memória de habituação são através do teste de campo aberto são demonstrados na **Figura 1B**. Pode-se observar que não houve diferença no número de *crossings* e *rearings* ( $p>0,05$ ) entre treino e teste nos animais não treinados, demonstrando comprometimento da memória de habituação. Após a aplicação de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade, por oito semanas, houve diferença significativa entre treino e teste no número de *crossings* e *rearings* ( $p<0,05$ ), significando que o uso deste protocolo reverteu o dano na memória de habituação. Nos outros grupos experimentais não houve comprometimento da memória de habituação entre os animais treinados e não treinados.

#### 4.2 ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

A **Figura 2** mostra os resultados do uso de um protocolo de exercício de baixa intensidade sobre a carbonilação de proteínas (**Figura 2A**), peroxidação lipídica (**Figura 2B**), atividade enzimática da catalase (**Figura 2C**) e da superóxido dismutase (**Figura 2D**) no músculo gastrocnêmio.

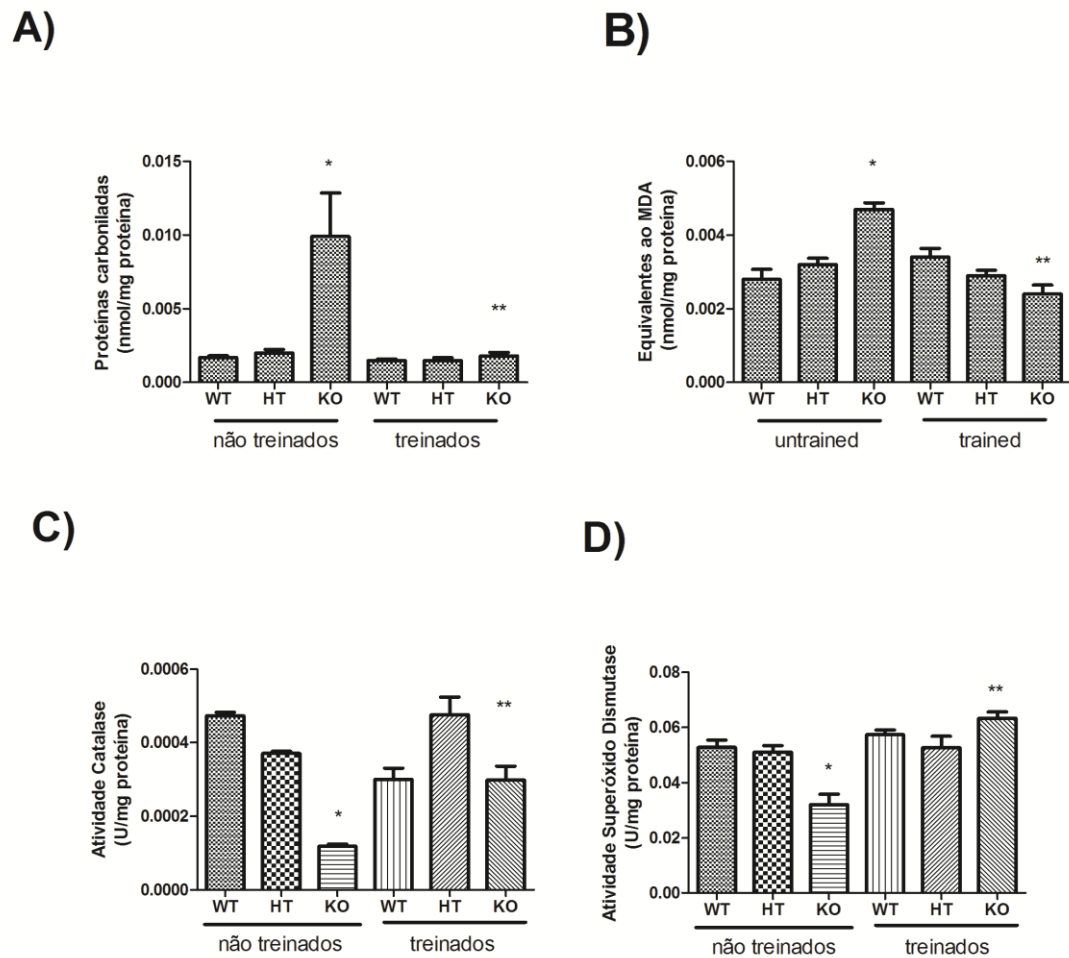


Figura 2 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de camundongos

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ( $p < 0,05$ ) em todas as análises realizadas no músculo gastrocnêmio. Pode-se observar que os animais KO não treinados apresentaram um aumento na carbonilação de proteínas em gastrocnêmio quando comparado ao grupo de animais selvagens não treinados (WT) ( $p < 0,05$ ). Após o treinamento, os animais KO apresentaram níveis de carbonilação de proteínas menores quando comparados aos animais KO não treinados ( $p < 0,05$ ), demonstrando que o protocolo de exercício físico de baixa intensidade, por 8 semanas, foi capaz de reverter o aumento da carbonilação de proteínas observado no músculo gastrocnêmio de animais KO (Figura 2A).

A **Figura 2B** mostra o resultado da avaliação da peroxidação lipídica em gastrocnêmio. Observou-se que os animais KO não treinados apresentaram um nível elevado de peroxidação lipídica em gastrocnêmio quando comparado com os animais WT não treinados ( $p < 0,05$ ). Já os animais KO que foram submetidos ao treinamento, apresentaram uma redução destes níveis quando comparados aos animais KO não treinados ( $p < 0,05$ ), evidenciando que o treinamento reverteu o aumento da peroxidação lipídica em gastrocnêmio em animais KO.

A atividade da catalase em gastrocnêmio é mostrada na **Figura 2C**. Pode-se observar que há uma diminuição da atividade da catalase em gastrocnêmio dos animais KO não treinados quanto comparados aos animais WT não treinados ( $p < 0,05$ ). Quando os animais KO são submetidos ao treinamento físico de baixa intensidade, houve um aumento da atividade da catalase em gastrocnêmio quando comparado aos animais KO não treinados, demonstrando que o exercício físico foi capaz de reverter esta alteração.

A **Figura 2D** demonstra os resultados obtidos na avaliação da atividade da superóxido dismutase em gastrocnêmio. Observa-se que os animais KO não treinados apresentaram uma diminuição da atividade da superóxido dismutase quando comparado aos animais WT não treinados ( $p < 0,05$ ). Após o uso de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade por 8 semanas, os animais KO apresentaram atividade elevada da superóxido dismutase quando comparado aos animais KO não treinados ( $p < 0,05$ ), demonstrando que o protocolo foi benéfico para o músculo gastrocnêmio.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM TECIDO ENCEFÁLICO

A **Figura 3** demonstra a avaliação da carbonilação de proteínas em estriado (**Figura 3A**), córtex pré-frontal (**Figura 3B**), hipocampo (**Figura 3C**) e cortex (**Figura 3D**).

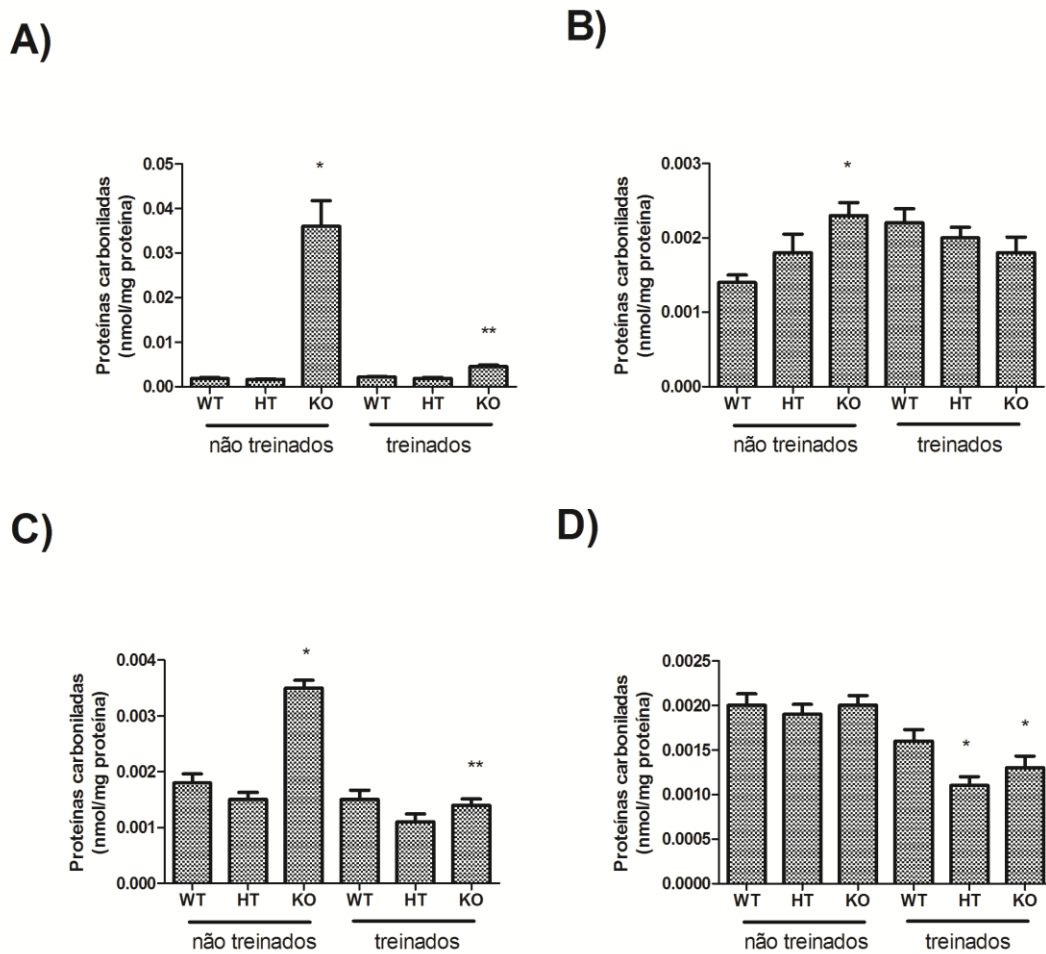


Figura 3 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre avaliação da carbonilação de proteínas em tecido encefálico de camundongos

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ( $p < 0,05$ ) em todas as análises realizadas nesta sessão. Houve um aumento da carbonilação de proteínas em estriado, córtex pré-frontal e hipocampo nos animais KO não treinados quando comparados aos animais WT não treinados ( $p < 0,05$ ). Entretanto, os animais KO que foram treinados, houve uma diminuição na carbonilação de proteínas em estriado e hipocampo quando comparados aos animais KO não treinados ( $p < 0,05$ ). No córtex pré-frontal, não houve diminuição nos níveis no grupo de animais KO treinados em comparação aos animais KO não treinados ( $p > 0,05$ ). Já no córtex, não houve alteração nos grupos experimentais dos animais não treinados. Houve somente uma diminuição da carbonilação de

proteínas dos animais HT e KO treinados quando comparados aos animais do mesmo grupo não treinados ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TECIDO ENCEFÁLICO

A avaliação da peroxidação lipídica é mostrada na **Figura 4** através das análises em estriado (**Figura 4A**), córtex pré-frontal (**Figura 4B**), hipocampo (**Figura 4C**) e cortex (**Figura 4D**).

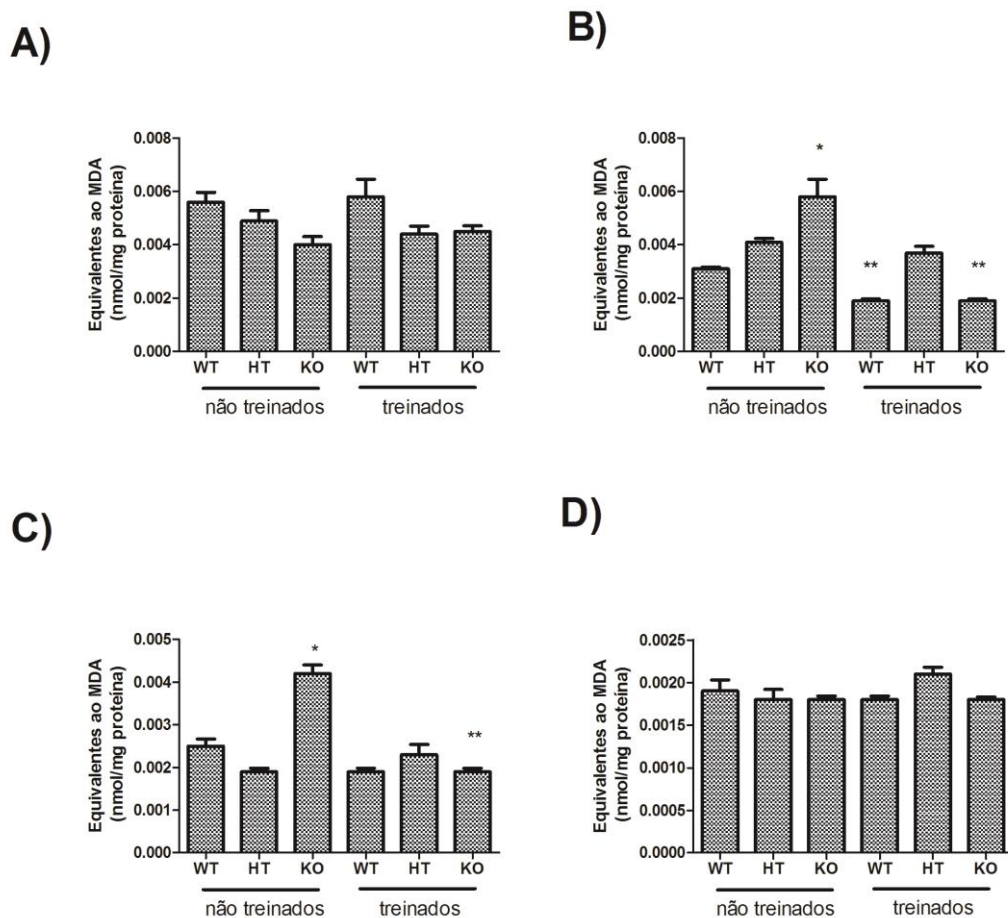


Figura 4 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a peroxidação lipídica em tecido encefálico em camundongos

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ( $p < 0,05$ ) em todas as análises realizadas nesta sessão. Pode-se observar que houve um aumento da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais KO não treinados em comparação aos animais WT não

treinados ( $p < 0,05$ ). Nos animais que foram submetidos ao protocolo de exercício físico de baixa intensidade, houve uma diminuição da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal dos animais WT e dos animais KO quando comparados aos mesmos grupos, porém quando não treinados ( $p < 0,05$ ) e no hipocampo de animais KO em comparação aos animais não treinados ( $p < 0,05$ ). Estes resultados mostram que o protocolo utilizado diminuiu os níveis elevados de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e hipocampo de animais KO ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE EM TECIDO ENCEFÁLICO

A **Figura 5** demonstra os resultados obtidos na avaliação da atividade da catalase em estriado (**Figura 5A**), córtex pré-frontal (**Figura 5B**), hipocampo (**Figura 5C**) e córtex (**Figura 5D**).

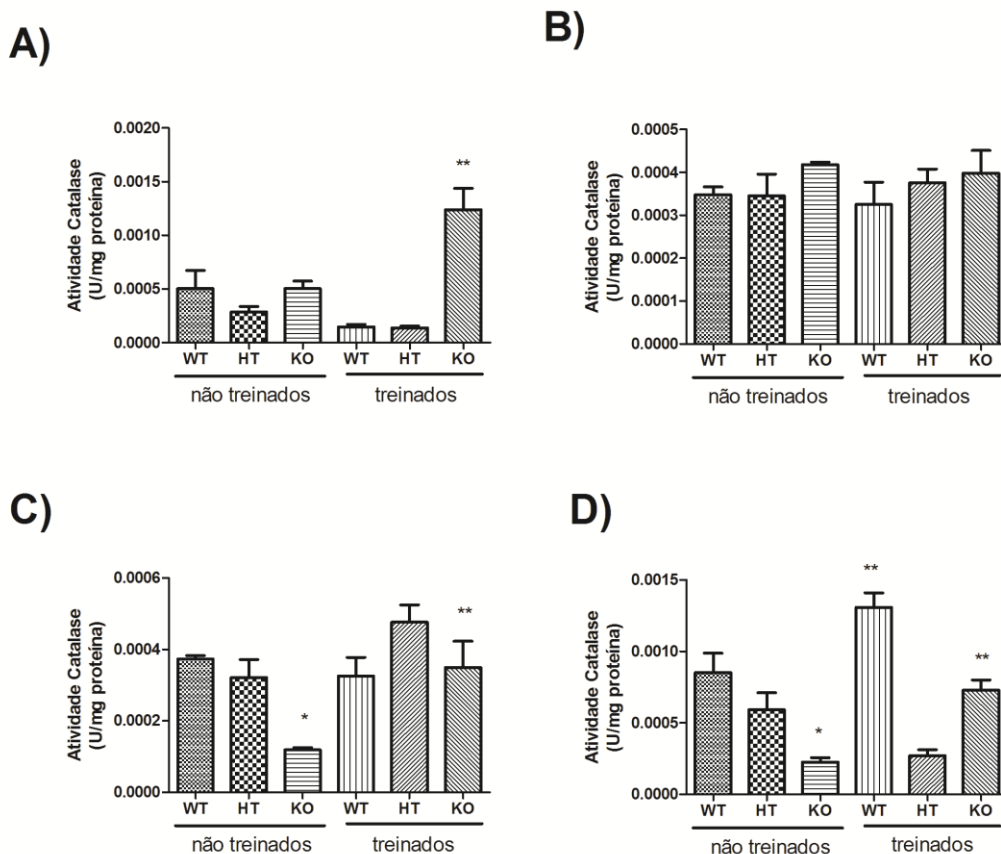


Figura 5 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a atividade da catalase em tecido encefálico de camundongos

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ( $p < 0,05$ ) em todas as análises realizadas nesta sessão. Houve uma diminuição da atividade da catalase em hipocampo e córtex dos animais KO não treinados quando comparados aos animais WT não treinados ( $p < 0,05$ ). Já os animais KO que foram submetidos ao protocolo de treinamento, demonstraram um aumento da atividade da catalase quando comparados aos animais KO não treinados, mostrando que o protocolo utilizado neste estudo foi capaz de reverter a diminuição da catalase em hipocampo e córtex ( $p < 0,05$ ). Em estriado e córtex pré-frontal, não houve diferença na atividade da catalase dos grupos KO e HT não treinados quando comparados aos animais WT não treinados ( $p > 0,05$ ). Em estriado houve somente um aumento da atividade da catalase nos animais KO treinados quando comparados aos não treinados ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM TECIDO CEREBRAL

A atividade da superóxido dismutase é mostrada na **Figura 6** através da análise do estriado (**Figura 6A**), córtex pré-frontal (**Figura 6B**), hipocampo (**Figura 6C**) e córtex (**Figura 6D**).

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ( $p < 0,05$ ) em todas as análises realizadas nesta sessão. Houve uma diminuição da atividade da superóxido dismutase nos grupos HT e KO em estriado nos animais não treinados quando comparados aos animais WT não treinado ( $p < 0,05$ ). Não houve alterações nas demais estruturas analisadas nos grupos HT e KO ( $p > 0,05$ ). Entretanto não houve aumento da atividade da superóxido dismutase em estriado nos grupos HT e KO treinados quando comparados aos não treinados ( $p > 0,05$ ), mostrando que o protocolo de exercício físico utilizado não foi capaz de reverter a alteração acima descrita ( $p > 0,05$ ). Em córtex, houve somente um aumento da superóxido dismutase no grupo KO treinado quando comparado ao grupo KO não treinado ( $p < 0,05$ ).

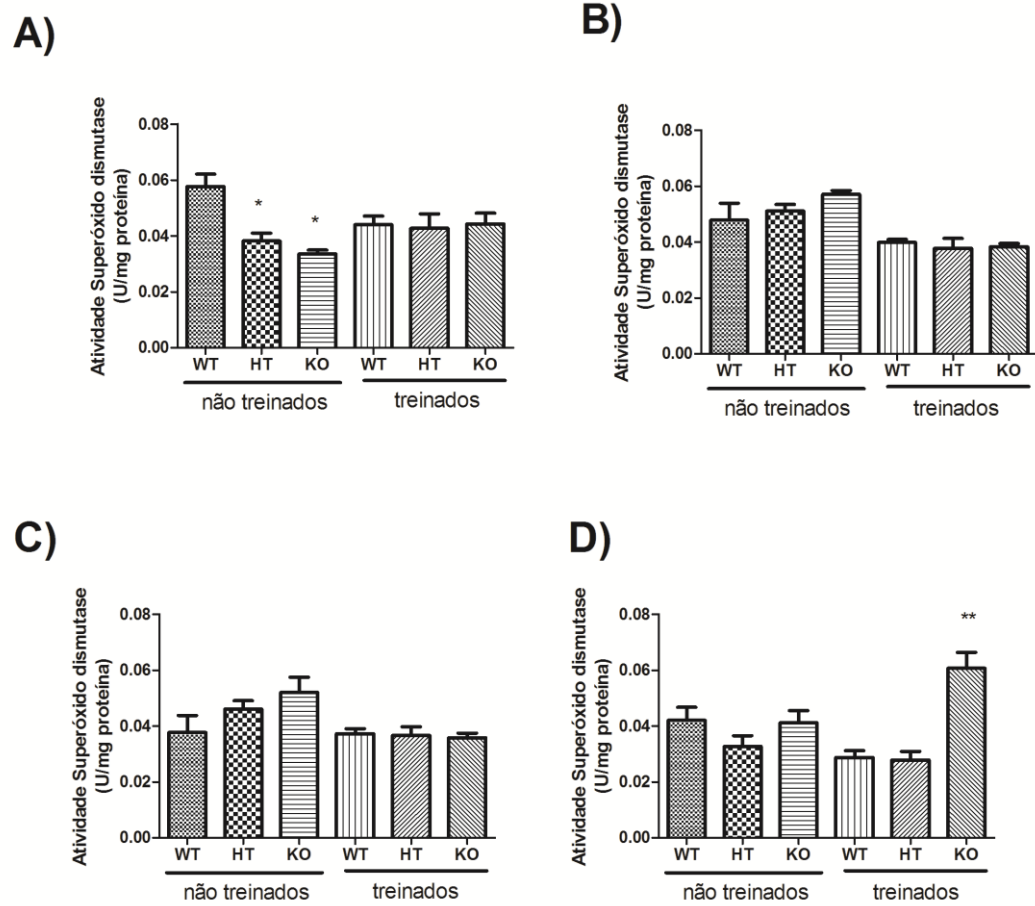


Figura 6 – Efeito de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade sobre a superóxido dismutase em tecido cerebral de camundongos

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo pode-se observar que um protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade durante oito semanas, sendo executado durante 30 min e duas vezes por semana, foi capaz de reverter o comprometimento da memória aversiva e de habituação bem como o estresse oxidativo no encéfalo e no músculo gastrocnêmio. A análise do músculo gastrocnêmio foi de importante valia, pois, a DMC1D é, em sua essência, uma doença neuromuscular. Melhorar a capacidade cognitiva não teria importância se o exercício físico aeróbio de baixa intensidade aumentasse o estresse oxidativo em tecido muscular esquelético, visto que o estresse oxidativo é um dos eventos fisiopatológicos associados à degeneração progressiva das DMP<sup>56-58</sup>.

A DMC1D é uma patologia caracterizada por uma mutação no gene *LARGE*, responsável por gerar uma alteração no mecanismo de glicosilação da proteína  $\alpha$ -DG, que está fortemente implicada como tendo um papel causal para o desenvolvimento de anomalias do SNC dos portadores, como retardo mental grave<sup>98,99</sup>. Sabe-se que a porção glicosilada da  $\alpha$ -DG é a parte a qual há a ligação desta proteína com a matriz extracelular e, alterando sua glicosilação, há uma redução do seu peso molecular, juntamente com a redução do peso molecular da proteína  $\alpha$ -2-laminina, assim causando o fenótipo distrófico e demonstrando que a ocorrência de alterações, desestabiliza o complexo distroglicano<sup>100</sup>. O complexo distroglicano foi localizado em várias regiões neuronais, incluindo o hipocampo e o córtex cerebral, onde forma um elemento estrutural em determinadas sinapses<sup>101</sup>. A hipoglicosilação da proteína de  $\alpha$ -DG foi localizada em distintas estruturas cerebrais incluindo o córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex, onde o dano pode afetar um único elemento neuronal e sua estrutura para determinada sinapse ou alterar mais que um elemento em cascata, capaz de gerar danos em múltiplas estruturas do SNC<sup>102</sup>. A destruição da lâmina basal, pode ser causada por perda de interação entre  $\alpha$ -DG e o seu ligante, desencadeando alterações estruturais e desempenhando um papel importante na patogênese do SNC<sup>103</sup>. Foi demonstrado que as mutações no gene *LARGE* têm sido associadas às alterações na migração neuronal, atrasos cognitivos, alterações motoras e envolvimento do SNC<sup>104</sup>.

O hipocampo é uma área do cérebro importante para a formação da memória de longo prazo, tanto em humanos como em animais<sup>95</sup>. Recentemente foi demonstrado que animais LARGE<sup>myd</sup> apresentam comprometimento da memória de habituação, aversiva e de reconhecimento de objeto<sup>5,6</sup> quando adultos (60 dias de vida). Neste estudo, o protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade foi iniciado quando os camundongos tinham 28 dias de vida e foi finalizado quando tinham 88 dias. Aos 88 dias de vida, os animais LARGE<sup>myd</sup> submetidos ao protocolo em questão, não apresentaram comprometimento da memória de habituação e memória aversiva, ou seja, o protocolo de exercício físico reverteu o dano na memória.

Estudos mostram que a prática regular de exercícios físicos influencia na melhora cognitiva, na neuroquímica e na função mitocondrial e oxidativa sobre o SNC realizando uma influência favorável à plasticidade no cérebro, facilitando os processos neurogenerativos, neuroadaptativos e neuroprotetores em modelos experimentais<sup>61</sup>. Embora as bases neurobiológicas exatas subjacentes aos benefícios cognitivos do exercício físico não foram totalmente elucidadas, existem evidências que suportam a relevância de respostas adaptativas neuronais no SNC, tais como o aumento da plasticidade sináptica<sup>105-108</sup> e neurogênese<sup>108,109</sup>. Foi demonstrado que o exercício físico aumenta a expressão de muitos genes associados à função sináptica, envolvidos na plasticidade sináptica, formação da memória, integração de múltiplos sinais extracelulares e nos processos de memória<sup>110</sup>. Corroborando com estes achados, Molteni e colaboradores descrevem que o exercício aumenta a proteção neuronal no hipocampo<sup>107</sup>. Para Spangenburg e colaboradores, a resposta fisiológica ao treinamento estimula várias vias de sinalização, aumentando a expressão gênica e seus produtos proteicos, associados à plasticidade sináptica<sup>111</sup>. O mecanismo subjacente ao comprometimento da memória relacionado à DMC1D não é totalmente compreendido. Entretanto, neste estudo, podemos observar que a memória de habituação e aversiva pode ser modulada por uma das vias associadas às mudanças fisiológicas ocasionadas pela prática de exercício físico aeróbio de baixa intensidade.

Neste contexto, este estudo também observou que o protocolo de exercício físico de baixa intensidade utilizado, diminuiu a carbonilação de proteínas em estriado e hipocampo, a peroxidação lipídica em córtex pré-frontal e hipocampo além de aumentar a atividade antioxidante da catalase em hipocampo e cortex nos

animais LARGE<sup>myd</sup>. Estudos mostram que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes no cérebro está provavelmente ligado a resposta ao aumento na formação de radicais livres relacionados a prática de exercício físico<sup>112,113</sup>. Neste contexto, há indícios de que exercícios aeróbios de baixa intensidade ou intensidade moderada podem retardar o desenvolvimento de miopatias<sup>11</sup>.

A análise do gastrocnêmio foi realizada neste estudo a fim de se certificar que o protocolo utilizado não danificaria ainda mais o músculo esquelético, aumento a progressão da doença, visto que a DMC1D também afeta de modo progressivo a musculatura esquelética. Foi observado que houve uma diminuição da carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica bem como um aumento da atividade antioxidante da catalase e da superóxido dismutase. Em um estudo, foi visto que em um modelo animal de DMD, o uso do mesmo protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade, por oito semanas, na mesma intensidade, diminuiu significativamente a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas em músculo esquelético<sup>12</sup>. O aumento da degradação da proteína muscular pode ser relacionado à redução de estabilidade da membrana sarcolemal, acúmulo de cálcio intracelular, que pode ativar a apoptose e a necrose celular<sup>114</sup>. Kaczor e colaboradores propõe que, o exercício físico de baixa intensidade pode induzir a homeostase do cálcio no músculo esquelético distrófico e diminuir o acúmulo de cálcio mitocondrial e a produção de ERO<sup>12</sup>.

A resposta oxidativa ao exercício físico é determinada pelo tipo, frequência, duração e intensidade. Com isso, o exercício físico regular pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas ERO e os sistemas de defesas antioxidantes<sup>115</sup>. Além disso, o exercício físico tem a capacidade de modular a atividade das enzimas do ciclo de Krebs, aumentar a disponibilidade dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e a atividade da ATP em músculo esquelético<sup>116-119</sup>. O exercício físico regular promove um aumento adaptativo dos mecanismos de defesa do músculo esquelético capaz de proteger contra as lesões produzidas pelas ERO<sup>120</sup>.

Os resultados de diferentes modelos de exercício físico no metabolismo oxidativo e neurotrófico do SNC são muito controversos, mas geralmente demonstram ganhos na plasticidade sináptica e na função cognitiva com exercícios de intensidade moderada e baixa<sup>72</sup>. A resposta fisiológica ao treinamento estimula algumas vias de sinalização como o aumento da expressão gênica de muitos

componentes da cascata MAPK, a maior cascata sinalizadora dos receptores TRK<sup>12</sup>. A MAPK está envolvida na plasticidade sináptica, formação de memória e integração de múltiplos sinais extracelulares<sup>122</sup> incluindo o aprendizado<sup>123-125</sup> e o aumento da expressão de genes associados à função sináptica<sup>123</sup>.

Alguns estudos apontam efeitos benéficos da prática de exercícios físicos nas DMP<sup>126,127</sup>. Entretanto, tem sido debatido se o exercício físico é benéfico ou prejudicial para pacientes com distúrbios miopáticos e o papel do exercício físico no manejo desses pacientes permanece controverso. Após a conclusão de um estudo experimental em que o protocolo de exercício físico de alta intensidade induziu degeneração muscular em camundongos MDX; formulou-se a hipótese de que a resposta estressora da intervenção terapêutica é capaz de gerar danos e degeneração celular em pacientes, sugerindo a contra-indicação da prática de atividade física<sup>127-129</sup>. Em contraponto, para Akimoto e colaboradores, atualmente não existem dados suficientes na literatura para justificar a contra-indicação da prática de exercícios terapêuticos de baixa intensidade em portadores de DMP<sup>130</sup>. Para Grange e associados, o exercício físico poderia exacerbar o dano celular dos portadores de DMP<sup>84</sup>. Neste contexto, é necessário estabelecer quais os limites para minimizar o dano e determinar quais os parâmetros capazes de melhorar a função muscular de portadores de DMP, por isso, elegeram-se quatro principais limitações para a prescrição de exercício em pacientes com DMP: (1) a indefinição até este momento do papel que exercício pode desempenhar no tratamento das DMP, devido à insuficiência de estudos em humanos bem controlados, bem como, o número limitado de estudos experimentais em modelos animais; (2) o exercício físico poderia exacerbar o processo de degeneração/regeneração, aumento de fibrose e diminuição da capacidade proliferativa da célula satélite; e, (3) a fragilidade da membrana celular característica do músculo distrófico pode limitar a capacidade da função muscular<sup>131,132</sup>. Neste cenário, Kaczor e colaboradores, questionaram a falta de padronização dos estudos experimentais, salientando a limitação do número de experimentos bem como os controversos resultados relacionados a discrepâncias quanto à metodologia usadas em estudos experimentais como a idade dos camundongos; a intensidade, tipo e a duração do exercício; as divergentes variáveis fisiológica, histológica e bioquímica mensuradas e a mensuração da composição de distintas células analisadas a fim de estabelecer um protocolo de exercício físico de

baixa intensidade que possa ser benéfico, reduzindo o processo degenerativo celular e diminuindo a progressão das DMP<sup>12</sup>.

Sabe-se que o estresse oxidativo está presente em tecido muscular esquelético e no tecido encefálico e que participa ativamente do processo de degeneração celular durante o curso das DMP. Em modelo animal de DMC1D, há estresse oxidativo em animais adultos em tecido cerebral<sup>5</sup>. O exercício físico de baixa intensidade por oito semanas é capaz de reverter o estresse oxidativo em camundongos MDX<sup>12</sup>. E já é sabido que o exercício físico de média e baixa intensidade tem efeitos antioxidantes tanto em músculo esquelético como em tecido encefálico de animais saudáveis ou em modelos animais de doenças psiquiátricas ou neurodegenerativas, como citado ao longo deste trabalho. Com estas evidências, o propósito desta pesquisa foi investigar o papel do exercício físico de baixa intensidade, por oito semanas, sendo realizadas duas vezes por semana, sobre o estresse oxidativo e a memória. Foi observado que, de uma maneira geral, o protocolo utilizado foi benéfico para o SNC e para o músculo gastrocnêmio, pois diminuiu o estresse oxidativo e ainda reverteu o comprometimento da memória aversiva e de habituação.

Alguns itens devem ser considerados. O protocolo iniciou-se quando os animais tinham 28 dias de idade, ou seja, animais jovens. Foi finalizado quando os animais tinham 88 dias. Com 88 dias, eles não apresentavam alteração na memória e mostraram pouco envolvimento do estresse oxidativo em tecido cerebral e no gastrocnêmio. Comim e colaboradores mostraram que animais DMC1D com 60 dias apresentaram dano cognitivo e estresse oxidativo<sup>5</sup>. Este trabalho traz possíveis evidências de que o exercício físico de baixa intensidade é capaz de retardar o processo de comprometimento cognitivo possivelmente por diminuir o estresse oxidativo em tecido cerebral. Sabe-se que o estresse oxidativo é uma das causas do comprometimento da memória e do aprendizado<sup>133</sup>. Estudos adicionais devem ser realizados para trazer maiores evidências desta associação e fundamentar os dados obtidos neste estudo.

## 6. CONCLUSÃO

O objetivo principal deste estudo foi verificar o papel de um protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade sobre parâmetros relacionados a degeneração celular em um animal modelo de CMD1D, iniciando-se quando animal ainda jovem (28 dias de vida) e estendendo-se até a idade adulta (88 dias de vida).

Observou-se neste estudo que um protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade realizado por oito semanas por dois dias por semana foi capaz de reverter o comprometimento da memória aversiva e de habituação e também diminuir a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em músculo gastrocnêmio e tecido encefálico. Também se observou que o protocolo em questão aumentou a atividade enzimática da catalase e da superóxido dismutase em músculo gastrocnêmio e parcialmente em tecido encefálico.

Este estudo poderá contribuir como alicerce para o desenvolvimento de futuros estudos que visam à implementação de práticas regulares de exercícios físicos como métodos coadjuvantes de tratamento, em pacientes com DMC1D ou outras formas de DMP, a fim de tentar diminuir a progressão da degeneração tanto em músculo esquelético quanto em tecido encefálico.

## REFERÊNCIAS

1. Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:1189–1192.
2. Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002;12:349–361.
3. Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 2003;12:285–361.
4. Yoshida A, Kobayashi K, Many H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, et al. Muscular and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001 Nov 1(5):717-24.
5. Comim CM, Mendonça BP, Dominguni D, Cipriano AL, Steckert AV, Scaini G, et al. Envolvimento do sistema nervoso central no modelo animal de myodystrophy. *Mol Neurobiol.* 2013;48:71-77.
6. Comim CM, Schactae AL, Soares JA, Ventura L, Freiburger V, Mina F, Quevedo J. Behavioral Responses in Animal Model of Congenital Muscular Dystrophy 1D. *Mol Neurobiol.* 2015; 1-6.
7. Odom GL, Gregorevic P, Chamberlain JS. Viral-mediated gene therapy for the muscular dystrophies: successes, limitations and recent advances. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:243-262.
8. Grange RW, Call JA. Recommendations to define exercise prescription for Duchenne muscular dystrophy. *Exerc Sport Sci Rev.* 2007;35:12-17.
9. Andrade LS, Marreiro DN. Aspectos sobre a relação entre exercício físico, estresse oxidativo e zinco. *Rev Nutr.* 2011;24:629-640.
10. Ansved T. Muscle training in muscular dystrophies. *Acta Physiol Scand.* 2001;171:359-66.
11. Ansved T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003;6:435-439.
12. Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:145-54.
13. Otsuka MA, Boffa CFB, Vieira ABAM. *Distrofias Musculares Fisioterapia Aplicada*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.

14. Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med.* 2002;81:162-174.
15. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Ver Moll Cell Biol.* 2006;7:762-73.
16. Spencer HJ, Yun-Ju C, Steven JW. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. *Bioessays.* 2002;24:542–52.
17. Deconinck N, Bernard D. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric neurology.* 2007;36:1-7.
18. Emery J, Kumar S, Smith H. Patient understanding of genetic principles and their expectations of genetic services within the NHS: a qualitative study. *Community Genet.* 1998;1:78-83.
19. Fonseca IF, Pianete G, Xavier CC. *Compêndio de neurologia infantil.* São Paulo-SP: MEDII Editora Médica e Científica Ltda, 2002.
20. Romeu V. Myotonic dystrophy type 1 or Steinert's disease. In: *Neurodegenerative diseases.* Springer US, 2012. p. 239-257.
21. Leite CC, Lucato LT, Martin MG, Ferreira MB, Carvalho MS, Marie SK, et al. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (CMD): a study of 25 Brazilian patients using MRI. *Pediatr Radiol.* 2005;35:572-9.
22. Muntoni F, Brockington M, Godfrey C, Ackroyd M, Robb S, Manzur A, et al. Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. *Acta Myol.* 2007;26:129-35.
23. Bertini E, D'Amico A, Gualandi F, Petrini S. Congenital Muscular Dystrophies: A Brief Review. *Semin Pediatr Neurol.* 2011;18:277-88.
24. Clarke N, Maugenre S, Vandebrouck A, Willer T, Cinza F, Bouchet C, et al. Congenital muscular dystrophy type 1D (MDC1D) due to a large intragenic insertion/deletion, involving intron 10 of the LARGE gene. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:452-7.
25. Lisi MT, Cohn RD. Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:159-72.
26. Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM, Banks GB, Gardner MK, et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:5723-8.
27. Modoni A, Silvestri G, Pomponi MG, Mangiola F, Tonali PA, Marra C. Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol.* 2004;61:1943-7.

28. Vermersch P, Sergeant N, Ruchoux MM, Hofmann-Radvanyi H, Wattez A, Petit H, et al. Specific tau variants in the brains of patients with myotonicdystrophy. *Neurology*. 1996;47:711-7.
29. Baudry M, Bi X. Learning and memory: An emergent property of cell motility. *Neurobiol Learn Mem*. 2013;104:64-72.
30. Satz JS, Ostendorf AP, Hou S, Turner A, Kusano H, Lee JC, et al. Distinct Functions of Glial and Neuronal Dystroglycan in the Developing and Adult Mouse Brain *J Neurosci*. 2010;30:14560-72.
31. Browning CA, Grewal PK, Moore CJ, Hewitt JE. A rapid PCR method for genotyping the Largemyd mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 2005;15:331-335.
32. Kanagawa M, Saito F, Kunz S, Yoshida-Moriguchi T, Barresi R, Kobayashi YM, et al. Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*. 2004;117:953–64.
- 33- Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, et al. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res*. 2010;15:200-7.
34. Holzfeind PJ, Grewal PK, Reitsamer HA, Kechvar J, Lassmann H, Hoeger H, et al. Skeletal,cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large (myd) natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Hum Mol Genet*. 2002;11:2673-87.
35. Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, et al. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nat*. 2012;418:417–21.
36. Li J, Yu M, Feng G, Hu H, Li X. Breaches of the pialbasement membrane are associated with defective dentate gyrusdevelopment in mouse models of congenital muscular dystrophies. *Neurosci Lett*. 2001;505:19–24.
37. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Belló-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol*. 2005;30:723-34.
38. Matsuo M; Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák, Z. *Free Radicals in Exercise and Aging* Champaign: Human Kinetics. 2001;1-33.
39. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *ProcSocExpBiol Med*. 1999; 222(1):236–45.
40. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press; 1990.

41. Halliwell BH, Gutteridge, JMC. Iron and free radical reactions: Two aspects of antioxidant protection. *Trends biochem Sci.* 1987;11:372–375.
42. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn-superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362:59-62.
43. Durany N, Munch G, Michel T, Riederer P. Investigations on oxidative stress and therapeutical implications in dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249 Suppl 3:68-73.
44. Abraham S, Soundararajan CC, Vivekanandhan S, Behari M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J Med Res.* 2005;121:111-5.
45. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, et al. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J Psychiatr Res.* 2009;43:864-9.
46. Tews DS. Apoptosis and muscle fibre loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders.* 2002;12:613-622.
47. Kim JH, Kwak HB, Thompson LV, Lawler JM. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2013;34:1-13.
48. Renjini R, Gayathri N, Nalini A, Srinivas BMM. Oxidative damage in muscular dystrophy correlates with the severity of the pathology: role of glutathione metabolism. *Neurochem Res* 2012;37:885-898.
49. Comim CM, Tuon L, Stertz L, Vainzof M, Kapczinski F, Quevedo J. Striatum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Decreased In Dystrophin-Deficient Mice. *Neurosci Lett.* 2009;459:66-8.
50. Dudley RWR, Danialou G, Govindaraju K, Lands L, Eidelman DE, Petrof BJ. Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. *Am J Pathology.* 2006;168:1276.
51. Menazza S, Blaauw B, Tiepolo T, Toniolo L, Braghetta P, Spolaore B, et al. Oxidative stress by monoamine oxidases is causally involved in myofiber damage in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:4207–4215.
52. Rando et al. Mitochondrial DNA Analysis of Northwest African Populations Reveals Genetic Exchanges with European, Near-Eastern and Sub-Saharan populations. *Ann Hum Genet.* 1998;62:531-550.
53. Comim CM, et al. Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências AHEAD,* 2015.

54. Ramadasan-Nair, Renjini, et al. Mitochondrial Alterations and Oxidative Stress in an Acute Transient Mouse Model of Muscle Degeneration implications for muscular dystrophy and related muscle pathologies. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:485-509.
55. Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol*. 2007;102:1677-1686.
56. Lawler JM. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol*. 2011;589:2161-2170.
57. Chelly J, Desguerre I. Progressive muscular dystrophies. *Handb Clin Neurol*. 2013;113:1343-1366.
58. Wicklund MP. The muscular dystrophies. *Continuum (Minneap Minn)*. 2013;19:1535-1570.
59. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Reports*. 1985;100:126-131.
60. Organização Mundial da Saúde.  
<http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>. Acessado em 18/03/2015.
61. Lowe DA, Williams BO, Thomas DD, Grange RW. Molecular and cellular contractile dysfunction of dystrophic muscle from young mice. *Muscle Nerve*. 2006;34:92-100.
62. Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A. Physical Activity and Oxidative Stress During Aging. *Int J Sports Med*. 2000;21:154-157.
63. Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009; 34:1079-86.
64. Ciolac EG, Greve JM. Exercise-induced improvements in cardiorespiratory fitness and heart rate response to exercise are impaired in overweight/obese postmenopausal women clinics. *São Paulo* 2011;66:583-9.
65. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *Can Med Assoc J*. 2006;174:801–809.
66. Takács J. Regular physical activity and mental health. The role of exercise in the prevention of, and intervention in depressive disorders. *Psychiatr Hung*. 2014;29:386-97
67. Dunn AL. Exercer tratamento para a depressão: Eficácia e resposta à dose. *Am J of Med Prev*. 2005;28:1-8.

68. Fisher BE, Wu AD, Salem GJ, Song J, Lin CHJ, Yip J, Petzinger G. The effect of exercise training in improving motor performance and corticomotor excitability in people with early Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008;89:1221-9.
69. Arcoverd C, Deslandes A, Moraes H, Almeida C, Araujo NB, Vasques PE, et al. Treadmill training as an augmentation treatment for Alzheimer's disease: a pilot randomized controlled study. *J Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72:190-6.
70. Lowe DA, Williams BO, Thomas DD, Grange RW. Molecular and cellular contractile dysfunction of dystrophic muscle from young mice. *Muscle Nerve.* 2006;34:92-100.
71. Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res.* 2011;218:308–314.
72. Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett.* 2009;452:281-285.
73. Arida RM, Scorza CA, Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EP. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett.* 2004;364:135-8.
74. Fordyce DE, Farrar RP. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav Brain Res.* 1991;46:123-33
75. Acikgoz O, Aksu I, Topcu A, Kayatekin BM. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett.* 2006;406:148-51
76. Arida RM, Scorza CA, Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EP. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett.* 2004;364:135-8.
77. Dohm MR, Hayes JP, Garland T Jr. The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice. *Genetics.* 2001;159:267-77.
78. Lighfoot JT, Turner MJ, Debate KA, Kleeberger SR. Interstrain variation in murine aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:2053-7
79. Liu J, Yeo HC, Övervik-Douk E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol.* 2000;89:21-8.
80. Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994;273:1167-73.

81. Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2002;93:1301-9.
82. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity controlled treadmill in rats: VO<sub>2</sub>max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:1301-10.
83. Lovering RM, Porter NC, Bloch RJ. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther* 2005;85:1372-1388.
84. Grange RW, Call JA. Recommendations to define exercise prescription for Duchenne muscular dystrophy. *Exerc Sport Sci Rev*. 2007;35:12-17.
85. Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br. J. Nutr*. 2007;96:31–33.
86. Brussee V, Tardif F, Tremblay JP. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord*. 1997;7:487-492.
87. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S. Chronic exercise accelerates the degeneration–regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle & nerve* 2005; 1:191-199.
88. De Luca A, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Fraysse B, Mirabella M, et al. Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304:453-63.
89. Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir. Bras*. 2005; 20:2-9.
90. Wayne W, Daniel CL. *Cross Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*, 2013.
91. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*. 1990;186:421-431.
92. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 1994;79: 583-593.
93. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J BiolChem*. 1951;193:265-75.

95. Izquierdo I1, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T. Short-and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;69:219-224.
96. Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, De-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem.* 1999;6:600-7.
97. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-40.
98. Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 2003;12:285–361.
99. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, et al. Muscular and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001;1:717-24.
100. Reeuwijk JV, Grewal PK, Salih MAM, Bernabé DBV, Laughlan JM, Michelse CB, et al. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet.* 2007;121(6): 685-90.
101. Hughes BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta.* 1962;7(1):597-603.
102. Zaccaria ML, di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neurosci* 2001;104:311–324.
103. Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 2003;341:217–220.
104. Damaj L, Lupien-Meilleur A, Lortie A, Riou É, Ospina LH, Gagnon L, Rossignol E. CACNA1A haploinsufficiency faz com comprometimento cognitivo, autismo e encefalopatia epiléptica com sintomas leves do cerebelo. *European Journal of Human Genetics* 2015.
105. Cotman CW, Nicole CB. Exercício: uma intervenção comportamental para melhorar a saúde do cérebro e plasticidade. *Tendências em Neurociências.* 2002;25:295-301.
106. Hammock EAD Larry JY. Microsatellite instability generates diversity in brain and sociobehavioral traits. *Science* 2005;308:1630-1634.

107. Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity – related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *European Journal of Neuroscience*. 2002;16:1107-16
108. Van Praag, Henriette. Correr melhora a neurogênese, o aprendizado, e potenciação de longa duração em camundongos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96:13.427-13.431.
109. Kempermann G, van Praag H, Gage FH. Regulação dependente de atividade da plasticidade neuronal e auto reparo. *Progress in Brain Research* 1999;127:35-48.
110. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn-superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362:59-62.
111. Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol. Scand*. 2003;178:413-424.
112. Rada'k Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-ishi S, Suzuki K. et al. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol*. 1995;79:129–135.
113. Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;50:635-9.
114. Emery J, Kumar S, Smith H. Patient understanding of genetic principles and their expectations of genetic services within the NHS: a qualitative study. *CommunityGenet*. 1998;1:78-83.
115. Pinho RA, Silveira PC, Piazza M, Tuon T, Silva GA, Dal-Pizzol F, et al. Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2006;12:81-84.
116. Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neurosci*. 2006;140:823-33.
117. Cui L, Hofer T, Rani A, Leeuwenburgh C, Foster TC. Comparison of lifelong and late life exercise on oxidative stress in the cerebellum. *Neurobiol Aging*. 200;30:903-909.
118. Kirchner L, Chen WQ, Afjehi-Sadat L, Viidik A, Skalicky M, Höger H, et al. Hippocampal metabolic proteins are modulated in voluntary and treadmill exercise rats *Exp Neurol*. 2008;212:145-151.
119. Opii WO, Joshi G, Head E, Milgram NW, Muggenburg BA, Klein JB, et al. Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging

following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2008;29:51-70

120. Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt J. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn Mem*. 2001;8:11-9.

121. Sweatt J. David. A neuronal cascata da MAP-cinase: um sistema de integração de sinal bioquímico que auxilia plasticidade sináptica e memória. *Journal of Neurochemistry* 2001;76:1-10.

122. Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt J. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn Mem*. 2001;8:11-9.

123. Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity – related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *European Journal of Neuroscience*. 2002;16:1107-16.

124. Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol. Scand*. 2003;178:413-424.

125. Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, et al. Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:345-56.

126. Dupont-Versteegden, Esther E, Roger J. McCarter, Michael S. Katz. Exercício voluntário diminui progressão da distrofia muscular em diafragma de camundongos mdx. *Journal of Applied Physiology* 1994;77:1736-1741.

127. Carter GT, Wineinger MA, Walsh SA, Horasek SJ, Abresch RT, Fowler WM Jr. Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*. 1995;5(4):323-32.

128. Granchelli, J. A.; Pollina, C.; Hudecki, M. S. Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*. 2000;10:235-239.

129. Eagle M. Report on the Muscular Dystrophy Campaign Workshop: exercise in neuromuscular diseases, Newcastle, January 2002. *Neuromuscul. Disord*. 2002;12:975–983.

130. Akimoto T, Sorg BS, Yan Z. Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:790-796.

131. Ruegg UT; Nicolas-Metral V, Challet C, Bernard-Helary K, Dorchies OM, Wagner S, et al. Pharmacological control of cellular calcium handling in dystrophic skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord*. 2002;1:155–161

132. Franco AA, Odom RS, Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27:1122–1132.
133. Huang TT, Leu D, Zou Y. Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Arch Biochem Biophys.* 2015;576:2-7.

## **ANEXO**

### **ANEXO A – Parecer Aprovação do Comitê de Ética**