



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde
Mestrado e Doutorado - UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PRISCILA MANTOVANI NOCETTI RIBEIRO

**NATAÇÃO PREVINE COMPROMETIMENTO DA MEMÓRIA POR
AUMENTAR DEFESA ANTI-OXIDANTE EM UM MODELO ANIMAL DE
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

Palhoça
2017

PRISCILA MANTOVANI NOCETTI RIBEIRO

**NATAÇÃO PREVINE COMPROMETIMENTO DA MEMÓRIA POR
AUMENTAR DEFESA ANTI-OXIDANTE EM UM MODELO ANIMAL DE
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências da saúde para obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

Orientador: Profa. Clarissa Martinelli Comim, Dra.
Co-orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Palhoça
2017

PRISCILA MANTOVANI NOCETTI RIBEIRO

**NATAÇÃO PREVINE COMPROMETIMENTO DA MEMÓRIA POR
AUMENTAR DEFESA ANTI-OXIDANTE EM UM MODELO ANIMAL DE
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

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 (SC), 21 de julho de 2017.

Orientador (a): Profa. Clarissa Martinelli Comim, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Jaqueline da Silva Generoso, Dra.

Universidade do Extremo Sul Catarinense

R36 Ribeiro, Priscila Mantovani Nocetti, 1977-

Natação previne comprometimento da memória por aumentar defesa anti-oxidante em um modelo animal de Distrofia Muscular de Duchenne / Priscila Mantovani Nocetti Ribeiro. – 2017.

62 f. : il. color. ; 30 cm

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

Orientação: Prof^a. Clarissa Martinelli Comim

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Distrofia muscular. 3. Natação. 4. Estresse oxidativo. 5. . I. Comim, Clarissa Martinelli. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.748

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul

Dedico este trabalho aos “Ewertons” e “Caíques”, que não estão mais entre nós, mas que me ensinaram tanto em tão pouco tempo. E a todos aqueles que aprendem a conviver com a distrofia muscular de Duchenne.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora - que se tornou amiga -, professora doutora Clarissa Martinelli Comim, pois, sem ela, este trabalho nem teria sido idealizado. Obrigada por toda dedicação, cuidado e direção com que conduziu todas as coisas e com que me ajudou em todo o meu mestrado. Você é uma inspiração para mim. Pretendo continuar pesquisando e aprendendo com você!

Agradeço ao meu co-orientador, professor doutor Daniel Fernandes Martins, a paciência e ajuda durante todo o mestrado e, em especial, a contribuição na minha dissertação.

Agradeço aos membros da minha banca, professoras doutoras Anna Paula Piovezan e professora doutora Jaqueline da Silva Generoso, a disposição e importante contribuição neste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de mestrado - Nathalia, Leandro, Letícia, Melissa, Juliana, Madá e Dani - a parceria e o encorajamento. E a todo o grupo de pesquisa Neuropat, em especial Vivi, Letícia, Lilian, Regina, Deisy, Daiane, Matheus e Helena, tudo o que fizeram sempre.

Agradeço aos meus colegas professores do curso de Fisioterapia da Unisul a parceria e amizade de sempre e aos meus alunos do curso de Fisioterapia da Unisul por me ensinarem a cada dia. Agradeço também, aos pacientes, que já atendi, a confiança em meu trabalho; e aos meus ex-professores por me inspirarem a continuar e perseverar.

Agradeço aos amigos que, de perto ou de longe, me fortaleceram e incentivaram.

Aos meus pais, Sylvia e Odilon, obrigada por absolutamente tudo que sempre fizeram por mim, meu amor por vocês é muito maior do que posso expressar. E aos meus irmãos, Luciana e André, o amor incondicional que temos entre nós. Enfim, agradeço a toda minha família, (Mantovani, Nocetti, Ribeiro) por serem fundamentais em minha vida, as orações e apoio.

Agradeço aos meus amores Jean, Caio e Pedro a paciência, o apoio e o conforto em todo o processo. E por serem a melhor parte de mim. A vida é muito melhor com vocês!

Finalmente, mas o mais importante, agradeço ao Autor e Consumador da minha fé, sem O qual nada em minha vida seria possível ou se concretizaria... Seus milagres, Sua provisão e Seu cuidado sempre foram palpáveis em minha vida. Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

“Tudo tem o seu tempo determinado e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

Introdução: A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética associada a uma degeneração progressiva da musculatura esquelética. A ausência da distrofina está relacionada a processos degenerativos tanto musculares como neuronais, evidenciada, principalmente, por um quadro de estresse oxidativo que culmina na morte celular. Alterações no aprendizado e na memória também são descritos no processo da doença. A natação é geralmente indicada por evitar impacto e facilitar a adesão pela melhor adaptação ao ambiente com água aquecida e por ter efeitos benéficos em pacientes; na cognição, por modular os processos de memória e aprendizado, e, no estresse oxidativo, por aumentar as defesas antioxidantes. Apesar dos benefícios conhecidos da natação, ainda há controvérsia sobre seu uso terapêutico na DMD. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de um protocolo de natação sobre a memória e o estresse oxidativo em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne. **Métodos:** Foram utilizados camundongos machos mdx e wild-type (selvagens), com 28 dias. Os animais foram submetidos a um protocolo escalonado de natação por quatro semanas consecutivas. Após vinte e quatro horas do último dia de exercício, foram realizados testes de memória aversiva e teste de memória de habituação e foram retiradas as estruturas encefálicas do estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e córtex e os músculos gastrocnêmio e diafragma, para avaliação da carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica e tióis livres. **Resultados:** Verificou-se que a natação foi capaz de reduzir significativamente os níveis de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas no gastrocnêmio e nas estruturas hipocampo e estriado dos animais exercitados. A natação também preveniu a peroxidação lipídica em diafragma. Além disso, o protocolo de natação foi capaz de aumentar os tióis livres em gastrocnêmio, diafragma e nas estruturas do SNC analisadas. Estes resultados mostraram que a natação preveniu o comprometimento da memória aversiva e de habituação nos camundongos mdx. **Conclusão:** Um protocolo de natação aplicado em camundongos mdx foi capaz de prevenir o dano à memória e o estresse oxidativo em gastrocnêmios e na maioria das estruturas analisadas do SNC, com aumento significativo da atividade antioxidante em todas as estruturas analisadas.

Descritores: Distrofia Muscular de Duchenne; natação; estresse oxidativo; memória.

ABSTRACT

Introduction: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a genetic disease which is associated to a progressive skeletal muscle degeneration. The lack of dystrophin is related to degenerative muscular and neuronal processes, evidenced mainly by oxidative stress that leads to cell death. Changes in learning and memory are also described in this disease's process. Swimming is usually indicated for avoiding impact and facilitating adherence because of a better adaptation to a warm water environment and also for its benefits on cognition, and modulating memory and learning processes and for increasing antioxidant defenses in oxidative stress. Although swimming is known for its benefits, its therapeutic use in DMD is still controversial. Objective: The objective of this study was to evaluate the effects of a swimming protocol on memory and oxidative stress in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. Methods: male mdx and wild type mice within 28 days were used in this study. The animals were trained in a stepped swimming protocol for four consecutive weeks. Twenty four hours after the last exercise day, aversive memory and habituation memory tests were performed and removed the encephalic structures of striatum, pre frontal cortex, hippocampus, and cortex and gastrocnemius and diaphragm muscles to evaluate protein carbonylation and lipid peroxidation and free thiols. Results: it was verified that swimming was able to reduce significantly the levels of lipid peroxidation and protein carbonylation in gastrocnemius and hippocampus and striatum in exercised animals. Swimming has also prevented lipid peroxidation in diaphragm. Besides, this swimming protocol was able to increase free thiols in gastrocnemius, diaphragm and in analysed SNC structures. These results showed that swimming prevented aversive and habituation memory in mdx mice. Conclusion: a swimming protocol applied in mdx mice was able to prevent memory damage and oxidative stress in gastrocnemius and in most of analysed SNC structures with a significant increase in antioxidant activity in all analysed structures.

Keywords: Muscular Dystrophy, Duchenne; Swimming; Oxidative stress; Memory.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ACSM – Colégio Americano de Medicina do Esporte (do inglês, *American College Sports Medicine*)

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Adenosina Trifosfato (do inglês, *adenosine triphosphate*)

AVDs – Atividades de Vida Diária

BDNF – Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)

BHT – Hidroxitolueno Butilado (do inglês, *butylated hydroxytoluene*)

CAT – Catalase

CK – Creatina quinase (do inglês, *creatine kinase*)

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

DTNB – Ditiobis-2-nitrobenzóico

DNTP – 2,4-Dinitrofenil Hidrazina

EEG – Eletroencefalograma

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FC_{máx} – Frequência Cardíaca Máxima

GPX – Glutaciona Peroxidase

GR – Glutaciona Redutase

GSH – Glutaciona

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IL 1 β – Interleucina 1 β

LANEX – Laboratório de Neurociência Experimental

LTP – Potencialização de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)

MDA – Malondialdeído

mA – miliampere

MMP-2 – Metaloproteinase-2

NaOH – Hidróxido de Sódio

O₂ – Radical Superóxido

OH – Radical Hidroxila
 PBS – Tampão Fosfato Salino
 QI – Quociente de Inteligência
 SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
 SNC – Sistema Nervoso Central
 SOD – Superóxido Dismutase
 TBA – Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid*)
 TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*)
 TCA – Ácido Tricloro Acético (do inglês, *trichloroacetic acid*)
 TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α (do inglês, *tumor necrosis factor*)
 TRIS-HCl – Ácido Clorídrico (do inglês, *tris hydroxymethyl aminomethane hydrochloric acid*)
 VD – Ventrículo Direito
 VE – Ventrículo Esquerdo
 VO_{2máx} – Volume Máximo de Oxigênio
 WT – Selvagens (do inglês, *Wild Type*)
 NEUROPAT – Grupo de Pesquisa em Neuropatologia Experimental Unisul
 AVE – Acidente vascular encefálico

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo..... 36

Lista de Figuras

Figura 1 – Complexo Oligomérico..... 18

Figura 2 – Linha do tempo – delineamento do estudo..... 32

Figura 3 – Medida de lactato dos animais mdx e wt submetidos ao protocolo de natação..... 38

Figura 4 – Efeito de um protocolo de natação sobre a memória aversiva e de habituação de camundongos..... 39

Figura 5 – Efeito de um protocolo de natação sobre o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de camundongos..... 41

Figura 6 – Efeito de um protocolo de natação sobre o estresse oxidativo no músculo diafragma de camundongos.....	43
Figura 7 – Efeito de um protocolo de natação sobre a peroxidação lipídica em estruturas do SNC de camundongos.....	45
Figura 8 – Efeito de um protocolo de natação sobre a carbonilação de proteínas em estruturas do SNC de camundongos.....	46
Figura 9 – Efeito de um protocolo de natação sobre os Tióis livres em estruturas do SNC de camundongos.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1 Distrofia muscular de Duchenne	16
1.1.2 Aprendizado e memória.....	20
1.1.3 Estresse oxidativo.....	22
1.1.4 Exercício físico aeróbio e natação.....	23
1.1.5 Modelo animal de Distrofia Muscular de Duchenne.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MÉTODOS	30
3.1 TIPO DE ESTUDO	30
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	30
3.3 ANIMAIS.....	31
3.3.1 Cálculo amostral	31
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS	33
3.5.1 Teste de memória aversiva	33
3.5.2 Teste de memória de habituação	34
3.5.3 Medidas de estresse oxidativo	34
3.5.3.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
3.5.3.2 Medida do dano oxidativo em proteínas.....	35
3.5.3.3 Grupamentos tióis	35
3.5.3.4 Dosagens de proteínas	36
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	36
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	36
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	37
4. RESULTADOS	38
4.1 MEDIDA DO LACTATO.....	38
4.1 AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO E DA MEMÓRIA	38
4.2 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO..	40
4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO DIAFRAGMA.....	42

4.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	44
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	53
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO	61
ANEXO A – Parecer Aprovação da Comissão de Ética.....	61

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença associada a alterações alélicas, herdadas geneticamente de forma recessiva e ligada ao cromossomo X. É caracterizada por uma degeneração progressiva da musculatura esquelética e sua incidência é de 1 para cada 3500 meninos nascidos vivos^{1,2}. O quadro clínico é composto por fraqueza, dano muscular e substituição progressiva do músculo esquelético por tecido não contrátil, adiposo e fibrótico³. É, portanto, uma distrofinopatia que se caracteriza por debilidade muscular, com início na infância e que segue um curso progressivo e estereotipado². Sem nenhuma intervenção, os pacientes perdem a marcha antes da adolescência².

A proteína distrofina, fundamental para a manutenção da homeostase da fibra muscular, está ausente na DMD². A distrofina se expressa fundamentalmente no músculo esquelético e cardíaco, mas existem isoformas que se expressam seletivamente em outros órgãos como o sistema nervoso central (SNC). Esta proteína está associada a processos degenerativos tanto musculares como neuronais, evidenciados, principalmente, por um quadro inflamatório e de estresse oxidativo, que culminam na morte celular^{2,4}. Alterações no aprendizado e na memória também são descritas no processo da doença⁵. Atualmente não existe cura. Entretanto, a terapia multidisciplinar cardiorrespiratória e ortopédica tem modificado a história natural da DMD⁶.

Neste contexto, os exercícios físicos aeróbios têm sido citados na literatura como fatores importantes no bem-estar⁷. Em indivíduos saudáveis, o exercício físico aeróbio pode prevenir e auxiliar no tratamento de doenças metabólicas e interferir de maneira positiva na capacidade funcional, através da redução da adiposidade corporal⁸, queda da pressão arterial, melhora do perfil lipídico, aumento da massa e força musculares, da capacidade cardiorrespiratória, da flexibilidade e do equilíbrio⁸. O exercício físico também pode tanto prevenir quanto retardar a perda de volume encefálico e pode ser benéfico para aumentar a conectividade das regiões encefálicas⁹. Além disso, estudos demonstram que o exercício físico aeróbio aumenta a atividade antioxidante em músculo esquelético em pacientes com DMD¹⁰. Em outras patologias, tais como hipercolesterolemia¹¹ e doença de Parkinson, também foram demonstrados efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e melhora da função cognitiva,

através de protocolos de exercícios físicos aeróbios, a longo prazo, em modelo animal¹².

Apesar dos benefícios conhecidos do exercício físico, ainda há controvérsia sobre seu uso terapêutico na DMD. Barbin e colaboradores⁴ (2016) demonstraram que houve um aumento na fibrose no diafragma de animais mdx, após serem submetidos ao exercício físico aeróbio do tipo natação⁴. Estudos mostram que o treinamento aeróbio de alta intensidade induz o dano muscular em camundongos mdx, porém o treino de baixa intensidade reduz o fenótipo e diminui os níveis de carbonilação de proteínas em músculo esquelético^{13,14}.

Há também uma discussão sobre a intensidade do exercício, já que exercício intenso está relacionado a um aumento de espécies reativas ao oxigênio (ERO)¹⁵. O estresse oxidativo surge no processo fisiopatológico da DMD como curso normal da doença^{13,14}. Assim, pode-se pensar em usar o exercício físico aeróbio de baixa intensidade como meio de tratamento para evitar a progressão da doença, já que sua prática para pacientes portadores de DMD tem sido utilizada como forma de retardar os efeitos da doença¹⁶. Porém há uma grande dificuldade em se estabelecer protocolos, pois o exercício físico aeróbio em excesso (alta intensidade ou grande volume) pode trazer prejuízos ao invés de benefícios⁴. Por outro lado, um estresse oxidativo leve, como no caso do exercício físico de moderada intensidade, pode aumentar o sistema de defesa antioxidante em pacientes¹⁰.

A natação é uma das modalidades de exercício físico aeróbio que tem se tornado muito popular. O exercício físico aeróbio na água é uma alternativa viável ao exercício em solo, pois a água, através de suas propriedades físicas como empuxo, pressão hidrostática, viscosidade, dentre outros, traz aumento do bem-estar e da qualidade de vida¹⁷. A natação, assim como a caminhada e a corrida, traz benefícios para a saúde quando comparados com um estilo de vida sedentário¹⁸. A natação é geralmente indicada por evitar impacto e facilitar a adesão pela melhor adaptação ao ambiente com água aquecida¹⁸. A natação também é descrita na literatura como tendo efeitos benéficos em pacientes: na cognição, por modular os processos de memória e aprendizado; e, no estresse oxidativo, por aumentar as defesas antioxidantes¹⁸.

Entretanto, não há consenso na literatura atual sobre a natação como recurso de tratamento para pacientes com DMD. Em um programa de natação de quinze semanas, camundongos mdx demonstraram aumento de massa muscular e também maior resistência à fadiga, quando comparados com animais selvagens¹⁹. Um estudo

recente, utilizou a natação de baixa intensidade por quatro semanas em camundongos mdx e encontrou uma redução de marcadores de dano oxidativo em músculo esquelético¹³. Já outros estudos demonstraram um aumento da hipertensão pulmonar e aumento da fibrose em diafragma em modelo animal de DMD^{4,13,14,18}.

Observações clínicas e achados em estudos experimentais, envolvendo modelos animais, mostram alterações cognitivas e estresse oxidativo, tanto em músculo esquelético como em tecido encefálico, como um dos fatores principais no processo de fisiopatologia da degeneração celular na DMD^{3,5,9,20-22}. Estabelecer se a natação pode diminuir a carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, e aumentar as defesas antioxidantes em tecido muscular esquelético e encefálico, e modular a função cognitiva é o propósito deste estudo. O estudo dos efeitos do exercício físico aeróbio, do tipo natação, sobre a memória e estresse oxidativo, traz uma nova perspectiva de tratamento para os pacientes com DMD. Como a natação é um recurso acessível, de alta adesão e prazeroso, poderá ser utilizada como recurso terapêutico, principalmente por não empregar impacto e oferecer inúmeros benefícios fisiológicos, como o conforto da água aquecida, seus efeitos na dor, no relaxamento muscular, na circulação sanguínea, dentre outros^{23,24}. Sendo assim, espera-se que os resultados deste estudo possam contribuir para definir um protocolo de natação mais seguro e eficaz, estabelecendo mais um recurso no tratamento da DMD. Estes resultados também contribuirão com a literatura científica, embasando futuros ensaios pré-clínicos e clínicos para o tratamento desta doença.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Distrofia muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença de origem genética, que apresenta, como característica principal, a degeneração progressiva e fraqueza muscular devido a ausência da proteína distrofina, uma proteína que protege a célula muscular do estresse induzido durante a contração muscular²⁵. Nas distrofinopatias, há diversos fenótipos, dentre os quais a DMD tem a progressão mais severa²⁵. A incidência é de 1 para cada 3500 meninos nascidos vivos¹ e a morte ocorre geralmente entre a segunda e a terceira décadas de vida¹. Há pouca sobrevivência

na quarta década de vida e as causas mais comuns de morte são as complicações cardiorrespiratórias²⁶.

A DMD é uma das formas mais comuns de distrofinopatias que acomete crianças²⁶. Os primeiros sinais evidenciados são atrasos do desenvolvimento motor, como demora na aquisição do controle de tronco para o sentar e a marcha independente e conseguinte, distúrbios de deambulação. A fraqueza muscular que se segue por contratura articular origina deformidades compensatórias da coluna vertebral, como escoliose e hiperlordose lombar²⁶. Tais deformidades agravam a postura a ponto do indivíduo não conseguir mais deambular, passando a utilizar auxílios de locomoção, como a cadeira de rodas, por volta dos treze anos de idade, devido à progressão rápida da doença. Os primeiros sinais evidentes ocorrem por volta dos três aos cinco anos de vida²⁶. Além disso, as cardiomiopatias ocorrem por volta dos dezoito anos.

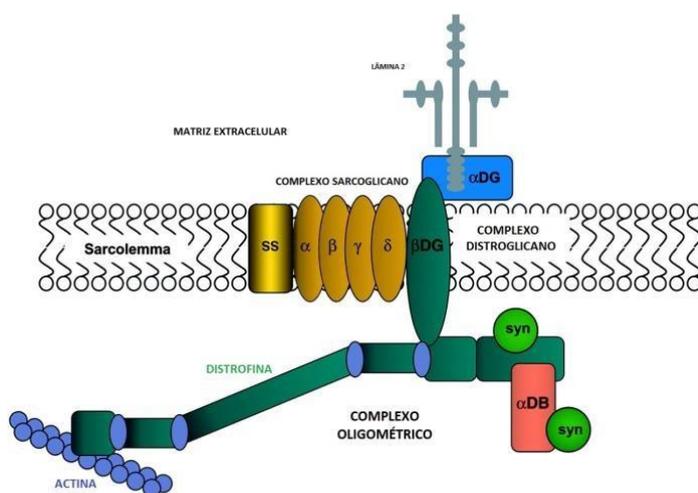
Entre as deficiências mais comuns, estão a fraqueza muscular e a fadiga, que formam a base do quadro clínico, e que seguem pela contratura articular, originando deformidades na coluna vertebral, alterações nas funções pulmonar e cardíaca, geralmente associadas à dor²⁶. Em casos mais severos, estas deficiências diminuem a expectativa de vida²⁶. Há, ainda, a incapacidade desses indivíduos demonstrada a partir da diminuição da mobilidade, dificuldades nas atividades da vida diária, aumento e rápida fadigabilidade e a dificuldade de ajustamento psicossocial²⁷. As alterações geram um impacto na vida social dos pacientes com diagnóstico de DMD, incluindo a redução da qualidade de vida, das oportunidades educacionais, de emprego e aumento da dependência funcional²⁶. Em um estudo realizado na Holanda, foram aplicados questionários de qualidade de vida em portadores da DMD, comparando-se os resultados com os da população em geral. Em pacientes com DMD, a pontuação foi inferior em todos os domínios, exceto as limitações de saúde e função mental, devido a problemas emocionais, bem como no escore de domínio de relações sociais. Os principais problemas detectados foram relacionamentos íntimos, trabalho, lazer, transporte e significado da vida. Os homens adultos portadores de DMD acreditam que suas limitações maiores estavam relacionadas às funções motoras e não mentais²⁷.

Sobre o diagnóstico, deve-se suspeitar, independente do histórico familiar, se houver os seguintes achados: função muscular anormal, detecção de altos valores de creatina quinase sérica e aumento dos valores de transaminases²⁰. Desde a fase de

deambulação, a creatina quinase se mostra aumentada por pelo menos 10 vezes o valor normal²⁰. A biópsia muscular segue como um dos testes para se diagnosticar a DMD, onde se encontram fibras necróticas, infiltração de macrófagos e linfócitos e fibras imaturas²⁰. Além disso, deve-se realizar a detecção da distrofina através de testes de imunofluorescência e imunohistoquímica, para verificar a deficiência total ou parcial da proteína. Até agora, foram identificados e registrados mais de 4500 variantes do gene DMD por biópsia muscular. Destes, 72% correspondiam a deleções extensas, 7% a duplicações e 20% a pequenas deleções, inserções ou mutações de uma única base²⁰.

A ausência da proteína distrofina é a causa principal da DMD. A distrofina é uma proteína longa que está apoiada sobre os filamentos de actina e miosina, responsáveis pela contração muscular. No músculo esquelético, a proteína distrofina tem função de conectar o citoesqueleto interno da fibra esquelética com as proteínas de matriz extracelular, promovendo a estabilização do sarcolema e isso reflete na contração muscular²⁰. A ausência da distrofina compromete o funcionamento do complexo oligomérico²⁰. Esse complexo é responsável pela ligação entre o citoesqueleto da actina e a matriz extracelular, pela estabilização do miócito durante a contração e relaxamento, e por transmitir a força gerada nos sarcômeros musculares para a matriz extracelular (Figura 1). O rompimento desse complexo leva à alta suscetibilidade de lesões por repetição, durante as contrações excêntricas²⁰.

Figura 1



A proteína distrofina estabiliza o complexo oligomérico durante a contração muscular.

Figura 1 – Complexo Oligomérico.
Fonte: Adaptada de Blake e colaboradores (2002)²⁸.

Há duas teorias sobre o papel da proteína distrofina nos tecidos. A primeira afirma que, quando a homeostase do cálcio é interrompida, há um aumento de cálcio intracelular e consequente necrose celular⁵. A segunda sustenta que a distrofina tem um papel estrutural importante na manutenção da integridade da dupla camada lipídica quando há estresse mecânico e osmótico. Na falta da proteína distrofina, a membrana se rompe, aumentando o influxo de íons extracelulares⁵. Quando há uma deficiência da proteína distrofina, as células tornam-se susceptíveis ao estresse mecânico e, finalmente, à infiltração anormal de cálcio que, somada à interação com outras proteínas, levam à destruição da fibra muscular. Em biópsias de sujeitos com diagnóstico de DMD, é possível observar conjuntos de fibras musculares necróticas, infiltração de macrófagos e linfócitos e fibras imaturas com núcleos centrados, resultantes dos ciclos de degeneração / regeneração, que dão origem ao fenótipo DMD⁶.

Além de estar presente no músculo esquelético, pode-se encontrar a distrofina em tecido encefálico⁵. A distrofina encefálica está localizada na membrana pós-sináptica cortical e nos neurônios do cerebelo. O cerebelo expressa uma isoforma de distrofina, a P-distrofina, que difere em apenas poucos aminoácidos e se localiza próximo às células de Purkinje. A C-distrofina se expressa nas células piramidais do córtex e no hipocampo, ao longo da membrana do corpo celular e dendritos⁵. Sendo assim, a ausência da distrofina pode estar relacionada a alterações da função neuronal⁵.

Além disso, a ausência da distrofia em tecido encefálico de animais mdx é associada a alterações importantes como o estresse oxidativo²⁹, diminuição dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF)²¹ e da atividade da acetilcolinesterase³⁰, alteração do metabolismo energético³¹ e da atividade das enzimas do ciclo de Krebs³². Estudos mostraram que a deficiência de distrofina em estruturas encefálicas como o hipocampo e neocórtex, está relacionada a prejuízos na retenção de memória e atrasos nas tarefas de aprendizagem³³. A falta de distrofina altera a homeostase do cálcio e a função neuronal do hipocampo, relacionando-se a déficits na memória de longa duração³⁰. Em camundongos mdx, evidencia-se encolhimento neural de até 50% no córtex e tronco encefálico⁵. E a bioenergética do SNC mostra aumento do nível de fosfato inorgânico, indicativo de patologia no encéfalo⁵. Em pacientes, há evidências de

desordem na arquitetura do SNC, anormalidades nos dendritos e perda de neurônios⁵. Além disso, o eletroencefalograma mostra-se alterado devido a ausência de distrofina na função sináptica^{5,34}.

Neste sentido, estudos têm sugerido que a distrofina possa desempenhar um papel estabilizador nos neurônios, semelhante à sua função na célula muscular, contribuindo, assim, para a integridade das sinapses. A distrofina está localizada nos dendritos e tende a se agregar nas densidades pós-sinápticas, sugerindo seu possível papel na transmissão neural e nos processos de aprendizado e memória^{5,35}. Na DMD, prejuízos no aprendizado e na memória vêm sendo descritos tanto em estudos pré-clínicos como clínicos^{5,29,33,35,36}.

1.1.2 Aprendizado e memória

A memória desenvolve-se graças à íntima relação entre aspectos biológicos e sociais, ocorrendo de forma distributiva, não existindo uma localização própria. O hipocampo, giro do cíngulo, amígdala, corpo mamilar e tálamo anterior tem participações importantes na sua formação³⁷. A memória é um processo cognitivo que envolve vários mecanismos neurais, os quais estão divididos em aquisição, armazenamento e evocação³⁷⁻⁴⁰. O momento em que a informação chega até o SNC é a aquisição³⁹. O processo, em que a informação é armazenada e retida por um período de tempo, chama-se consolidação e este processo acontece no hipocampo³⁷. Já a evocação ocorre no córtex pré-frontal e consiste na recuperação da informação armazenada⁴¹.

A memória pode ser classificada de acordo com o tempo de armazenamento em memória de curto prazo, memória de trabalho e memória de longo prazo. A memória de curto prazo abriga uma quantidade limitada de dados e pode durar de segundos a horas, retendo temporariamente as informações³⁷. A memória de trabalho é essencial para o processo de aprendizagem e realiza a comparação das informações novas com as que estão armazenadas na memória de longo prazo⁴⁰. As informações que passam pela memória de curto prazo ou serão perdidas ou serão armazenadas na memória de longo prazo³⁹. A memória de longo prazo armazena informações por longos períodos, informações estas que são reforçadas, ao longo do tempo, para que permaneçam lá⁴⁰.

O déficit cognitivo na DMD é um aspecto clínico conhecido, inclusive referido por Duchenne em 1868, na primeira descrição clínica da doença. Embora muitos pesquisadores em décadas passadas tenham refutado a hipótese do déficit cognitivo ser uma manifestação clínica associada à DMD, existem evidências corroborando a incorporação desse achado ao cenário semiológico da doença³³.

Neste contexto, sujeitos portadores de DMD apresentam deficiências cognitivas, menor quociente de inteligência (QI) e prejuízo na memória e no aprendizado³⁴. Estudos clínicos comportamentais mostraram diminuição de QI (média 85) em portadores de DMD⁵. Distúrbios psiquiátricos como autismo, distímia e depressão são comuns em pacientes com DMD. Além do atraso motor, observa-se também atraso da linguagem. O déficit cognitivo é um aspecto bastante frequente em pacientes com DMD, afetando cerca de 30% deles. Essa prevalência é maior do que a observada na população geral (1%). A média do QI é de 85, ou seja, abaixo do considerado normal, que oscila entre 90 e 120. Geralmente, o QI verbal é mais afetado que o QI executivo. Entretanto, a gravidade do déficit cognitivo não parece se correlacionar com a intensidade da fraqueza muscular³³.

Estudos utilizando animais mdx demonstraram prejuízo na memória aversiva⁵ e na memória visuo-espacial⁵. A ausência de distrofina no hipocampo e neocórtex está correlacionado a anormalidades no potencial de longa-duração^{5,44}. Sendo assim, o déficit de distrofina nos terminais neuronais pós-sinápticos do córtex, hipocampo e cerebelo, áreas intensamente envolvidas com o raciocínio e aprendizado, podem estar envolvidas das disfunções de neurodesenvolvimento e de cognição observadas na DMD³³.

Além da ausência da distrofina, outros fatores estão relacionados ao prejuízo de memória e aprendizado, como o estresse oxidativo³³. Há mecanismos antioxidantes que são protetores das estruturas encefálicas⁴². Sabe-se que o exercício físico pode aumentar as defesas antioxidantes⁴³. Porém, até o momento, não se explorou protocolos de exercício físico aeróbio como natação, com intuito de proteger contra as alterações decorrentes do processo da doença no SNC. Sendo assim, para se estudar estes mecanismos, há que se entender primeiramente o estresse oxidativo.

1.1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo⁴⁴. As mais importantes ERO são: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^-). A alta produção de ERO pode modificar macromoléculas de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios⁴⁵. Neste contexto, a peroxidação lipídica é um efeito bem caracterizado das espécies reativas, que resulta em dano na membrana e organelas celulares. Já em proteínas, as ERO podem induzir desnaturação, tornando-as disfuncionais⁴⁶. E a morte celular é regulada por enzimas que podem ser ativadas pelo excesso de ERO⁴⁷.

Além disso, o organismo apresenta defesas antioxidantes que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR), agem no intuito de minimizar a agressão das ERO no meio celular⁴⁵. A defesa não enzimática inclui as vitaminas, betacaroteno, glutathione (GSH), entre outros⁴⁵. A GSH é um tripeptídeo, com papel fundamental de antioxidante endógeno, contendo cisteína. Ela é o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos^{48,49}. Concentrações baixas de GSH têm sido identificadas em doenças que tenham estresse oxidativo relacionado a sua fisiopatologia⁵⁰.

Estudos apontam que, no processo fisiopatológico da DMD, ocorre um desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade antioxidante, causando danos e aumento da degeneração celular^{20,42,50}. Em pacientes com DMD, o nível de carbonilação de proteínas no músculo quadríceps foi aumentado cerca de 211%^{51,52}. Em contrapartida, um estudo mostrou que pacientes com diagnóstico de DMD, demonstraram níveis elevados de superóxido dismutase em soro²². Em tecido muscular de modelo animal, encontram-se o enfraquecimento mecânico do sarcolema, influxo inapropriado de cálcio, e sinalização celular anormal, além de estresse oxidativo e isquemia muscular recorrente⁴³. Em camundongos mdx foi observado um aumento dos produtos da lipoperoxidação lipídica em músculo esquelético⁵³. Evidências sugerem que o estresse oxidativo leva ao agravamento da patologia, seja respiratória ou da musculatura, em pacientes com DMD²⁰.

Além do estresse oxidativo, o processo inflamatório faz parte da fisiopatologia desta doença⁵⁴. No músculo distrófico, encontram-se elevados as interleucinas (IL)-

1 β e o fator de necrose tumoral (TNF- α), responsável pela regulação da expressão dos genes envolvidos na resposta inflamatória⁵⁵. Estas citocinas inflamatórias estão associadas com o estresse oxidativo e desempenham importantes papéis no processo degenerativo, em muitas doenças²⁰. Na DMD, o estresse oxidativo é um fator patogênico que pode determinar a gravidade da patologia no músculo distrófico⁵⁴.

Além de estar presente nos músculos esqueléticos, o estresse oxidativo está envolvido nas disfunções neuronais em animais mdx. Um estudo mostrou evidências de alterações nas enzimas antioxidantes no tecido encefálico de camundongos mdx e demonstrou que o aumento da atividade da enzima SOD pode ter um papel protetor importante contra os efeitos do estresse oxidativo²¹. O estresse oxidativo está relacionado, também, a doenças neurodegenerativas associadas a disfunções cognitivas⁵⁶. Estruturalmente, os neurônios contêm muitas mitocôndrias, o que torna o cérebro suscetível às ERO⁵⁶. Em animais mdx, já foram demonstradas alterações no metabolismo energético em tecido encefálico³¹, o que pode contribuir para o aumento da liberação de ERO. Além disso, o cérebro contém muitos ácidos graxos poli-insaturados, os quais são vulneráveis à peroxidação lipídica⁵⁷. Esses ácidos graxos encontram-se tanto em substância cinzenta como em substância branca e, também, na mielina⁵⁸. Isso torna o SNC vulnerável ao estresse oxidativo⁵⁹.

Neste sentido, muito tem sido estudado sobre os tratamentos possíveis e eficazes para o paciente com DMD, seja nos efeitos no SNC como nos efeitos musculares deletérios da doença. Um estudo, feito, em 2008, por Whitehead, demonstrou que seis semanas de tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína apresentou proteção contra o dano oxidativo e fraqueza muscular em camundongos mdx com oito semanas de idade. Há diversos métodos para aumentar as defesas antioxidantes, e, assim, evitar o desequilíbrio entre agentes oxidantes e essas defesas. Um destes métodos é o exercício físico.

1.1.4 Exercício físico aeróbio e natação

O exercício físico é uma vertente da atividade física, que tem como característica ser planejada, estruturada e repetitiva, afim de melhorar ou manter uma boa forma ou bem-estar⁷. O exercício pode ser de diversos tipos. Exercícios aeróbios e anaeróbios são dois tipos de exercício que diferem com base na intensidade, intervalo e tipos de fibras musculares incorporadas. O *American College of Sports*

Medicine (ACSM) define o exercício aeróbio como qualquer atividade que usa grandes grupos musculares, podendo ser mantido continuamente e tem natureza rítmica. Como o nome indica, os grupos musculares, ativados por este tipo de exercício, dependem do metabolismo aeróbio para extrair energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP, do inglês adenosine *triphosphate*, ou trifosfato de adenosina), a partir de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos. Exemplos de exercícios aeróbios incluem ciclismo, dança, caminhadas, corridas e natação⁶⁰. Quando controlado, o exercício de intensidade alta/vigorosa (64–90% VO₂ max; 77–95% frequência cardíaca (FC) máxima) é superior ao exercício de intensidade leve a moderada (46–63% VO₂ max; 64–76% FC max) para melhorar a capacidade aeróbia⁶¹. A prática regular de exercício físico estimula o fortalecimento muscular, a manutenção do peso corporal, o condicionamento cardiovascular, a manutenção do sistema imune e também ajuda a prevenir doenças crônicas^{7,8}.

A natação é uma modalidade de exercício aeróbio muito popular e altamente recomendada para prevenção e promoção da saúde²³. É geralmente indicada por evitar impacto e facilitar a adesão pela melhor adaptação ao ambiente com água aquecida. A natação é descrita, na literatura, como tendo efeitos no alívio da dor e na melhora da qualidade de vida de seus praticantes²⁴, além de efeitos benéficos na cognição e no estresse oxidativo^{62,63}. Há relatos de benefícios da prática da natação na performance e no envelhecimento cognitivo, além do condicionamento cardiorrespiratório⁶⁴. O treino de natação aumenta a função pulmonar e o condicionamento cardiorrespiratório e é bem tolerado até mesmo em crianças e adolescentes com asma estável⁶⁵.

Ainda não há consenso, na literatura, quanto a evidências dos efeitos dos exercícios para tratamento da DMD¹⁶. O papel do exercício no tratamento da DMD permanece indefinido porque há poucos dados com estudos controlados em pacientes e, além disso, porque estudos com o modelo animal também são poucos e limitados para descrever parâmetros de exercícios. Os riscos do exercício para o músculo distrófico vêm sendo discutidos, na literatura, por muitos anos, já que muito exercício pode causar fraqueza ou lesão¹⁶. Essa limitação pode ser devida a problemas éticos, pois ao colocar pacientes em grupos controles sem exercício, pode-se piorar o processo distrófico⁶⁶, visto que quase todas as distrofias musculares progressivas causam intolerância ao exercício em algum grau^{3,67}. Faltam evidências para sustentar a prescrição de exercício físico aeróbio apropriada na DMD, uma vez que a atividade

inapropriada pode exacerbar o processo distrófico. Uma análise sistemática da função muscular deve ser feita para determinar os limites de carga, a fim de evitar dano no tecido muscular esquelético em animais distróficos e, posteriormente, em humanos. Exercícios diferentes têm sido utilizados na tentativa de aumentar a performance muscular, incluindo exercício de resistência, produzindo melhoras significativas na função muscular, quando iniciados durante os primeiros estágios da doença⁶⁸. Para a DMD, tem se demonstrado ser necessária uma intensidade mínima de 20% da contração voluntária máxima, a fim de evitar a hipotrofia muscular por desuso; enquanto o exercício de força e resistência deve ser regular e com uma intensidade progressiva e controlada⁶.

Neste contexto, programas de exercícios são propostos para verificar os efeitos nas fibras musculares. Alguns estudos observaram efeitos benéficos do exercício sobre o músculo distrófico, sugerindo a melhora da capacidade oxidativa muscular e a transformação em fibras menos fadigáveis, o que provê uma maior resistência muscular como um mecanismo de adaptação⁴³. Há muitos fatores que podem interferir nos efeitos do exercício na terapêutica da DMD, tais como: o grau de severidade da doença, localização e progressão da fraqueza, e, ainda qual o tipo, a intensidade e a duração de exercício são prescritos⁴³. O estilo de vida sedentário leva à redução da qualidade de vida e da capacidade funcional, além de efeitos secundários da doença, como: hipotrofia, fraqueza, fadiga, dificuldade de locomoção, dor, excesso de peso corporal e dificuldade de se exercitar⁴³.

Um estudo comparou os efeitos de dois tipos de exercício físico em pacientes com DMD nos estágios iniciais e concluiu que o treino de membros superiores e com um cicloergômetro (exercício aeróbio) foi mais efetivo em preservar o nível funcional no início da doença, comparando-se com exercícios de força e de amplitude de movimento. Houve melhoras na deambulação, resistência, função de membros superiores e força muscular proximal no grupo estudado⁶⁹. Outro estudo aponta que o exercício físico aeróbio foi benéfico aos camundongos mdx, reforçando a regeneração de função muscular por aumentar a proporção de fibras oxidativas e reduzir a fatigabilidade muscular¹⁹. Em um programa de natação, de quinze semanas, foram comparados camundongos mdx com camundongos normais, demonstrando aumento de massa muscular nos camundongos distróficos treinados quando comparados com controles. Os controles não mostraram mudança em sua função nem na morfofisiologia do músculo. Os treinados tiveram alta tensão muscular após o

exercício e tempo maior de relaxamento muscular após o exercício¹⁹. Além disso, um outro estudo, ainda com modelo animal mdx, mostrou benefícios da natação aliada à suplementação dietética em testes de memória e reconhecimento de objetos, demonstrando melhora na memória curta, memória de longo prazo e aprendizagem espacial. O grupo que praticou a natação apresentou melhor resultado em testes de memória a curto e a longo prazo⁷⁰.

Tem sido mostrado, em animais saudáveis, que o treinamento aeróbio com natação diminuiu os marcadores de estresse oxidativo e também aumentou o estoque de glicogênio no sóleo e no fígado⁶⁴. Outro estudo demonstrou que os benefícios de um protocolo de natação de baixa intensidade estão associados com a diminuição do dano oxidativo, verificado na redução da carbonilação de proteínas envolvidas no metabolismo energético e na contração muscular¹³.

Como descrito acima, o exercício aeróbio, de baixa a moderada intensidade, para miopatias, pode causar efeitos benéficos, porém exercícios de alta intensidade devem ser evitados na DMD⁶⁶. Assim, dependendo da intensidade do exercício físico, esse recurso terapêutico pode melhorar ou piorar a fisiopatologia da DMD. Há estudos que demonstraram prejuízos do exercício em modelo animal, como aumento da fibrose no diagrama nos camundongos mdx exercitados, aumento da atividade da MMP-2, (do inglês, matrix metalloproteinase-2, ou metaloproteinase de matriz, que está envolvida na resposta inflamatória) 45% de fibrose no ventrículo direito e 35% no ventrículo esquerdo; aumento de 95% densidade cardiomiócitos; aumento da espessura da parede do ventrículo direito, sugerindo hipertensão pulmonar. A degeneração do diafragma é o principal contribuinte para patologia distrófica do ventrículo direito. Este estudo concluiu que a natação (sessenta minutos por dia, seis dias por semana por dois meses) exacerbou a degeneração do diafragma e aumentou o fenótipo distrófico; porém a natação é benéfica para o músculo-esquelético (mdx); além disso a expressão de isoformas MMP-2 foi maior no diafragma do mdx treinado. Ou seja, apesar da natação aumentar a função cardíaca, outros estudos mostram o coração afetado negativamente pelo exercício com aumento da parede VD; aumento da espessura do tronco pulmonar com diminuição do lumen, levando à hipertensão pulmonar⁴.

Sendo assim, não há estudos atuais que relacionem o exercício físico aeróbio de baixa intensidade na água (natação) com a modulação do estresse oxidativo em

tecido muscular e nervoso nem com a reversão do dano à memória, encontrado na DMD.

1.1.5 Modelo animal de Distrofia Muscular de Duchenne

O modelo animal de DMD, o camundongo mdx, é o modelo mais acessível e próximo ao ser humano para experimentos pré-clínicos de intervenção na DMD⁶³. Os camundongos mdx também apresentam a falta de distrofina graças a uma mutação no gene para distrofina. A patologia muscular é semelhante à que ocorre em meninos com DMD, mas o curso clínico é menos severo do que em pacientes mais velhos. Estudos com modelo animal mdx já reproduziram os mecanismos complexos de degeneração muscular, progressão de fraqueza muscular e apresentação clínica da doença⁴. Camundongos mdx apresentam dano muscular como nos pacientes, porém sofrem uma regeneração quase completa que lhes permite viver ativos durante toda sua vida. Entretanto a degeneração, a inflamação e a regeneração são vistas até 30 semanas de vida nos camundongos mdx, sugerindo que a miopatia persiste até a idade na qual a função muscular é restaurada. Além disso, a massa muscular é mantida, fazendo com que os camundongos mdx sejam um bom modelo para utilizar em estudos sobre DMD, pois asseguram os efeitos do exercício de resistência de longa duração nas propriedades do músculo distrófico⁶⁸.

O camundongo mdx apresenta uma mutação no gene da distrofina, como nos humanos. Estes animais também apresentam infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, mas não apresentam intensa fibrose nem depósito de tecido adiposo no músculo, diferente dos humanos. Outras semelhanças são: a degeneração e fibrose do diafragma, o processo de envelhecimento e sobrevida diminuída. O comprometimento celular, causado pelo estresse oxidativo, ocorre tanto em meninos quanto em camundongos mdx, que são o modelo animal mais largamente utilizado por ser aceito como um modelo genético e bioquímico da DMD, o qual tem sido estudado desde 1980^{43,71}.

Sabendo-se que a ausência da distrofina e o estresse oxidativo em músculo esquelético e no SNC são encontrados tanto em pacientes como no modelo animal, considera-se o camundongo mdx um bom modelo para se estudar os efeitos do exercício sobre estes processos. Assim, o modelo animal mais aceito para estudos de

doenças, que têm como principal causa a deficiência da distrofina, é o camundongo mdx. Esses animais permitem que se desenvolvam diversos estudos, para que se entenda melhor o mecanismo da DMD e seja possível pensar em novas intervenções para modificar o curso desta doença⁷².

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da natação sobre a memória e o estresse oxidativo em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a intensidade do protocolo de natação utilizado;
- Avaliar os efeitos da natação sobre a memória aversiva e de habituação em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne;
- Verificar os efeitos da natação sobre a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em tecido encefálico e esquelético em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne;
- Analisar os efeitos da natação sobre os grupamentos tióis em tecido encefálico e esquelético em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo é do tipo experimental com o uso de um modelo animal.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os animais foram cuidados, utilizando-se caixas-moradia de polipropileno, frascos de água, maravalha (Biotécnicas, Brasil) e ração (Nuvilab Quimtia, Brasil). Para a natação, foi utilizado um recipiente (recipiente plástico adaptado para este fim (170 x 100mm), com 35 litros de água de 28 a 30°C, dividido em 8 poços), um termômetro (Kuka, Brasil) e shampoo de bebê (Johnson, Brasil).

Para a realização dos testes de comportamento, foram utilizados o teste de esQUIVA inibitória (Insight, Brasil) e o teste de habituação em campo aberto (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 foi dividido em 16 quadrados iguais marcados por linhas pretas. O material foi construído por marceneiro local.

Para a bioquímica, foi utilizado um *kit* para dosagem de proteínas pelo método BCA (Thermo Scientific, EUA) e, também, os seguintes reagentes: tampão PBS pH 7,2 +/-0,1 (Laborclin, Brasil), 1,1,3,3-Tetramethoxypropane 99% (Aldrich Chemistry, EUA), TBA (ácido tiobarbitúrico, EMD Milipore Corporation, EUA), BHT (hidroxitolueno butilado (2,6-Di-ter-butil-4-metilfenol) ≥99.0%, (Aldrich Chemistry, EUA), NaOH (Hidróxido de Sódio) (Tedia, EUA), DNTP (2,4-Dinitrofenilhidrazina) PM:198,14 (Dinâmica, Brasil), Carbonato de Sódio (Spectrum, Canadá), Ácido acético P.A Glacial (Vetec Química Fina, Brasil), Acetato de etila, 3, PG II (Tedia, EUA) e também placas para tecidos, com 96 poços (TPP, Suíça). Além destes, utilizou-se material de laboratório (vidraria, estantes, instrumentos cigúrgicos). Para a anestesia dos animais, foi utilizado tiopental sódico 1g pó estéril (Thiopentax, Cristália, Brasil). Para o preparo das amostras, foi utilizada a centrífuga refrigerada SL-701 (Solab Científica, Brasil). E para a verificação dos resultados, o leitor de microplacas DNM-9602 Microplate Reader (Perlong Medical, China). Para a determinação dos níveis de

lactato sanguíneo, foi utilizado um lactímetro portátil (Accutrend® Roche, Basel, Suíça). Todos estes materiais foram utilizados no Laboratório de neurociências experimental (LANEX) e Laboratório de bioquímica e biologia molecular (UNISUL, campus Pedra Branca, bloco I).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos mdx e *wild-type* da linhagem C57BL/6 com 28 dias de vida, pesando entre 18-23g, procedentes (doação) da USP – São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do LANEX e acondicionados 5 animais por caixa, ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00h) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C. O estudo foi realizado no LANEX e no Laboratório de bioquímica e biologia molecular, durante os anos de 2016 e 2017.

3.3.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do número de animais necessários para cada grupo experimental, temos que: $n = [(z\alpha/2 + z\beta)^2 \cdot s^2] / (\bar{x} - \mu)^2$. Onde:

$z\alpha/2$ = valor de z na curva normal segundo o valor α ;

$z\beta$ = erro beta;

s^2 = variância;

$(\bar{X} - \mu)^2$ = diferença máxima estimada entre a média amostral (\bar{X}) e a verdadeira média populacional (μ). É a margem de erro ou erro máximo de estimativa.

Assim, atribuíram-se os seguintes valores para o cálculo do número de animais:

1. O valor de alfa será fixado em 0,05. Assim, o valor de $z\alpha/2$, baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal, é 1,96.
2. O valor de beta será fixado em 0,20. Assim, o valor de $z\beta$, baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal), é 0,84.
3. O valor do desvio padrão (s) como sendo em média 30% do valor das médias (baseado em dados experimentais do nosso laboratório).
4. O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm

embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem etc).

Aplicando os valores à fórmula acima, temos:

$$n = [(1,96 + 0,84)^2 \cdot 302] / (0,4 - 0,1)^2 = 7,84 \text{ animais}$$

Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais deve ser utilizado em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existam, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não existam. Para segurança e confiabilidade dos dados, 10 animais por grupo foram utilizados neste estudo.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Como ilustrado na Figura 2, ao completarem 28 dias de vida, os animais foram separados em quatro grupos: (1) *wild-type* não exercitado; (2) *wild-type* exercitado; (3) mdx não exercitado e (4) mdx exercitado. Os grupos 2 e 4 foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico do tipo natação durante quatro semanas, conforme protocolo descrito abaixo. Vinte quatro horas após o último dia de treinamento, os testes de memória aversiva e de habituação foram realizados. Após, os animais foram sedados e submetidos ao procedimento de morte indolor assistida e foram retiradas as estruturas: gastrocnêmio, quadríceps, diafragma, córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex encefálico para determinação da peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e grupamentos tióis.

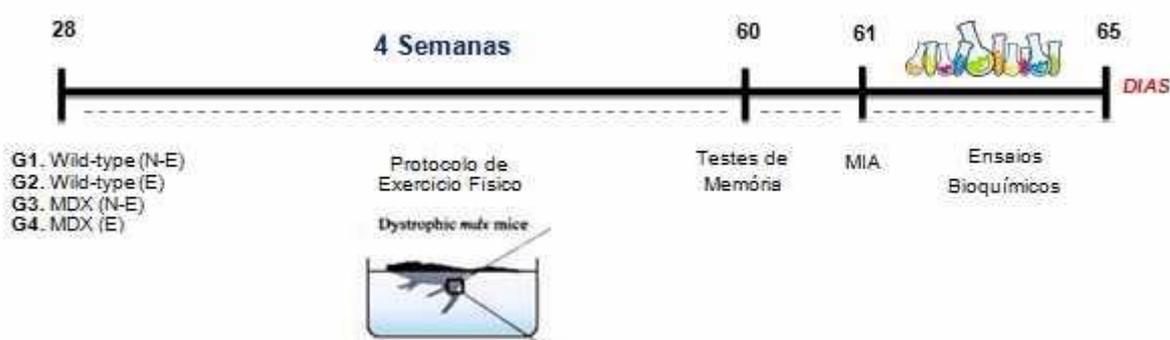


Figura 2 – Linha do tempo – delineamento do estudo.

Os grupos de animais exercitados foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio de natação em um recipiente plástico adaptado para este fim (170 x 100mm), com 35 litros de água de 28 a 30°C, dividido em 8 raias. Foram quatro semanas consecutivas de exercícios, quatro vezes por semana, com sessões diárias de 15 min na primeira semana, 20 min na segunda, 30 min na terceira e quarta semana (adaptado de Hyzewicz e colaboradores, 2015)¹³. Foi utilizado 1ml de shampoo de bebê em todo o recipiente para diminuir a tensão superficial da água (adaptado de Mazzardo-Martins e colaboradores, 2010)⁷³. Após o protocolo, os animais foram gentilmente secados. Os grupos de animais não exercitados não realizaram nenhum tipo de exercício físico, permanecendo em suas caixas-moradia durante todo o período de estudo.

A determinação da intensidade do exercício foi realizada na quarta semana de protocolo nos animais wt e mdx. Amostras de sangue foram coletadas antes do teste, no 10^o e no 30^o minuto de exercício para a subsequente análise da concentração de lactato. O critério para considerar a intensidade foi o aumento da concentração de não mais que 1 mmol/L entre o 10^o e o 30^o minuto de exercício físico. A higienização do local a ser coletado o sangue foi realizada com álcool (70%). Após este procedimento, a porção distal da cauda do animal foi ligeiramente seccionada com uma tesoura cirúrgica e 25 µl e uma gota de sangue foi inserida na fita de coleta do lactato, e por meio de um lactímetro portátil, foi realizada a mensuração do nível sanguíneo de lactato. Antes de cada teste o equipamento foi calibrado de acordo com instruções do fabricante⁷⁴.

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Teste de memória aversiva

Este teste consiste em uma caixa de acrílico, na qual o piso é formado por barras paralelas de metal. Uma plataforma com 7cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais são colocados sobre a plataforma e mede-se o tempo, em segundos, que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebe um

choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele leva para descer (latência), porém não é administrado choque. O teste também é finalizado se o animal não descer até o tempo máximo de 3 minutos⁷⁵.

3.5.2 Teste de memória de habituação

Este teste 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 16 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 exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa-moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos com as 4 patas (*crossings*: atividade motora) através das linhas pretas e o número de vezes em que os animais se apoiaram sobre as patas traseiras (*rearings*: atividade exploratória) foram avaliados em ambas sessões⁷⁶.

3.5.3 Medidas de estresse oxidativo

3.5.3.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é utilizado para avaliação do estado de oxidação de hidroperóxidos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (como MDA ou malondialdeído), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um produto colorido róseo, lido em leitor de microplacas a 535nm. A técnica consiste na seguinte forma: primeiramente, calculou-se o valor da diluição para que, no tubo de reação do TBARS, tenha 100µl de proteína do tecido em 500µl de tampão BHT. Após, adicionou-se 500µl da solução de TBA a 0,67%. Os tubos foram colocados em banho seco à 96°C, durante 30 minutos. Para

parar a reação, as amostras foram colocadas em gelo durante 5 minutos. Por fim, 200 µl da reação foram colocados em microplacas de 96 poços e lidos no leitor de microplacas à 535nm.

3.5.3.2 Medida do dano oxidativo em proteínas

Este método foi utilizado para dosagem de oxidação de proteínas. Baseia-se no princípio de que vários ERO atacam resíduos de proteínas como aminoácidos para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado através de um leitor de microplacas a 370nm, como descrito por Levine e colaboradores, em 1990. Primeiramente, o tecido foi homogeneizado em 1 ml de tampão BHT. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos à 4°C em 14000 rpm. Separaram-se 200 µl da amostra para o branco e 200 µl para o teste. Foram colocados 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 20% em todos os eppendorfs. Foi centrifugado por 5 minutos em 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante. Redissolveu-se o pellet em 100 µl de NaOH 0,2 molar. Foram colocados 100 µl de dinitrofenilhidrazina 2,4 (DNTP) na amostra e deixou-se descansar por 1 hora. Colocaram-se 100 µl de TCA a 20% em todos os eppendorfs, que foram centrifugados por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante. O pellet então foi lavado por 3 vezes com 500 µl de etanol e acetato de etila (1:1). Para cada lavagem, foi centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm e descartado o sobrenadante. Depois de descartar a última lavagem, foi colocado 1ml de hidróxido de sódio (NaOH) 3% em todos os eppendorfs. As amostras foram levadas ao banho-maria à 60°C por 30 minutos e lidas no leitor de microplacas a 370 nm.

3.5.3.3 Grupamentos tióis

Os radicais sulfidrilas representam todos os grupos de tióis encontrados em proteínas como a albumina e compostos de baixo peso molecular, como a glutathiona. Esses grupos podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado. A determinação de grupos sulfidrilas totais, grupos sulfidrilas ligados a proteínas e grupos sulfidrilas em compostos de baixo peso molecular (sulfidrilas livres) pode ser realizada pela utilização do reagente de Ellman (ácido 2,2-dinitro-5,5-ditiobenzoico - DTNB). Os grupos tióis reagem com DTNB, formando um complexo que absorve luz

a 412 nm. A técnica consiste na adição do TCA a 10% ao mesmo volume da amostra (diluição 1:1). Preparou-se branco, contendo 100 µl de TCA adicionado 100 µl de PBS. Foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm (temperatura 4°C); recolheu-se o sobrenadante e a 75 µl deste foram adicionados 30 µl de DTNB (1,7mM) e 300 µl de ácido clorídrico (TRIS-HCl); deixou-se reagir por 30 minutos e transferiu-se para a placa de 96 poços. As amostras foram lidas em leitor de microplacas à 412 nm.

3.5.3.4 Dosagens de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de BCA e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. O método baseia-se na reação do cobre com proteínas em meio básico. As amostras foram analisadas por um leitor de placas à 562nm.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Exercício	Independente	Qualitativa nominal	Sim/ Não
DMD	Independente	Qualitativa discreta	Sim/ Não
Teste de memória Aversiva	Dependente	Quantitativa discreta	Segundos (s)
Teste de habituação em campo aberto	Dependente	Quantitativa discreta	Número de cruzamentos
Carbonilação de proteínas	Dependente	Quantitativa contínua	nmol/mg
TBARS	Dependente	Quantitativa contínua	nmol/mg
Grupamentos tióis	Dependente	Quantitativa contínua	nmol/mg

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após a coleta, os dados foram inseridos em um banco de dados, desenvolvido em meio eletrônico, no software IBM SPSS Statistics 24.0 (@copyright IBM corporations and its licensors 1989, 2016). O teste de normalidade, de Shapiro-Wilk,

foi aplicado para verificar o comportamento dos dados. Os dados referentes ao teste de habituação ao campo aberto foram expressos em média e desvio padrão por se tratarem de dados paramétricos. Para diferença entre os grupos, foi utilizado teste de ANOVA de duas vias com post-hoc Bonferroni. Para diferença entre treino e teste em um mesmo grupo, foi utilizado teste t de student para amostras pareadas. Os dados do teste de esquiva inibitória foram expressos em mediana e intervalo interquartil por se tratarem de dados não paramétricos. Foi utilizado o teste de Wilcoxon para análise entre treino e teste em um mesmo grupo. Os dados dos testes bioquímicos foram expressos em média e desvio padrão por se tratarem de dados paramétricos. Foi utilizado o teste de ANOVA, de duas vias, com post-hoc Bonferroni, para análise entre os grupos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA da UNISUL sob o número 16.003.4.01.IV.

4. RESULTADOS

4.1 MEDIDA DO LACTATO

A Figura 3 expõe os resultados obtidos após a medida do lactato feita no sangue retirado dos animais, durante a realização do protocolo de natação.

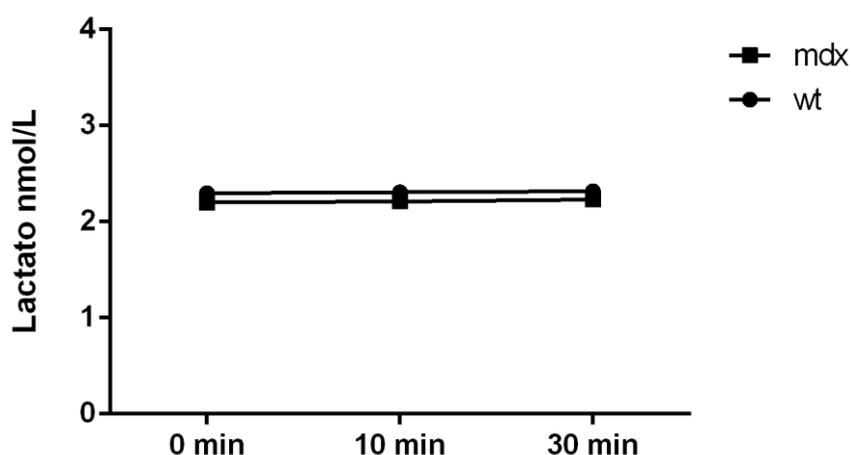


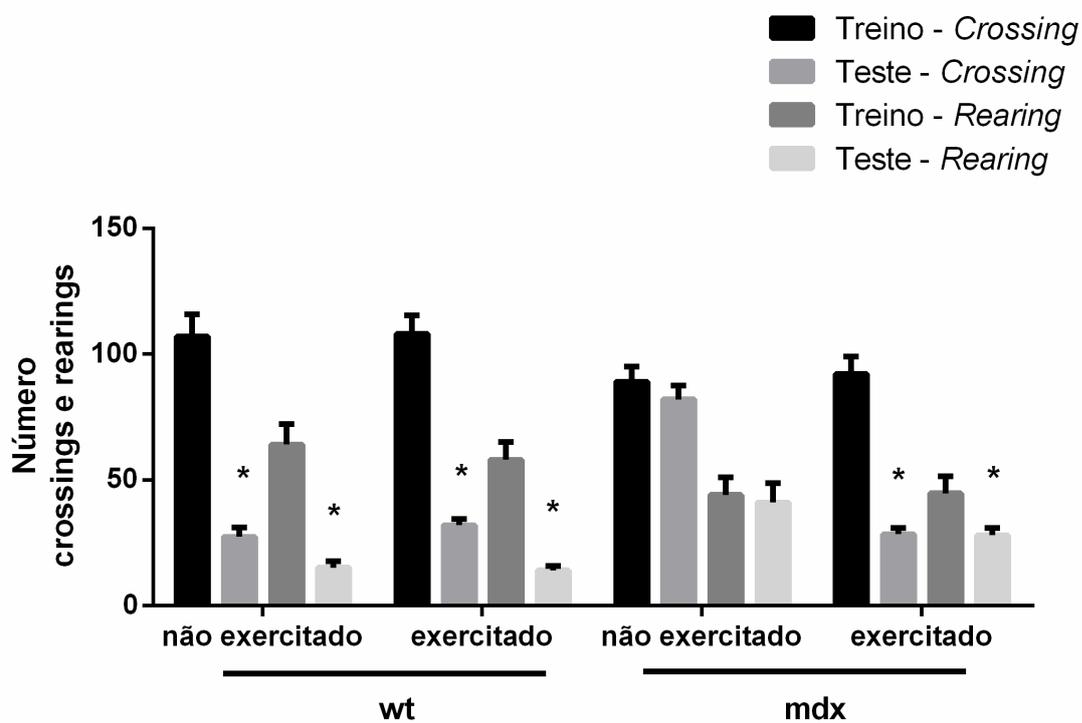
Figura 3 – Medida de lactato dos animais mdx e wt submetidos ao protocolo de natação.

A Figura 3 mostra que tanto em animais *mdx* quanto em animais *wt* submetidos ao protocolo de natação, não houve modificação do lactato sangüíneo acima de 1 mmol/L entre o 10º e o 30º minuto de exercício físico em relação aos valores de repouso, (sendo os valores médios de lactato de 2,31nmol/l para os animais *wt* e 2,21 para os animais *mdx*) isto é, mantiveram-se abaixo do limiar de lactato. Sendo assim, pode-se considerar o protocolo de natação utilizado neste estudo como de intensidade moderada.

4.1 AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO E DA MEMÓRIA

A Figura 4 expõe os resultados obtidos após a aplicação de um protocolo de natação sobre a memória aversiva (Figura 4A) e de habituação (Figura 4B).

A)



B)

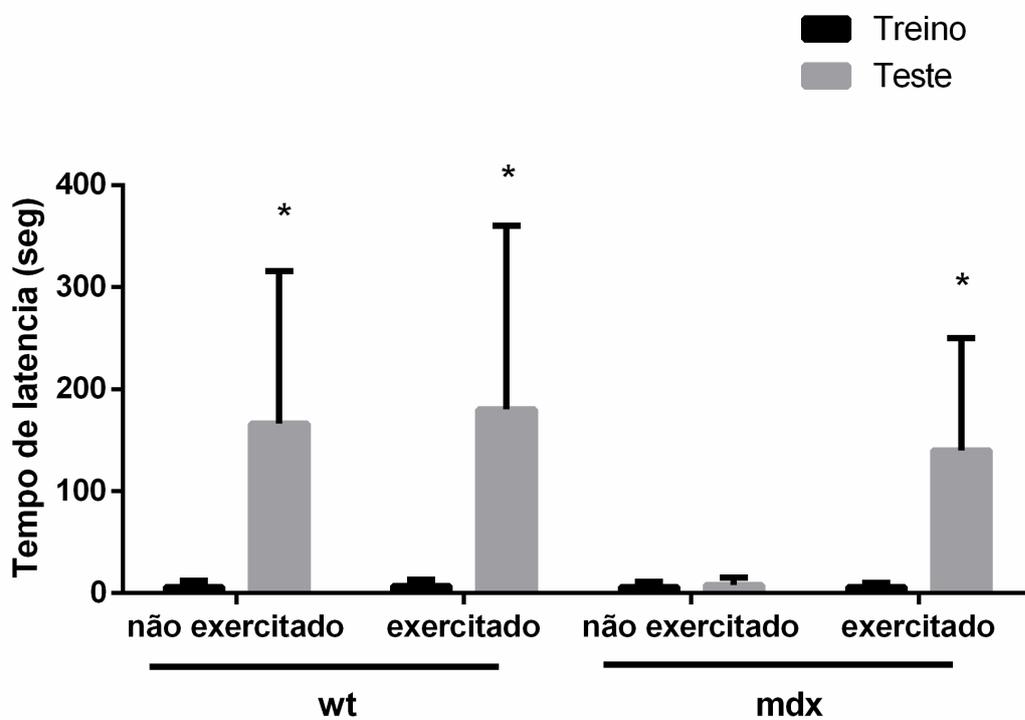


Figura 4 – Efeito de um protocolo de natação sobre a memória aversiva e de habituação de camundongos.

Na Figura 4A, observam-se os resultados da avaliação da memória de habituação, através do teste de campo aberto. Pode-se observar que não houve diferença no número de *crossings* e *rearings* ($p > 0,05$), entre os grupos, durante a fase de treino, demonstrando que não houve diferença na atividade locomotora entre os grupos. Os animais wt (selvagens) não exercitados e exercitados demonstraram alterações significativas, entre treino e teste, tanto no número de *crossings* quanto no número de *rearings* ($p < 0,05$), ou seja, não houve comprometimento da memória avaliada. Já o grupo de animais mdx (DMD) não exercitados, não demonstraram alterações significativas entre treino e testes no número de *crossings* e de *rearings* ($p > 0,95$), evidenciando um comprometimento da memória. Em contrapartida, o grupo de animais mdx que foram submetidos ao protocolo, mostraram uma diminuição no número de *crossings* e *rearings* entre treino e teste ($p < 0,05$), sugerindo uma possível prevenção ao comprometimento da memória aversiva nos camundongos mdx.

Os resultados da avaliação da memória aversiva através do teste de esQUIVA inibitória são demonstrados na Figura 4B. No grupo de animais wt não exercitados e exercitados, houve uma diferença estatisticamente significativa no tempo de latência entre treino e teste, não demonstrando comprometimento da memória aversiva ($p < 0,05$). No grupo de animais mdx não exercitados, não houve diferença estatisticamente significativa entre treino e teste, evidenciando um comprometimento da memória aversiva ($p > 0,05$). Já os animais mdx submetidos ao protocolo experimental, mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre treino e teste, ou seja, não houve comprometimento da memória aversiva nestes animais ($p < 0,05$).

4.2 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

A Figura 5 mostra os resultados do uso de um protocolo de natação sobre a peroxidação lipídica (Figura 5A), carbonilação de proteínas (Figura 5B), e tióis livres (Figura 5C) no músculo gastrocnêmio.

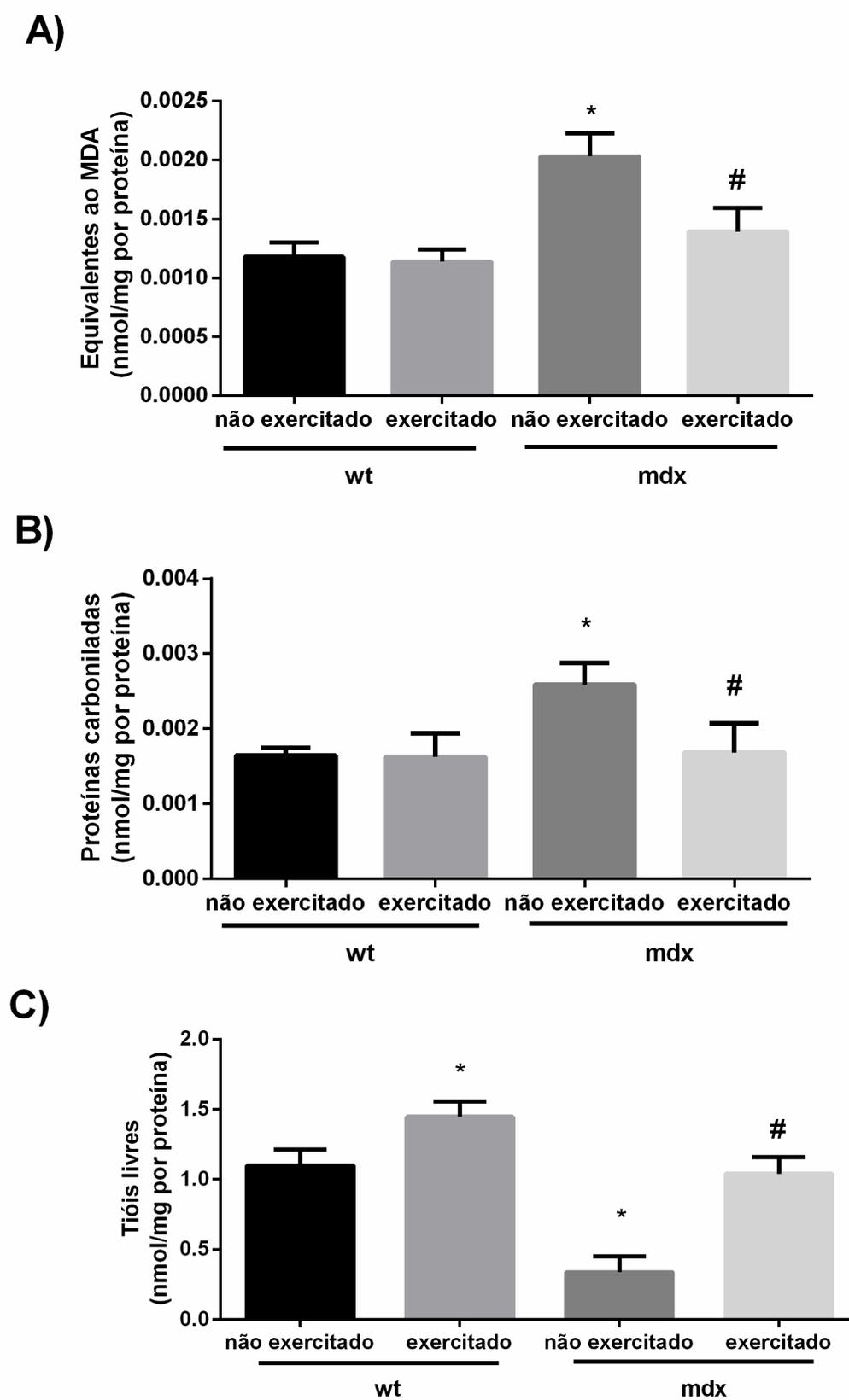


Figura 5 – Efeito de um protocolo de natação sobre o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de camundongos. (* quando comparado com o grupo wt não exercitado; ** quando comparado com o grupo mdx não exercitado).

A Figura 5A mostra o resultado da avaliação da peroxidação lipídica em gastrocnêmio. Observou-se que os animais mdx não exercitados apresentaram níveis significativamente elevados de peroxidação lipídica em gastrocnêmio, quando comparado com os animais selvagens não treinados ($p < 0,05$). Já os animais mdx que foram submetidos ao protocolo experimental, apresentaram uma redução significativa destes níveis quando comparados aos animais mdx não exercitados ($p < 0,05$), evidenciando que o protocolo experimental utilizado neste estudo protegeu contra o aumento da peroxidação lipídica em gastrocnêmio em animais mdx.

Pode-se observar que os animais mdx não exercitados apresentaram um aumento significativo na carbonilação de proteínas em gastrocnêmio quando comparado ao grupo de animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Após o protocolo experimental, os animais mdx apresentaram níveis de carbonilação de proteínas significativamente menores quando comparados aos animais mdx não exercitados ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de natação, por quatro semanas, foi capaz de prevenir o aumento da carbonilação de proteínas, observado no músculo gastrocnêmio de animais mdx (Figura 5B).

A quantificação dos tióis livres em gastrocnêmio é mostrada na Figura 5C. Pode-se observar que houve um aumento significativo na quantidade de tióis livres em gastrocnêmio do grupo de animais selvagens submetidos ao protocolo experimental, quando comparado aos animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Também houve uma diminuição significativa nos animais mdx não exercitados, quanto comparados aos animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Quando os animais mdx foram submetidos ao protocolo experimental, houve um aumento da quantidade de tióis livres, quando comparado aos animais mdx não exercitados.

4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO DIAFRAGMA

A Figura 6 mostra os resultados do uso de um protocolo de natação sobre a peroxidação lipídica (Figura 6A), a carbonilação de proteínas (Figura 6B), e tióis livres (Figura 6C) no músculo diafragma.

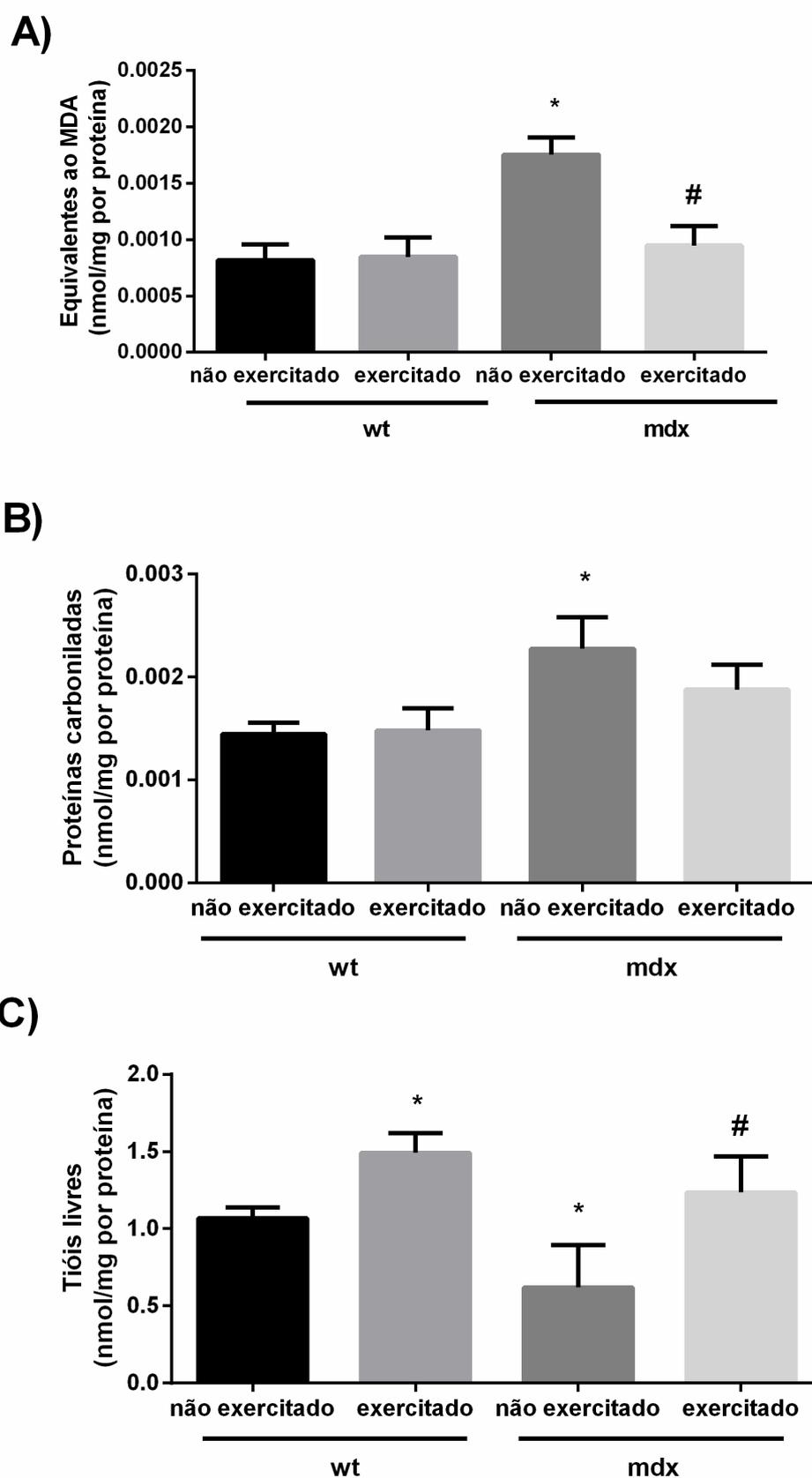


Figura 6 – Efeito de um protocolo de natação sobre o estresse oxidativo no músculo diafragma de camundongos. (* quando comparado com o grupo wt não exercitado; ** quando comparado com o grupo mdx não exercitado).

Observa-se que os animais mdx, não exercitados, apresentaram um aumento significativo na peroxidação lipídica em diafragma, quando comparado ao grupo de animais selvagens, não exercitados ($p < 0,05$). Após o protocolo experimental, os animais mdx apresentaram níveis de peroxidação lipídica significativamente menores quando comparados aos animais mdx, não exercitados ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de natação, por quatro semanas, foi capaz de prevenir o aumento da peroxidação lipídica observada no músculo diafragma de animais mdx (Figura 6A).

A Figura 6B mostra o resultado da avaliação da carbonilação de proteínas em diafragma. Observou-se que os animais mdx, não exercitados, apresentaram níveis significativamente elevados de carbonilação de proteínas em diafragma, quando comparado com os animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Já os animais mdx que foram submetidos ao protocolo experimental, não apresentaram uma redução significativa destes níveis quando comparados aos animais mdx não exercitados, evidenciando que o protocolo experimental utilizado neste estudo não protegeu contra o aumento da carbonilação de proteínas em diafragma em animais mdx.

A quantificação dos tióis livres em diafragma é mostrada na Figura 6C. Pode-se observar que houve um aumento significativo na quantidade de tióis livres em diafragma do grupo de animais selvagens submetidos ao protocolo experimental, quando comparado aos animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Também houve uma diminuição significativa nos animais mdx, não exercitados, quando comparados aos animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Quando os animais mdx foram submetidos ao protocolo experimental, houve um aumento da quantidade de tióis livres, quando comparado aos animais mdx não exercitados, demonstrando que a natação foi capaz de proteger esta alteração.

4.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A Figura 7 mostra os resultados do uso de um protocolo de natação sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal (Figura 7A), hipocampo (Figura 7B), estriado (Figura 7C) e córtex (Figura 7D).

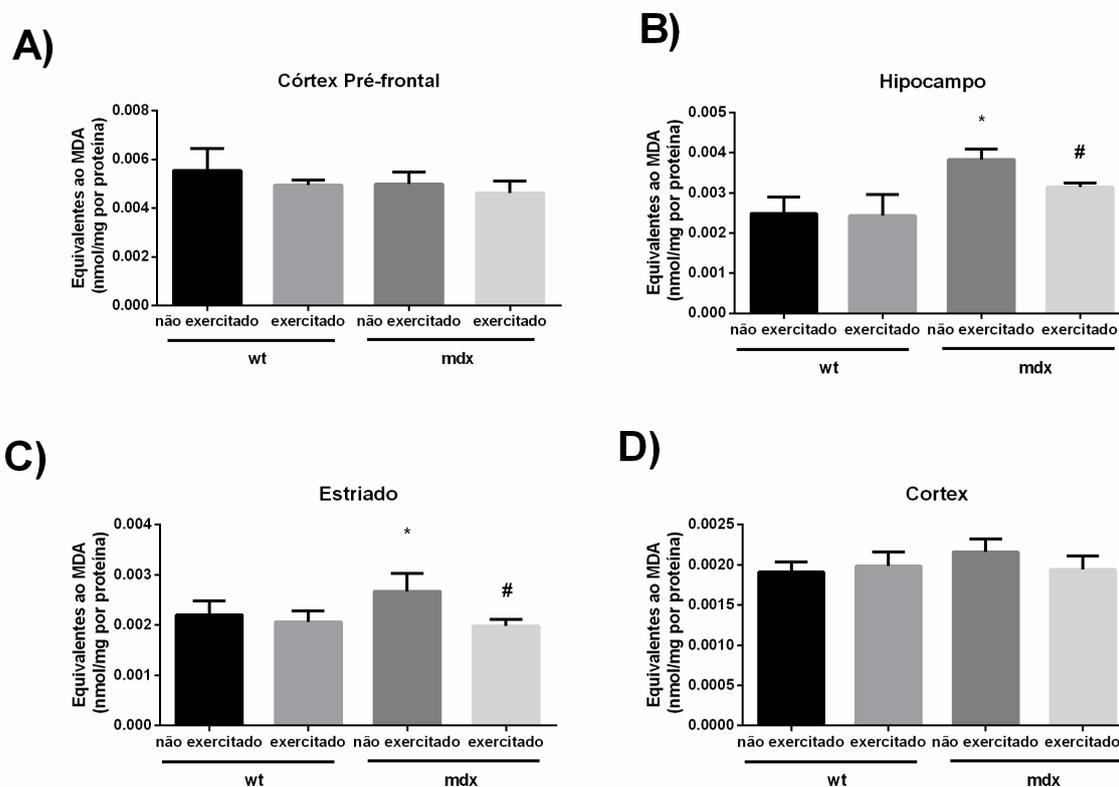


Figura 7 – Efeito de um protocolo de natação sobre a peroxidação lipídica em estruturas do SNC de camundongos. (* quando comparado com o grupo wt não exercitado; ** quando comparado com o grupo mdx não exercitado).

Observa-se que os animais mdx, não exercitados, apresentaram um aumento significativo na peroxidação lipídica em hipocampo e estriado, quando comparado ao grupo de animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Após o protocolo experimental, os animais mdx apresentaram níveis de peroxidação lipídica significativamente menores em hipocampo e estriado, quando comparados aos animais mdx não treinados ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de natação, por quatro semanas, foi capaz de prevenir o aumento da peroxidação lipídica observado nas estruturas hipocampo e estriado de animais mdx (Figura 7B e 7C). As Figuras 7A e 7D mostram que nas estruturas córtex pré-frontal e córtex não houve alterações significativas entre os grupos analisados.

A Figura 8 mostra os resultados do uso de um protocolo de natação sobre a carbonilação de proteínas no córtex pré-frontal (Figura 8A), hipocampo (Figura 8B), estriado (Figura 8C) e córtex (Figura 8D).

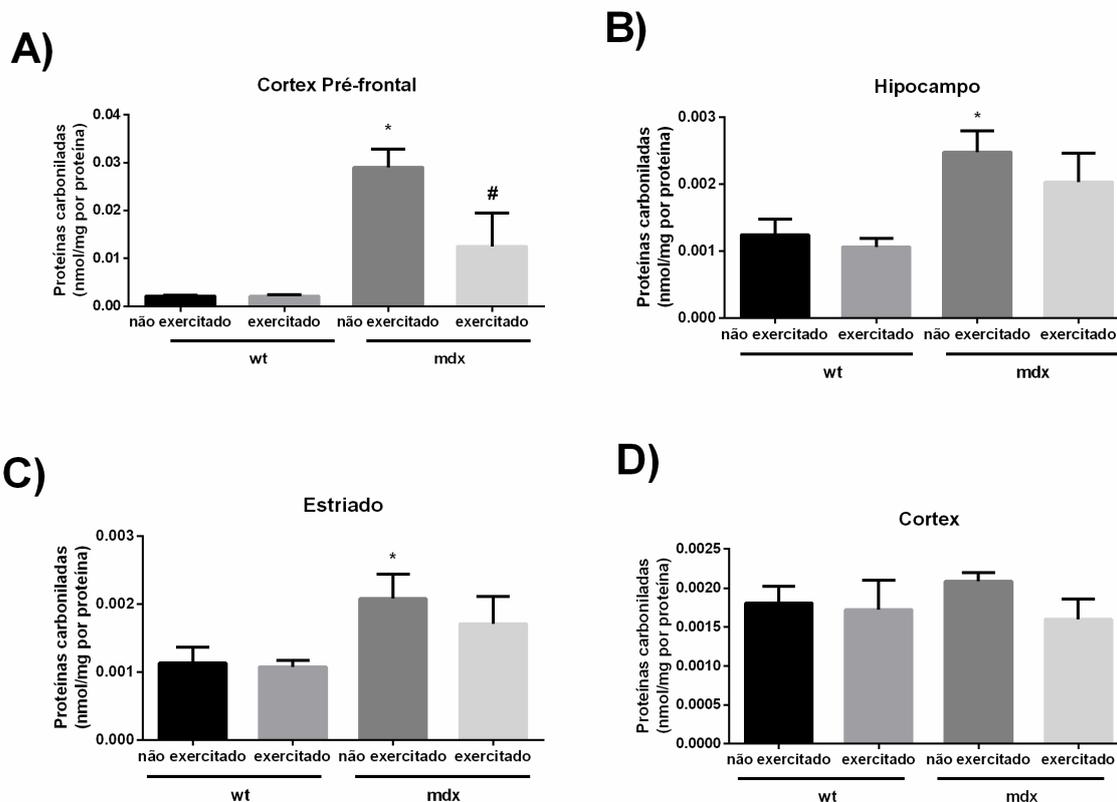


Figura 8 – Efeito de um protocolo de natação sobre a carbonilação de proteínas em estruturas do SNC de camundongos. (* quando comparado com o grupo wt não exercitado; ** quando comparado com o grupo mdx não exercitado).

Pode-se observar que os animais mdx, não exercitados, apresentaram um aumento significativo na carbonilação de proteínas em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, quando comparado ao grupo de animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Após o protocolo experimental, os animais mdx apresentaram níveis de carbonilação de proteínas significativamente menores em córtex pré-frontal, quando comparados aos animais mdx não treinados ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de natação, por quatro semanas, foi capaz de prevenir o aumento da carbonilação de proteínas, observada apenas na estrutura córtex pré-frontal de animais mdx (Figura 8A). As Figuras 8B e 8C mostram que o protocolo de natação, por quatro semanas, não foi capaz de prevenir o aumento da carbonilação de proteínas em hipocampo e estriado. A figura 8D mostra que na estrutura córtex não houve alteração significativa entre os grupos analisados.

A Figura 9 mostra os resultados do uso de um protocolo de natação sobre os tióis livres no córtex pré-frontal (Figura 9A), hipocampo (Figura 9B), estriado (Figura 9C) e córtex (Figura 9D).

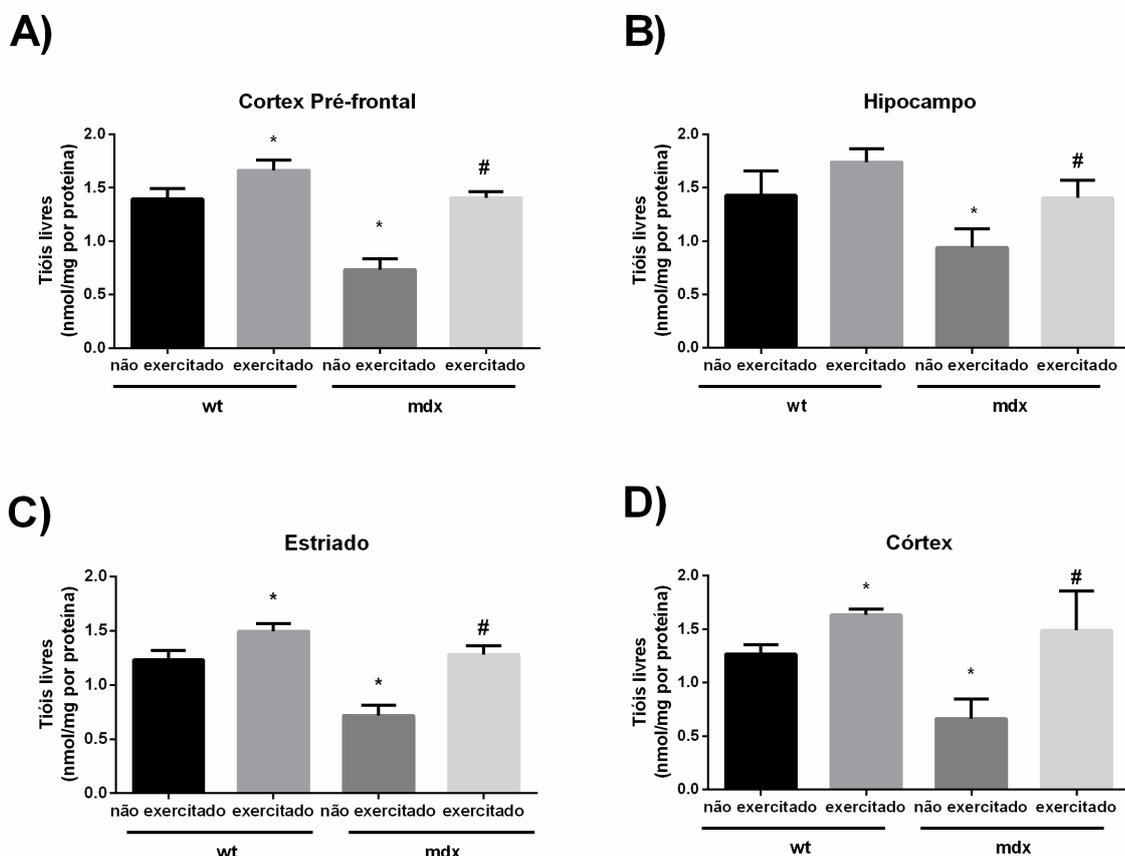


Figura 9 – Efeito de um protocolo de natação sobre os Tióis livres, em estruturas do SNC de camundongos. (* quando comparado com o grupo wt não exercitado; ** quando comparado com o grupo mdx não exercitado).

Pode-se observar que os animais mdx, não exercitados, apresentaram uma diminuição significativa nos tióis livres em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex, quando comparado ao grupo de animais selvagens não exercitados ($p < 0,05$). Após o protocolo experimental, os animais mdx apresentaram níveis de tióis livres significativamente maiores em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex, quando comparados aos animais mdx não treinados ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de natação, por quatro semanas, foi capaz de aumentar as defesas antioxidantes em todas as estruturas do SNC de animais mdx. (Figuras 9A, 9B, 9C e 9D).

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da natação sobre a memória e o estresse oxidativo em músculo esquelético e tecido encefálico em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne. Para isso, foi utilizado um protocolo de natação de intensidade moderada realizado por quatro semanas consecutivas, quatro vezes por semana. Os resultados mostraram que a natação preveniu o comprometimento da memória aversiva e de habituação nos camundongos mdx. Em paralelo a esse efeito, também foi observado pela análise dos parâmetros relacionados ao dano oxidativo, um aumento de carbonilação de proteína em cortex pré-frontal, hipocampo, estriado, diafragma e gastrocnêmio e aumento de peroxidação lipídica em hipocampo, estriado, diafragma e gastrocnêmio, concomitante com a diminuição dos tióis livres em animais mdx não exercitados, evidenciando o estresse oxidativo. Interessantemente, a natação de baixa intensidade foi capaz de prevenir o estresse oxidativo em gastrocnêmio e nas estruturas hipocampo e estriado destes animais. Este mesmo protocolo aumentou os tióis livres em gastrocnêmio, diafragma e nas estruturas do SNC analisadas.

A natação (exercício aeróbio), utilizada neste estudo, foi de moderada intensidade, segundo medidas do lactato feita nos animais, e para isso foi utilizado um ml de shampoo em todo o recipiente adaptado para a natação. Sobre a intensidade do exercício, além da classificação baseada na medida do VO_2 máx e da frequência cardíaca máxima, que classifica o exercício como de leve/ baixa intensidade, moderado ou de alta intensidade⁶¹, há também o modelo proposto por Gaesser e Poole (1996) que propõe três domínios em relação à intensidade de esforço: moderado, pesado e severo. O domínio moderado compreende todas as intensidades de esforço que podem ser realizadas sem a modificação do lactato sanguíneo em relação aos valores de repouso, isto é, abaixo do limiar de lactato (LL). O domínio pesado, inicia a partir da menor intensidade de esforço onde o lactato se eleva, e tem, como limite superior, a intensidade correspondente à media de 4mM de lactato. Já no domínio severo, não existe fase estável de lactato sanguíneo, com este se elevando durante todo o tempo de esforço, até que o indivíduo entre em exaustão⁸⁵.

A DMD é caracterizada por uma ausência da proteína distrofina em músculo esquelético⁵. Entretanto, a literatura também traz que a distrofina está ausente em tecido encefálico e esta alteração está associada a alterações como o estresse

oxidativo²⁹. A ausência de distrofina e o estresse oxidativo em SNC fazem com que o comprometimento cognitivo seja parte da fisiopatologia desta doença. Neste estudo, evidenciou-se que o protocolo de natação foi capaz de proteger o comprometimento da memória aversiva e da memória de habituação nos camundongos mdx submetidos ao protocolo. Dados não publicados do grupo de pesquisa NEUROPAT mostram que animais mdx, com 30 dias, não apresentam comprometimento da memória e do aprendizado. Porém, estes animais com 60 e 90 dias já apresentam evidências deste comprometimento.

O protocolo do presente estudo foi iniciado com animais de 28 dias de idade e finalizado aos 56 dias de vida. Com esta idade, seria esperado que estes animais apresentassem prejuízos de memória e aprendizado, o que não ocorreu nos animais submetidos a natação. Assim, pode-se afirmar que o exercício preveniu os *déficits* da memória e do aprendizado. Apesar de não haver estudos relacionando a natação diretamente com a prevenção do comprometimento de memória e aprendizado relacionado a DMD, há relatos de benefícios da prática da natação no envelhecimento cognitivo⁶⁴. Um outro estudo, ainda com animais de meia idade, mostrou benefícios da natação, quando aliada à suplementação dietética, em testes de memória de reconhecimento de objetos, demonstrando melhora na memória de curto e longo prazo⁶³.

Em um recente estudo de revisão, os autores sugerem que o exercício regular pode prevenir transtornos cognitivos com mínimos efeitos adversos. São citados estudos clínicos e pré-clínicos que têm mostrado que o exercício físico aeróbio regular auxilia a recuperação funcional após lesão encefálica, melhorando o aprendizado e a memória, inclusive em condições relacionadas ao envelhecimento como a neurodegeneração, a demência e em doenças psiquiátricas e neurológicas. Assim, o exercício pode ser uma ótima abordagem para prevenção e tratamento do comprometimento cognitivo⁶. Nesta mesma revisão, cita-se que em estudos envolvendo modelos animais, o exercício melhora a função cognitiva e previne o declínio da memória no encéfalo idoso e em doenças como Alzheimer, Parkinson e depressão dentre outras⁶.

O efeito do exercício na função cognitiva já está bem estabelecido, porém, há diversos fatores que contribuem para este efeito. Sabe-se que o tipo, a intensidade e a frequência do exercício, podem mudar a efetividade do efeito neuroprotetor do exercício tanto em estudos clínicos quanto pré-clínicos. Ambos exercícios, aeróbio e

anaeróbio, produzem efeitos positivos na função encefálica, inclusive quando associados⁷⁶. Um estudo com pacientes pós acidente vascular encefálico (AVE) com a associação dos dois tipos de exercício, demonstrou melhoras significativas na função cognitiva⁷⁷. E isso também foi verificado em idosos e pessoas com demência⁷⁸. Outro ponto a ser discutido é qual o volume e a intensidade de exercício produzem benefícios para a função cognitiva, pois exercício muito leve ou em excesso, pode não só não trazer benefícios, como pode ser prejudicial⁷⁹.

Em modelos experimentais, é sabido que exercícios de alta intensidade prejudicam a aquisição da memória. O exercício muito intenso leva à fadiga e aumenta a formação de ERO. Já o exercício de intensidade moderada melhora a função cognitiva⁸⁰. Sendo assim, há uma relação entre a intensidade do exercício e a aquisição e retenção de memória⁸¹. Estudos mostram que o exercício promove aumento da liberação de BDNF, que tem efeito neuroprotetor, modula o estresse oxidativo, diminui a neuroinflamação e melhora a perfusão principalmente em córtex e hipocampo. Estes processos são mediados por vias neurofisiológicas que levam à melhora da memória e do aprendizado⁸². Assim, a modulação da função cognitiva, através do exercício, pode estar relacionada ao BDNF sintetizado e liberado pelo músculo, ou ainda pelo BDNF liberado pelas plaquetas ativadas pelo exercício. Ou, ainda, pela secreção de citocinas como a IL-6, através de seus papéis anti-inflamatórios, ou mesmo como mensageiros intercelulares e pela maior vascularização do encéfalo, através da angiogênese e vasodilatação de áreas encefálicas específicas, relacionadas ao processo de aprendizado e memória. Além destas, há também o aumento da eficiência da oxidação mitocondrial⁸². Por tudo isso, seria simplista atribuir a melhora da memória e comportamento somente à modulação do estresse oxidativo ou à atividade antioxidante medidos neste estudo. Ainda assim, a literatura traz que parte dos efeitos do exercício no encéfalo podem ser causados pelo aumento das enzimas antioxidantes⁸².

Além do comprometimento cognitivo, outro objetivo deste trabalho foi verificar se a natação pode alterar o estresse oxidativo em tecido neuronal e muscular esquelético. Estudos mostram que o estresse oxidativo está presente no processo fisiopatológico da DMD, pois há um desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade antioxidante^{20,42,50}. O estresse oxidativo está presente na DMD, em músculo esquelético, e, também, no SNC²⁰. Um dos efeitos do exercício é o aumento da atividade antioxidante. O exercício produz ERO, as quais atuam como

sinalizações de eventos moleculares, que regulam adaptações nas células musculares, como a regulação de enzimas antioxidantes⁸³. Neste estudo, foi observado que a natação aumentou os tióis livres, demonstrando que o exercício físico foi capaz de aumentar os níveis do antioxidante glutathiona, concordando com estudos anteriores que demonstraram o papel protetor do exercício^{10,11}. Os tióis livres são uma medida indireta da atividade da glutathiona, um antioxidante que está presente em maior quantidade no SNC⁸⁴.

Em camundongos, o exercício diminui as ERO e a carbonilação de proteínas e aumenta os níveis de alguns antioxidantes endógenos em hipocampo e outras regiões do SNC, além da melhora das atividades, envolvendo tarefas espaciais⁸². O grupo de pesquisa NEUROPAT tem estudado o efeito dos diferentes tipos de exercício físico no processo de degeneração na DMD e foi verificado que um protocolo de exercício físico de intensidade moderada, utilizando uma esteira adaptada, aplicado em camundongos mdx, foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica e as proteínas carboniladas, além de aumentar a quantidade de grupamentos tióis em tecido muscular e na maioria das estruturas analisadas do SNC. Além disso, o protocolo de exercício na esteira melhorou a atividade da maioria dos complexos respiratórios da mitocôndrias, tanto em tecido muscular quanto em SNC (dados não publicados).

Em uma revisão de literatura, estudos mostraram que o exercício na esteira reverteu o estresse oxidativo em camundongos, provavelmente por fortalecer a resposta antioxidante do corpo. O acúmulo de ERO acontece no envelhecimento, doenças relacionadas ao estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas. Grandes quantidades de ERO podem interferir em vários processos biológicos como o sistema de defesa antioxidante mitocondrial, podem alterar ácidos nucleicos, fosfolípídeos de membrana e proteínas que podem levar à apoptose induzida pelo estresse oxidativo. É conhecido que o exercício de intensidade moderada normaliza os níveis de ERO, modulando o estresse oxidativo, enquanto que o exercício intenso induz ao dano oxidativo⁸⁰. Esta mesma revisão traz que o exercício regula a expressão de enzimas antioxidantes, como, por exemplo, a glutathiona transferase (que degrada os produtos da peroxidação lipídica nas células), a 4-hidroxinanal (que aumenta muito durante o exercício). Outro mecanismo pelo qual o exercício pode combater os efeitos do estresse oxidativo no encéfalo, é aumentando a atividade proteasomal e os mecanismos de defesa antioxidantes mitocondriais⁸⁰.

Além de verificar a influência da natação sobre o comprometimento encefálico, a avaliação de alguns tecidos musculares esqueléticos se faz necessária. Como a DMD é uma doença essencialmente neuromuscular, há a necessidade de incluir as avaliações do músculo esquelético (gastrocnêmios e diafragma), uma vez que a principal característica desta doença está relacionada com o comprometimento destas estruturas com a pseudo-hipertrofia de panturrilhas, as quedas frequentes, a perda da marcha e as disfunções cardiorrespiratórias²⁶. Evidências sugerem que o estresse oxidativo está associado ao agravamento da patologia tanto respiratória como muscular nestes pacientes²⁰. Além disso, há estudos que mostram que o exercício pode proteger contra o estresse oxidativo no músculo esquelético em camundongos mdx^{4,13}. O protocolo utilizado neste estudo protegeu contra o aumento da peroxidação lipídica em gastrocnêmio em animais mdx. A natação por quatro semanas, foi capaz de prevenir o aumento da carbonilação de proteínas observado no músculo gastrocnêmio de animais mdx. Este achado está de acordo com um estudo ,feito em 2015 em que foi utilizado um protocolo de natação e encontrou diminuição da carbonilação de proteínas¹³.

O mesmo ocorreu com o músculo diafragma, no qual os animais mdx apresentaram níveis de peroxidação lipídica significativamente menores quando comparados aos animais mdx não exercitados, demonstrando que o protocolo de exercício físico por quatro semanas foi capaz de prevenir o aumento da peroxidação lipídica. Entretanto, a natação não foi capaz de reverter o aumento da carbonilação de proteínas em diafragma. A degeneração do diafragma é o principal contribuinte para patologia distrófica do ventrículo direito. Um estudo concluiu que apesar da natação ser benéfica para o músculo esquelético e aumentar a função cardíaca, um protocolo de sessenta minutos por dia, seis dias por semana, durante dois meses, exacerbou a degeneração do diafragma e aumentou o fenótipo distrófico, além de causar hipertensão pulmonar⁴.

Considerando o exposto, pode-se sugerir que o exercício aeróbio de moderada intensidade – natação – possa reduzir o estresse oxidativo pelo aumento das defesas antioxidantes, como a glutathione, haja visto o aumento na formação dos tióis livres mostrado nos resultados deste estudo. Porém, como ainda não há consenso na literatura sobre volume, frequência e intensidade do exercício no tratamento da DMD, este estudo pode ajudar a propor novas perspectivas do uso terapêutico do exercício no tratamento desta doença.

6. CONCLUSÃO

O protocolo de natação utilizado neste estudo, foi considerado de moderada intensidade baseando-se na classificação da medida do lactato. Este protocolo, aplicado em camundongos mdx foi capaz de prevenir o comprometimento da memória e preveniu o estresse oxidativo em gastrocnêmios e na maioria das estruturas analisadas do SNC, com aumento significativo da atividade antioxidante.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, foi analisada apenas uma das vias de modulação do SNC (aprendizado e memória). Sugerem-se futuros estudos para verificar outras vias que podem modular a memória e o aprendizado, como das neurotrofinas, por exemplo. Espera-se que dados deste estudo possam servir para futuras pesquisas pré-clínicas e clínicas com o intuito de padronizar o uso do exercício na terapêutica da DMD.

REFERÊNCIAS

1. Alcántara-Ortigoza, M. Á. *et al.* Prenatal molecular diagnosis of a DMD carrier female fetus by chorionic villus sampling and linkage analysis. *Ginecol. Obstet. Mex.* 2009; 77 (2):103-109.
2. Le Rumeur, E. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2015; 15 (3): 14–20.
3. Willcocks, R. J. *et al.* Longitudinal measurements of MRI-T2 in boys with Duchenne muscular dystrophy: effects of age and disease progression. *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2014; 24 (5): 393–401.
4. Barbin, I. C. C. *et al.* Diaphragm degeneration and cardiac structure in mdx mouse: Potential clinical implications for Duchenne muscular dystrophy. *J. Anat.* 2016; 228 (5): 784–791.
5. Anderson, J. L., Head, S. I., Rae, C. & Morley, J. W. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain.* 2002; 125, 4–13.
6. Chaustre, D. M., Md, R., Chona, W. & Md, S. Distrofia muscular de duchenne. Perspectivas desde la rehabilitación Duchenne muscular dystrophy. Perspectives from the rehabilitation. 2011; 19, 45–55.
7. Andrade, L. S. de & Marreiro, D. do N. Aspects of the relationship between physical activity, oxidative stress and zinc. *Braz J. of Nutri.* 2011; 24, (4): 629-640.
8. Christianne de Faria, C. & Roberto Carlos, B. Physical activity to prevent and treat non-communicable chronic diseases and functional disability. *Revista de Nutrição.* 2009; 22.(6): 937-946
9. Li, M.-Y. *et al.* The effects of aerobic exercise on the structure and function of DMN-related brain regions: a systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2016; 1–16.
10. Antoncic-Svetina, M. *et al.* Ergometry induces systemic oxidative stress in healthy human subjects. *Tohoku University Medical Library.* 2010; 221, 43-48.
11. Jia, B. *et al.* The effects of long term aerobic exercise. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2012; 51, 117–127.
12. Ryan, S. M. & Kelly, Á. M. Exercise as a pro-cognitive, pro-neurogenic and anti-inflammatory intervention in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* (2016); 27, 77–92.
13. Hyzewicz, J. *et al.* Low intensity training of mdx mice reduces carbonylation and increases expression levels of proteins involved in energy metabolism and muscle contraction. *Free Radic. Biol. Med.* (2015); 82, 122–36.
14. Terrill, J. R. *et al.* oxidative stress and pathology in muscular dystrophies. *FEBS J.* (2013); 280, 4149–4164.

15. Pinho, R. A. de, Araújo, M. C. de, Ghisi, G. L. de M. & Benetti, M. Enfermedad arterial coronaria, ejercicio físico y estrés oxidativo Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2010; 94,(4): 549-555.
16. Grange, R. W. & Call, J. A. Recommendations to define exercise prescription for duchenne muscular dystrophy. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2007; 35, 12–17.
17. Nikolai, A. L., Novotny, B. A., Bohnen, C. L., Schleis, K. M. & Dalleck, L. C. Cardiovascular and Metabolic Responses to Water Aerobics Exercise in Middle-Aged and Older Adults. *J of Phys Act & Health*. 2009; 6,(3): 333–338.
18. Chase, N. L., Sui, X. & Blair, S. N. Comparison of the Health Aspects of Swimming With Other Types of Physical Activity and Sedentary Lifestyle Habits.. *Int. J. of Aquatic Res & Educ*. 2008; 2, (2): 151-161.
19. Hayes, A., Lynch, G. S. & Williams, D. A. The Effects of Endurance Exercise on Dystrophic mdx Mice. I. Contractile and Histochemical Properties of Intact Muscles. *Biological Sciences*. 1993; 253, (1336): 19-25.
20. Lawler, J. M. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol*. 2011; 589, (9): 2161–2170.
21. Comim, C. M. *et al.* Oxidative variables and antioxidant enzymes activities in the mdx mouse brain. *Neurochem. Int.* 2009; 55,(8): 802–805.
22. Comim, C. M. *et al.* Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive muscular dystrophies. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2015; 87,(3): 1809–1818.
23. Tanaka, H. Swimming exercise: impact of aquatic exercise on cardiovascular health. *Sports Med.* 2009; 39, 377–87.
24. Honda, T. & Kamioka, H. Curative and health enhancement effects of aquatic exercise: evidence based on interventional studies. *Open access J. Sport. Med.* 2012; 3, 27–34.
25. López-Hernández, L. B. *et al.* Genotype-phenotype discordance in a Duchenne muscular dystrophy patient due to a novel mutation: insights into the shock absorber function of dystrophin. *Rev. Neurol.* 2011; 52,(12): 720–724.
26. Okama, L. O. *et al.* Functional and postural evaluation in duchenne and becker muscular dystrophies. *Cons e Saúde*. 2010; 9,(4) 649–658.
27. Pangalila, R. F. *et al.* Quality of life of adult men with Duchenne muscular dystrophy in the Netherlands: Implications for care. *J of Rehab Med*. 2015; 47, (2) 161–166
28. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. & Davies, K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 2002; 82, (2) 291–329.

29. Comim, C. M. *et al.* Striatum brain-derived neurotrophic factor levels are decreased in dystrophin-deficient mice. *Neuroscience Letters*. 2009; 459, (2) 66–68.
30. Comim, C. M. *et al.* Reduction of acetylcholinesterase activity in the brain of mdx mice. *Neuromuscular Disorders*. 2011; 21,(5): 359-362
31. Tuon, L. *et al.* Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in mdx mouse brain. *Muscle Nerve*. 2010; 41, (2): 257–260.
32. Comim, C. M. *et al.* Activity of Krebs cycle enzymes in mdx mice. *Muscle Nerve*. 2016; 53, (1): 91-5.
33. Flávia, N., Alexandra P. Q. C., A. & Márcia Gonçalves, R. Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy. *J Ped*. 2012; 88(1):6-16.
34. Brandsema, J. F. & Darras, B. T. Dystrophinopathies. *Rev Fac Med*. 2015; 19 (1): 45-55.
35. Billard, C. *et al.* Cognitive functions in duchenne muscular dystrophy: A reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neurom Dis*. 1992; 2, (5-6): 371–378.
36. Comim, C. M. *et al.* Behavioral Responses in Animal Model of Congenital Muscular Dystrophy 1D. *Mol. Neurobiol*. 2016; 53 (1):402-407.
37. Izquierdo, I. Memória. *Artmed*. (2011).
38. Eichenbaum, H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav. Brain Res*. 2001;127, 199–207.
39. Fuentes D. Malloy-Diniz, L.F. Camargo, C. H. P. C. R. *Neuropsicologia - Teoria e Prática*. 2ed. Porto Alegre: Artemed; 2014.
40. Alberto C, Júnior M, F. N. Memória Memory. *Psychol Reflexão e Crítica*. 2015.
41. Dalgalarondo P. *Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais*. 2008.
42. LH, M. *et al.* Effect of N-acetylcysteine plus deferoxamine on oxidative stress and inflammation in dystrophic muscle cells. *Redox Report*. 2015; 20, (3): 109-115.
43. Markert, C. D., Ambrosio, F., Call, J. A. & Grange, R. W. Exercise and Duchenne muscular dystrophy: Toward evidence-based exercise prescription. *Muscle and Nerve*. 2011; 43, 464–478.
44. Bitanihirwe, B. K. Y. & Woo, T.-U. W. Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2011; 35, 878–893.
45. Halliwell B; Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology*. Med. Univ. Press. Oxford, NY. 2007.

46. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 1997; 11, 526–34.
47. Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2007; 17, 422–7.
48. Ross D, M. P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C. *Membrane lipid oxidation*. Boca Rat. CRC Press. 1991; 151–70.
49. Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Grounds, M. D. & Arthur, P. G. N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis. *Neuromuscul. Disord.* 2012; 22, 427–34.
50. Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A. & Dulak, J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2015; 36, 377–393.
51. Vianna, M. R. 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, 333–340.
52. Haycock, J. W., MacNeil, S., Jones, P., Harris, J. B. & Mantle, D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport* .1996; 8, 357–61.
53. Ragusa, R. J., Chow, C. K. & Porter, J. D. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 1997; 7, 379–86.
54. Kim, J.-H., Kwak, H.-B., Thompson, L. & Lawler, J. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Motility*. 2013; 34, (1) 1-13.
55. Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B. & AR, B. TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Ctry. Publ. Engl. NLM.* 2007; 19, (7): 1419- 1433.
56. Kapogiannis, D. & Mattson, M. P. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2011; 10, 187–198.
57. Newton, D. F., Naiberg, M. R. & Goldstein, B. I. Oxidative stress and cognition amongst adults without dementia or stroke: Implications for mechanistic and therapeutic research in psychiatric disorders. *Psychiatry Res.* 2015; 227, 127–34.
58. Durand, T. *et al.* F(2)-Dihomo-isoprostanes and brain white matter damage in stage 1 Rett syndrome. *Biochimie.* 2013; 95, 86–90.

59. Reisner, A. D. Possible mechanisms for delayed neurological damage in lightning and electrical injury. *Brain Inj.* 2013; 27, 565–9.
60. Patel H, Alkhawam H, Madanieh R, Shah Niel, Kosmas CE, V. T. Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. *World J Cardiol.* 2017; 9, (2): 134.
61. Schubert MM, Washburn RA, Honas JJ, Lee J, D. J. Exercise volume and aerobic fitness in young adults: the Midwest Exercise Trial-2. *Springerplus.* 2016; 5, (1): 183.
62. Abou-Dest, A., Albinet, C. T., Boucard, G. & Audiffren, M. Swimming as a Positive Moderator of Cognitive Aging: A Cross-Sectional Study with a Multitask Approach. (2012).
63. Cechella, J. L., Leite, M. R., Gai, R. M. & Zeni, G. The impact of a diphenyl diselenide-supplemented diet and aerobic exercise on memory of middle-aged rats. *Physiol Behav.* 2014; 135, 125-129.
64. De Araujo, G. G. *et al.* Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2012; 112, (13): 839-852.
65. Beggs, S. *et al.* Swimming training for asthma in children and adolescents aged 18 years and under. *Evid-Bas Chil Heal: A Cochrane Review Journal.* 2013; 8, (5): 1514-1581.
66. Ansved, T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. *Curr.Opin. Clin.Nutr. Metab. Care.* 2003; 6, 435-439.
67. MS, B., JM, M., Townsend, D. & JM, M. Exercise and muscular dystrophy: implications and analysis of effects on musculoskeletal and cardiovascular systems. *Compr Physiol Subsets.* 2011; 1, 1353.
68. Palmieri, B., Sblendorio, V., Ferrari, A. & Pietrobelli, A. Diagnostic in Obesity Comorbidities Duchenne muscle activity evaluation and muscle function preservation: is it possible a prophylactic strategy? *Obes. Rev.* 2008; 9, 121–139.
69. AlemdaroAlu, I., Karaduman, A., Yilmaz, O. T. & TopaloAlu, H. Different types of upper extremity exercise training in Duchenne muscular dystrophy: Effects on functional performance, strength, endurance, and ambulation. *Muscle & Nerve.* 2015; 51, 697.
70. De Luca, A. Pre-clinical drug tests in the mdx mouse as a model of dystrophinopathies: an overview. *Acta Myologica.* 2012;31 (5) 40-47.
71. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. L. & Moore, K. J. X Chromosome-Linked Muscular Dystrophy (mdx) in the Mouse. 4 OP - Proceedings of the National Academy of Sciences. 1984; 81, (4): 1189-1192.

72. SL, S., Lagrota-Cândido, J., Savino, W. & Quirico-Santos, T. The importance of mdx mouse in the physiopathology of Duchenne's muscular dystrophy. *Arq Neur Psiq.* 1997; 55, 610-617.
73. Mazzardo-Martins, L. *et al.* High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J. Pain.* 2010; 11, 1384–93.
74. Ishii H, N. Y. Effect of lactate accumulation during exercise-induced muscle fatigue on the sensorimotor cortex. *J Phys Ther Sci.* 2013; 25, 1637–42.
75. Leussis, M. P. & Bolivar, V. J. Habituation in rodents : A review of behavior , neurobiology , and genetics. *Neurosc and Biobehav Rev.* 2006; 30, 1045–1064.
76. Ogihara, C. A. *et al.* Swimming Exercise Changes Hemodynamic Responses Evoked by Blockade of Excitatory Amino Receptors in the Rostral Ventrolateral Medulla in Spontaneously Hypertensive Rats. *BioMed Research International.* 2014; 2014.
77. Marzolini S, Oh P, McIlroy W, B. The effects of an aerobic and resistance exercise training program on cognition following stroke. *Neurorehabil Neural Repair.* 2013; 27, 392–402.
78. Kluding PM, Tseng BY, B. S. Exercise and executive function in individuals with chronic stroke: a pilot study. *J Neurol Phys Ther.* 2011; 35, 11–17.
79. Heyn P, Abreu BC, O. K. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004; 85, 1694–1704.
80. Alkadhi, K. A. Exercise as a Positive Modulator of Brain Function. *Molecular Neurobiology* 2017; 516-4
81. Kennard JA, W.-P. D. A comparison of low- and high-impact forced exercise: effects of training paradigm on learning and memory. *Physiol Behav.* 2012; 106, 423–427.
82. Hamilton, G. F. & Rhodes, J. S. Exercise Regulation of Cognitive Function and Neuroplasticity in the Healthy and Diseased Brain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 2015; 135, 381-406.
83. Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E. & Viña, J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44, 126–131.
84. Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992; 59, 609–23.

85. Gaesser GA, P. D. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. *Exerc Sport Sci Rev.* 1996; 24, 35–71.

ANEXO

ANEXO A – Parecer Aprovação da Comissão de Ética