**ANDREZA HOEPERS**

# EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A DEGENERAÇÃO DE TECIDO MUSCULAR E NEURONAL EM UM MODELO ANIMAL DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

**Palhoça**

**2015**

**ANDREZA HOEPERS**

# EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A DEGENERAÇÃO DE TECIDO MUSCULAR E NEURONAL EM UM MODELO ANIMAL DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Clarissa Martinelli Comim

**Co-**orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

**Palhoça**

**2015**

**ANDREZA HOEPERS**

# EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A DEGENERAÇÃO DE TECIDO MUSCULAR E NEURONAL 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, ___ de _____ de 2015

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

_____
Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira (Membro Externo)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Prof. Dr. Maicon Roberto Kviecinski (Membro Interno)
Universidade do Sul de Santa Catarina

Dedico esta dissertação à todas as pessoas com Distrofia Muscular Progressiva e ao amigo e paciente Gustavo Monteiro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores do PPGCS-UNISUL, em especial a minha orientadora Professora Doutora Clarissa Martineli Comim, pela paciência, generosidade, seriedade que este trabalho foi conduzido e pela amizade construída.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins, pela fundamental contribuição neste trabalho.

Agradeço as minhas colegas do Grupo de Pesquisa Neuropat, em especial a Aryadnne Schactae e Regina Bussmann, pela parceria e apoio.

Agradeço as alunas de Iniciação Científica Letícia Ventura e Viviane Freiberger, pela dedicação ao projeto e pelos ensinamentos no laboratório.

Agradeço aos meus colegas de trabalho da Clínica Neurovital, especialmente a Clarissa Moraes, pela amizade, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis deste percurso.

Agradeço aos meus amigos, pelo entendimento nas ausências e pela parceria nos fundamentais momentos pausa.

Agradeço à Sabrina Generoso pela gentil estadia durante as aulas em Tubarão.

Agradeço eternamente a Juliana Rocha pelo incondicional apoio, incentivo e companheirismo.

Agradeço ao meu irmão André Luiz Hoepers, por ser, de maneira totalmente inconsciente, a pessoa que me apresentou à Neurociência.

Agradeço aos meus pais, Godofredo e Silvana Hoepers, primeiramente pela vida, mas também por me fazer entender desde cedo que certos obstáculos devemos vencer sozinhos.

Agradeço a todos os meus pacientes, e também aqueles que já passaram pela minha vida, por me proporcionar experiência e gerar um mar de dúvidas e inquietações em mim.

E agradeço especialmente ao amigo Gustavo Monteiro e sua família, por se tornarem o maior desafio da minha vida profissional.

## RESUMO

Distrofia muscular de Duchenne (DMD) está ligada a alteração do cromossomo X, possui caráter recessivo e atinge 1:3500 nascidos vivos, principalmente indivíduos do sexo masculino. Apresenta-se na primeira infância, por atrasos motores. A anormalidade genética no braço curto do cromossomo X (lócus Xp21.2) é responsável pela falta de produção da proteína distrofina que, associada em trama com a matriz extracelular, forma o complexo oligométrico de glicoproteínas, localizada na superfície interna do sarcolema e responsável pela manutenção do bom funcionamento muscular. A ausência da distrofina provoca diminuição da permeabilidade da membrana muscular, permitindo que uma quantidade excessiva de cálcio se acumule no interior da célula. Essa condição leva a uma supercontratura miofibrilar, degradação das fibrilas e distúrbios metabólicos, como estresse oxidativo e alterações do metabolismo energético, que culminam com a morte da fibra muscular. O exercício físico de baixa intensidade é conhecido por diminuir alguns parâmetros associados à degeneração muscular em modelos animais de distrofias musculares progressivas. O objetivo deste estudo foi avaliar quais os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio sobre a degeneração do tecido muscular e neuronal em um modelo animal de DMD. Foram utilizados camundongos machos mdx e wild-type (selvagens) com 28 dias. Os animais foram submetidos a um protocolo de exercício físico de baixa intensidade por oito semanas. Vinte quatro horas após o último dia de treinamento, foram retiradas as estruturas encefálicas do estriado, cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e córtex e o músculo gastrocnêmio, para avaliação da carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, tióis livres, atividade dos complexos da cadeia respiratória e creatina quinase. Verificou-se que o protocolo de exercício físico de baixa intensidade foi capaz de modificar parâmetros de estresse oxidativo em tecido muscular e na maioria das estruturas analisadas do SNC, com aumento significativo da atividade antioxidante em todas as estruturas analisadas. Além disso, o protocolo modificou a atividade da maioria dos complexos respiratórios mitocôndrias, tanto em tecido muscular quanto em SNC, apesar de ter diminuído a atividade de creatina quinase somente de cerebelo. Em conclusão, pode-se inferir que a utilização de um protocolo de exercício de baixa intensidade durante 8 semanas foi capaz de modificar parâmetros de estresse oxidativo e melhorar o metabolismo energético em tecido encefálico e no músculo gastrocnêmio de animais com DMD.



**Palavras-chave:** camundongos mdx; exercício físico; estresse oxidativo; metabolismo energético.

## ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is on the amendment to the X chromosome, has recessive character and affects 1: 3500 live births, especially males. Presents in infancy, delays engines. The genetic abnormality in the short arm of the X chromosome (Xp21.2 locus) is responsible for the lack of production of dystrophin protein linked in frame with the extracellular matrix, forming the oligométrico complex glycoproteins located on the inner surface of the sarcolemma and responsible for maintaining proper muscle functioning. The lack of dystrophin leads to muscle decreased permeability of the membrane, allowing an excessive amount of calcium to accumulate inside the cell. This condition leads to a super myofibrillar contraction, degradation of fibrils and metabolic disorders such as oxidative stress and altered energy metabolism, culminating in the death of the muscle fiber. The low-intensity exercise is known to decrease some parameters associated with macular degeneration in animal models of progressive muscular dystrophies. The objective of this study was to evaluate what the effects of an aerobic exercise protocol on the degeneration of muscle and neuronal tissue in an animal model of DMD. Male mdx mice were used and wild-type (wild) 28 days. The animals were submitted to a physical exercise protocol of moderate intensity for eight weeks. Twenty four hours after the last day of training, the brain structures of the striatum were removed, cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus and cortex and gastrocnemius muscle, to evaluate the carbonylation of proteins, lipid peroxidation, glutathione activity, activity of complex respiratory chain and creatine kinase. It was found that physical exercise protocol of moderate intensity was able to reduce oxidative stress in muscle tissue and most of the structures analyzed the CNS, with significant increase in antioxidant activity in all analyzed structures. Furthermore, the protocol improved the activity of most of the mitochondria respiratory complexes both in muscle tissue and in the CNS, although it decreased the creatine kinase activity cerebellum only. In conclusion, it can be inferred that the use of a moderate intensity for 8 weeks exercise protocol was capable of reducing oxidative stress and improving energy metabolism in brain tissue and in the gastrocnemius muscle of animals with DMD.



Keywords: mdx mice; physical exercise; oxidative stress; energy metabolism.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – Difosfato de Adenosina

ATP – Trifosfato de Adenosina

BDNF – Fator Neutrófico Derivado do Cérebro (do inglês: *Brain derived neurotrophic fator*)

CAT – Catalase

CAT – Catalase

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CMV – Contração máxima voluntária

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

DMP – Distrofia Muscular Progressiva

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FAD – Flavina-adenina-dinucleotídeo

GRMD – Modelo canino Golden Retriever

GSH – Glutationa Reduzida

GSH-Px – Glutationa-peroxidase

GSH-Rd – Glutationa-redutase

GSSG – Glutationa oxidada

LDH – Lactato desidrogenase

LL – Limiar de lactato

MFEL – Máxima Fase Estável de Lactato

MFM – Medida de função motora

NAD – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

QH2 – Ubiquinol

QI – Coeficiente de Inteligência

RM – Ressonância Magnética

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento

SDH – Succinato desidrogenase

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TC6 – Teste de caminha de 6 minutos

WT – Wild Type

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1 Complexo Oligométrico ..... 9

Figura 2 Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial ..... 18

Figura 3 Peroxidação lipídica ..... 34

Figura 4 Carbonilação de Proteínas ..... 36

Figura 5 Tióis Livres ..... 37

Figura 6 Atividade do Complexo I .....39

Figura 7 Atividade do Complexo II ..... 41

Figura 8 Atividade do Complexo II-III .....42

Figura 9 Atividade do Complexo IV ..... 44

Figura 10 Atividade da Creatina Quinase .....45

# SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** ..... 7

1.1.1 DISTROFIAS MUSCULARES PROGRESSIVAS ..... 7

1.1.2 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE ..... 8

1.1.3 ESTRESSE OXIDATIVO ..... 11

1.1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO ..... 16

1.1.5 EXERCÍCIO FÍSICO ..... 20

1.1.6 MODELO ANIMAL DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE ..... 26

2. **OBJETIVOS** ..... 28

2.1 OBJETIVO GERAL ..... 28

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 28

3. **METODOLOGIA** ..... 29

3.1 TIPO DE ESTUDO ..... 29

3.2 ASPECTOS ÉTICOS ..... 29

3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS ..... 29

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL ..... 29

3.4.1 **Determinação da intensidade do exercício pela máxima fase estável do lactato (MFEL)** ..... **29**

3.4.2 **Protocolo de exercício físico de baixa intensidade** ..... 30

3.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS ..... 31

**3.5.1 Mensurações de Biomarcadores de Estresse Oxidativo ..... 31**

3.5.2 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial ..... 32

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 32

4. RESULTADOS ..... 34

6. CONCLUSÃO ..... 54

REFERÊNCIAS.....55

# 1. INTRODUÇÃO

O tratamento de pacientes com diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) precisa ser multidisciplinar, criterioso e voltado sempre ao bem estar do paciente. Visto isso, o papel da fisioterapia torna-se crucial para o sucesso do tratamento. A fisioterapia tem alcançado bons resultados a curto prazo, como a manutenção da autonomia destes indivíduos, mas enfrenta dificuldades para alcançar os objetivos planejados a médio e longo prazo. Mais que isso, os métodos que existem atualmente na reabilitação das Distrofias Musculares Progressivas (DMP) são limitados e algumas vezes pouco fundamentadas, por não conseguir prever seus resultados a longo prazo[1,2].

O ponto de equilíbrio para um bom tratamento está diretamente ligado ao processo de fadiga muscular, pois se sabe que durante uma atividade de esforço ocorrem alterações metabólicas e fisiológicas que refletem em sensações de cansaço e fadiga. Porém, pacientes em estágios avançados da doença tornam-se incapazes de relatar tais sensações. Percebe-se, portanto, que apesar de existirem estudos que descrevem todo o processo de fadiga e degradação da fibra muscular esquelética e sistema nervoso durante a prática de um exercício físico, poucos estudos têm avaliado estes parâmetros em pacientes com doenças associadas[3]. Por esta razão, esse estudo pretende avaliar quais os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio sobre a degeneração do tecido muscular e neuronal em um modelo animal de DMD, o camundongo mdx, tendo como intuito, futuramente relacionar com a prática atual da fisioterapia, melhorando o tratamento e contribuindo para uma melhor qualidade de vida destes pacientes.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Distrofias Musculares Progressivas

As Distrofias Musculares Progressivas (DMP) formam um grupo de doenças genéticas que possuem como característica comum à fraqueza muscular progressiva ocasionada pela degeneração do tecido muscular esquelético. Existem

diferentes formas de DMP, diferenciadas pelo tipo de musculatura atingida, à forma de herança genética, à idade de inicio da sintomatologia e velocidade da evolução. As DMPs podem ser classificadas de acordo com o tipo de herança genética[4]:

a. Formas recessivas ligadas ao cromossomo X:
    - Distrofia muscular do tipo Duchenne;
    - Distrofia muscular do tipo Becker;
    - Distrofia de Emery-Dreyfuss.
b. Formas autossômicas recessivas:
    - Distrofia muscular do tipo Cinturas;
    - Distrofia muscular Congênita;
    - Distrofia muscular da Primeira Infância.
c. Formas autossômicas dominantes:
    - Distrofia Miotônica;
    - Distrofia muscular do tipo Facioescapuloumeral;
    - Distrofia muscular Distal;
    - Distrofia muscular Oculofaríngea.

O foco deste estudo será a DMD pois dentre os tipos de DMP, possui uma progressão rápida e ainda desafia os pesquisadores e terapeutas quanto ao padrão degenerativo e terapêutico.

### 1.1.2 Distrofia Muscular de Duchenne

Distrofia muscular de Duchenne é uma das DMP ligadas ao cromossomo X, de caráter recessivo e atinge principalmente indivíduos do sexo masculino. Geralmente, se apresenta na primeira infância, caracterizada por atrasos nos marcos motores. A DMD leva ao enfraquecimento da musculatura esquelética e é conhecida por ser o tipo mais comum e grave, pelo seu inicio precoce e pela rapidez da evolução dos sintomas[4,5,6]. Estimativas epidemiológicas de base populacional têm sido relatadas, com incidência de 1:3500 nascidos vivos[2]. Porém, nota-se uma necessidade de mais estudos epidemiológicos abordando as estimativas globais sobre a incidência e prevalência das DMP, utilizando critérios e diagnósticos padronizados, além de múltiplas fontes de dados[7].

A DMD ocorre pela anormalidade genética no braço curto do cromossomo X (lócus Xp21.2), responsável pela produção da proteína distrofina. Devido a complexidade e tamanho do gene, ocorre uma parada prematura da sua transcrição gênica e codificação anormal da proteína, facilmente degradada por proteases endógenas[8,9]. A proteína distrofina, associada em trama com a matriz extracelular, forma o complexo oligométrico de glicoproteínas, localizada na superfície interna do sarcolema e responsável pela manutenção do bom funcionamento muscular. Portanto, a deficiência desta proteína leva a uma hipersensibilidade da fibra muscular, deixando-as suscetíveis à lise osmótica[8].

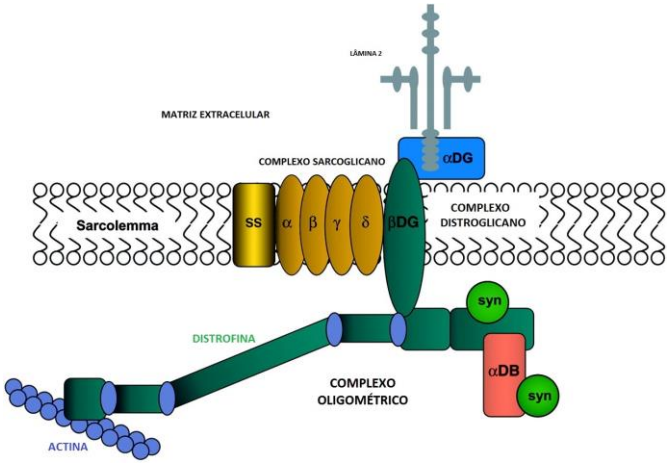


**Figura 1- Complexo Oligométrico**
Fonte: Adaptado de Blake DJ e colaboradores (2002)[10].

Os primeiros sintomas surgem entre os 3 e 5 anos, quando ocorre um número elevado de quedas, dificuldades de correr e saltar. O exame clínico revela aumento do volume muscular do gastrocnêmio, postura levemente lordótica, dificuldade de levantar do chão (sinal de Gower), dificuldade para sustentar a cabeça quando puxado para sentar de supino e marcha anseriana. Os meninos com DMD tendem a conquistar marcos motores até os 6 ou 7 anos de idade, embora a fraqueza muscular continue progredindo[4,5,11]. A perda da marcha ocorre por volta dos 12 anos de idade, acelerando o surgimento de contraturas musculares e deformidades articulares. A escoliose está presente na maioria dos pacientes, e evolui mais rapidamente após a perda da marcha, aumentando a chance de problemas cardiorrespiratórios associados. Os indivíduos afetados possuem uma expectativa de vida de 20 a 30 anos, e o óbito acontece geralmente por insuficiência respiratória ou comprometimento cardíaco[4,5,11].

A distrofina é uma proteína localizada na superfície interna do sarcolema, e sua principal função é a de possibilitar uma conexão da membrana celular ao mecanismo contrátil da actina e aos filamentos de miosina e, externamente, com a membrana basal. A distrofina liga-se a um amplo complexo glicoproteico que envolve o sarcolema e liga-se à lâmina basal, na matriz extracelular. A organização e as propriedades características de articulação das moléculas de distrofina conduzem ao nível de elasticidade da membrana celular. Assim, ela protege a integridade da membrana durante os processos de contração e relaxamento[12,13].

A mutação patogênica do gene DMD causa alteração na expressão da distrofina, e quando esta proteína não é sintetizada, ocorre uma diminuição da permeabilidade da membrana muscular, permitindo que uma quantidade excessiva de cálcio se acumule no interior da célula. Essa condição leva a uma supercontratura miofibrilar, degradação das fibrilas e distúrbios metabólicos que culminam com a morte da fibra muscular[12,13]. De acordo com Belanto[12] (2014), no músculo distrófico, a diminuição da síntese de distrofina se correlaciona com vários fenótipos fisiopatológicos, incluindo uma dramática redução do potencial de contração e regeneração muscular, levando ao acúmulo de tecido adiposo e conjuntivo.

O aumento da infiltração de lipídios no músculo esquelético de indivíduos com DMD está associado a fraqueza progressiva e diminuição da capacidade funcional. Exames ressonância magnética (RM) têm fornecido informações importantes sobre esta infiltração lipídica intramuscular. O acúmulo de lipídios intramusculares modifica a fisiologia do músculo, dependendo de onde o lipídio é armazenado[14]. Um estudo realizado por Lott e colaboradores[14] (2014) demonstrou uma fração de gordura intramuscular substancialmente mais elevada em todos os participantes com DMD quando comparados a indivíduos sadios. No mesmo estudo foi observada uma relação direta entre concentração de lipídio intramuscular e idade do indivíduo.

O Sistema Nervoso Central (SNC) também está envolvido na DMD, resultando em perturbação significativa da função neuronal. Tanto a distrofina como a utrofina, proteína homóloga à distrofina e também localizada na região subsarcolemal, estão presentes também no SNC[13]. 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, diferindo em apenas poucos aminoácidos e se localiza após as células de Purkinje. A C-distrofina se

expressa nas células piramidais do córtex e no hipocampo, ao longo da membrana do corpo celular e dendritos[13].

Os principais estudos sobre a DMD focam no comprometimento do músculo esquelético, entretanto, além do atraso motor, observa-se também atraso cognitivo e de linguagem. Pacientes com atraso mental somam 30% dos indivíduos diagnosticados, prevalência maior do que a população em geral, que possui taxa de aproximadamente 1%[12]. Outra medida de comparação é o coeficiente de inteligência (QI), onde pacientes afetados apresentam índice de 85, enquanto a população geral oscila entre 90 e 120. Além do comprometimento cognitivo, observa-se nesses indivíduos maior frequência de doenças psiquiátricas, como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade[11]. O diagnóstico é realizado pelo exame clínico, exame do nível da enzima Creatina Quinase e necessariamente confirmado pelo exame de DNA ou pela análise da proteína distrofina na musculatura esquelética[4].

Apesar da DMD não ter cura, é necessário que seja realizado um tratamento multidisciplinar desses pacientes, visando principalmente seu bem estar. Além de médico cardiologista, pneumologista e ortopedista para os comprometimentos já descritos, outros especialistas são fundamentais para o tratamento, como endocrinologista para o controle da osteoporose; oftalmologista para prevenir a formação de catarata; nutricionista, fonoaudiólogo e medico gastroenterologista para uma ideal ingestão calórica; médico pediatra e psicólogo para o acompanhamento do desenvolvimento cognitivo e questões comportamentais[1,5].

A fisioterapia vem completar essa equipe com um papel fundamental na prevenção de contraturas musculares e complicações respiratórias, na manutenção da autonomia para a realização das atividades de vida diária, visando a melhor qualidade de vida desses pacientes. Contudo, existe preocupação com a moderação dos exercícios físicos realizados durante a sessão, para que não haja fadiga muscular e possível aceleração no processo degenerativo já existente[1].

### 1.1.3 Estresse Oxidativo

Estudos apontam que no processo fisiopatológico da DMD também ocorre um desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade antioxidante, causando danos e aumento da degeneração celular[15]**.** Para discutir estresse

oxidativo, é necessário compreender que o termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. O não-emparelhamento de elétrons da última camada é que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas[16]. Um exemplo é a formação do superóxido ($O_2$-.), que é derivado do oxigênio molecular ($O_2$). O $O_2$ é composto por dois elementos oxigênio (O), cujo número atômico é oito, sendo sua distribuição de elétrons estável na última camada com dois elétrons solitários (subnível p). Para formar o oxigênio molecular ($O_2$), os dois elétrons solitários do subnível p fazem intercâmbio com os dois elétrons de outro elemento oxigênio, formando um composto estável com 12 elétrons na última camada (L). Acontece que, quando no metabolismo normal ocorre uma redução do oxigênio molecular ($O_2$), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido ($O_2$-.), considerado instável por possuir treze elétrons na última camada L[16].

As reações que podem resultar no desemparelhamento de elétrons são as de redução, onde ocorre ganho de elétron, e as de oxidação, perda de elétron. Portanto, a formação de um radical livre ocorre em reações de óxido-redução[16,17,18]. Ferreira[18] (1997) já descrevia inúmeras pesquisas que esclareciam o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação. Cohen[19] (1989) já afirmava que radical livre não era o termo ideal para denominar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Portanto, como em sua maioria são derivados do metabolismo do $O_2$, o termo “espécies reativas ao oxigênio” (ERO) se torna mais apropriado. Durante o funcionamento normal do metabolismo celular aeróbio, o $O_2$ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, porém, durante as reações são formados intermediários reativos, formando então os principais ERO como o radical superóxido ($O_2$-.), hidroperoxila ($HO_2$), hidroxila ($OH^{\cdot}$), e o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$)[19].

O radical superóxido ($O_2$-), formado em todas as células aeróbicas, é a primeira das espécies formada pela redução do oxigênio por um único elétron, podendo agir como oxidante e como redutor[20]. O $O_2$- se forma através de várias vias metabólicas, como a cadeia respiratória mitocondrial, via da xantina oxidase, via da NADPH via da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso[20,21,22]. O hidroperoxila ($HO_2$) é considerado mais reativo que o superóxido, por possuir maior facilidade em destruir membranas celulares[16]. Já o hidroxila ($OH^{\cdot}$) é considerado o ERO mais

reativo dos sistemas biológicos[17]. O peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH[18].

Para que ocorra o funcionamento ideal das células é essencial que haja o equilíbrio entre agentes óxido-redutores, como as ERO, e o sistema de defesa antioxidante. Segundo Halliwel[23] (2006), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Portanto, como forma de proteção, a célula possui um sistema de defesa que atua basicamente em duas linhas: uma como detoxificadora, constituída por glutationa reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; e a outra linha tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutationa-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px[24]. A enzima SOD por sua vez, é responsável pela conversão do $O_2^-$ em $H_2O_2$, o qual, através da ação da CAT é convertido em oxigênio e água. O desequilíbrio desse processo, ou seja, quando a concentração de SOD estiver menor do que a concentração de superóxido, teremos o estresse oxidativo, pela conversão do $H_2O_2$ em $OH^-$[23].

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[24,25]. Concentrações baixas de GSH têm sido identificadas em doenças que tenham estresse oxidativo relacionado a sua fisiopatologia. A GSH está envolvida especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um ERO, formando um radical GS·, que produz, por dimerização, o GSSG (glutationa oxidada). O GSSG é, então, reduzido pela glutationa redutase, regenerando o GSH, num processo às custas do NADPH. Portanto, a GSH atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Entre as funções do GSH, está a proteção contra a peroxidação lipídica, e, através da glutationa-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído) que são gerados durante a peroxidação lipídica[25]. Se, de fato, grande parte da ação do GSH é obtida pela indução de suas enzimas, é necessária a manutenção do nível de GSH para suportar a ação funcional destas enzimas. Variações nos níveis de glutationa afetam

diretamente a síntese de proteínas e de DNA. Oxidação ou depleção do GSH pode diminuir a síntese protéica[24]. O GSH pode ser perdido de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzido[25].

Halliwel[26] (2006) também afirmou que, quando ocorre um desequilíbrio no balanço redox, onde a geração de ERO ultrapassa a capacidade de reparo das defesas antioxidantes do organismo, com a potencialidade exercer efeitos deletérios, cria-se um estado denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre em todas as células, independente da atividade realizada pelo indivíduo, mas em determinadas situações, a quantidade elevada de oxigênio reativo liberado gera danos cruciais em determinadas moléculas, tais como a lipoperoxidação e a carbonilação de proteínas. Que por sua vez, levam a perda da atividade catalítica e integridade estrutural da molécula[26].

Com o intuito de identificar os danos causados pelas ERO e a eficácia da defesa antioxidante, comumente são utilizados biomarcadores sanguíneos do balanço redox. Eles são capazes de avaliar o dano oxidativo em estruturas lipídicas, através da lipoperoxidação e avaliar o dano oxidativo a proteínas, através dos compostos carbonílicos e sulfidrílicos. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Como consequência, ocorre perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular[26].

A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e a exacerbação da toxicidade de xenobióticos[24,27]. Assim como na formação dos ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória[24,27]. As proteínas também são alvos das ERO e causam modificação em sua estrutura, provocando perda da função e fragmentação das estruturas proteicas, resultando na proteína carbonil. Seu conteúdo é, atualmente, usado como marcador de oxidação, e suas alterações de concentrações estão sendo utilizadas na identificação de doenças degenerativas e processos inflamatórios[28].

Algumas situações que geram ERO também podem auxiliar neutrófilos e macrófagos na defesa do organismo, pois contem atividade bactericida pela degradação oxidativa de lipídios e proteínas. Por outro lado, A ERO pode ter efeito prejudicial quando possui produção excessiva, causando oxidação celular, considerada a fase inicial de inúmeras patologias cardíacas, pulmonares, vasculares e neoplasias[26].

Nas DMP's, a severidade do dano muscular é dependente da ação das ERO, na formação de resíduos de carbonil provenientes de aminoácidos e proteínas. Baseado nisso, um estudo realizado por Souza e colaboradores[29] (2011) avaliou o dano oxidativo através de marcadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes em 25 pacientes com DMP e vinte cinco no grupo controle. Verificou-se, no grupo com DMD, a diminuição apenas na atividade da SOD quando comparada ao grupo controle. Houve também diminuição da SOD no grupo com Distrofia Miotônica de Steinert quando comparado ao grupo controle. A atividade da CAT, substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e Carbonil não mostraram diferenças quando comparadas ao grupo controle.

No estudo realizado por Comim e colaboradores[30] (2015), foram investigados os níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF), interleucinas e parâmetros oxidativos no soro dos pacientes com DMP, onde demonstrou, assim como no estudo anterior, em pacientes com DMD a diminuição da atividade somente da SOD, quando comparados ao grupo controle. Já no estudo realizado por Rajakumar e colaboradores[31] (2013) foi avaliado danos à fibra muscular de pacientes com Distrofia Muscular de Cinturas, que, assim como a DMD também apresenta perda da atividade contrátil por lesão muscular. Neste estudo foram realizadas 15 biópsias de músculos esqueléticos de indivíduos distróficos e 8 no grupo controle, entre 6 e 28 anos de idade. Os resultados mostraram que a lipoperoxidação foi 2,5 vezes maior em comparação ao grupo controle, e concluiu que o estresse oxidativo está associado com a evolução da doença, principalmente por aumento dos níveis de ubiquinona.

### 1.1.4 Metabolismo Energético

O funcionamento celular ideal depende diretamente do equilíbrio entre a formação de ERO e a atividade antioxidante, além do suporte energético necessário para que reações químicas ocorram[31]. Na DMD, o dano oxidativo gera alterações na membrana celular que provoca diminuição na produção de energia necessária, tanto para o funcionamento quanto para a recuperação celular. Coletivamente, essas reações são denominadas metabolismo energético[32]. Para isto, existe a necessidade de vias metabólicas capazes de converter nutrientes alimentares numa forma de energia biologicamente utilizável, o ATP[33]. O cérebro, por exemplo, desenvolve uma intensa atividade metabólica, mas possui pouca reserva energética em relação ao grande consumo de glicose, existindo assim uma necessidade contínua de substratos energéticos[34].

Nas células de um modo geral, a energia chega na forma de trifosfato de adenosina (ATP), substrato fundamental também no tecido muscular, possibilitando a contração das fibras. Como o exercício físico requer um suprimento constante de ATP, seria lógico pensar que nas fibras musculares existem vias metabólicas com capacidade de rápida produção de energia[33]. Na realidade existem três vias responsáveis pela produção de ATP: atividade da creatina quinase, glicólise e formação oxidativa do ATP, ou cadeia respiratória. As duas primeiras ocorrem de maneira anaeróbia e produzem pouco ATP, em contra partida, a cadeia respiratória ocorre de maneira aeróbica e é capaz de produzir maior quantidade de ATP[33,34].

O mecanismo responsável pela produção dessa energia vital se chama respiração celular, e está dividida em três etapas: a glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória. A glicólise acontece no citoplasma da mitocôndria e realiza a quebra da glicose em duas moléculas menores chamadas piruvato, resultando em pouca produção de ATP e transformação do primeiro nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) em NADH, coenzima transportadora de elétron. A função do ciclo de Krebs, que ocorre já na matriz mitocondrial, é remover o hidrogênio (energia) do piruvato (resultante da glicólise) com a utilização de NAD ou flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) para que essa energia seja utilizada na cadeia respiratória. Através da NADH e o $FADH_2$, ocorre a combinação com o difosfato de adenosina (ADP) + P e finalmente a formação do ATP[33]. O NADH e o $FADH_2$,

formados na glicólise e no ciclo de Krebs, são moléculas ricas em energia, pois cada uma delas possui um par de elétrons com alto potencial de transferência. Estes elétrons quando são utilizados para reduzir o oxigênio molecular até a água, liberam grande quantidade de energia que pode ser usada para gerar ATP. As mitocôndrias, organelas celulares com função de produção de ATP, contêm as enzimas do ciclo de Krebs e as enzimas de oxidação dos ácidos graxos, além dos complexos respiratórios[35]. Portanto, qualquer tecido que possua atividade metabólica aeróbica intensa, como o encéfalo e o músculo esquelético e cardíaco, apresentam altas concentrações dessa organela[36].

A cadeia respiratória é o estágio final do metabolismo que produz energia nos organismos aeróbicos, formada por quatro complexos proteicos (I, II, ll-III e IV) e dois componentes que não fazem parte dos complexos, a coenzima Q, que transporta elétrons do Complexo I e II ao complexo II-III, e o citocromo c, que transporta elétrons do complexo II-III ao complexo IV. Ela é, portanto, o processo no qual se forma ATP quando o NADH e o $FADH_2$ transferem elétrons, por uma série de transportadores de elétrons[35]. A membrana interna da mitocôndria é impermeável à maior parte de moléculas menores e de íons de prótons, porém, aqueles que possuem transportadores específicos conseguem chegar até o interior da membrana. E é no seu interior que se encontram os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase[37].

O complexo l contribui significativamente para a produção de energia na mitocôndria, pois é responsável pela transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol (QH2). Por meio da NADH desidrogenase ocorre o bombeamento de quatro íons de hidrogênio para fora da matriz da mitocôndria. Por fim, estes elétrons são transferidos a uma ubiquinona móvel no centro hidrófobo da membrana, resultando na captação de mais dois prótons da matriz[35]. O complexo II é denominado de succinato, onde a ubiquinona oxirredutase é formada pela succinato desidrogenase (SDH), enzima do ciclo de Krebs, que gera $FADH_2$ na oxidação de succinato a fumarato e três subunidades hidrofóbicas. Os elétrons e os prótons do succinato são transferidos para o FAD, que se reduz a $FADH_2$ e não sai do complexo. Por esses componentes passam os elétrons derivados do $FADH_2$, e finalmente serem doados para a ubiquinona e entram na cadeia respiratória[35].

Duas outras enzimas, a glicerol fosfato desidrogenase e a acil CoA desidrogenase, transferem do mesmo modo seus elétrons de alto potencial do

$FADH_2$, para ubiquinona, formando QH2, o estado reduzido da ubiquinona. O complexo III transfere elétrons do QH2 para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O último complexo IV é responsável pela doação de quatro elétrons para a molécula de oxigênio (O2) que, liga-se a prótons do meio e converte-se em água[22,34,38]. A importância da ligação indireta entre a transferência de elétrons é que um não ocorre sem o outro. Assim quando os prótons não estão sendo utilizados para a síntese de ATP, o gradiente de prótons e o potencial de membrana estão sendo formados. Essa pressão de retorno de prótons é o que vai controlar a velocidade de bombeamento de prótons, no qual controla o transporte de elétrons e o consumo de oxigênio[39].

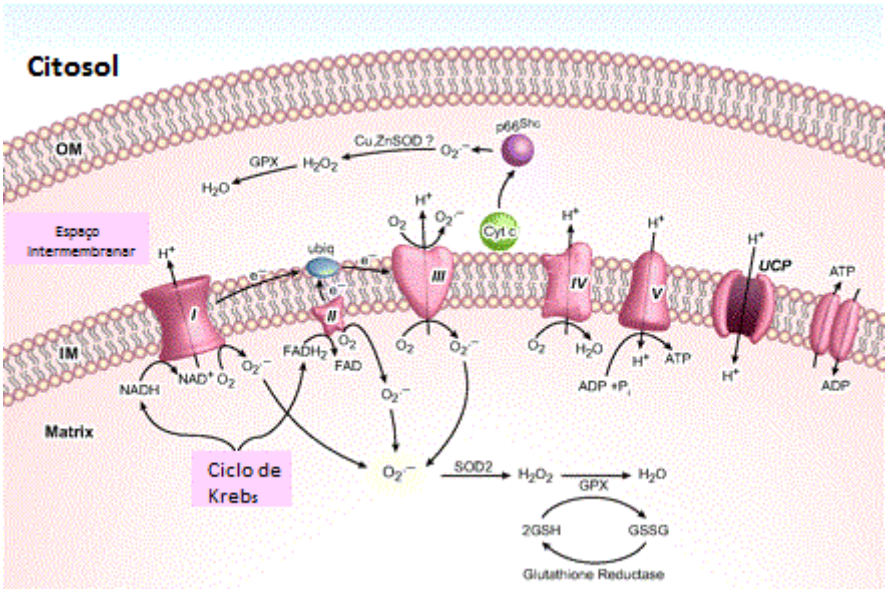


**Figura 2- Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial**
Fonte: Adaptada de Timpani e colaboradores[40] (2015).

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP[41]. Sabe-se também que o dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e consequente morte celular[42]. As citopatias mitocondriais são as doenças hereditárias do metabolismo mais frequentes, e segundo a literatura, alterações do complexo I são mais frequentes[43]. As necessidades celulares de ATP variam segundo o estado fisiológico do tecido ou órgão, sendo o cérebro o tecido de maior demanda, pois mesmo em repouso, é extremamente sensível às variações no metabolismo energético. Mesmo constituindo apenas 2% do peso corporal, o cérebro possui alto consumo de energia, chegando a aproximadamente 25% do total da glicose corporal. O

suprimento de ATP no encéfalo dura em torno de segundos, o que explica a rápida deterioração que ocorre no encéfalo devida a privação de $O_2$[44].

Madrigal e colaboradores[45] (2001) observaram em seu estudo uma alteração na cadeia de transporte de elétrons em encéfalo de ratos submetidos ao estresse crônico. Em pacientes com DMD, há uma evidência de desordem na arquitetura do SNC, anormalidades nos dendritos e perda neural[2]. No camundongo mdx, modelo animal da DMD, observa-se diminuição de 50% no número de neurônios, quando comparados a encéfalos que expressam distrofina, e perdas neurais nas regiões do córtex e tronco encefálico, levando a conclusão que ambos possuem alterações morfológicas[13]. Navarro e colaboradores[46] (2004), afirmou que a atividade enzimática dos complexos I e IV são marcadores de função mitocondrial, e que aumentos da atividade dessas enzimas são diretamente relacionados com os produtos oxidativos e a função neurológica em camundongos mdx. Sabe-se, portanto, que doenças neurodegenerativas estão associadas a alterações do metabolismo energético encefálico, visto que essas doenças, incluindo a DMD, possuem alterações do funcionamento dos complexos da cadeia respiratória[41,47]. Tuon e colaboradores[48] (2010) investigou a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e da creatina quinase em encéfalos de camundongos mdx, e observou diminuição da atividade no complexo I em córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex total, mas não houve alteração na atividade do complexo II. Houve também um aumento da atividade do complexo II-III no córtex e na atividade do complexo IV no pré-frontal e estriado. A atividade da creatina quinase apresentou aumento em hipocampo, córtex pré-frontal, córtex e estriado, corroborando com estudos anteriores, onde a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial e o aumento na atividade da creatina quinase no cérebro de camundongo mdx foi evidente.

Sabendo-se das alterações encontradas na fisiopatologia da DMD, inúmeros estudos tem investigado tratamentos que diminuam do estresse oxidativo e melhorem a atividade mitocondrial. Nesse contexto, tratamentos alternativos, como protocolos de exercício físico, também estão sendo estudados como possíveis recursos para diminuir a progressão da doença.

### 1.1.5 Exercício Físico

A prática de exercício físico vem sendo descrita desde os primórdios da humanidade, onde o homem dependia da sua força, velocidade e resistência para sobreviver. Mais tarde na Grécia, a prática de exercício foi fundamental para a preparação bélica e treinamento de gladiadores. Já no século XIX, na Europa, essa prática surge em forma de jogos escolares, ginástica e danças, sempre com o intuito de bem-estar e saúde. No Brasil, com a implantação do estado novo em 1930, surge a tendência militar nos programas de exercício físico na área escolar, mas só em 1940 a Educação Física iniciou seu ingresso na área pedagógica. Porém, somente em 1970 a prática de exercício físico foi difundida como benéfica para saúde e qualidade de vida[49].

Atualmente, exercício físico pode ser entendido como uma forma de atividade física planejada, repetitiva, com orientação profissional, que visa desenvolver a resistência física e as habilidades motoras[50]. Diferente da atividade física, que pode ser qualquer movimento corporal produzido pela musculatura esquelética, de maneira passiva ou ativa, que resulte em gasto energético[3]. Sua prática regular pode contribuir para o reforço da musculatura, perda de excesso de peso, aperfeiçoamento de habilidades atléticas, melhoria ou manutenção do funcionamento ideal do sistema cardiovascular, estimulação do sistema imunológico, além de contribuir na prevenção de doenças sistêmicas crônicas[33,51,52]. Contudo, existe na literatura importante distinção entre exercício físico para prevenção de doenças crônicas e para o bom condicionamento físico, com relação a sua frequência, intensidade, tipo e duração dos exercícios realizados[51,3].

A influencia do exercício físico no SNC também vem sendo discutida, especialmente os exercícios físicos aeróbios, por apresentarem efeito benéfico nas funções cognitivas[52]. Ele possui capacidade de aumentar a produção de neurotrofinas encefálicas, especialmente o BDNF, além de induzir uma cascata de processos celulares e moleculares que favorecem a angiogenese, a neurogenese e sinaptogenese[53]. Evidências sugerem que o exercício físico possua ação protetora para doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e Parkinson[54]. Pacientes com desordens como ansiedade e depressão também podem se beneficiar dos efeitos do exercício físico, por aumentar a sensação de bem estar

psicológico e diminuir o isolamento social[55]. Portanto, pode-se concluir que existem provas convergentes em vários níveis que os benefícios do exercício físico também atingem o SNC e influenciam vários transtornos neuropsiquiátricos[52].

No corpo humano, o tecido muscular se torna fundamental para a prática de qualquer exercício físico[56]. Além disso, o músculo possui uma capacidade notável de regenerar-se, após microlesões, causados pela intensidade ou tipo de exercício. Essa regeneração acontece graças a múltiplos fatores, mas principalmente as células satélites. Estas células estão localizadas abaixo da lâmina basal do tecido muscular e, quando ocorre uma lesão elas são transformadas em novas células musculares, ou mioblastos, tornando possível a regeneração tecidual[56,57].

Na DMD, as alterações fisiológicas típicas da doença impossibilitam que o paciente realize diversas tarefas que recrutem uma maior demanda de força muscular, e entre elas está a prática de exercício físico. Contudo, existe na literatura importante distinção entre exercício físico para prevenção de doenças crônicas e para o bom condicionamento físico, com relação a sua frequência, intensidade, tipo e duração dos exercícios realizados[58]. Por este motivo, em pacientes com DMD, a recuperação muscular não ocorre de maneira tão eficaz, pois sua facilidade em chegar a fadiga muscular faz com que as células satélites se esgotem rapidamente e sua capacidade de recuperação da função se torna limitada. Nos últimos anos, alguns estudos tentaram implantar estes mioblastos, ou células satélites, em camundongos mdx, demonstrando aumento da capacidade de regeneração muscular. Porém, quando reproduziram a pesquisa em crianças com DMD não tiveram o mesmo sucesso[56,57]. Fukada[59] (2010) concluiu em seu estudo que células satélites são células-tronco envolvidas no crescimento muscular e sua regeneração, e que o microambiente influencia no comportamento dessas células. O estudo também afirma que células satélites são uma fonte para a terapia de transplante de células, mas a preparação das células de doadores viáveis em uma grande quantidade ainda não é possível. Para superar esta limitação, a técnica de reprogramação está agora no centro das atenções em novos ensaios clínicos.

A diminuição progressiva da força em pacientes com DMD resulta em limitações funcionais e aumento progressivo do número de quedas. Como consequência, suas possibilidades físicas e interação social se tornam cada vez mais limitados. Estudos utilizando a prática de exercício físico em indivíduos com DMD tem sido realizado no intuito de diminuir a deterioração muscular, contraturas

musculares, fraturas ósseas e aumentar o tempo independência funcional[58]**.** Com base nas evidências até então disponíveis, e experiência clínica, diretrizes internacionais recomendam a estes pacientes a realização de exercícios ativos assistidos e exercícios na água, mas evitar exercícios excêntricos[60]. Em contra partida, protocolos de exercício físico de alta intensidade, determinado por meio do $VO_2$máx, em pacientes com distrofias musculares diversas, tem demonstrado aumento de nível de creatina quinase, indicando de esses exercícios podem induzir danos celulares[61].

A fim de desenvolver um quadro racional para responder questões sobre o papel do exercício na DMD, um estudo realizado em 2012 apontou cinco mecanismos fisiopatológicos e ofereceu breves hipóteses a respeito de como o exercício físico pode beneficamente modular a fisiopatologia da doença, baseando-se no fato de que o exercício físico possui efeito protetor da membrana celular, diminui o influxo de cálcio e aumenta a capacidade de regeneração muscular e a atividade antioxidante[3]. O estudo concluiu que existe forte necessidade na investigação sobre os mecanismos fisiopatológicos da DMD e que a incorporação de exercício em projetos experimentais poderia ajudar significativamente nesse processo[3].

Num estudo randomizado controlado, trinta meninos com diagnóstico DMD participaram de um programa de exercícios físicos com duração de 24 semanas e realizaram exercícios de baixa intensidade na bicicleta para membros inferiores e superiores. Os resultados do estudo foram avaliados pela Medida da Função Motora (MFM) e a pontuação permaneceu estável no grupo de intervenção e diminuiu significativamente no grupo controle[58]. Quando comparado os efeitos de dois tipos de protocolos de exercício com bicicleta adaptada para membro superior e inferior em pacientes em estágio inicial da doença, observou-se a melhora mais acentuada nos escores correspondentes função de membro superior, quando comparada a deambulação. Portanto, os resultados deste estudo demonstraram que o treinamento de membros superiores é mais eficaz na preservação e melhoria do nível funcional de início da doença em pacientes com DMD[62].

O Teste de Caminhada de seis minutos (TC6) tem se mostrado factível e confiável como instrumento para ensaios clínicos com pacientes com DMD que estão focados terapeuticamente na manutenção da deambulação e abrandamento da progressão da doença[63]. Baseando-se nisso, um estudo de coorte com 114

pacientes com diversas doenças neuromusculares avaliou fraqueza e fadiga muscular através do TC6 na esteira e compararam os valores obtidos com valores normais já descritos em literatura. O aumento da fraqueza muscular foi significativo em todos os grupos, e a fadiga (medida pela distância percorrida) diminuiu apenas no grupo de participantes com DMD, de 75,8% para 62,3%[64].

O relatório do *Muscular Dystrophy Campaign workshop: Exercise in neuromuscular diseases*, realizado em 2002 aponta que após a discussão sobre a prática corrente na prescrição de exercício físico associado a doenças neuromusculares, algumas decisões foram tomadas: (1) os programas de exercícios devem estar ligados à atividades de vida diária; (2) os grupos musculares devem ser alongados e os grupos opostos devem ser fortalecidos; (3) a hidroterapia deve ser indicada, mas há poucas evidências dos seus benefícios publicadas; (4) os cuidados devem ser tomados em estudos de exercícios em camundongos mdx para comparação com pacientes com DMD, pois a história natural da distrofia muscular é muito diferente no camundongo mdx em comparação com pacientes de DMD, mas há evidências de que a contração excêntrica leva ao aumento da lesão muscular[60].

Estudos com exercício físico em camundongos mdx jovens (21 dias de vida) utilizando roda de corrida voluntária têm mostrado diminuição da progressão da doença, pelo aumento da resistência a fadiga e força muscular, indicando benefícios a saúde desses animais especialmente quando iniciado em uma idade precoce[65]. Porém, estes dados também sugerem que pode haver um limite funcional para atividade muscular desses animais, particularmente na membrana celular que será limitada, ao passo que a força muscular é aumentada. Determinar esse limite poderia auxiliar na prescrição de um exercício físico adequado. Para comprovar essa teoria, camundongos foram forçados a correr na esteira e o processo distrófico foi claramente observado, com aumento da concentração de cálcio intracelular e consequentemente aceleração do processo distrófico[66].

Um estudo que aplicou protocolo de 12 semanas de exercício em camundongos exercitados em roda voluntária observou o aumento expressivo da proteína utrofina no quadríceps e sóleo de 334,63% em relação ao controle não exercitado. O exercício aumentou também os núcleos celulares centrais em 4±1% e concluiu que a prática de exercício pode ser uma intervenção segura para pacientes com DMD[67]. Por outro lado, um estudo realizado anteriormente determinou as consequências do exercício físico em roda voluntária a longo prazo, e observou

diminuição da função diafragmática em 60%, aumento de massa muscular e força de sóleo e gastrocnêmio (36%), aumento do músculo cardíaco (15%), tamanho da câmara do ventrículo esquerdo (20%) e volume sistólico em duas vezes quando comparado ao grupo não exercitado[68].

Já em um protocolo e exercício na esteira, foi avaliado o consumo máximo de $VO_2$ e desempenho nos exercícios físicos no início e no final do protocolo. Os resultados mostraram que o consumo de $VO_2$ máximo, tempo de exaustão, velocidade na exaustão e gasto calórico diminuíram significativamente no final do estudo[69]. Também utilizando a esteira ergométrica como recurso, foram descritos dois protocolos de exercício de alta intensidade (12 m/min) padronizados para o exercício em camundongos mdx, analisando alterações moleculares. Tanto o protocolo A (única sessão de 30 minutos), quanto o protocolo B (4 semanas, com exercício duas vezes por semana) aumentaram significativamente marcadores de lesão muscular, concluindo que uma única sessão de exercício em esteira 30 min é um teste de rastreio rápido e suficiente para avaliar os benefícios ou malefícios de estudos pré clínicos[70].

#### 1.1.5.1 Intensidade do exercício físico e concentração de lactato sanguíneo

Desde a década de 60, estudos identificaram que a concentração de lactato sanguíneo ao exercício físico pode ser considerado um índice para avaliação da intensidade de uma atividade aeróbia[71]. Ainda neste período, surgiu o termo “Limiar Anaeróbio” para identificar a intensidade de esforço onde existe o aumento da concentração de Lactato sanguíneo durante o exercício de cargas progressivas[71]. Posteriormente, pesquisadores vem verificando a validade da resposta do lactato, como índice de avaliação aeróbia, independente de muitos fatores, como idade, sexo e tipo de exercício, além de indicar a quantidade total de energia que pode ser fornecida pelo sistema aeróbio[72]. Sendo assim, as adaptações decorrentes do treinamento aeróbio que são encontradas no músculo esquelético, determinam o aumento da taxa de remoção do lactato durante o exercício físico e consequentemente, uma diminuição da sua concentração sanguínea para a mesma intensidade. Desta maneira, pode-se afirmar que, ocorrendo modificações com o

treinamento ou mesmo com a falta de treinamento, a resposta do lactato sempre se modificará na mesma direção e proporção[72].

Entre os princípios do treinamento físico está a individualidade, onde se propões que a sobrecarga a ser aplicada deve observar a capacidade funcional de cada indivíduo. Por este motivo, a intensidade do exercício pode ser o fator mais importante, determinando quase que isoladamente, a existência ou não de adaptações com a realização do exercício físico[73]. Além disso, a intensidade do exercício também é fundamental para a elaboração de um delineamento experimental, que se utilizará do exercício para estudar o comportamento de uma determinada variável. Alguns procedimentos podem ser utilizados para determinar a intensidade do exercício físico, como o estresse fisiológico, $VO_2$máx ou resposta ao lactato sanguíneo, onde o exercício físico pode se tornar mais individualizado[72]. A determinação da intensidade do exercício físico utilizando o Limiar de Lactato (LL) pode ser encontrada pela glicogenólise muscular, tendo como resultado o tempo de fadiga por depleção do glicogênio de até três horas. Este resultado ocorre pela estreita associação entre a resposta do lactato e as catecolaminas plasmáticas[74].

O modelo apresentado por Gaesser e Poole[75] (1996) 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 de 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 o 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 exaustão.

A máxima fase estável de lactato (MFEL) é a maior carga de trabalho que pode ser mantido ao longo do tempo, sem acúmulo de lactato no sangue[76]. O aumento sérico de mais de 1 mmol/L entre o 10º e o 30º minuto durante o exercício físico parece ser o procedimento mais razoável para a determinação da MFEL. A mensuração do lactato é dependente do ergômetro utilizado no estudo, o que implica cuidados na generalização de informações equivocadas a cargas de treinamento prescritas pela concentração de lactato sanguíneo[77]. Portanto, quando a carga de exercício se mantem abaixo da MFEL, não ocorre acúmulo de lactato, e

quando esta carga ultrapassa a MFEL, a taxa de produção de lactato excede a taxa de sua remoção e ele se acumula[78].

O exercício físico intenso e contínuo é acompanhado pela produção de ERO, que provocam lesões na membrana celular acompanhada por um processo inflamatório ao nível das fibras musculares. Várias causas foram sugeridas para estas alterações, como aumento da microcirculação, produção de metabólitos tóxicos e depleção intramuscular dos substratos energéticos. Esse dano muscular está associado com aumentos dos níveis plasmáticos de creatina quinase e de lactato desidrogenase (LDH), o que serve como indicador do aumento da permeabilidade celular resultante[73].

Um estudo realizado por Ishii[76] (2013) observou que antes de efetuar um determinado exercício físico com 50% da contração máxima voluntária (CMV), os indivíduos apresentavam 1.2 ± 0,19 de concentração de lactato no sangue (mmol/L); e após a realização da atividade, apresentaram 1,8 ± 0,25 (mmol/L) de lactato. Concluiu-se, portanto que, níveis de lactato no sangue são diretamente proporcionais à intensidade do exercício realizado. Mensurar índice de lactato em indivíduos com DMD pode ser fundamental para identificar a acidose metabólica, processo causador de degradação celular e por provocar alterações no sistema respiratório, renal e nervoso[33].

### 1.1.6 Modelo animal de Distrofia Muscular de Duchenne

Pesquisas realizadas com animais sempre foram polêmicas e repletas de controvérsias. No entanto, estratégias de tratamento de doenças ósteomusculares estão sendo validadas através de estudos em animais e sobre seus resultados existem poucas contradições[79]. A partir da identificação do gene defeituoso da DMD em humanos, tornou-se possível encontrar o mesmo defeito em outros animais, como cão, gato e camundongo. Entre as espécies pesquisadas, chegou-se ao consenso que o camundongo mdx possui o maior numero de características em comum, ainda que haja diferenças importantes na fisiopatologia de ambos[8,79].

Estudos genéticos mostraram que o camundongo mdx possui mutação no gene da distrofina, assim como em humanos. Ele também apresenta intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, mas difere dos humanos por não

apresentar intensa fibrose e depósito de tecido adiposo no músculo. A degeneração e fibrose do tecido do diafragma são muito semelhantes entre os dois, assim como o processo de envelhecimento e sobrevida diminuída[8]. Portanto, o camundongo mdx é considerado o modelo animal mais aceito para estudos de doenças que tem como principal causa a deficiência da distrofina. Esses animais permitem a realização de estudos criteriosos com a utilização de agentes moduladores, capazes de modificar o curso da doença e possibilitar avanços no tratamento da DMD[8].

O sistema músculo esquelético do camundongo mdx sofre degeneração e ciclos de regeneração semelhante aos humanos com DMD, de forma mais aguda entre as idades de 3 e 10 semanas. Observa-se melhora do processo degenerativo após 10 semanas de idade e é atribuída a supra-regulação da proteína utrofina, um homólogo da distrofina. Outro modelo animal que apresenta a fisiopatologia semelhante a DMD é o modelo canino do golden retriever (GRMD), cujo características se aproximam do camundongo mdx, mas por causa da limitada disponibilidade destes animais e os custos de manutenção uma colônia, a sua utilização em estudos de exercício físico seria limitado. No entanto, uma vez que o exercício adequado da prescrição for definida em camundongos distróficos, um estudo dirigido com o cães GRMD seria uma boa ponte para estudos em seres humanos[65].

# 2. OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio sobre a degeneração de tecido muscular e cerebral em camundongos portadores de DMD.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Máxima Fase Estável do Lactato em camundongos mdx;
- Verificar os efeitos de um protocolo de exercício físico baseado na MFEL sobre o dano oxidativo através da carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica em músculo esquelético e tecido encefálico de camundongos mdx;
- Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico baseado na MFEL sobre a formação de Tióis livres, em músculo esquelético e tecido encefálico em camundongos mdx;
- Verificar os efeitos de um protocolo de exercício físico baseado na MFEL sobre a atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória mitocondrial (complexos I, II, III e IV) e creatina quinase em músculo esquelético e tecido encefálico em camundongos mdx.

# 3. METODOLOGIA

## 3.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo caracteriza-se como experimental com a utilização de um modelo animal.

## 3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA da Universidade do Sul de Santa Catarina, conforme Registro 14.017.4.08.IV.

## 3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos machos mdx e wild-type (Black C57BJ/6) com 28 dias, pesando entre 25-30g, procedentes da USP – São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do LANEX e acondicionados em 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 a temperatura de 23 $\pm$ 1º C.

## 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

### 3.4.1 Determinação da intensidade do exercício pela máxima fase estável do lactato (MFEL)

A fim de determinar a intensidade do programa de exercício físico foi utilizado o teste da MFEL. Para isto, os animais (utilizados apenas para este teste. n=15) foram submetidos a 2 sessões de exercício físico com intensidade constante por 30 minutos, no qual as amostras de sangue foram coletadas no 10º e no 30º minuto de exercício para a subsequente análise da concentração de lactato. Cada teste foi conduzido em dias diferentes (com intervalos de 7 dias) correspondente as seguintes cargas de trabalho: 6 e 9m/min. O critério para considerar a intensidade da MFEL foi o aumento da concentração de não mais que 1 mmol/L entre o 10º e o 30º minuto de exercício físico[76,80].

Para a determinação da MFEL, foi realizada a higienização do local com álcool (70%) e 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 lactímentro portátil (Accutrend® Roche, Basel, Suiça), foi realizada a mensuração do nível sanguíneo de lactato. Antes de cada teste o equipamento foi calibrado de acordo com instruções do fabricante.

Para a realização do protocolo de exercício físico aeróbio Os animais foram divididos em 4 grupos de 15 animais cada: 1) wt não exercitado; 2) wt exercitado; 3) mdx não exercitado; 4) mdx exercitado. Os animais dos grupos não exercitado, não fizeram nenhum tipo de exercício físico, permanecendo em suas caixas moradia durante todo o tempo do experimento. Já os animais dos grupos submetidos ao exercício físico (grupo exercitado) passaram por um protocolo de treinamento aeróbico por 8 semanas sendo realizado 2 vezes por semana[81]. Vinte e quatro horas após o último dia de exercício, os animais foram submetidos a morte indolor assistida para a retirada do músculo gastrocnêmio e córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex total (tecido encefálico). As amostras foram isoladas para posterior análise e acondicionadas em tubos plásticos congelando-se a -80°C.

### 3.4.2 Protocolo de exercício físico de baixa intensidade

Os animais foram submetidos ao treino duas vezes por semana, durante 8 semanas, em uma esteira sem inclinação com velocidade e tempo programados e

adaptados para este fim. O tempo de cada treinamento foi de 30 minutos[81,82]. Os animais foram habituados na esteira durante sete dias antes do início do programa de treinamento, com velocidade de 4 m/min, a fim de minimizar o estresse causado pelo ambiente diferente. O programa de treinamento foi realizado em esteira ergométrica de uso humano e adaptada para camundongos, com 16 raias individuais (25 x 10 x 9,5 cm) de acrílico.

## 3.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

### 3.5.1 Mensurações de Biomarcadores de Estresse Oxidativo

**Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):** como indício de peroxidação lipídica foi medido a concentração de TBARS tecidual cerebral durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito[83]. Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,067%, fervidas por 15 minutos, e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm através do espectrofotômetro.

**Medida do dano oxidativo em proteínas:** o dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito[84]. Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas em adição de ácido tricloroacético 20% e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). O conteúdo dos grupamentos carbonil foi medido pela absorbância em 370 nm através do espectrofotômetro.

**Atividade de Tióis Livres:** As amostras foram precipitadas com TCA a 10%, centrifugado, e o sobrenadante foi adicionada a DTNB (5,599 -ditiobis-2-nitrobenzóico - 1,7 M) e Tampão Tris-HCl (30 mM, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético ácido-3 mM de EDTA, pH 8,9). Os resultados foram expressos em Tiol (e = 1.4156104M21cm21) em nmol / mg de proteína[85].

**Dosagens de Proteínas:** As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry[86] e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

### 3.5.2 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

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

**Atividades dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória Mitocondrial:** A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Rad[87] pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade do complexo II foi medida pelo método descrito por Fischer e colaboradores[88] (1985), em que a diminuição da absorbância do 2,6 – dicloroindofenol (DCIP) em 600 nm foi usada para o cálculo da atividade do complexo II. A atividade do complexo II-III foi determinada de acordo com Fischer e colaboradores [88] (1985) e baseada na redução do citocromo c acompanhando-se o aumento da absorbância em 550 nm durante 5 minutos a 37°C. A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin e colaboradores[89] (1994), e calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm. A atividade da creatina quinase foi determinada de acordo com a metodologia de Hugnes[90] (1962) e medido em 550 nm[78].

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta dos dados foi realizado o teste de normalidade de shapiro-wilk para caracterização dos dados. Os dados foram expressos através da média e do erro da média. Para avaliar a interação entre as variáveis estudadas, foi usado o teste ANOVA de duas vias com post hoc bonferroni. Para avaliar a interação entre

os grupos foi utilizada ANOVA de uma via com post hoc Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p<0,05$.

# 4. RESULTADOS

## 4.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Para determinar o estresse oxidativo foram analisados a peroxidação lipídica (Figura 3), carbonilação de proteínas (Figura 4) e tióis livres (Figura 5) em tecido encefálico e músculo gastrocnêmio.

A Figura 3 expõe os resultados da peroxidação lipídica obtido em córtex pré-frontal (3A), cerebelo (3B), hipocampo (3C), estriado (3D), córtex (3E) e gastrocnêmio (3F).

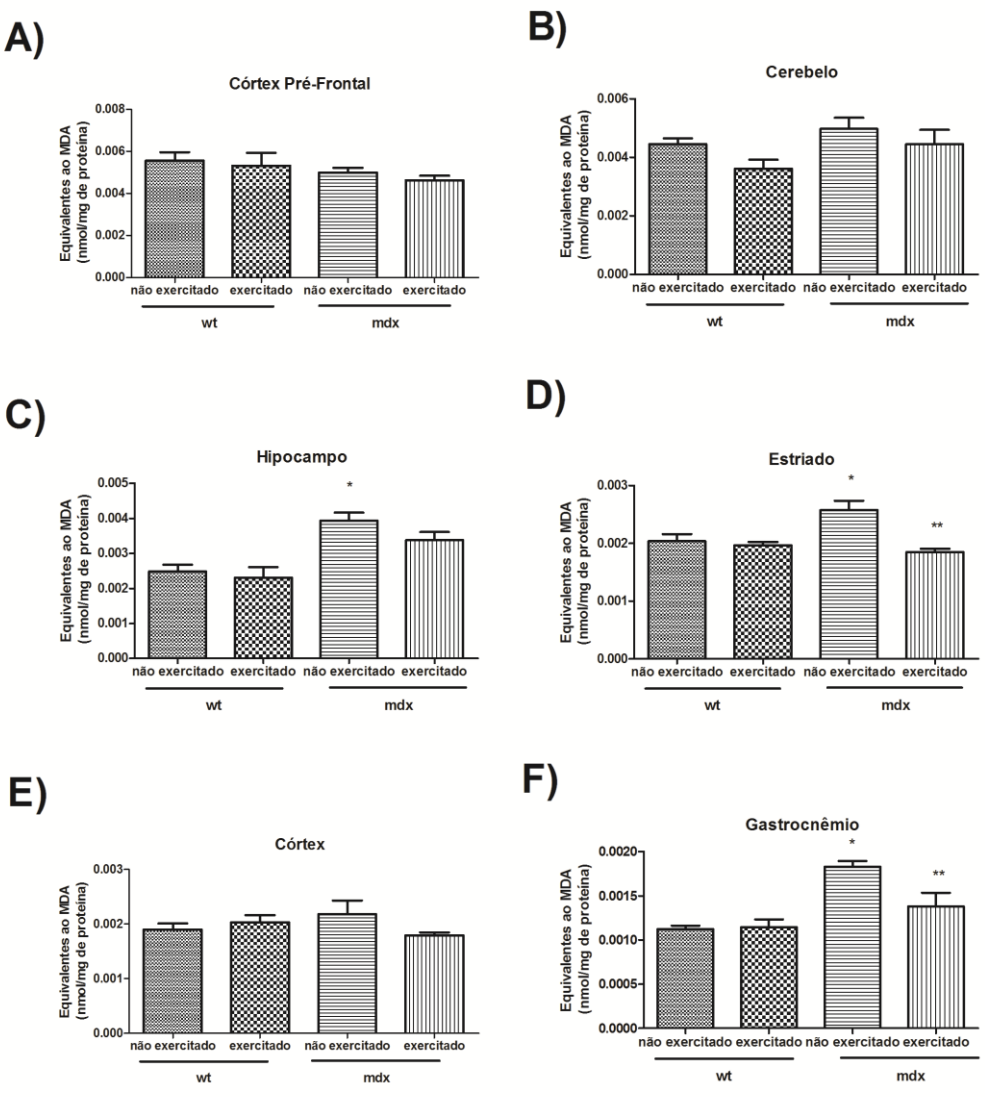


Figura 3- Peroxidação lipídica. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ($p<0,05$) nas análises em estriado e gastrocnêmio ($p<0.05$). Pode-se observar que não houve alteração entre os grupos experimentais quanto a peroxidação lipídica em córtex pré-frontal (3A), cerebelo (3A) e córtex (3E) ($p>0.05$). Em hipocampo, houve um aumento da peroxidação lipídica nos animais mdx não exercitados quando comparados aos animais selvagens (wt) não treinados ($p<0.05$). Entretanto, não houve diminuição da peroxidação lipídica nos animais mdx treinados quando comparados aos animais mdx não treinados ($p>0.05$), evidenciando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir neste parâmetro analisado. Em estriado (3D) e gastrocnêmio (3F) houve um aumento da peroxidação lipídica nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados ($p>0,05$). Os animais mdx submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram uma diminuição significativa quando comparados aos animais mdx não treinados ($p<0.05$), ou seja, o exercício físico teve um efeito benéfico nestas estruturas analisadas.

A Figura 4, demonstra os resultados do dano a proteína identificado em córtex pré-frontal (4A), cerebelo (4B), hipocampo (4C), estriado (4D), córtex (4E) e gastrocnêmio (4F)

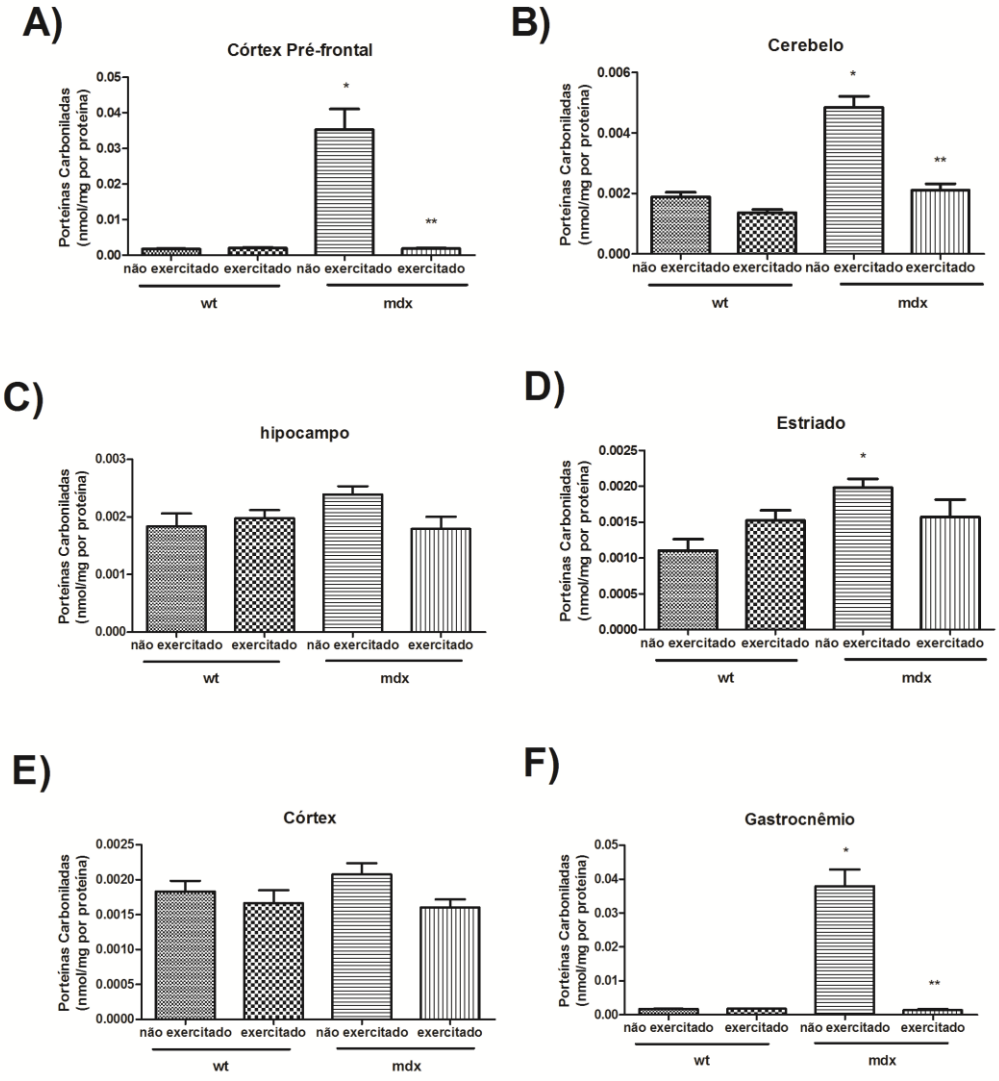


Figura 4- Carbonilação de Proteínas. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

Na análise da carbonilação de proteínas observou-se interação significativa entre a condição experimental e a intervenção nas análises em córtex pré frontal, cerebelo, e gastrocnêmio (p<0.05). Por outro lado, não houve alteração entre os grupos experimentais em hipocampo (4C) e córtex (4E) (p>0.05). Em estriado (4D), houve um aumento da carbonilação de proteínas nos animais mdx não exercitados quando comparados aos animais selvagens (wt) não treinados (p<0.05). Entretanto, nessa estrutura não houve diminuição nos animais mdx treinados quando comparados aos animais mdx não treinados (p>0.05), evidenciando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir neste parâmetro analisado. Em córtex pré frontal (4A), cerebelo (4B) e gastrocnêmio (4F) houve um aumento da peroxidação lipídica

nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados (p>0,05). Os animais mdx que realizaram o protocolo de exercício físico, apresentaram uma diminuição significativa  quando comparados aos animais mdx não treinados (p<0.05), ou seja, o exercício físico teve um efeito benéfico nestas estruturas analisadas.

Sabe-se que processo fisiopatológico da DMD ocorre o desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade antioxidante, aumentando o dano e degeneração da fibra muscular e tecido neuronal. Para isso, foi realizada também a avaliação da atividade de agentes antioxidantes, como Tióis livres (Figura 5).

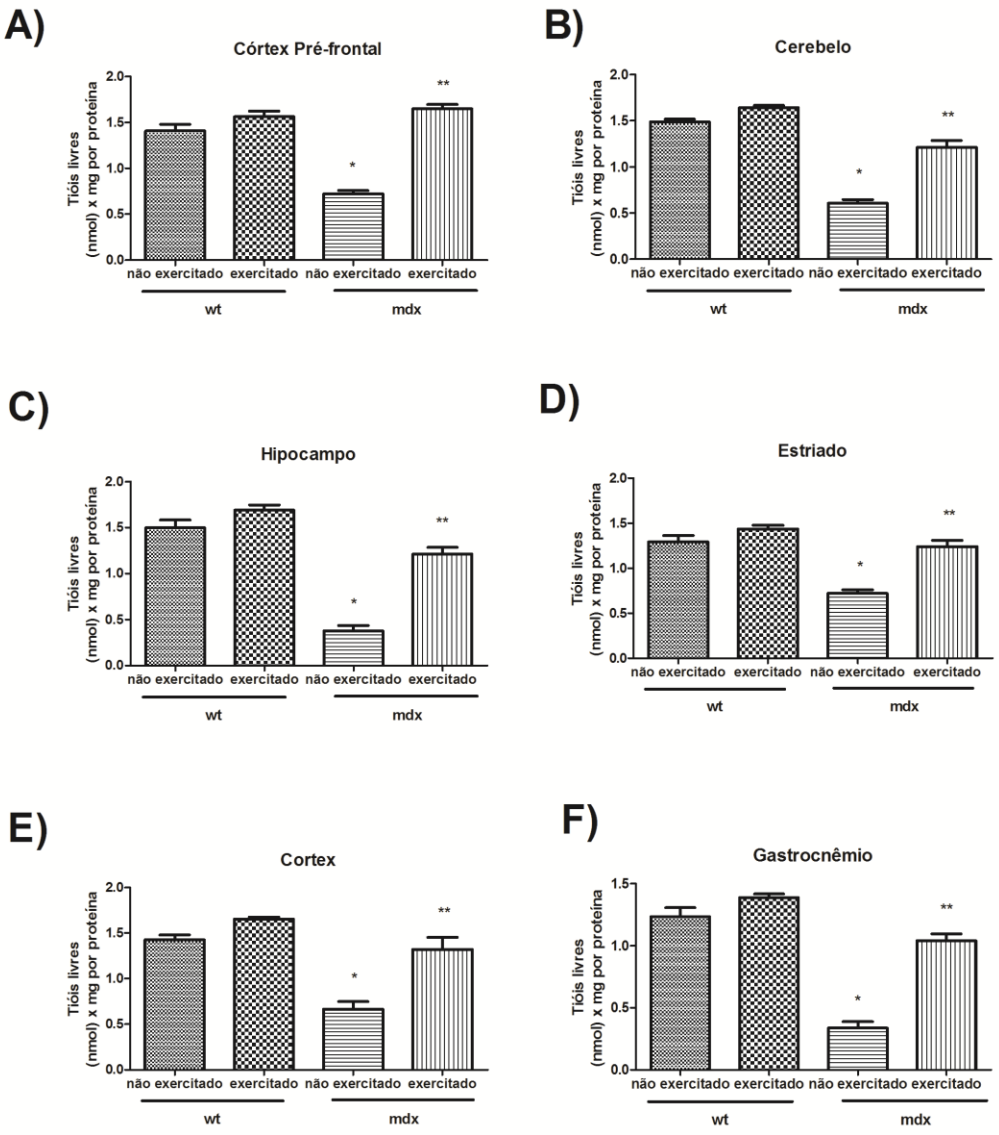


Figura 5- Tióis Livres. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

A atividade antioxidante demonstrou interação significativa entre a condição experimental e a intervenção nas análises em todas as estruturas analisadas (córtex pré frontal, cerebelo, hipocampo, estriado, córtex e gastrocnêmio ($p<0.05$). Os animais mdx que realizaram o protocolo de exercício físico, apresentaram aumento significativo da atividade antioxidante quando comparados aos animais mdx não treinados ($p<0.05$), ou seja, o exercício físico teve um efeito positivo nestas estruturas analisadas.

## 4.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

Com o objetivo de verificar a influência do protocolo de exercício físico da DMD, foi analisada a atividade dos complexos respiratórios I (Figura 6), II (Figura 7), II-III (Figura 8) e IV (Figura 9), além da creatina quinase (figura 10), em tecido encefálico e músculo gastrocnêmio.

A Figura 4 expõe os resultados da atividade do complexo I da cadeia respiratória, em córtex pré-frontal (6A), cerebelo (6B), hipocampo (6C), estriado (6D), córtex (6E) e gastrocnêmio (6F).

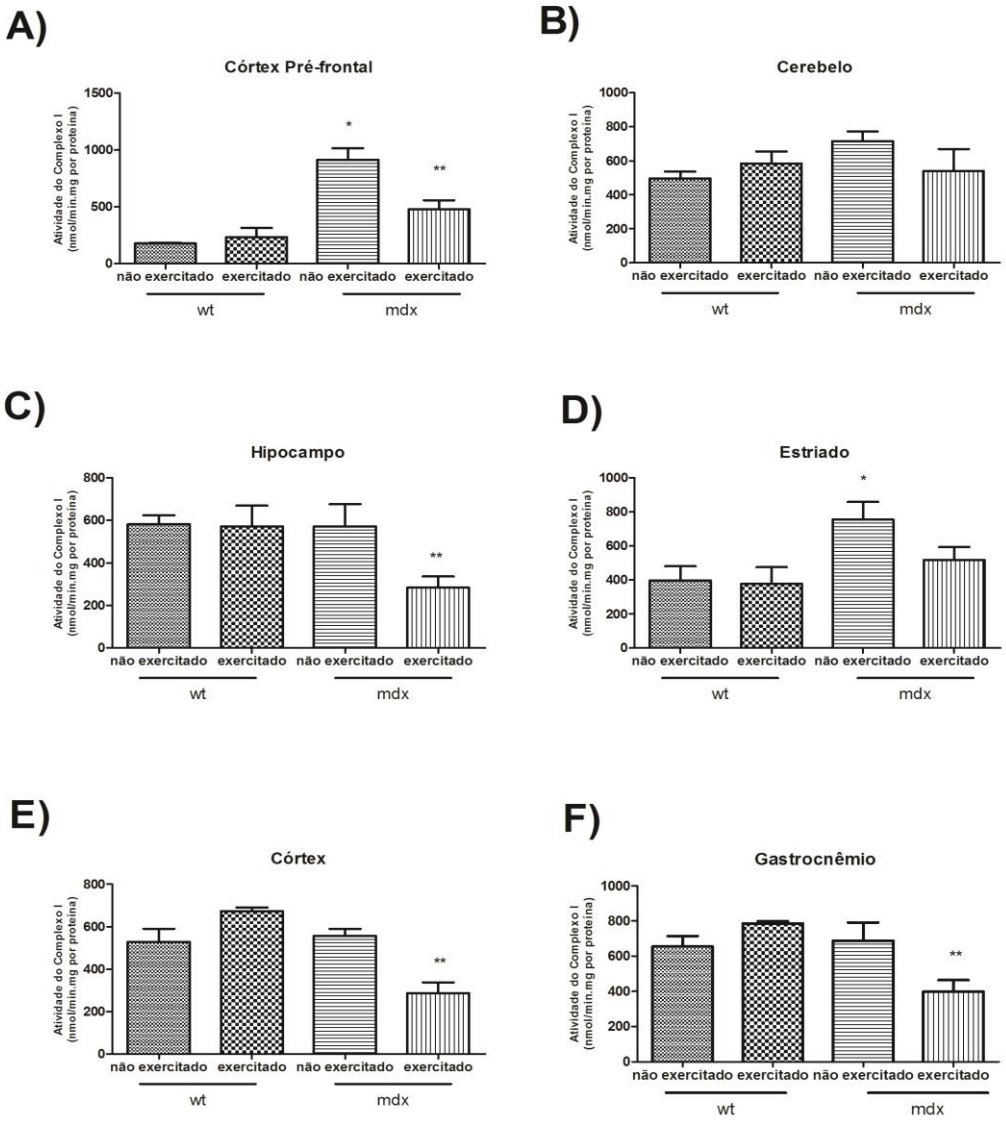


Figura 6- Atividade do Complexo I. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção (p<0,05) somente na análise de córtex pré frontal (p<0.05). Não houve alteração entre os grupos experimentais quanto a atividade do complexo I em cerebelo (6B) ) (p<0.05). Em estriado (6D), houve um aumento da atividade deste complexo nos animais mdx não exercitados quando comparados aos animais selvagens (wt) não treinados (p<0.05). Entretanto, não houve diminuição alteração na atividade enzimática nos animais mdx treinados quando comparados aos animais mdx não treinados (p>0.05), evidenciando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir neste parâmetro analisado. Em hipocampo (6C), córtex (6E) e gastrocnêmio

(6F), não observou-se alteração nos animais mdx não treinados, quando comparados aos wt não treinados, mas houve diminuição da atividade enzimática dos animais mdx treinados, quando comparados as animais wt não treinados ($p>0.05$). Em pré frontal (6A) houve um aumento da atividade do complexo I nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados ($p>0,05$), mas ns animais mdx submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram uma diminuição significativa quando comparados aos animais mdx não treinados ($p<0.05$), ou seja, o exercício físico teve um efeito benéfico nestas estruturas analisadas.

A Figura 7 expõe os resultados da atividade do complexo II da cadeia respiratória em córtex pré-frontal (7A), cerebelo (7B), hipocampo (7C), estriado (7D), córtex (7E) e gastrocnêmio (7F).

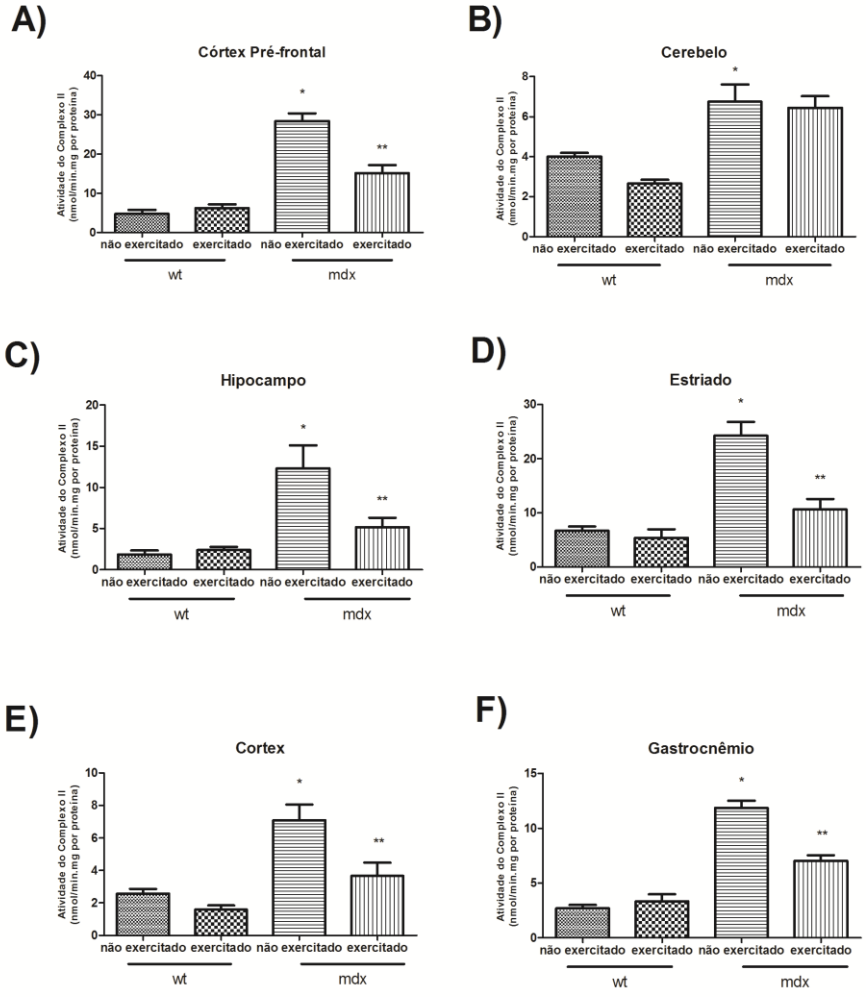


Figura 7- Atividade do Complexo II. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

A atividade do complexo II apresentou interação significativa entre a condição experimental e a intervenção (p<0,05) nas análises em córtex pré frontal, hipocampo, estriado, córtex e gastrocnêmio (p<0.05). No cerebelo (7B) houve um aumento da atividade do complexo II nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens (wt) não treinados (p<0.05), mas não houve alteração nos animais mdx treinados quando comparados aos animais mdx não treinados (p>0.05), evidenciando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir neste parâmetro analisado. Em córtex pré frontal (7A), hipocampo (7C), estriado (7D), córtex (7E) e gastrocnêmio (7F) houve um aumento da atividade enzimática nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados (p>0,05). Porém, os animais mdx submetidos ao protocolo de exercício

físico apresentaram uma diminuição significativa da atividade deste complexo, quando comparados aos animais mdx não treinados ($p<0.05$), indicando influência benéfica do exercício físico nestas estruturas analisadas.

A Figura 8 expõe os resultados da atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em córtex pré-frontal (8A), cerebelo (8B), hipocampo (8C), estriado (8D), córtex (8E) e gastrocnêmio (8F).

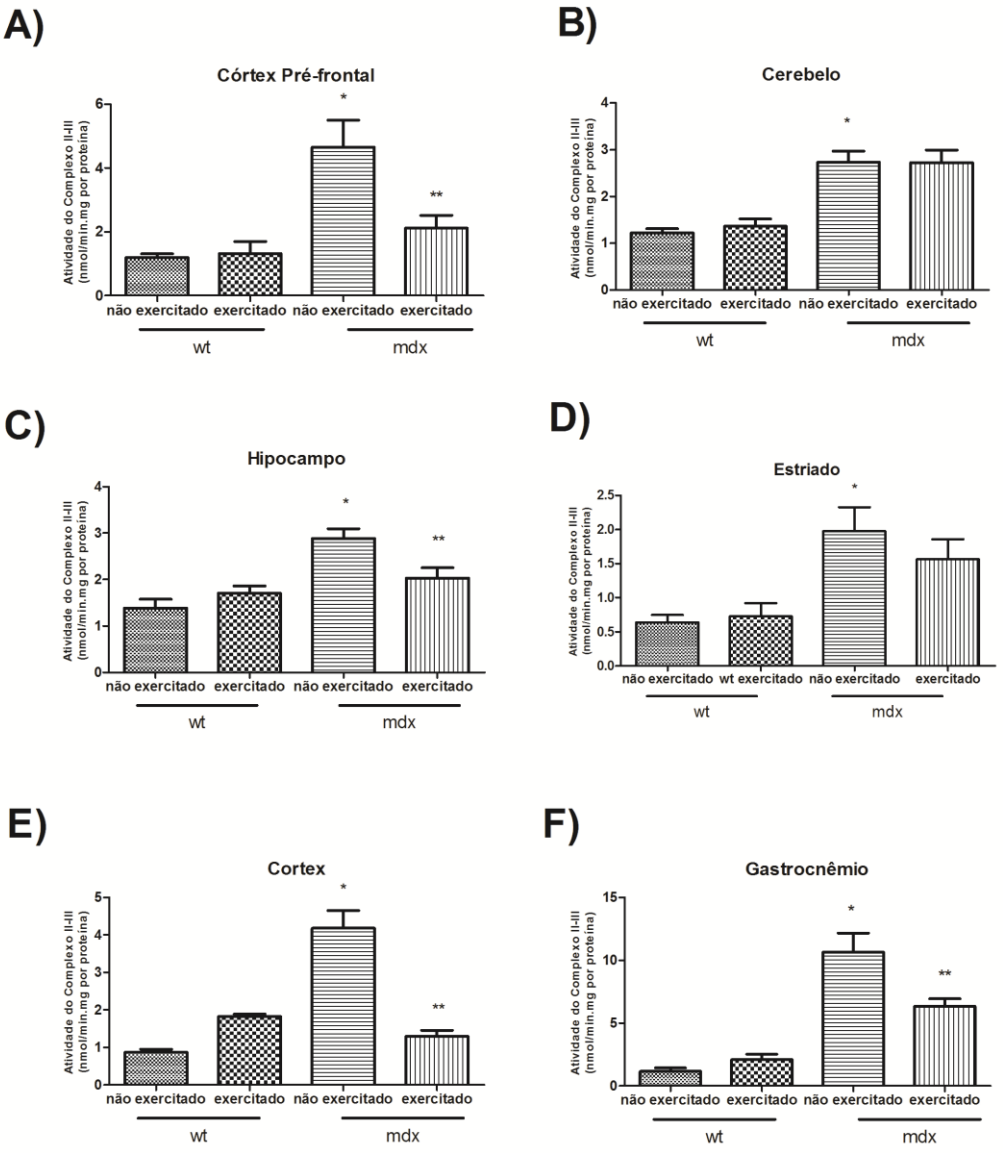


Figura 8- Figura 5 Atividade do Complexo II-III. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

Houve uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ($p<0,05$) nas análises em córtex pré frontal, hipocampo, córtex e

gastrocnêmio ($p<0.05$). Em cerebelo (8B) e estriado (8D), houve um aumento na atividade deste complexo, nos animais mdx não exercitados quando comparados aos animais selvagens (wt) não treinados ($p<0.05$). Entretanto, não houve diminuição da atividade enzimática nos animais mdx treinados quando comparados aos animais mdx não treinados ($p>0.05$), demonstrando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir neste parâmetro analisado. Em córtex pré frontal (8A), hipocampo (8C), córtex (8E) e gastrocnêmio (8F) houve um aumento da atividade do complexo II-III nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados ($p>0,05$). Os animais mdx submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram uma diminuição significativa quando comparados aos animais mdx não treinados ($p<0.05$), ou seja, o exercício físico teve um efeito benéfico nestas estruturas analisadas.

A Figura 9 expõe os resultados da atividade do complexo IV da cadeia respiratória em córtex pré-frontal (9A), cerebelo (9B), hipocampo (9C), estriado (9D), córtex (9E) e gastrocnêmio (9F).

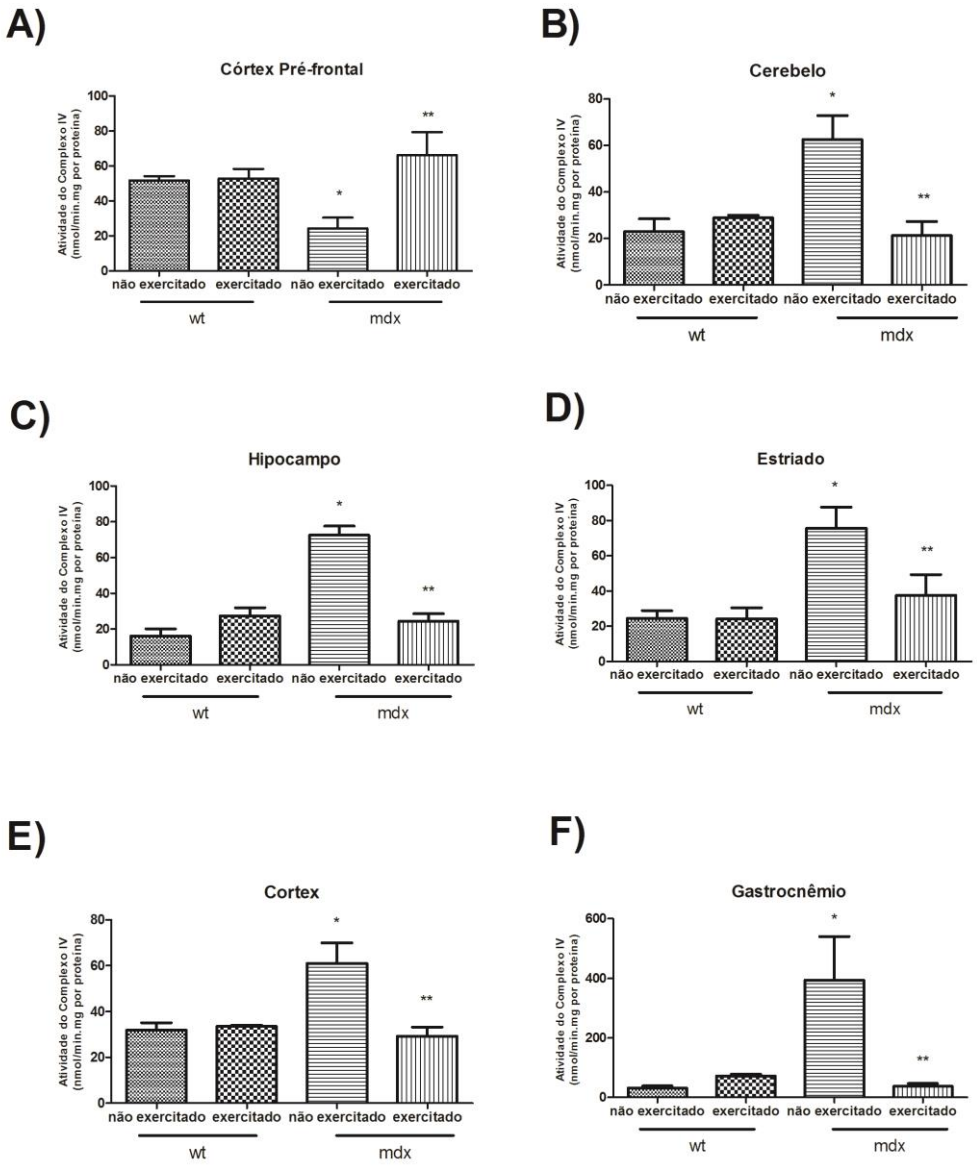


Figura 9- Figura 5 Atividade do Complexo IV. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

Na análise do complexo IV, ocorreu interação significativa entre a condição experimental e a intervenção (p<0,05) nas análises em córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado, córtex e gastrocnêmio (p<0.05). Em córtex pré frontal (9A) ocorreu diminuição da atividade enzimática do complexo IV nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais wt não treinados (p>0,05), mas nos animais submetidos ao exercício físico houve aumento significativo desta atividade (p>0,05). Em cerebelo (9B), hipocampo (9C), estriado (9D), córtex (9E) e gastrocnêmio (9F) houve um aumento da atividade do complexo IV nos animais mdx

não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados (p>0,05). Os animais mdx submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram uma diminuição significativa desta atividade, quando comparados aos animais mdx não treinados (p<0.05), ou seja, o exercício físico teve um efeito benéfico nestas estruturas analisadas.

A Figura 10 expõe os resultados da atividade de creatina quinase em córtex pré-frontal (10A), cerebelo (10B), hipocampo (10C), estriado (10D), córtex (10E) e gastrocnêmio (10F).

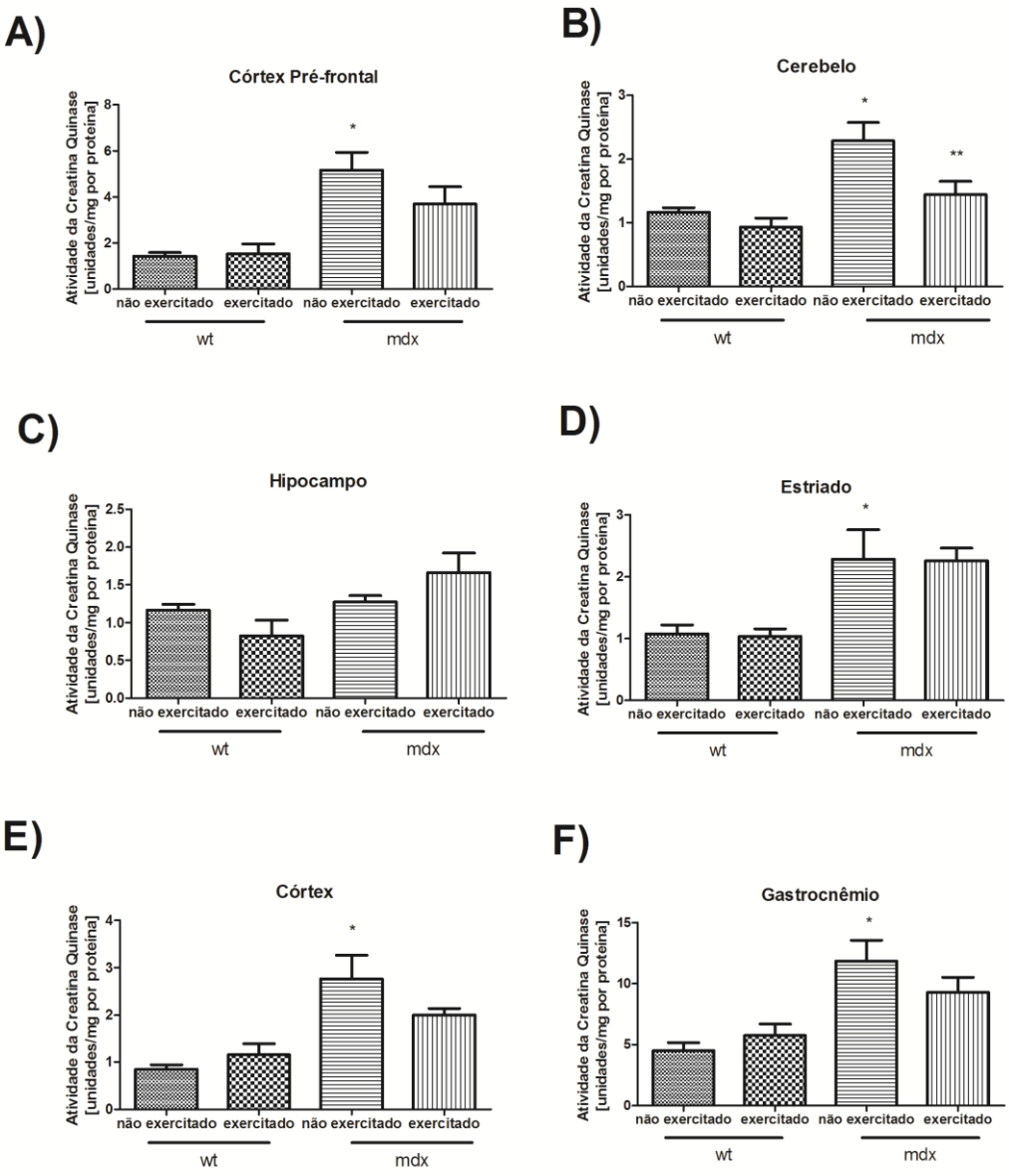


Figura 10- Atividade da Creatina Quinase. Dados expressos em média e erro da média. *p<0.05 vs wt não exercitado. **p<0.05 vs mdx não exercitado.

Observou-se também uma interação significativa entre a condição experimental e a intervenção ($p<0,05$) na análise em cerebelo ($p<0.05$). Pode-se observar que não houve alteração entre os grupos experimentais quanto a atividade de creatina quinase em hipocampo (10C) ($p>0.05$). Em córtex pré frontal (10A), estriado (10D), córtex (10E) e gastrocnêmio (10F), houve um aumento da atividade creatina quinase nos animais mdx não exercitados quando comparados aos animais selvagens (wt) não treinados ($p<0.05$). Entretanto, não houve diminuição desta atividade nos animais mdx treinados quando comparados aos animais mdx não treinados ($p>0.05$), evidenciando que o protocolo utilizado não foi capaz de interferir neste parâmetro analisado. Em cerebelo (10B) houve um aumento da atividade de creatina quinase nos animais mdx não treinados quando comparados aos animais selvagens não treinados ($p>0,05$). Os animais mdx submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram uma diminuição significativa desta atividade, quando comparados aos animais mdx não treinados ($p<0.05$), ou seja, o exercício físico teve um efeito benéfico destas estruturas analisadas também na atividade da creatina quinase.

# 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos de um protocolo de exercício físico sobre o estresse oxidativo e alterações do metabolismo energético, em músculo esquelético e tecido encefálico em camundongos mdx. Os resultados correspondentes ao estresse oxidativo, demonstraram que em animais mdx não treinados ocorreu aumento de dano a proteína e lipídio em cerebelo, estriado e gastrocnêmio, concomitante com a diminuição da atividade antioxidante destas mesmas estruturas, evidenciando o estresse oxidativo. Da mesma maneira, nos animais mdx não exercitados evidenciou-se alterações na atividade em todos os complexos mitocondriais, com aumento de creatina quinase em todas as estruturas analisadas. A presente pesquisa optou por avaliar estresse oxidativo e atividade do metabolismo energético por se tratarem de eventos fisiopatológicos associados ao processo de evolução da DMD.

A literatura afirma que a DMD é uma doença neuromuscular caracterizada pela ausência da proteína distrofina, tanto em músculo esquelético quanto em SNC[91]. Esta proteína está localizada no interior da membrana nos músculos e nas células do encéfalo, em associação com um complexo de proteínas do citoesqueleto ligada à membrana conhecida como o proteína associada a distrofina[92]. A ausência de distrofina encefálica afeta o funcionamento do SNC de várias maneiras, desde o seu desenvolvimento, por alterar a migração e diferenciação neuronal; por alterar a excitabilidade neuronal, pois esta proteída também encontra-se na fenda pós sináptica; e a longo prazo, afeta a plasticidade sináptica[93]. Além disso, a falta da a distrofina encefálica leva a diminuição de BDNF, um regulador de sobrevivência neurona[94,30], podendo induzir a morte celular. Essas anormalidades encefálicas podem explicar o comprometimento cognitivo apresentado em pacientes com DMD. No entanto, a natureza, magnitude e suporte biológico dos déficits cognitivos que envolvem deficiência de distrofina ainda permanecem pouco claros, embora tenham sido parcialmente abordados por estudos em camundongos mdx por Anderson e colaboradores[13] (2002).

O processo fisiopatológico da DMD causa danos na membrana celular, atuando em ácidos graxos insaturados, modificando a estrutura das proteínas e

induzindo modificações no DNA[23]. Estas alterações ocorrem tanto em SNC quanto em tecido muscular, sendo o músculo gastrocnêmio primeiramente atingido, pela sua alta atividade contrátil e consequente alto metabolismo[95]. Por esta razão, este estudo optou pela utilização do músculo gastrocnêmio como representante do sistema músculo esquelético, para demonstrar que o protocolo escolhido de exercício físico, pode influenciar os parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em tecido neuronal sem acelerar o processo degenerativo da musculatura esquelética.

Sabe-se que os efeitos deletérios à membrana provocados pelo estresse oxidativo provocam a ruptura no sarcolema, aumento no influxo de cálcio, toxicidade celular e consequente degeneração muscular[32]. Afim de diminuir estes danos, os tratamentos mais recentes tem estudado mecanismos que diminuam dano celular, aumente atividade antioxidante e melhore produção de ATP via mitocôndria[50]. Nesse contexto, a prática de exercício físico na DMD vem sendo estudada como auxiliar no tratamento da doença, mas o volume ideal ainda é questionável. Sabe-se que exercícios de alta intensidade (acima da MMFEL) são claramente prejudiciais e podem acelerar a evolução da doença[96]. Por isso, no intuito de realizar um protocolo de exercício físico que não acelerasse a evolução da doença, o presente estudo realizou um protocolo baseado na MFEL, onde a velocidade considerada segura por não promover liberação de lactato foi de 6m\m. Segundo Gaesser e Poole[75] (1996), os domínios em relação à intensidade de esforço são moderado, pesado e severo. Por este motivo, o domínio do presente estudo pode ser denominado moderado, por não modificar o lactato sanguíneo em relação aos valores de repouso, isto é, abaixo de LL. Outros autores também consideram que exercícios sem liberação de lactato podem ser denominados de baixa a moderada intensidade. O protocolo escolhido foi realizado durante oito semanas, com volume de duas vezes por semana com duração de trinta minutos.

Um estudo que realizou um protocolo de exercício físico na esteira durante oito semanas, com velocidade de 9m\m observou diminuição de dano à lipídio e a proteína em musculo gastrocnêmio de animais mdx que realizaram o exercício, quando comparados com animais mdx não exercitados[81]. O presente estudo observou resultados semelhantes em músculo gastrocnêmio, demonstrando que o exercício físico de baixa intensidade é capaz de reverter o dano à lipídio e a proteína

neste músculo, além de aumentar significativamente a atividade antioxidante da glutationa nos animais mdx exercitados, quando comparados aos animais mdx não exercitados. Em estudo prévio, o autor aponta que o músculo gastrocnêmio é uma das estruturas mais atingidas pela DMD, e que exercícios físicos de baixa intensidade podem reverter a parâmetros normais a atividade antioxidante de SOD, indicando diminuição de estresse oxidativo e consequente diminuição da progressão da doença[95]. Outro estudo que utilizou um protocolo de natação em animais jovens mdx, durante quatro semanas, quatro dias por semana, com trinta minutos de exercício por dia também apontou diminuição da carbonilação de proteínas no músculo gastrocnêmio, quando comparado ao grupo mdx não exercitado[97]. Dessa maneira, os resultados obtidos no presente estudo e os dados já descritos concluem que um protocolo de exercício físico controlado pode melhorar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Além da análise muscular, o presente estudo observou que os animais mdx não exercitados apresentaram dano a lipídio ou proteína também em estruturas do SNC, como em córtex pré frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex. Estes resultados reafirmam o estudo realizado por Comim e Colaboradores[94] (2009), onde já havia sido descrito o envolvimento do estresse oxidativo em estruturas encefálicas de animais mdx, além da diminuição da atividade antioxidante de CAT. Porém, o protocolo de exercício físico foi capaz de diminuir o dano à proteína em pré frontal e cerebelo; e dano à lipídio em estriado. Em contra partida, em hipocampo e córtex, o exercício não foi capaz de interferir no dano à lipídio e proteína. Sabe-se que o córtex pré-frontal e hipocampo são sensíveis a exercer a respostas tróficas que conduzem ao aumento de volume e aumentos do fluxo sanguíneo cerebral[98]. Por isso, com base em estudo anterior, onde o tempo do protocolo foi de doze semanas e houve aumento de concentração de utrofina e consequente diminuição do estresse oxidativo[96], surge a hipótese de que o tempo do presente estudo pode ter sido insuficiente para avaliar o total efeito do exercício físico no SNC. Esta hipótese fundamenta-se no aumento da atividade antioxidante em todos as estruturas analisadas nos animais mdx que realizaram o protocolo, mas o dano à proteína e lipídio não reverteu na mesma proporção. Além disso, as duas estruturas que o exercício físico não interferiu, hipocampo e córtex, são, entre as estruturas analisadas, as regiões que normalmente possuem maior concentração de distrofina, sugerindo que estas estruturas apresentem mais dificuldade de recuperação[99].

Sabe-se que a atividade antioxidante está diretamente relacionada com o nado oxidativo, e por isso um dos principais biomarcadores do estresse oxidativo é a Glutationa, um importante antioxidante encefálico por se expressar em alta quantidade no SNC[27]. No presente estudo foi observado diminuição da atividade do subproduto da glutationa, Tióis Livres, nos animais mdx não exercitados, quando comparados com animais wt não exercitados. Porém, houve um aumento significativo de Tióis Livres em todas as estruturas analisadas dos animais mdx que realizaram o protocolo de exercício, corroborando com outros resultados apresentados na literatura, onde a pratica de exercício físico induziu o aumento da atividade antioxidante[53]. Em contra partida, um estudo com animais Wistar adultos, que aplicou um protocolo de natação de 4 semanas, baseado no limiar aeróbio, mostrou-se eficaz no condicionamento aeróbico, mas não alterou atividade antioxidante de CAT e Glutationa[100]. Já no estudo que utilizou a aceleração periódica (pGz), que aumenta a tensão pulsátil de cisalhamento cardíaco, para avaliar estresse oxidativo em camundongos mdx observou aumento significativo da expressão de antioxidantes endógenos (Glutathioneperoxidase-1 (GPx-1), CAT e SOD, em musculatura cardíaca[101]. Outro estudo evidenciou a recuperação significativa do músculo esquelético danificado de camundongos mdx na sequência de um protocolo de exercício de baixa intensidade na esteira, onde observaram diminuição da atividade antioxidante SOD em animais mdx não exercitados, e restauração dos níveis de SOD nos animais mdx exercitados[95].

A literatura aponta que uma das principais fontes de ERO e consequente surgimento de estresse oxidativo na fisiopatologia da DMD são alterações da cadeia respiratoria mitocondrial[97]. No presente estudo, Verificou-se que, em animais mdx não exercitados, houve alterações na atividade do complexo I em córtex pré frontal e estriado; no complexo II e II-III e IV, em todas as estruturas analisadas. A atividade da creatina quinase apresentou-se aumentada em córtex pré frontal, cerebelo, estriado, córtex e gastrocnêmio. Estes resultados confirmam dados da literatura, onde afirma-se que alterações do metabolismo energético fazem parte do processo típico da DMD[48,40].

Sob circunstâncias normais, aproximadamente 98% de oxigenio mitocondrial participa ativamente da formação de ATP, com formação normal de ERO no final do processo. A formação de ERO na cadeia respiratória pode ser parcialmente explicada pelo desvio de elétrons do complexo I para o complexo II, através de

ubiquinona, formando o superóxido. Esta formação de agentes oxidantes é naturalmente equilibrada pela ação antioxidantes, como SOD, CAT e Glutationa[94,100]. Na DMD, a alteração no transporte de elétrons entre os complexos, causado pelas lesões na membrana mitocondrial, geram aumento na produção de ERO e consequente aumento do dano à lipídio e a proteína[40].

O complexo I, por ser o primeiro a receber elétrons por meio do NADH, é geralmente mais sensível à alterações na sua atividade, principalmente em doenças que envolvam estresse oxidativo, como a DMD[40]. No presente estudo observou-se alteração na atividade do complexo I em animais mdx não exercitados em córtex pré frontal e estriado, mas o protocolo de exercício físico foi capaz de reverter somente a atividade do córtex pré frontal. Em hipocampo, córtex e músculo gastrocnêmio, não houve alteração nos animais mdx não exercitados, mas o exercício físico provocou efeito deletério na atividade do complexo I nestas estruturas, confirmando sua sensibilidade às alterações metabólicas. Um estudo recente apontou que ocorrem alterações na atividade das enzimas que participam do ciclo de Krebs em animais mdx[102]. Além disso, outro estudo com animais mdx isolou a atividade do complexo I e estimulou a atividade do complexo II, tendo como resultado a melhora da atividade mitocondrial. Este estudo concluiu que a deficiência do complexo I pode estar diretamente relacionada à produção deficitária de NADH vindo do ciclo de Krebs, mas não esclareceu completamente o mecanismo de ação[28]. Desta maneira, supõe-se que o protocolo utilizado neste estudo pode não ter interferido no funcionamento do ciclo de Krebs e talvez por esta razão não houve mehora da atividade do complexo I.

Por outro lado, as alterações encontradas nos animais mdx não exercitados, na atividade dos complexos II, II-III e IV, foram claramente revertidas após a realização do exercício físico, em córtex pré frontal, hipocampo, córtex e gastrocnêmio, demonstrando que o protocolo conseguiu melhorar a atividade dos demais complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Em estudo prévio com animais saudáveis, com protocolo de quatro semanas e intensidade baixa, também baseada na MFEL observou aumento significativo na atividade de NADH e Ubiquinona e concluiu que este tipo de exercício pode induzir uma adaptação benéfica na mitocôndria[103]. Já no estudo realizado com animais mdx demonstrou que exercícios de baixa intensidade podem melhorar a produção de ATP

mitocondrial, possivelmente por aumentar a expressão de isoformas rápidas de troponina T, da proteína C de ligação da miosina, e glicogênio fosforilase, proteínas envolvidas no funcionamento da ATP sintase[97]. Portanto, com base nos resultados do presente estudo e nos dados da literatura, sugere-se que este protocolo pode ter interferido também de maneira molecular, mas com mais eficácia nos complexos II, II-III e IV. Além disso, sugere-se que as alterações encontradas na atividade dos complexos podem estar relacionadas também com outras fontes de ERO, onde o exercício físico pode não ter interferido.

Para que ocorra continuidade na função celular, contrátil ou impulso elétrico do SNC, apesar da produção ineficiente de ATP mitocondrial na DMD[96], ocorrem reações entre um grupo de fosfato à creatina (Cr), tornando-a uma molécula de fosfocreatina (PCr). A fosfocreatina então é utilizada pelo organismo para fornecer energia em forma de ATP para as células, atraves da creatina quinase. Durante o processo de degeneração muscular, a atividade de creatina quinase encontra-se aumentada, além de ocorrer liberação desta para corrente sanguínea, quando ocorre morte celular[48]. No presente estudo, houve aumento da atividade da creatina quinase nos animais mdx não exercitados em córtex pré frontal, cerebelo, estriado, córtex e gastrocnêmio, indicando a existencia do processo de degeneração celular. Porém, o protocolo de exercício físico foi capaz de reverter a parâmetros normais, quando comparados animais mdx treinados com wt treinados, somente em cerebelo. Resultados diferentes foram encontrados em um estudo que avaliou os efeitos de um protocolo de quatro semanas de exercício de natação em animais wt e mdx, onde observaram aumento de atividade de creatina quinase nos animais não exercitados e retorno aos níveis normais de creatina quinase em gastrocnêmio nos animais mdx submetidos a natação[104]. Em contra partida, protocolos de exercício físico de alta intensidade, determinado por meio do $VO_2$máx, em pacientes com distrofias musculares diversas, tem demonstrado aumento de nível de creatina quinase, indicando que este tipo de exercício pode induzir danos celulares[61]. Desta maneira, surge o questionamento se a construção de um protocolo de exercício físico baseado somente na MFEL seria suficiente, já que níveis de creatina quinase são considerados biomarcadores fundamentais para avaliação de degeneração celular na DMD.

Apesar disso, os resultados deste estudo indicam que um protocolo de exercício físico de baixa intensidade aplicado em animais mdx pode ser considerado seguro no processo de degeneração muscular, pois a análise do gastrocnêmio apontou melhora em todos os parâmetros de estresse oxidativo e de três, dos quatro complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Sobre o SNC, conclui-se que o protocolo de exercício físico moderado não aumentou o processo de estresse oxidativo, e modificou positivamente a maioria das estruturas analisadas. Além disso, pode-se sugerir que este protocolo de exercício foi capaz de elevar significativamente os parâmetros da atividade antioxidante pela Glutationa ao ponto de chegar a níveis considerados normais. Porém, sobre a atividade da cadeia respiratória, o protocolo não foi capaz de melhorar a atividade do complexo I, mas reverteu ao funcionamento ideal a grande maioria das estruturas dos complexos II, II-III e IV, indicando melhora da produção de ATP e diminuição da produção de ERO. A atividade de creatina quinase, importante biomarcador de lesão celular, foi revertida em cerebelo, sugerindo desaceleração do processo fisiopatológico nesta estrutura. Porém, apesar do presente estudo ter melhorado vários parâmetros de degeneração neuromuscular, ele apresentou como limitações o possível tempo, volume e intensidade insuficiente de intervenção durante o protocolo aplicado e o questionamento sobre utilizar somente a MFEL como requisito para a definição da intensidade. Outro fator a ser levado em consideração e cautela na interpretação dos resultados, é o fato do uso de modelos animais. O animal mdx possui o genótipo, mas não o fenótipo da DMD, o que altera alguns parâmetros em sua fisiopatologia. Entretanto este modelo ainda é o mais aceito.

# 6. CONCLUSÃO

Um protocolo de exercício físico de baixa intensidade aplicado em camundongos mdx foi capaz de modificar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em tecido muscular e na maioria das estruturas analisadas do SNC, com aumento significativo da atividade antioxidante em todas as estruturas analisadas. Além disso, o protocolo melhorou a atividade da maioria dos complexos respiratórios mitocôndrias, tanto em tecido muscular quanto em SNC, apesar de ter diminuído a atividade de creatina quinase somente de cerebelo.

Espera-se que o presente estudo sirva como base para outros estudos que ajudem a esclarecer melhor a interferência do exercício físico na atividade do complexo I e creatina quinase e/ou protocolos que determinem o efeito do exercício físico a longo prazo sobre a degeneração celular e como base para futuras pesquisas clínicas.

## REFERÊNCIAS


1. Gevaerd MS, Domenech SC, Junior NGB, Higa DF, Lima-Silva AE. Alterações fisiológicas e metabólicas em indivíduo com distrofia muscular de Duchenne durante tratamento fisioterapêutico: um estudo de caso. Fisiot Mov. 2010;23(1):93-103.

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. Markert CD, Case LE, Carter GT, Furlong PA, Grange RW. Exercise and Duchenne muscular dystrophy: where we have been and where we need to go. Muscle & Nerve. 2012;746-51.

4. Otsuka MA, Boffa CFB, Vieira ABAM. Distrofias musculares. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda; 2005.

5. Matthew PW. The muscular dystrophies. Continuum Journ. 2013;19(6):1535-70.

6. Ljubicic V, Burt M, Jasmin BJ. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. The FASEB Journ. 2014;28:548-568.

7. Topaloglu H. Epidemiology of muscular dystrophies in the Mediterranean area. Acta Myolog. 2013:138-41.

8. Seixas SL, Cândido JL, Savino W, Santos TQ. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. Arq Neuropsiq. 1997;55(3-B):610-7.

9. Kaplan JC, Hamroun D. The 2014 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). Neuromusc Disord. 2013;23:1081-1111.

10. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. Physiological Reviews.2002;82(2): 291-329

11. Nardes F, Araújo APCQ, Ribeiro MG. Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy. Jorn de Ped. 2011;88(1):6-16.

12. Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM, Banks GB, Gardner MG, et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. PNAS. 2014;111(15):5723-28.

13. Anderson JL, Head SI, Rae C, Morley JW. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. Brain. 2002;125:4-13.

14. Lott DJ, Forbes SC, Mathur S, Germain SA, Senesac CR, Sweeney HL, et al. Assessment of intramuscular lipid and metabolites of the lower leg using magnetic resonance spectroscopy in boys with Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord, 2014.

15. Rapucci LH, Bollineli RC, Mizobuti DS, Dos Reis SL, Marques MJ, Minatel E. Effect of N-acetylcysteine plus deferoxamine on oxidative stress and inflammation in dystrophic muscle cells. 2014;15:111-28.

16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 1990;186:1-85.

17. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem. 1992;59(1):609-23.

18. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil. 1997;43(1):61-8.

19. Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? Ann Intern Med. 1989;111:918-31.

20. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual Review of Biochemistry. 1995;64:97-112.

21. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwel VW. Harper's Biochemistry. 24 ed. Stamford: Appleton & Lange; 1996.

22. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principles of Biochemistry. 3.ed. New York: Worth Publishers; 2000.

23. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. Journ of Neuro. 2006;97:1634-1658.

24. Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C. Membrane lipid oxidation. Boca Raton: CRC Press; 1991. p.151-70.

25. Terrill JR, Radley-Crabb HG, Grounds MD, Arthur PG. N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis. Neuromuscul Disord. 2012;22(5):427-34.

26. Oliveira MC, Schoffen JPF. Oxidative stress action in cellular aging. Braz Arch Biol Technol. 2010;53(6):1333-42.

27. Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. Pharmacol Ther. 1990;47:61-71.

28. Berlett BS, Stadtman ER. Oxidação de proteínas no envelhecimento, doenças e estresse oxidativo. J. Biol. 1997;372:20313-16.

29. Souza MV, Bareta GM, Tuon L, Moraz T, Rosa MI. Avaliação de estresse oxidativo em pacientes portadores de distrofias musculares progressivas. In: 1º Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação do IF-SC; 2011; Campus Criciúma.

30. Comim CM, Mathia GB, Hoepers A, Tuon L, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Rosa MI. Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and funcionality in Progressive Muscular Dystrophies. An Acad Bras Cienc. 2015;87(3):1809-18.[1]

31. Rajakumar D, Alexander M, Oommem Anna. Oxidative Stress, NF-jB and the Ubiquitin Proteasomal Pathway in the Pathology of Calpainopathy. Neurochem Res. 2013;38:2009-18.

32. Viola HM, Adams AM, Davies SM, Fletcher S, Filipovska A, Hool LC. Impaired functional communication between the L-type calcium channel and mitochondria contributes tometabolic inhibition in the mdx heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(28):905-14.

33. Andrade LS, Marreiro DN. Aspectos sobre a relação entre exercício físico, estresse oxidativo e zinco. Rev Nutr Campinas. 2011;24(4):629-40.

34. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Bioquímica. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004.

35. Stryer L, Berg J M, Tymoczko J L. Bioquímica. 5º ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004.

36. Orth M, Schapira, AHV. Mitochondria and degenerative disorders. Jorn of Med and Gen. 2001;106:27-36.

37. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Simões AA, Lodi WRN. Princípios de bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

38. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouses. Science. 1999;283:1482-87.

39. Smith CM, Marks AD, Lieberman M. Bioquímica Médica Básica de Marks: uma abordagem clínica. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

40. Timpani CA, Hayes A, Rybalka E. Revisiting the dystrophin-ATP connection: How half a century of research still implicates mitochondrial dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy aetiology. Med Hypotheses. 2015.

41. Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. Bioch et Bioph Acta. 1999;1410(2):215-228.

42. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton AS, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a sucession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron. 1995;15:961-73.

43. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho. Cadeia Respiratória Mitocondrial: Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. Arq Med. 2008:22(2/3).

44. Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed; 2002.

45. Madrigal JLM, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. Neuropsychopharmacol. 2001;24:420-29.

46. Navaro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. Molec Asp of Med. 2004;25:37-4.

47. Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological ilnesses. Annals of Neurology. 1992;31(2):119-30.

48. Tuon L, Comim CM, Fraga DB, Scain G. Mitochondrial respiratory chain and Creatine Kinase activities in the brain mdx mouse. Muscle & Nerve. 2010:257-64.

49. Pitanga FLG. Epidemiologia, atividade física e saúde. Rev. Bras. Ciên. e Mov. 2002;10(3).

50. Harden SM, McEwan D, Sylvester BD, Kaulius M, Ruissen G, Burke SM, Estabrooks PA, Beauchamp MR. Understanding for whom, under what conditions, and how group-based physical activity interventions are successful: a realist review. BMC Public Health. 2015;15(1):958.

51. Coelho CF, Burini RC. Atividade física para prevenção e tratamento das doenças crônicas não transmissíveis e da incapacidade funcional. Rev Nutr Campinas. 2009;22(6):937-946.

52. Sachdeva A, Kumar K, Anand KS. Non Pharmacological Cognitive Enhancers – Current Perspectives. J Clin Diagn Res. 2015;9(7):01-06.

53. Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedroso RV, Santos-Galduroz RF. Physical exercise modulates peripheral levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. Arch Gerontol Geriatr. 2013;56:10-5.

54. Kaur J, Garnawat D, Bhatia MS, Sachdev M. Rehabilitation in Alzheimer's disease. Delhi Psychiatry J. 2013;16:166-70.

55. Jayakody K, Gunadasa S, Hosker C. Exercise for anxiety disorders: systematic review. Br J Sports Med. 2014;48:187–96.

56. Motohashi N, Asakura Y, Asakura A. Isolation, Culture, and Transplantation of Muscle Satellite Cells. J Vis Exp. 2014;86(10).

57. Bankolé LC, Feasson L,Ponsot E, Kadi F. Fibre type-specific satellite cell content in two models of muscle disease. Histopathology. 2013;63:826-32.

58. Jansen M, Alfen NV, Geurts ACH, Groot IJM. Assisted Bicycle Training Delays Functional Deterioration in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy: The Randomized Controlled Trial “No Use Is Disuse”. Neurorehabilit and Neural Repair. 2013;27(9):816-27.

59. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T et al. Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. Amer J Pathol. 2010;176(5):2414-24.

60. Eagle M. Report on the Muscular Dystrophy Campaign workshop: Exercise in neuromuscular diseases. Neuro Dis. 2002;12:975–83.

61. Andersen SP, Sveen ML, Hansen RS, Madsen KL, Hansen JB, Madsen M, Vissing J. Creatine kinase response to high-intensity aerobic exercise in adult-onset muscular dystrophy. Muscle Nerve. 2013;48:897–901.

62. Alemdaroğlu D, Karaduman A, Tunca OY, Topaloğlu H. Different types of upper extremity exercise training in duchenne muscular dystrophy: effects on functional performance, strength, endurance, and ambulation. Muscle & Nerve. 2013:4-28.

63. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence J, Eagle M, Gappmaier E, Glanzman AM. The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne muscular dystrophy: reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study. Muscle Nerve. 2013;48:357-68.

64. Montes J, Blumenschine M, Dunaway S, Alter AS, Engelstad K, Rao AK. Weakness and Fatigue in Diverse Neuromuscular Diseases. J Child Neurol. 2013;28:1277.

65. Grange R W, Call J A. Recommendations to define exercise prescription for Duchenne muscular dystrophy. Exerc Sport Sci Rev. 2007;35(1):12-7.

66. Fraysee BA, Liantonio, M, Cetrone R, Burdi S, Pierno A, Frigeri M, Pisoni C. The alteration of calcium homeostasis in adult dystrophic skeletal muscle fibers is worsened by a chronic exercise in vivo. Neurobiol. Dis. 2004;17:144-54.

67. Gordon BS, Lowe DA, Kostek MC.. Exercise increases utrophin rotein expression in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve. 2014;49:915–8.

68. Joshua TS, Acosta P, Sleeper MM, Barton ER, Sweeney L. Long-term wheel running compromises diaphragm function but improves cardiac and plantarflexor function in the mdx mouse. J Appl Physiol. 2013;115:660–6.

69. Rocco AB, Levalley JC, Eldridge JA, Marsh SA, Rodgers BD. A novel protocol for assessing exercise performance and dystropathophysiology in the mdx mouse. Muscle & Nerve. 2014;50(4):541-8.

70. Radley-Crabb H, Terrill J, Shavlakadze T, Tonkin J, Arthur P, Grounds M. A single 30 min treadmill exercise session is suitable for proof-of concept studies' in adult mdx mice: A comparison of the early consequences of two different treadmill protocols. Neur Disord. 2012;22:170–82.

71. Wasserman, K; McLlory, MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. American Journal Cardiology. V.14, p.844-852, 1964.

72. Denadai BS. Avaliação aeróbia: determinação indireta da resposta do lactato sanguíneo. Rio Claro: Motrix, 2000.

73. Rao MV, Sindhav GM, Mehta J. Duchenne/Becker muscular dystrophy: A report on clinical, biochemical, and genetic study in Gujarat population, India. Ann Indian Acad Neurol. 2014; 17(3): 303–7.

74. Coggan AR, Coyle EF. Carbohydrate ingestion during prolonged exercise: effects on metabolism and performance. Exerc Sport Sci Rev. 1991;19:1-40.

75. Gaesser GA, Poole DC. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. Exerc Sport Sci Rev. 1996;24:35-71.

76. Ishii H, Nishida Y. Effect of lactate accumulation during exercise-induced muscle fatigue on the sensorimotor cortex. J Phys Ther Sci. 2013;25:1637-42.

77. Ferreira JBC, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. Clin and Exp Pharmac & Physic. 2007;34(8):760-765.

78. Machado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti MP, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. Rev Bras Med Esp. 2006;5(12):259-262.

79. Faude O, Kindermann W, Meyer T. Lactate Threshold Concepts how valid are they?. Sports Med. 2009;6(9):469-490.

80. Partridge TA. The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. FEBS Journ. 2013;280:4177-86.

81. Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA.Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice.Free RadicBiol Med. 43:145-54, 2007.

82. Urhausen A, Coen B, Weiler B, Kindermann W. Individual Anaerobic Threshold and Maximum Lactate Steady S tate. Int J Sports Med. 1993;14:134-39.

83. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods in enzymology. 1990;186:421-431.

84. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H2O2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell. 1994;79: 583-593.

85. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of lowdensity

86. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology 186: 464-478, 1990.

87. Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193:265-75, 1951.

88. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. Clin Chim Acta 153:23–26, 1985.

89. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clinica Chimica Acta. 288: 35-51, 1994.

90. Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. Clinica chimica acta. 1962; 7:597-603.

91. Ragusa RJ, Chow CK, Porter JD. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 1997;7(6-7):379-86.

92. Blake DJ, Kröger S. The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? Trends Neurosci. 2000;23(3):92-9.

93. Culligan K, Ohlendieck K. Diversity of the Brain Dystrophin-Glycoprotein Complex. J Biomed Biotechnol. 2002;2(1):31-36.

94. Comim CM, Lucca G, Valvassoria SS, Réusa GZ, Vuolob F, Pedronilhob F, Gaviolia EC, Dal-Pizzolb F, Quevedo J. Effects of chronic mild stress model on the oxidative damage parameters in the rat brain. 2009;54:358-362.

95. Fontana S, Schillaci O, Frinchi M, Giallombardo M, Morici G, Liberto VD, Alessandro R, De Leo G, Perciavalle V, Belluardo N, Mudò G. Reduction in mdx mouse muscle degeneration by low-intensity endurance exercise: a proteomic analysis in quadriceps muscle of exercised compared with sedentary mdx mice. Biosci Rep. 2015;35(3):12.

96. Abou-Samra M, Lecompte S, Schakman O, Noel L, Many MC, Gailly P, Brichard SM. Involvement of adiponectin in the pathogenesis of dystrophinopathy. Skelet Muscle. 2015;7(5):25.

97. Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. 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.

98. Berchicci M, Lucci G, DiRusso F. Benefits of physical exercise on the aging brain: the role of the prefrontal cortex. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013;68:1337-41.

99. Lidov HG, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. Nature. 1990;348(6303):725-8.

100. Andreotti FJP, Voltarelli FA, Oliveira CAM, Gobatto CA, Macedo DV, Mello MAR. Aerobic condition and oxidative stress in rats swim-trained at the anaerobic threshold intensity. R. bras. Ci. e Mov. 2004;12(2):29-34.

101. Uryash A, Bassuk J, Kurlansky P, Altamirano F, Lopez JR, Adams JA. Antioxidant Properties of Whole Body Periodic Acceleration (pGz). PLoS One. 2015;10(7).

102. Comim CM, Hoepers A, Ventura L, Freiberger V, Dominguini D, Mina F, Mendonça BP, Scaini G, Vainzof M, Streck EL, Quevedo J. Activity of Krebs cycle enzymes in mdx mice. Muscle Nerve. 2015;12.

103. Rocha LA, Oliveira KS, Migliolo L, Franco OL. Effect of Moderate Exercise on Mitochondrial Proteome in Heart Tissue of Spontaneous Hypertensive Rats. Am J Hypertens. 2015.

104. Rybalka E, Timpani CA, Cooke MB, Williams AD, Hayes A. Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency. PLoS ONE. 2014;9.