



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

PAULA ANDREA SAENZ SUAREZ

**“TERAPIA FARMACOLOGICA COM DEFLAZACORTE E OMEGA-3 NA
DISTROFINOPATIA DE CAMUNDONGOS *mdx* EXERCITADOS NA
ESTEIRA”**

Campinas

2019

PAULA ANDREA SAENZ SUAREZ

**“TERAPIA FARMACOLOGICA COM DEFLAZACORTE E OMEGA-3 NA
DISTROFINOPATIA DE CAMUNDONGOS *mdx* EXERCITADOS NA
ESTEIRA”**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural-
área de concentração em Anatomia.*

ESTE ARQUIVO CORRESPONDE
A VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA, **PAULA ANDREA
SAENZ SUAREZ** ORIENTADA
PELA DRA. MARIA JULIA
MARQUES.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Campinas

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sa16t Saenz-Suarez, Paula Andrea, 1993-
Terapia farmacológica com deflazacorte e omega-3 na distrofinopatia de camundongos *mdx* exercitados na esteira / Paula Andrea Saenz Suarez. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Julia Marques.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Deflazacorte. 3. Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo. 4. Exercícios físicos. 5. Ácidos graxos ômega-3. I. Marques, Maria Julia, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pharmacological therapy with deflazacort and omega-3 on dystrophinopathy in *mdx* mouse exercised at the treadmill

Palavras-chave em inglês:

Muscular dystrophy, Duchenne

Deflazacort

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

Exercise

Omega-3 fatty acids

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Julia Marques [Orientador]

Anabelle Silva Cornachione

Bruno Rodrigues

Elaine Cristina Leite Pereira

Valeria Helena Alves Cagnon Quitete

Data de defesa: 29-03-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4814-2668>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7733392755720952>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

Prof. Dr. Bruno Rodrigues

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

*Para ter sucesso, é preciso primeiro acreditar que podemos” – Nikos **Kazantzakis***

Dedico e Agradeço...

Dedico em primeiro lugar à Deus que iluminou meu caminho durante este tempo.

Aos **pacientes com DMD**, seus pais e familiares que sofrem dia a dia tentando dar a melhor qualidade de vida

Aos meus pais, **Dagoberto e Angélica**; meus avós, **Orlando e Amparo** e a minha irmã **Luísa** pelo amor incondicional e educação que me deram, pelo exemplo de força e dedicação, pela confiança e apoio em minhas decisões e propulsão em minha vida, e especialmente pela compreensão da minha ausência física.

Ao meu namorado **Kristian**, que sempre esteve presente ao meu lado, aconselhando e ajudando em tudo o que podia, além de todo o amor que tem me dado. Obrigada pelo carinho e pela alegria que a sua Vida traz a minha.

“Porque para DEUS nada é impossível”

Lucas cap. 1 vers. 37.

Com vocês aprendi que os sonhos devem ser sonhados juntos e que os obstáculos estão presentes, porém com união, fé e amor conseguimos chegar no final. Obrigada a todos por me apoiar para que mais esse sonho se tornasse realidade, vocês são minhas joias valiosas, amo-os incondicionalmente.

Agradecimento especial...

À Profa. Dra. Maria Julia Marques, por ter aberto as portas desta universidade e ter credo em mim sem me conhecer, pelo despertar de ideias novas e por todas as oportunidades de desenvolvimento pessoal e profissional, por ter proporcionado uma das melhores experiências que tive até hoje (estar em outro país); pela paciência, compreensão, confiança e aprimoramento didático-científico compartilhado.

Agradeço aos membros da banca...

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

Prof. Dr. Bruno Rodrigues

Por gentilmente aceitarem nosso convite para compor a banca deste trabalho e pelas valiosas sugestões que contribuíram para este estudo.

AGRADECIMENTOS

A Meu tio **Jimmy**, sua esposa **Clarita** e as minhas princesinhas **Sofia e Maria** por ter me dado carinho, amor e apoio nos meus sonhos. Serei sempre grata pelas situações boas e ruins em que sempre estão presentes.

Aos meus avós **Leonel e Amparo** (*in memoriam*), que me ajudam com suas orações para que tudo fique bem.

Aos meus sogros **Alberto e Bibiana** e o meu cunhado **Sebastian** por ter me apoiado em todo o processo da vinda para o Brasil, pelos momentos de descontração convividos quando estou de férias na Colômbia e por ter me adoptado como um membro mais da família.

Ao Prof. **Dr. Humberto Santo Neto** pela contribuição em minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Profa. Dra Elaine Minatel e Profa Dra. Valeria Cagnon Quitete por sempre e gentilmente abrirem as portas de seus laboratórios e por contribuírem em minha formação profissional.

Á todos os demais docentes do Departamento de Anatomia da UNICAMP pelo conhecimento compartilhado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP e seus professores, por toda a ajuda e por fornecer as condições para a realização deste trabalho.

Ao laboratório **Multiusuário do Instituto de Biologia** por ter me permitido realizar alguns dos experimentos realizados neste trabalho.

Aos professores Doutores **Silvio Roberto Consonni, Samara Carvalho e Adriana Mauricio Fogagnolo** pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Aos funcionários do departamento de Anatomia, **Sr Paulo** e o **Sr Walter** e o **Sr Roberto** pelo auxílio técnico durante os estudos, amizade, e pelos momentos de alegria e descontração.

A **Marcos Maciel Junior** por ter me acolhido quando cheguei ao laboratório, por ter dividido e compartilhado a sala de estudo proporcionando momentos de discussão. Obrigada pela amizade.

A **Adriana Mauricio Fogagnolo** por ter me ensinado com paciência o cuidado dos animais, a técnica de gavagem e todas as outras coisas que aprendi na minha chegada ao laboratório.

Aos meus amigos **Juliano Alves Pereira, Marcos Maciel Junior, Renata Acunha Moreira e Samara Carvalho**, pelos bons momentos na bancada pela amizade e pelos momentos de descontração.

A minha amiga do **Laboratório de Plasticidade Muscular, Daniela Mizobuti**, pela amizade e pelo auxílio durante os experimentos.

A meus amigos **Catharina Nucci Martins, Bruna Bighetto e Rene Juliano Martins** pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade sincera.

Aos meus amigos das disciplinas da pós-graduação, **Isabela e Bruno**, cada um de vocês contribuiu de maneira única para que o aprendizado durante as disciplinas ultrapassasse o que eu aprenderia apenas nos livros e artigos.

Aos professores e funcionários da **Universidad del Tolima** na Colômbia que acreditaram no meu potencial e incentivaram minha trajetória acadêmica

Ao **Biotério Central da UNICAMP (CEMIB)** por ter subministrado os animais para esta pesquisa.

Aos **animais** que deram suas vidas em benefício da pesquisa científica. Meu mais sincero respeito e agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) código de financiamento 01, número de processo: 1695905.

A fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (**FAPESP**) - processo:17/240514, ao fundo de apoio ao ensino, pesquisa e extensão (**FAEPEX**)- processo: 2688/18 e ao **CNPQ**, pelo apoio financeiro indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que não mencionei e que torcem não só pela minha formação acadêmica, mas também pelo sucesso e amadurecimento na trajetória de vida, deixo expresso minha sincera gratidão. Muito obrigada.

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (*DMD*) é caracterizada pela falta da distrofina. Em ausência de distrofina ocorre instabilidade do sarcolema, entrada excessiva de cálcio e mionecrose. Ciclos de regeneração-degeneração muscular favorecem a instalação de processo inflamatório. Com o tempo, a regeneração diminui e ocorre deposição de fibrose. A terapia de escolha para a *DMD* é o anti-inflamatório esteroidal, tal como o deflazacorte. Devido a seus efeitos anti-inflamatórios, o ômega-3 também melhora a distrofinopatia no camundongo *mdx*, modelo experimental da *DMD*. Devido aos efeitos colaterais dos corticoides, outras terapias são intensamente investigadas. Considerando que o exercício físico é benéfico para os músculos, prevenindo a sarcopenia no envelhecimento, no presente trabalho investigamos os efeitos do exercício sozinho ou do exercício associado ao deflazacorte e/ou ao deflazacorte + ômega-3 sobre a distrofinopatia do *mdx* idoso (14 meses de idade). Camundongos *mdx* realizaram exercício de baixa intensidade em esteira horizontal (12,4 metros por minuto, durante 15 minutos, duas vezes/semana). Foram tratados com deflazacorte (DFZ; 1,2 mg/kg; via gavagem) sozinho ou combinado com ômega-3 (300 mg/kg, via gavagem). Camundongos *mdx* sedentários e C57BL/10 receberam óleo mineral e serviram de controle. Os músculos estudados foram o diafragma, tibial anterior e bíceps braquial, por representarem o músculo mais acometido e de valor clínico (o diafragma) e músculos apendiculares (tibial e bíceps). O exercício sozinho, ou associado às terapias, melhorou o desempenho comportamental (open field), a função muscular (grip strength, retenção dos quatro membros, suspensão em fio metálico, rotarod) e parâmetros respiratórios (consumo de O₂, produção de CO₂, energia gasta, distância e tempo de exaustão) do *mdx*. Estes efeitos benéficos foram concomitantes a redução da mionecrose (redução da CK), de marcadores musculares da inflamação (NF- κ B, TNF- α e IL-6) e fibrose (TGF- β , fibronectina e MMP-9). Marcadores relacionados a regeneração (IL-10), controle do cálcio (calsequestrina- CSQ), integridade do sarcolema (β -distroglicana) e manutenção da fibra muscular (PGC-1 α) foram aumentados pelo exercício sozinho ou associado às terapias. Sugere-se que o exercício de baixa intensidade em esteira, associado ou não a terapia com corticoide e ômega-3, beneficia a distrofinopatia no *mdx* idoso, possivelmente através de mecanismos anti-inflamatórios e da ativação de vias que envolvam o PGC-1 α .

Palavras-chave: Camundongo *mdx*; Deflazacorte; Distrofia Muscular de Duchenne;; Exercício; Fibrose; Inflamação; Omega-3, PGC-1 α .

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is characterized by lack of dystrophin in the sarcolemma. In the lack of dystrophin, there is increased calcium entry and progressive muscular degeneration. Cycles of muscle degeneration-regeneration are followed by inflammatory reaction and fibrosis deposition that worsen with progression of the disease. The therapy of choice is the use of corticoids, such as deflazacort (DFZ). Due to its anti-inflammatory effect, omega-3 also ameliorates dystrophy in the mdx mice model of DMD. However, other therapies are investigated, given the side effects of corticoids. Exercise improves skeletal muscle quality and protects against sarcopenia associated to aging. Given to that, in the present study we investigated the effects of exercise in treadmill, alone or in association with DFZ and DFZ+omega-3, in aged mdx (14 months age). Mdx mice performed a low level horizontal treadmill exercise (12.4 meters per minute, for 5 minutes, twice a week). Mice were treated with DFZ (1.2 mg/kg; gavage) alone or with omega-3 (300 mg/kg; gavage). Sedentary mdx mice and C57BL / 10 received mineral oil and served as control. Exercise and exercise-associated therapies improved behavior (open field), muscular function (grip strength, four limb hanging test, hanging wire test, rotarod) and respiratory performance (O₂ consumption, CO₂ production, energy expenditure, distance and time of exhaustion). These benefits were correlated to a decrease in myonecrosis (reduction of CK), in pro-inflammatory (TNF- α , NF-k β , IL-6) and pro-fibrotic (TGF- β , fibronectin MMP-9) factors. Exercise alone and its association to therapies increased the levels of IL-10 (regeneration), calsequestrina- CSQ (calcium buffering in sarcoplasmic reticulum), b-dystroglycan (sarcolemma integrity) and PGC1- α (muscle integrity). Overall, the present study suggests that low level treadmill exercise alone or associated to corticoid/omega-3 therapy, benefits dystrophy in aged mdx, possibly due to anti-inflammatory effects and mechanisms related to PGC-1 α pathways.

Keywords: Duchenne muscular Dystrophy, Deflazacort; Exercise; Fibrosis; Inflammation; mdx mice; Omega-3; PGC1- α

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Complexo Distrofina-Glicoproteínas	23
Figura 2 –	Linha de tempo relacionando as semanas e os tratamentos realizados segundo os grupos experimentais estabelecidos.....	28
Figura 3 –	Consumo de ração e água no início (semana 0) e final (semana 9) do experimento	34
Figura 4 –	Peso corporal no início (semana 0) e Final (semana 9) do experimento	34
Figura 5 –	Atividade locomotora espontânea (OPEND FIELD).	36
Figura 6 –	Medida de Força muscular (GRIP STRENGTH).	36
Figura 7 –	Teste de retenção de quatro membros (FOUR LIMB HANGING TEST) ..	36
Figura 8 –	Teste de suspensão do fio metálico (HANGING WIRE TEST).....	36
Figura 9 –	Avaliação de locomoção forçada em cilindro giratório (ROTA ROD)	36
Figura 10 –	Teste de esforço na esteira de corrida (VO2-CO2)	36
Figura 11 –	Teste de esforço na esteira de corrida (EU-CR)	36
Figura 12 –	Teste de esforço na esteira de corrida (Distancia-Tempo)	36
Figura 13 –	Media dos níveis séricos de CK-NAC	36
Figura 14 –	Toxicidade: ALT-AST, relação peso animal/peso fígado e histologia do fígado	37
Figura 15 –	Toxicidade: Relação peso animal/peso pulmão e histologia do pulmão	37
Figura 16 –	Cortes transversais do musculo diafragma (DIA) corados com H&E e TM.....	37
Figura 17 –	Cortes transversais do musculo bíceps braquial (BB) corados com H&E e TM	37
Figura 18 –	Cortes transversais do musculo tibial anterior (TA) corados com H&E e TM.....	37
Figura 19 –	Determinação proteica dos Marcadores de inflamação no musculo DIA pela técnica de western blot	37
Figura 20 –	Determinação proteica dos Marcadores de fibrose no musculo DIA pela técnica de western blot	37
Figura 21 –	Determinação proteica dos Marcadores relacionados a integridade do CDG (β -Distroglicana) e Tamponamento do cálcio (Calsequestrina) no músculo DIA pela técnica de western blot	37

Figura 22 – Determinação proteica dos Marcadores relacionados a inflamação no músculo BB pela técnica de western blot	37
Figura 23 – Determinação proteica dos Marcadores relacionados a inflamação no músculo TA pela técnica de western blot	37
Figura 24 – Determinação proteica dos Marcadores relacionados a fibrose no músculo BB pela técnica de western blot.....	37
Figura 25 – Determinação proteica dos Marcadores relacionados a fibrose no músculo TA pela técnica de western blot.....	37
Figura 26 – Determinação proteica dos Marcadores relacionados a integridade do CDG (β -Distroglicana) e Tamponamento do cálcio (Calsequestrina) no músculo BB pela técnica de western blot	37
Figura 27 – Determinação proteica dos Marcadores relacionados a integridade do CDG (β -Distroglicana) e Tamponamento do cálcio (calsequestrina) no músculo TA pela técnica de western blot.....	37
Figura 28 – Determinação proteica dos marcadores relacionados a resposta da atividade física nos músculos DIA, BB e TA pela técnica de western blot.....	38
Figura 29 – Diagrama resumo relacionando os achados neste trabalho.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo Experimental	29
Tabela 2 – Peso dos músculos com desvio padrão	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Acido araquidônico
ALA	Ácido alpha-linolênico
ALT	Alanina Aminotransferase-Transaminase Glutâmico Pirúvica GPT
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase GOT-AST
BB	Bíceps braquial
CDG	Complexo distrofina-glicoproteína
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Creatina quinase
CK-NAC	Creatina quinase Total
cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenase
CR	Coeficiente Respiratório
CSQ	Calsequestrina
DFZ	Deflazacorte
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DIA	Diafragma
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
EPA	Ácido Eicosapentanóico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EU	Energia utilizada
EXE	Exercício
Fdt	Impulso Físico

GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenase
gr	Gramas
H&E	Hematoxilina & Eosina
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Oxido nítrico induzível
IκB	Proteína inibitória
LOX	Lipooxigenase
M1	Macrófagos 1
M2	Macrófagos 2
<i>mdx</i> – X	Chromosome-linked muscular dystrophy
MEC	Matriz extracelular
min	Minutos
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MMPs	Metaloproteinases de matriz
NC	Núcleo central
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NIH	Institutos Nacionais de Saúde
nNOS	Óxido nítrico sintase neural
NP	Núcleo periférico
O3	Omega-3
PBS	Tampão fosfato salina
PGC-1α	Coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma.
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
ROS	Radicais de oxigênio
RPM	Revoluções por minuto
SED	Sedentário
SEG	Segundos
T&M	Tricrômico de Masson
TA	Tibial Anterior
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U.V	Ultravioleta
VCO₂	Produção máxima de dióxido de carbono
VO₂	Consumo máximo de oxigênio

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Distrofia Muscular de Duchenne	21
1.2. Camundongo <i>MDX</i>	21
1.3. Degeração Muscular	22
1.4. Exercício Físico	24
1.5. PGC1- α : Coativador 1 α de Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma.....	26
1.6. Terapias Farmacológicas da DMD	26
1.6.1. Deflazacorte (DFZ).....	26
1.6.2. Omega-3 (O3).....	26
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais	27
3.2. Protocolo Experimental.....	28
3.3. Tratamento Farmacológico	28
3.3.1. Óleo mineral	28
3.3.2. Deflazacorte (DFZ).....	28
3.3.3. DFZ-O3	28
3.4. Exercício na Esteira de Corrida (adaptado do <i>DMD_M.2.1.001</i>).	29
3.5. Consumo de Ração e Água	29
3.6. Peso Corporal e Peso Músculo.....	30
3.7. Desempenho Funcional	30
3.7.1. Avaliação da atividade locomotora espontânea (<i>OPEND FIELD</i>)	31
3.7.2. Medida de Força muscular (<i>GRIP STRENGTH</i>).....	31
3.7.3. Teste de retenção de quatro membros (<i>FOUR LIMB HANGING TEST</i>).....	31
3.7.4. Teste de suspensão do fio metálico (<i>HANGING WIRE TEST</i>)	31
3.7.5. Coordenação motora e equilíbrio: avaliação de locomoção forçada em cilindro giratório (<i>ROTA ROD</i>)	31
3.7.6. Teste de esforço na esteira de corrida.....	31
3.8. Níveis Séricos de Creatina Quinase (<i>CK</i>).....	31
3.9. Toxicidade:.....	31
3.9.1. Quantificação da Alanina Aminotransferase-Transaminase Glutâmico Pirúvica GPT (ALT) e do Aspartato Aminotransferase GOT-AST.	31
3.9.2. Relação peso órgão-animal.....	32
3.10. Obtenção e Análise Morfológica dos Músculos	32

3.10.1. Análise histopatológica: Preparo dos músculos para a técnica de Hematoxilina e Eosina (<i>H&E</i>).....	32
3.10.2. Análise histopatológica: Preparo dos músculos para a técnica de Tricômico de Massom (<i>TM</i>).....	32
3.11. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DA DISTROFINOPATIA NOS MÚSCULOS DIA, BB E TA, PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.....	32
3.11.1. Preparo do extrato total.....	33
3.11.2. Quantificação das proteínas.....	33
3.11.3. Anticorpos Primários.....	33
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS.....	33
4.1. EFEITOS DOS TRATAMENTOS NO CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA.....	33
4.2. EFEITO DOS TRATAMENTOS NO PESO CORPORAL E NO PESO DOS MÚSCULOS DIAFRAGMA, BÍCEPS BRAQUIAL E TIBIAL ANTERIOR.	34
4.3. DESEMPENHO FUNCIONAL	36
4.3.1. Atividade locomotora espontânea (OPEND FIELD): Atividade Horizontal e Atividade Vertical espontânea.	36
4.3.2. Força Muscular	36
4.3.3. Coordenação motora e equilíbrio: locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod). 36	
4.3.4. Teste de esforço na esteira de corrida.....	36
4.4. NÍVEIS SÉRICOS DE CREATINA QUINASE (CK).....	36
4.5. TOXICIDADE.....	37
4.5.1. Quantificação da alanina aminotransferase-Transaminase Glutâmico Pirúvica GPT (ALT), Aspartato aminotransferase GOT-AST. Relação peso fígado/ peso animal. Histologia qualitativa do fígado.	37
4.5.2. Relação peso animal/ peso pulmão e Histologia qualitativa do pulmão.	37
4.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA.	37
4.6.1. Análise histopatológica dos músculos DIA, BB e TA.	37
4.7. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DA DISTROFINOPATIA NO MÚSCULO DIA.....	37
4.7.1. Inflamação	37
4.7.2. Fibrose	37
4.7.3. Integridade do CDG: β -Distroglicana. Tamponamento do cálcio: Calsequestrina-CSQ.	37
4.8. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DA DISTROFINOPATIA NOS MÚSCULOS BB E TA.....	37
4.8.1. Inflamação	37

4.8.2. Fibrose	37
4.8.3. Integridade do CDG: β -Distroglicana e Tamponamento do cálcio: Calsequestrina.	37
4.9. MARCADOR DE RESPOSTA A ATIVIDADE FÍSICA (PGC-1 α) NOS MÚSCULOS DIA, BB E TA.	38
5. DISCUSSÃO.....	40
5.1. Efeitos do exercício físico associado ou não as terapias	40
5.1.1. Intensidade do exercício associado ou não as terapias e seus efeitos na qualidade de vida do <i>mdx</i>	40
5.1.2. Efeito do exercício físico associado ou não as terapias no comportamento: open field.....	41
5.1.3. Efeitos do exercício físico associado ou não as terapias na função muscular.....	41
5.1.4. Efeitos do exercício associado ou não as terapias nos parâmetros respiratórios e no desempenho de corrida em esteira	41
5.1.5. Efeito do exercício físico associado ou não as terapias nos níveis de CK.....	41
5.1.6. Efeito do exercício físico associado ou não as terapias em marcadores da inflamação e fibrose	41
5.1.7. Efeitos do exercício associado ou não as terapias na β -Distroglicana e calsequestrina	41
5.1.8. Efeitos do exercício associado ou não as terapias no PGC-1 α	41
5.2. Efeito das terapias com deflazacorte e ômega-3 associados ao exercício: considerações gerais.....	41
6. CONCLUSÕES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
ANEXO A.....	70
ANEXO B.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular causada pela mutação do gene que codifica a distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X (Hoffman, Brown, & Kunkel, 1987; Koenig et al., 1987; K. Matsumura, Ervasti, Ohlendieck, Kahl, & Campbell, 1992). Dentre as miopatias infantis, a DMD é a mais comum e devastadora com uma incidência mundial de um em cada 5000 meninos nascidos vivos (Bushby et al., 2010a; Emery, 2002; Mendell & Lloyd-Puryear, 2013).

Os primeiros sinais clínicos da DMD são observados geralmente entre os 2 e 5 anos de idade, onde os pacientes mostram comprometimento das atividades motoras (McGreevy, Hakim, McIntosh, & Duan, 2015). A rápida progressão da doença leva a perda da deambulação e dependência de cadeira de rodas aproximadamente na primeira década de vida. Observa-se ainda diminuição da função pulmonar devida a degeneração do diafragma e cardiomiopatia (Judge, Kass, Thompson, & Wagner, 2011; Lanza et al., 2001). Embora a utilização de aparelhos ventilatórios prolongue e melhore a qualidade de vida do paciente, o óbito frequentemente ocorre por volta da segunda ou terceira décadas de vida em decorrência da insuficiência cardiorrespiratória (Finsterer & Stöllberger, 2003; McNally et al., 2015). Não obstante os avanços nos estudos sobre a DMD, ainda não foi descrita uma terapia que possa efetivamente deter a degeneração muscular nesses pacientes (Kapsa, Kornberg, & Byrne, 2003).

1.2. CAMUNDONGO *MDX*

Os camundongos *mdx* (*x chromosome-linked muscular dystrophy*) foram inicialmente identificados na colônia *C57BL10/ScSn* por apresentarem níveis elevados de creatina quinase (CK) (Bulfield, Siller, Wight, & Moore, 1984). Estudos posteriores revelaram que o camundongo *mdx* apresenta mutação espontânea no cromossomo X que leva à ausência da distrofina (Hoffman et al., 1987). Ao contrário da miopatia humana, no início da doença os camundongos *mdx* apresentam regeneração muscular capaz de compensar os ciclos de degeneração (Torres & Duchon, 1987). Com a evolução da doença diminui a capacidade regenerativa e, ao redor dos dois anos de idade o *mdx* apresenta patologia semelhante aos humanos distróficos, com predominância da degeneração muscular, deposição de tecido fibroso e adiposo e diminuição da sobrevida (De Oliveira Moreira et al., 2013; Lefaucheur, Pastoret, & Sebillé, 1995). O músculo diafragma (DIA) é o mais afetado, sendo acometido progressivamente pela degeneração, inflamação e presença de fibrose, mimetizando a patologia

observada no humano (Grady et al., 1997; Stedman et al., 1991).

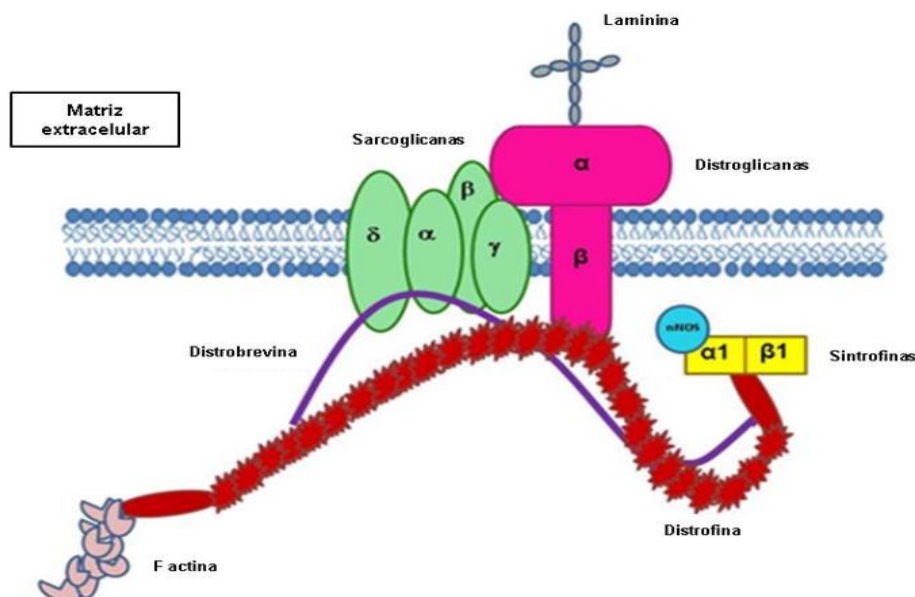
Embora existam diferenças entre a fisiopatologia e quadro clínico da distrofia entre humanos e camundongos *mdx*, os camundongos são excelente modelo para a investigação dos mecanismos da mionecrose e regeneração na DMD (Marques, Oggiam, Barbin, Ferretti, & Santo Neto, 2009; Seixas, Lagrota-Candido, Savino, & Quirico-Santos, 1997). Os camundongos *mdx* são amplamente utilizados devido ao seu baixo custo de produção e manutenção, em comparação com outros modelos experimentais (Seixas, Lagrota-Candido, Savino, & Quirico-Santos, 1997). Os camundongos *mdx* são o modelo animal preferido para estudos dos mecanismos e testes pré-clínicos relacionados à DMD (Grounds, Radley, Lynch, Nagaraju, & De Luca, 2008; Sasaoka et al., 2003).

1.3. DEGENERAÇÃO MUSCULAR

A distrofina, proteína de 427 KDa, desempenha papel essencial no complexo oligomérico distrofina-glicoproteínas (CDG) (Figura 1), que conecta o citoesqueleto da fibra muscular à matriz extracelular circundante, através do sarcolema (Deconinck & Dan, 2007; Hoffman et al., 1987). Em ausência da distrofina ocorre desorganização das proteínas associadas ao complexo distrofina glicoproteína (CDG), causando microrupturas da membrana celular durante o estresse mecânico proveniente dos ciclos de contração e relaxamento muscular (Grounds, Sorokin, & White, 2005). A ausência de distrofina causa fragilidade da membrana e o aumento do Ca^{+} que levam ao enfraquecimento das células do sarcolema e aumento de Ca^{+} basal nas células levando à sinalização celular inapropriada (Tidball & Villalta, 2010).

A diminuição da expressão das proteínas do CDG, alterações no funcionamento dos canais de cálcio, associados a inflamação, aumento de radicais livres e de enzimas citotóxicas (fosfolipases A2), levam a instalação da mionecrose (Allen & Whitehead, 2011; Tidball & Wehling-Henricks, 2007).

Figura 1 – Complexo Distrofina-Glicoproteínas



Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema, incluindo os componentes integrais do complexo (distrofina, complexo distroglicano, complexo sarcoglicano, distrobrevina e sintrofinas), a ligação com a matriz extracelular (laminina), parte da ligação intracelular (F-actina) e molécula de sinalização ligada ao complexo (óxido nítrico sintase neuronal – nNOS). *Laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular, 2012.*

Os ciclos de degeneração promovem aumento das células inflamatórias tais como macrófagos, neutrófilos e células T nos sítios mionecróticos, que visam a retirada dos restos de fibras necróticas. As células inflamatórias contribuem para o avanço da doença (Abdel-Salam, Abdel-Meguid, & Korraa, 2009), com ciclos de degeneração e regeneração muscular. (Gumerson & Michele, 2011; Whitehead, Yeung, & Allen, 2006). Acredita-se que a intensidade desses processos nos músculos dos pacientes com *DMD* esteja diretamente relacionada à liberação de diversos mediadores químicos, tais como o TGF- β e a fibronectina envolvidos no processo de fibrose, o fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (Argiles et al., 2000), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) (Smith, Cadet, Stefano, Opp, & Hughes, 1999), metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), regulados pelo fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) (Hollinger & Selsby, 2013) envolvido na resposta inflamatória (Pedersen & Febbraio, 2008).

O NF- $\kappa\beta$ é um dos principais fatores de transcrição encarregados de regular as vias inflamatórias sendo ativado nos músculos distróficos, possivelmente após o influxo de cálcio e ou produção das espécies reativas de oxigênio (Whitehead, Pham, Gervasio, & Allen, 2008). Mostra-se como um alvo importante na terapia antiinflamatória, tal como observado no ensaio

clínico realizado como o CAT-1004 um inibidor deste fator (<https://ClinicalTrials.gov/ct2/show/VBP15>). A liberação de TNF- α facilita o influxo de neutrófilos para o local onde ocorreu o dano muscular, sendo responsável pela indução da fagocitose dos tecidos danificados (Calle & Fernandez, 2010), levando a inibição da miogênese e apoptose de mioblastos e miotubos (Magee, Pearson, & Allen, 2008).

As células inflamatórias amplificam os danos ao músculo, produzindo lesões nas membranas das células que podem levar à necrose das fibras musculares, principalmente atribuíveis às ações dos radicais livres gerados pelo óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (S. A. Villalta, Nguyen, Deng, Gotoh, & Tidball, 2009). A medida que a doença progride, o potencial regenerativo dos músculos distróficos diminui já que as células passam por uma necrose completa e o reparo das miofibras torna-se direcionado para serem substituídas por fibroblastos e miofibroblastos os quais produzem matriz extracelular e tecido cicatrizal que se torna permanente e passa a ser denominado fibrose e infiltração de gordura (Serrano et al., 2011). No entanto, em situações de maior atividade o muscular (como no exercício) ou perante lesão muscular aguda, o número de macrófagos M1, que promovem a degeneração, diminui enquanto o número de macrófagos M2, que promovem a regeneração, aumenta e permanece elevado na reparação muscular, regeneração e crescimento muscular (St Pierre & Tidball, 1994).

1.4. EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico é capaz de induzir alterações moleculares no músculo esquelético, incluindo mudança dos tipos de fibras, aumentando a biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa (Egan & Zierath, 2013) e auxilia na regulação dos níveis de insulina (Schnyder & Handschin, 2015). As características do tipo de fibra são importantes devido a sua plasticidade e podem mudar dependendo do exercício, e em menor escala, idade, sexo e diferenças nutricionais (Ferraro, Giammarioli, Chiandotto, Spoletini, & Rosano, 2014). O exercício diminui a degeneração relacionada à idade, em diferentes órgãos (Safdar et al., 2011) e foi demonstrado que o exercício melhorou o grau de estresse oxidativo em músculos esqueléticos normais (Abruzzo et al., 2013).

O envelhecimento é acompanhado por sarcopenia, com aumento da inflamação e de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e TNF- α (Franceschi, 2007). O coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α) é um importante regulador da homeostase energética da célula (Lin, Handschin, & Spiegelman, 2005) e é um coativador transcripcional de receptores nucleares e de outros fatores de transcrição, que regula

a função mitocondrial em vários tecidos, incluindo coração, cérebro, fígado e músculo esquelético (Handschin et al., 2007). Sua atividade parece diminuir com a idade, o que parece contribuir para a sarcopenia (Finley et al., 2012).

O PGC-1 α é considerado um regulador das adaptações induzidas pelo exercício no músculo esquelético (Baar et al., 2002), sendo expresso em altos níveis em fibras musculares oxidativas de tipo I e II, que ocorrem no músculo sóleo, por exemplo (Lin et al., 2002). A expressão aumentada do PGC-1 α no músculo esquelético aumenta a resistência à insulina em resposta a uma dieta rica em gordura, provavelmente aumentando o influxo de ácidos graxos em excesso (Finley et al., 2012).

O exercício é muito utilizado em testes pré-clínicos de novos fármacos (A. De Luca et al., 2008; Grounds et al., 2008; Willmann et al., 2012) permitindo que intervenções terapêuticas potenciais sejam avaliadas de forma mais rigorosa ao longo do tratamento *in vivo* (Payne et al., 2006; Radley, De Luca, Lynch, & Grounds, 2007). As respostas específicas do tipo de músculo ocorrem durante o exercício de resistência e PGC-1 α induzida pelo exercício é observada exclusivamente no músculo esquelético (Terada, Kawanaka, Goto, Shimokawa, & Tabata, 2005).

Para as distrofias musculares, há uma dúvida considerável na hora de prescrever o exercício como uma terapia, já que existe a preocupação do efeito negativo que o exercício possa ter. Estudos clínicos não relatam consequências prejudiciais, alguns deles mostrando ganhos de força no decorrer do estudo de um ano (de Lateur & Giacon, 1979; Scott, Hyde, Goddard, Jones, & Dubowitz, 1981). Entretanto a atividade excessiva pode induzir danos musculares e aumentar a patologia em camundongos *mdx* (A. De Luca et al., 2003; Okano et al., 2005).

O exercício de baixa intensidade ou o exercício voluntário podem melhorar a patologia muscular, sendo observados efeitos benéficos como o aumento na força muscular (Carter et al., 1995; Hayes & Williams, 1998) e diferenças no tamanho da fibra muscular (Landisch, Kosir, Nelson, Baltgalvis, & Lowe, 2008).

1.5. PGC1- α : COATIVADOR 1 A DE RECEPTOR GAMA ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PERIOXISSOMA

O PGC-1 α parece ter efeitos anti-atróficos, tal como observado após lesão do nervo ciático, quando os níveis da proteína musculares são mantidos transgenicamente, causando menor perda muscular e mantendo o volume da fibra muscular (Sandri et al., 2006).

Na distrofia muscular, vários programas genéticos ligados à expressão e a função do PGC-1 α estão alterados. No camundongo *mdx*, a redução da capacidade da fosforilação oxidativa mitocondrial (Kuznetsov et al., 1998), elevação de radicais de oxigênio (ROS), anomalias na sinalização de cálcio (Chakkalakal, Michel, Chin, Michel, & Jasmin, 2006) e alteração na morfologia da junção neuromuscular (Lyons & Slater, 1991) podem potencialmente sofrer controle do PGC-1 α . A regulação positiva do PGC-1 α protege o músculo distrófico ao aumentar os níveis de utrofina, bem como o aumento da resistência à fadiga e uma mudança no músculo para um fenótipo mais oxidativo e mais lento (Hollinger & Selsby, 2015), demonstrando que a expressão da utrofina melhora o dano muscular nos animais *mdx* (Tinsley et al., 1998). Resultados demonstram que a elevação dos níveis da PGC-1 α no músculo esquelético tem efeito benéfico sobre a distrofia muscular em camundongos *mdx*, levando a diminuição da necrose e dos níveis séricos de creatina quinase (Handschin et al., 2007).

1.6. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS DA DMD

1.6.1. Deflazacorte (DFZ)

1.6.2. Omega-3 (O3)

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do exercício físico em esteira de corrida associado ou não a terapias farmacológicas sobre a distrofinopatia do camundongo *mdx* idoso.

- Avaliar os efeitos do exercício físico em esteira de corrida sobre a distrofinopatia do camundongo *mdx* idoso.
- Analisar se a terapia farmacológica com o corticoide deflazacorte, combinado ou não com o suplemento nutricional ômega-3, interfere nos efeitos do exercício físico, no camundongo *mdx* idoso.

- Verificar o efeito do exercício e das terapias farmacológicas deflazacorte isolado e associado ao suplemento alimentício com ômega-3 em animais *mdx* idosos exercitados em esteira de corrida, sobre a expressão da PGC1- α , molécula possivelmente relacionada a inflamação-mionecrose e fibrose, em músculos esqueléticos de animais como o diafragma, tibial anterior e bíceps braquial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/10ScCr/PasUnib e C57BL/10Dmdmdx/PasUnib de ambos sexos na fase tardia da doença (12 meses de idade). Os animais foram adquiridos do Biotério Central da UNICAMP e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Bloco-O, prédio da Anatomia- IB, UNICAMP em caixas padrão em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração Nuvilab CR-1 (Nuvital, Paraná, Brasil) e água ad libitum. Protocolo CEUA 4634-1.2017.

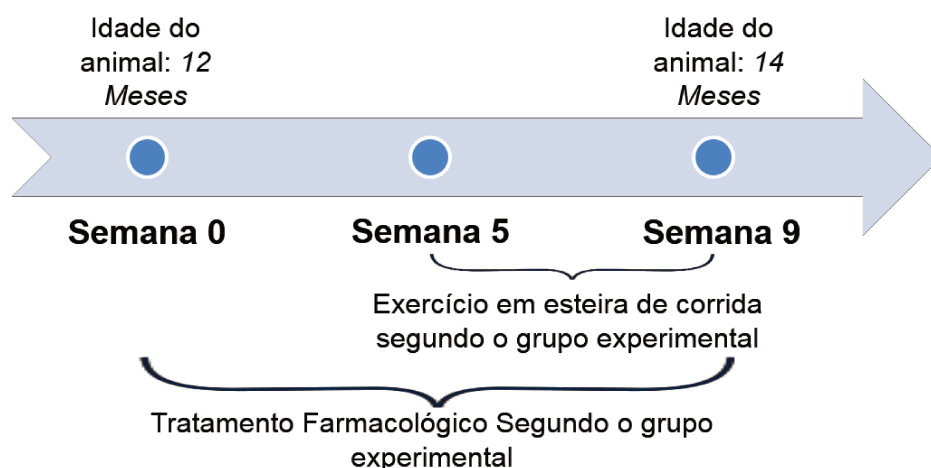
3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente e de forma uniforme entre fêmeas e machos nos seguintes grupos experimentais:

Sedentário (Sed): Camundongos controle (Sed-C57BL/10; $n=10$) e distróficos (Sed-*mdx*; $n=10$) que não fizeram exercício em esteira e foram tratados com nujol ($n=10$).

Exercitado (Exe): Camundongos *mdx* (Exe-**mdx**) submetidos a exercício na esteira de corrida e tratados com nujol ($n=10$); **Exer-*mdx* DFZ:** Camundongos *mdx* submetidos a exercício na esteira de corrida tratados com deflazacorte (DFZ; $n=10$); **Exer-*mdx* DFZ-O3:** Camundongos *mdx* submetidos a exercício na esteira de corrida tratados com deflazacorte e ômega-3 (DFZ-O3; $n=10$) (Figura 2 e Tabela 1).

Figura 2 – Linha de tempo relacionando as semanas e os tratamentos realizados segundo os grupos experimentais estabelecidos



3.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.

Os camundongos da linhagem *mdx* foram tratados via gavagem três vezes por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira), às 10 hrs, durante 9 semanas de acordo com o grupo experimental correspondente (Tabela 1).

3.3.1. Óleo mineral

3.3.2. Deflazacorte (DFZ)

3.3.3. DFZ-O3

3.4. EXERCÍCIO NA ESTEIRA DE CORRIDA (adaptado do *DMD_M.2.1.001*).

Os camundongos da linhagem *mdx* do grupo exercitados foram submetidos a exercício em esteira duas vezes por semana (terça-feira e quinta-feira, no período da manhã (10 hrs), durante quatro semanas. Uma semana antes do início do tratamento farmacológico, os animais foram submetidos à aclimação, realizando corrida na esteira a uma velocidade de 10,68 metros por minuto, sem inclinação, durante 5 minutos, duas vezes na semana (terça-feira e quinta-feira). Após a aclimação os animais correram durante 4 semanas na velocidade de 12,42 metros por minuto, sem inclinação, durante 15 minutos (A. De Luca et al., 2003; Radley-Crabb et al., 2012).

Tabela 1 – Protocolo Experimental

Controle Sed- C57BL/10 N=10	<i>mdx</i> Sed N=10	<i>mdx</i> Exer N=10	<i>mdx</i> Exer+DFZ N=10	<i>mdx</i> Exer+DFZ-O3 N=10
Sedentário	Sedentário	EXERCÍCIO: adaptado do <i>DMD_M.2.1.001</i> Corrida na esteira horizontal (12.4 mts/min, 15 min)		
Tratados com nujol	Tratados com nujol	Tratados com nujol	Tratados com DFZ (1.2 mg/kg)	Tratados com DFZ (1.2 mg/kg) e Omega-3: EPA and DHA (300 mg/kg)

3.5. CONSUMO DE RAÇÃO E AGUA

Para todos os grupos analisados foi realizada a medida de 10 animais para cada grupo do consumo médio de alimentos e água/camundongo/Semana nos seguintes momentos: semana 0 (antes de iniciar os tratamentos propostos) e na semana 9 (após finalizar os tratamentos propostos). Para este fim foi feito o controle de quantidade de ração e água de uma semana para outra, utilizando balança digital (Marte balanças e equipamentos®) e proveta,

respectivamente.

3.6. PESO CORPORAL E PESO MÚSCULO

Para 8 animais de cada grupo foi realizada a medida da massa corporal uma vez por semana, para controle na sua variação e ajuste da dose da droga a ser administrada. Com relação ao peso do músculo, imediatamente após a eutanásia dos animais (N=10 por grupo) os músculos diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) foram pesados em uma balança eletrônica de precisão (modelo EK-2000G – AND). O peso relativo dos órgãos foi calculado de um N=10 animais por grupo, sendo a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal, sendo calculado o arco-seno da razão peso corporal / peso musculo e extraída a média $\pm$ desvio padrão da média desses dados. Assim, esta avaliação comparativa entre os animais submetidos ao tratamento em relação ao grupo controle poderá indicar ou não alguma alteração (Kyselova, Peknicova, Buckiova, & Boubelik, 2003). O peso relativo dos órgãos foi calculado como a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal.

3.7. DESEMPENHO FUNCIONAL

Foram realizados testes funcionais para avaliação de diferentes grupos musculares e de coordenação motora. Foram coletados dados em três momentos do experimento: Semana 0: (antes de começar o tratamento farmacológico); Semana 5: (antes de começar o exercício em esteira de corrida) e Semana 9: (após o término dos tratamentos propostos). A Figura 2 apresenta uma linha do tempo indicando os momentos em que foram realizados a terapia e o exercício em esteira.

A maioria dos protocolos foi padronizada tendo como base as diretrizes contidas no TREAT-NMD (<http://www.treat-md.edu/activities/treatment/html>), rede acadêmica global voltada para o avanço das pesquisas sobre doenças neuromusculares (Leary, Oyewole, Bushby, & Aartsma-Rus, 2017). Desde o seu lançamento em janeiro de 2007, o foco desta rede tem sido o desenvolvimento de ferramentas que possam ser utilizadas por médicos e cientistas em testes pré-clínicos e clínicos, utilizando parâmetros e procedimentos padronizados, permitindo assim comparar resultados de todos os laboratórios envolvidos, no mundo todo. Atualmente, a rede possui mais de cem centros de pesquisa e organizações de pacientes de 54 países "*TREAT-NMD Alliance Members – Organizations*" bem como centros acadêmicos independentes e representantes de pacientes (TREAT-NMD Alliance Members – Individuals).

3.7.1. Avaliação da atividade locomotora espontânea (*OPEND FIELD*)

3.7.2. Medida de Força muscular (*GRIP STRENGTH*)

3.7.3. Teste de retenção de quatro membros (*FOUR LIMB HANGING TEST*)

3.7.4. Teste de suspensão do fio metálico (*HANGING WIRE TEST*)

3.7.5. Coordenação motora e equilíbrio: avaliação de locomoção forçada em cilindro giratório (*ROTA ROD*)

3.7.6. Teste de esforço na esteira de corrida

3.8. NÍVEIS SÉRICOS DE CREATINA QUINASE (*CK*)

A CK no plasma sanguíneo é um indicador de necrose muscular (Ozawa, Hagiwara, & Yoshida, 1999). Os níveis séricos de CK podem ser influenciados por múltiplos fatores, incluindo o exercício, idade e sexo (Annamaria De Luca et al., 2005; Grounds, Sorokin, & White, 2005; Spurney et al., 2009). O sangue de 10 animais por grupo foi coletado sob anestesia com Cloridrato de Ketamina 10%: 100-200mg/kg e Cloridrato de Xilazina 2%: 5-16mg/kg. Após a toracotomia e exposição do coração, uma seringa heparinizada foi utilizada para retirada do sangue do ventrículo direito do animal. O sangue foi centrifugado (centrifuga refrigerada Sigma 3-18k) nas seguintes condições: 3000 g, 4°C por 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para análise. Foram utilizados o kit CK-NAC Bioiquid (LB- LABORCLIN). As absorbâncias das amostras foram lidas a 37°C utilizando-se espectrofotômetro U.V (Thermo Electron Corporation Spectrophotometer Genesys 20) com comprimento de onda de 340nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L (Fogagnolo Mauricio et al., 2013).

3.9. TOXICIDADE:

3.9.1. Quantificação da Alanina Aminotransferase-Transaminase Glutâmico Pirúvica GPT (ALT) e do Aspartato Aminotransferase GOT-AST.

3.9.2. Relação peso órgão-animal

3.10. OBTENÇÃO E ANÁLISE MORFOLOGICA DOS MÚSCULOS

Após a coleta de sangue para quantificação de CK plasmático foi realizada perfusão cardíaca com injeção de 10 ml de PBS no ventrículo esquerdo, obedecendo-se o trajeto da circulação sistêmica. Uma incisão foi realizada no átrio direito para saída do sangue remanescente na circulação. Em seguida, os músculos diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) foram dissecados, retirados e fixados em suportes de madeira com uma cola resultante da mistura de Tissue-Tek com Tragacanth e imersos em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C. Os suportes com os músculos foram retirados do nitrogênio e armazenados à -80°C em Biofreezer. Para obtenção dos cortes histológicos, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -26°C e seccionados transversalmente na espessura de 8 µm utilizando criostato (Leica CM1860). Foram utilizados 4 animais por grupos dos quais se analisaram aleatoriamente entre 10 e 12 cortes por músculo para cada uma das colorações (Fogagnolo Mauricio et al., 2013).

3.10.1. Análise histopatológica: Preparo dos músculos para a técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E)

3.10.2. Análise histopatológica: Preparo dos músculos para a técnica de Tricomico de Massom (TM)

3.11. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DA DISTROFINOPATIA NOS MÚSCULOS DIA, BB E TA, PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.

Verificamos a inflamação a partir da quantificação dos níveis do fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-10 (IL-10), mionecrose; fibrose: Fator de transformação do crescimento β (TGF- β), Fibronectina, metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9); integridade do CDG (β -Distroglicana); tamponamento do cálcio (Calsequestrina - CSQ) e ao exercício físico, o coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α) nos músculos Diafragma, bíceps braquial e tibial anterior. Os valores foram normalizados com a proteína gliceraldeído 3-fosfato

dehidrogenase (GAPDH). Para isso, foram utilizados 6 animais para cada grupo experimental sendo assim feita análise individualmente com 3 repetições para cada.

3.11.1. Preparo do extrato total

3.11.2. Quantificação das proteínas

3.11.3. Anticorpos Primários

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Quando necessária comparação direta entre as médias de dois grupos experimentais foi realizado o teste t de *Student*. Para a comparação entre três ou mais grupos foi realizada análise de variância ANOVA de uma via seguido pelo pos-teste de Tukey's múltipla comparação e para comparação entre três ou mais grupos com mais de uma variável foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo pos-teste de Bomferroni. Em todas as análises, os valores de P foram considerados estatisticamente significativos apenas quando iguais ou inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Para todos os cálculos estatísticos foi utilizado o software Graph Pad Prism versão 6.01 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

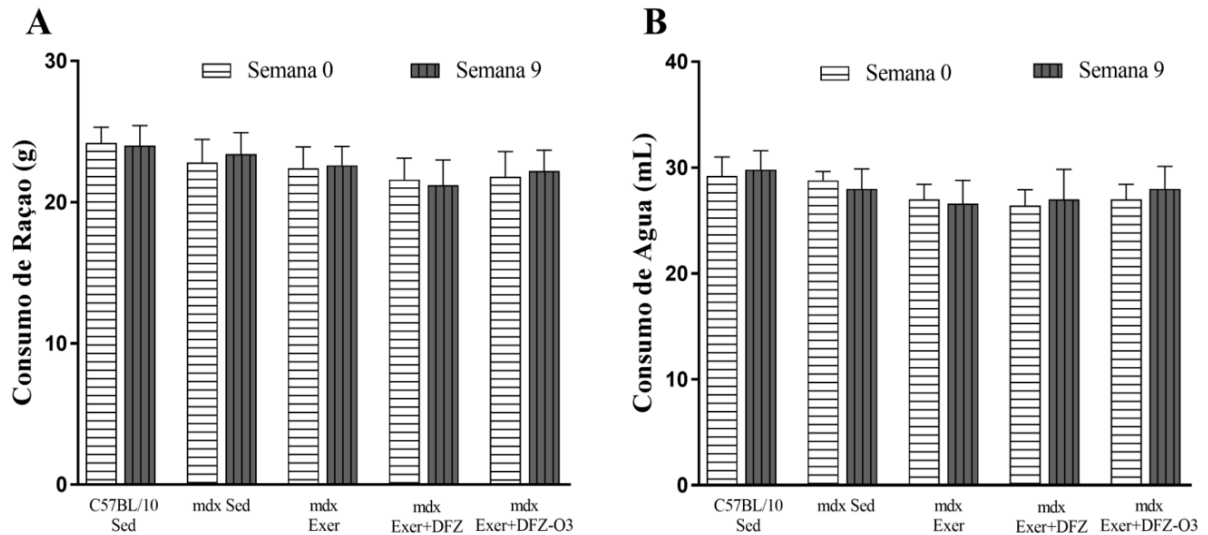
4. RESULTADOS

4.1.EFEITOS DOS TRATAMENTOS NO CONSUMO DE RAÇÃO E AGUA

O consumo de ração e água dos animais *mdx* de todos os grupos (Sedentário, Exercitado, Exer+ DFZ e Exer+DFZ-O3) não apresentou diferença significativa com relação

ao observado em animais C57BL/10 (Sed), bem como quando comparado o consumo das semanas 0 e 9 (Figura 3).

Figura 3 – Consumo de ração e água no início (semana 0) e final (semana 9) do experimento

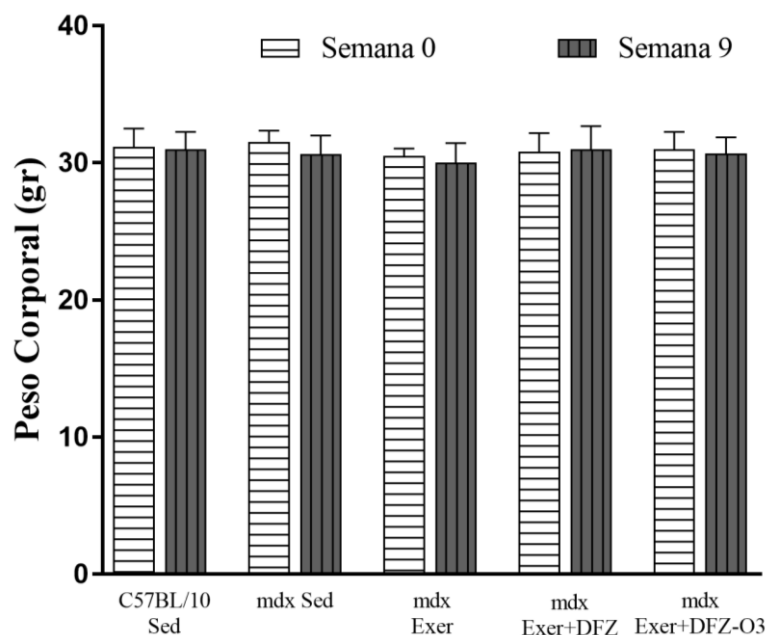


Consumo de ração (A) e água (B), no início (semana 0) e ao final (semana 9) do experimento. Animais controle (C57BL/10 sed) e distróficos (*mdx*) sedentários (Sed), distróficos exercitados (*mdx* Exer), animais *mdx* Exer que receberam deflazacorte (+DFZ) e *mdx* Exer que receberam DFZ + ômega-3 (+DFZ-O3). Valores representados como média $\pm$ desvio padrão. N=10 animais por grupo. A significância estatística foi determinada pelos seguintes testes: Teste *t Student*, para comparações entre semana 0 e semana 9 de cada grupo. ANOVA de 1 via seguido pelo pos-test de Tukey's ($p \leq 0,05$), para comparações entre as semanas.

4.2.EFEITO DOS TRATAMENTOS NO PESO CORPORAL E NO PESO DOS MÚSCULOS DIAFRAGMA, BÍCEPS BRAQUIAL E TIBIAL ANTERIOR.

O peso corporal (Figura 4) e o peso dos músculos analisados DIA, BB e TA (Tabela 1) dos animais *mdx* de todos os grupos (Sedentário, Exercitado, Exer+ DFZ e Exer+DFZ-O3) foram semelhantes as obtidas nos animais C57BL/10 (Sed). Não foi observada diferença significativa entre o peso corporal no início e no final do tratamento para cada um dos grupos analisados. O peso do diafragma dos animais DFZ exercitados diminuiu significativamente em 18% quando comparado ao dos animais *mdx* Sedentário (Tabela 2).

Figura 4 – Peso corporal no início (semana 0) e Final (semana 9) do experimento



Animais controles C57BL10 (sed) e distróficos: (*mdx*) sedentários (Sed), distróficos exercitados (*mdx* Exer), animais *mdx* Exer que receberam deflazacorte (+DFZ) e *mdx* Exer que receberam DFZ + ômega-3 (+DFZ-O3). Valores representados como Média $\pm$ Desvio padrão. N=10 animais por grupo. A significância estatística foi determinada pelos seguintes testes: Teste *t Student*, para comparações entre semana 0 e semana 9 de cada grupo. ANOVA de 1 via seguido pelo pos-test de Tukey's ($p \leq 0,05$), para comparações entre as semanas. Os tratamentos não interferiram na massa corporal dos animais.

Tabela 2 – Peso dos músculos com desvio padrão

GRUPO	DIA	BB	TA
C57BL/10 Sed	2.94 $\pm$ 0.39	2.48 $\pm$ 0.33	3.31 $\pm$ 0.28
<i>mdx</i> Sed	3.18 $\pm$ 0.35	2.20 $\pm$ 0.27	3.62 $\pm$ 0.25
<i>mdx</i> Exer	2.87 $\pm$ 0.16	2.27 $\pm$ 0.31	3.43 $\pm$ 0.32
<i>mdx</i> Exer+DFZ	2.58 $\pm$ 0.25 b ^{p 0,0081}	2.40 $\pm$ 0.18	3.42 $\pm$ 0.20
<i>mdx</i> Exer+DFZ-O3	2.77 $\pm$ 0.13	2.44 $\pm$ 0.14	4.54 $\pm$ 0.18

Peso dos músculos dos animais Controles C57BL/10 (sed) e *mdx* de todos os grupos (Sedentário, Exercitado, Exer+ DFZ e Exer+DFZ-O3). Valores representados como Média $\pm$ Desvio padrão. N=10 por grupo; (b) diferença em relação ao *mdx* sed ($p \leq 0.05$, ANOVA; Tukey).

4.3.DESEMPENHO FUNCIONAL

4.3.1. Atividade locomotora espontânea (OPEND FIELD): Atividade Horizontal e Atividade Vertical espontânea.

4.3.2. Força Muscular

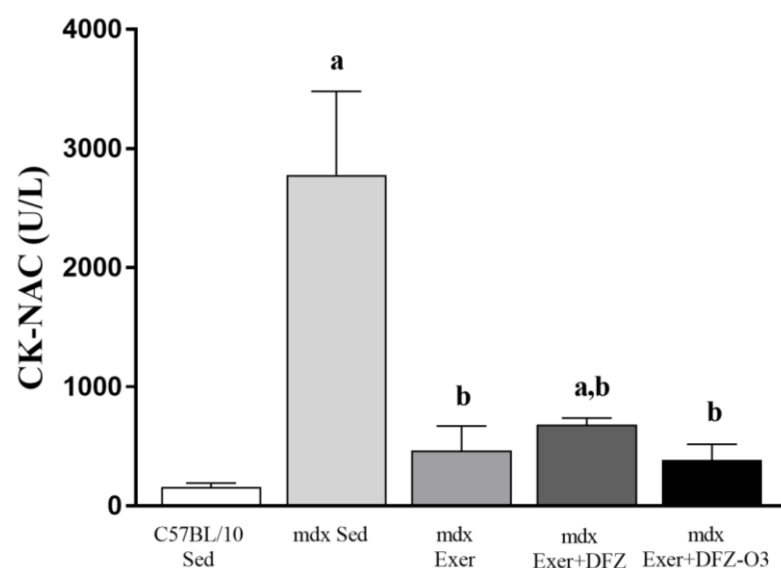
4.3.3. Coordenação motora e equilíbrio: locomoção forçada em cilindro giratório (rota rod).

4.3.4. Teste de esforço na esteira de corrida

4.4.NÍVEIS SÉRICOS DE CREATINA QUINASE (CK)

Os animais distróficos (*mdx* sed) apresentaram níveis elevados de CK (16,5 vezes) quando comparados aos animais controle (C57BL/10 sed). O exercício sozinho, ou combinado as terapias, promoveu diminuição significativa da CK, não havendo diferenças entre os tratamentos (exercício sozinho: 83% de redução; +DFZ: 75% de redução; +DFZ+O3: 86% de redução da CK) quando comparados aos animais distróficos (*mdx* sed). Os valores de CK nos animais *mdx* exercitados e DFZ+O3 exercitados foram similares aos obtidos nos animais controles (C57BL/10 sed; Figura 13).

Figura 13 – Media dos níveis séricos de CK-NAC



Quantificação dos níveis de CK-total, obtidos após os tratamentos propostos para cada um dos grupos experimentais. Animais controles C57BL10 (sed) e distróficos: (*mdx*) sedentários (Sed), distróficos exercitados (*mdx* Exer), animais *mdx* Exer que receberam deflazacorte (+DFZ) e

mdx Exer que receberam DFZ + ômega-3 (+DFZ-O3). Dados representados em média $\pm$ desvio padrão, N=10 animais por grupo. A significância estatística foi determinada pelo seguinte teste: ANOVA de 1 via seguido pelo pos-test de Tukey's ($p \leq 0,05$), para comparações múltiplas entre os grupos. Comparado com C57BL/10 (sed) **(a)**, comparado com *mdx* (sed) **(b)**.

- VS C57BL/10 (sed) **(a)**: *mdx* (sed) $p < 0,0001$. Exceto *mdx* Exer+DFZ $p = 0,0274$.
- VS *mdx* (sed) **(b)**: $p < 0,0001$.

4.5.TOXICIDADE

4.5.1. Quantificação da alanina aminotransferase-Transaminase Glutâmico Pirúvica GPT (ALT), Aspartato aminotransferase GOT-AST. Relação peso fígado/ peso animal. Histologia qualitativa do fígado.

4.5.2. Relação peso animal/ peso pulmão e Histologia qualitativa do pulmão.

4.6.ANÁLISE MORFOLÓGICA.

4.6.1. Análise histopatológica dos músculos DIA, BB e TA.

4.7. ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES DA DISTROFINOPATIA NO MÚSCULO DIA.

4.7.1. Inflamação

4.7.2. Fibrose

4.7.3. Integridade do CDG: β -Distroglicana. Tamponamento do cálcio: Calsequestrina-CSQ.

4.8. ANALISE DE MARCADORES MOLECULARES DA DISTROFINOPATIA NOS MÚSCULOS BB E TA.

4.8.1. Inflamação

4.8.2. Fibrose

4.8.3. Integridade do CDG: β -Distroglicana e Tamponamento do cálcio: Calsequestrina.

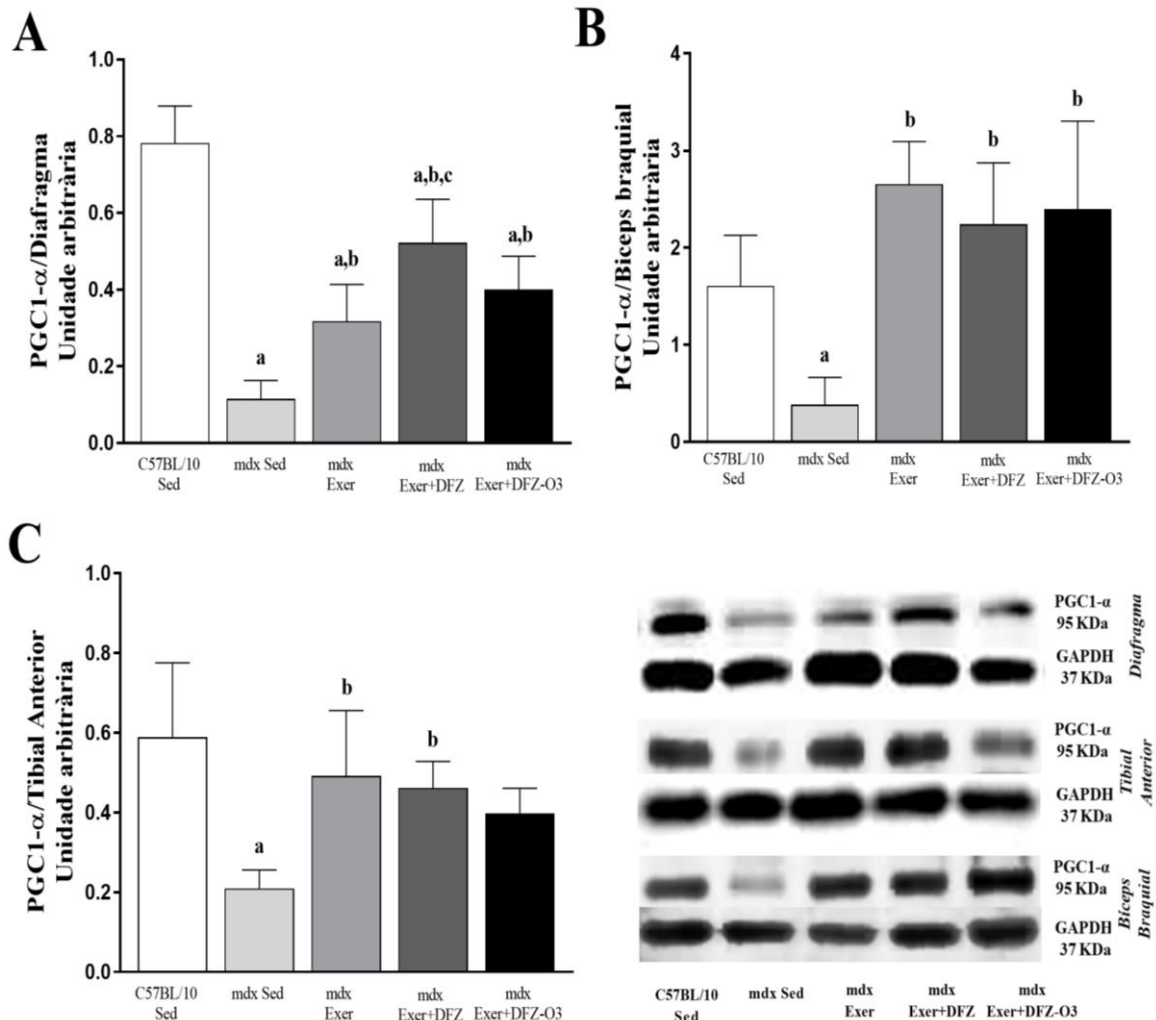
4.9.MARCADOR DE RESPOSTA A ATIVIDADE FÍSICA (PGC-1 α) NOS MÚSCULOS DIA, BB E TA.

Os músculos diafragma DIA (Figura 28A), BB (Figura 28B) e TA (Figura 28C) animais distróficos sedentários (*mdx sed*) mostram níveis diminuídos significativamente de PGC1- α [DIA: 85% (Figura 28A); BB: 76% (Figura 28B) e TA 63% (Figura 28C)] quando comparados com os animais C57BL10 (sed).

Nos animais tratados ocorreu aumento significativo do PGC1- α (DIA: *mdx Exer*: 1,8 vezes, *mdx Exer*+DFZ:37% e *mdx Exer*+DFZ-O3: 3 vezes; BB: *mdx Exer*: 5,9 vezes, *mdx Exer*+DFZ: 4,8 vezes e *mdx Exer*+DFZ-O3: 5,2 vezes; TA: *mdx Exer*: 1,3 vezes e *mdx Exer*+DFZ: 1,1 vezes) quando relacionado com os animais distróficos sedentários (*mdx sed*).

O melhor efeito dentre as terapias foi observado no DIA (Figura 28A) nos animais tratados exercitados +DFZ, com um aumento de 67% nos níveis de PGC1- α quando comparado aos animais *mdx exercitados* (*mdx Exer*). Quando comparados os níveis de PGC1- α nos músculos BB e TA entre os tratamentos não foram achadas diferenças significativas.

Figura 28 – Determinação proteica dos marcadores relacionados a resposta da atividade física nos músculos DIA, BB e TA pela técnica de western blot



Animais controles C57BL10 (sed) e distróficos: (*mdx*) sedentários (Sed), distróficos exercitados (*mdx* Exer), animais *mdx* Exer que receberam deflazacorte (+DFZ) e *mdx* Exer que receberam DFZ + ômega-3 (+DFZ-O3). Gráfico representando (média $\pm$ desvio padrão). N=6 animais por grupo. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de 1 via seguido pelo pos-teste de Tukey's (**a**) com relação ao C57BL/10 (sed), (**b**) com relação ao *mdx* sed e (**c**) com relação *mdx* Exer.

- VS C57BL/10 (sed) (**a**): <0,0001. Diafragma p=0,0022. Bíceps braquial p=0,0268.
- VS *mdx* (sed) (**b**): <0,0001. Diafragma *mdx* Exer p=0,0427 *mdx* Exer+DFZ-O3 p=0,0016. Bíceps Braquial *mdx* Exer+DFZ p=0,0007 e *mdx* Exer+DFZ-O3 p=0,0005. Tibial anterior *mdx* Exer p=0,0035, *mdx* Exer+DFZ p=0,0102.

5. DISCUSSÃO

A importância do exercício físico para a manutenção dos músculos estriados esqueléticos é bem conhecida. No envelhecimento, o exercício tem papel fundamental no retardo da sarcopenia. Assim, a atividade física é amplamente difundida atualmente, pelos seus efeitos na melhora da qualidade de vida, especialmente no envelhecimento ou mesmo em presença de patologias.

Na DMD, ocorre degeneração muscular progressiva pela falta da distrofina, proteína sarcolemal importante para a estabilidade mecânica da fibra muscular. Na falta de distrofina, o sarcolema se torna instável e a fibra muscular fica suscetível ao rompimento nos ciclos de contração e relaxamento. Por este motivo, o uso de exercício físico para pacientes distróficos é motivo de dúvida, não havendo consenso quanto ao tipo, frequência ou intensidade do exercício a ser utilizado (Bushby et al., 2010b; Gianola et al., 2013).

No presente trabalho verificamos se o exercício físico de baixa intensidade em esteira pode beneficiar a distrofinopatia de camundongos distróficos *mdx*, modelo experimental da DMD, em fases tardias da doença (14 meses de idade). Estudamos o exercício sozinho e associado a terapia com corticoide e ômega-3, uma vez que pacientes DMD, em estágios mais tardios da doença, normalmente estão sob terapia com corticoides.

A presente Discussão será organizada em dois tópicos principais: no primeiro, discutiremos os efeitos do exercício físico no camundongo *mdx* idoso, avaliando parâmetros comportamentais, funcionais, moleculares e estruturais (5.1. Efeitos do exercício físico associado ou não as terapias). No segundo tópico, discutiremos os efeitos das terapias com ômega-3 e deflazacorte (5.2. Efeitos do ômega-3 e deflazacorte). Ainda, daremos ênfase para a discussão dos resultados obtidos na última semana de avaliação (semana 9), visto que os efeitos mais evidentes ocorreram nesta semana.

5.1. Efeitos do exercício físico associado ou não as terapias

5.1.1. Intensidade do exercício associado ou não as terapias e seus efeitos na qualidade de vida do *mdx*

5.1.2. Efeito do exercício físico associado ou não as terapias no comportamento: open field

5.1.3. Efeitos do exercício físico associado ou não as terapias na função muscular

5.1.4. Efeitos do exercício associado ou não as terapias nos parâmetros respiratórios e no desempenho de corrida em esteira

5.1.5. Efeito do exercício físico associado ou não as terapias nos níveis de CK

5.1.6. Efeito do exercício físico associado ou não as terapias em marcadores da inflamação e fibrose

5.1.7. Efeitos do exercício associado ou não as terapias na β -Distroglicana e calsequestrina

5.1.8. Efeitos do exercício associado ou não as terapias no PGC-1 α

5.2. Efeito das terapias com deflazacorte e ômega-3 associados ao exercício: considerações gerais.

De maneira geral, a função muscular (grip strength, impulso de retenção dos quatro membros, impulso no fio metálico, locomoção forçada no rotarod) e os níveis dos marcadores de inflamação, fibrose, PGC-1 α e β -distroglicana, no músculo diafragma, foram melhores com o exercício associado às terapias. Isto pode ser explicado pela ação anti-inflamatória do deflazacorte e O-3, somada os efeitos benéficos do exercício, além do fato do diafragma ser o músculo mais afetado, se comparado com os músculos apendiculares, apresentando deposição de fibrose característica para esta fase da doença. O efeito benéfico das terapias anti-inflamatórias pode ser evidenciado na melhora de alguns parâmetros funcionais já na quinta semana de avaliação, anteriormente ao exercício em esteira.

Com relação aos efeitos de corticoides na função muscular, sabe-se que em baixa dose melhoram a função muscular (C. Angelini, 2007), retardando a perda da força muscular no *mdx* (Keeling et al., 2007). Os corticoides parecem ativar alguns reguladores transcricionais, como o ERR γ (Matsakas, Yadav, Lorca, & Narkar, 2013), o receptor de PPAR δ (Miura et al., 2009) e os coativadores PGC-1 α (Chan et al., 2014), envolvidos na patogênese da

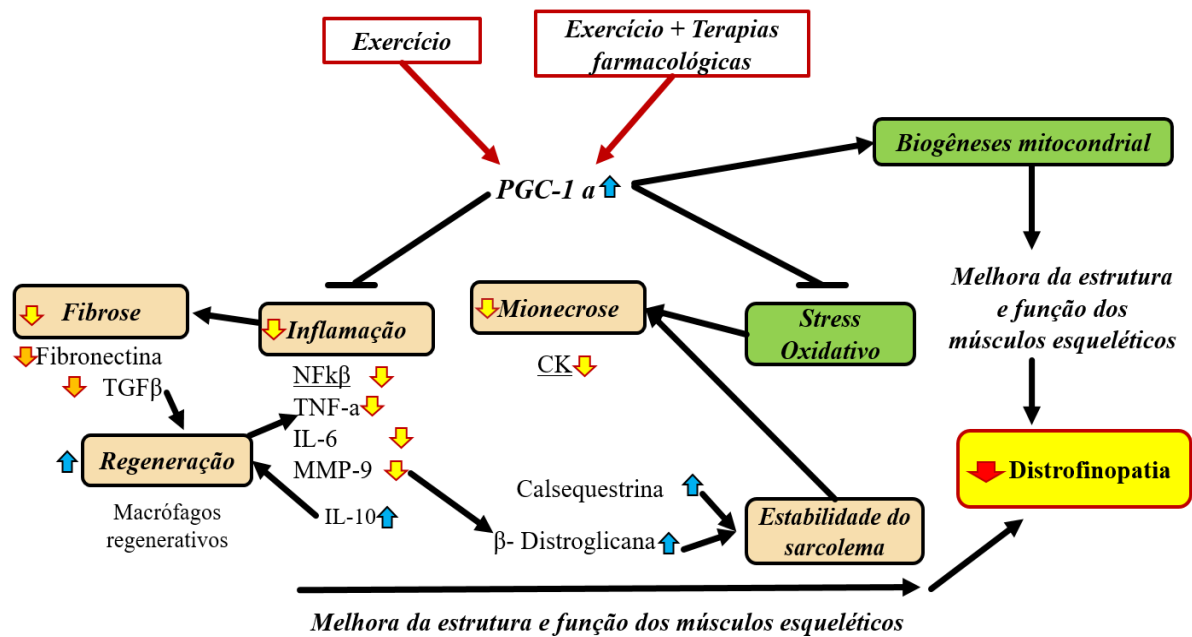
DMD(Morrison-Nozik et al., 2015), dados que concordam com os nossos resultados antes citados.

Com relação ao ômega-3, seus efeitos no exercício são bem sabidos. Além de reduzir a fibrose (Shaaban, Shaker, Zalata, El-kashef, & Ibrahim, 2014), o O-3 e o DHA diminuem citocinas pro-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (DiLorenzo, Drager, & Rankin, 2014; Jakeman, Lambrick, Wooley, Babraj, & Faulkner, 2017; Tartibian, Maleki, & Abbasi, 2011; Tsuchiya, Yanagimoto, Nakazato, Hayamizu, & Ochi, 2016). Adicionalmente, efeitos benéficos do O-3 como a melhora da força muscular e capacidade muscular em humanos (L N Rodacki et al., 2012), além dos efeitos positivos observados nos ossos (Tartibian, Hajizadeh Maleki, Kanaley, & Sadeghi, 2011), podendo melhorar os efeitos do exercício na saúde óssea e muscular (Daly, Duckham, & Gianoudis, 2014).

O EPA e o DHA diminuem a fadiga e dor musculares associadas ao exercício exaustivo (Da Boit, Hunter, & Gray, 2017; Mickleborough, 2013; Tsuchiya et al., 2016), melhoram a recuperação da fadiga e o desempenho de resistência, bem como regulam a síntese proteica do músculo esquelético (Calder, 2015; Heaton et al., 2017; Macartney, Hingley, Brown, Peoples, & McLennan, 2014; Zebrowska, Mizia-Stec, Mizia, Gasior, & Poprzecki, 2015). Além de seus efeitos no sistema muscular, efeitos no sistema nervoso central incluem benefícios na memória (Su, 2010) e, tal como o exercício físico, na depressão (Jacka & Berk, 2013). Adicionalmente, a suplementação com DHA associada ao exercício voluntário aumenta a aprendizagem espacial e a plasticidade sináptica (Chytrova, Ying, & Gomez-Pinilla, 2010; Wu, Ying, & Gomez-Pinilla, 2008), o que poderia justificar uma melhor performance do grupo tratado no teste de open Field. Ainda, exercício físico e suplementação com óleo de semente de linho aumentou a neurogênese no hipocampo e a produção de fatores neurotróficos, em camundongos com estresse crônico (Hutton et al., 2015).

Assim é possível sugerir que a diminuição da inflamação, mionecrose e fibrose esteja associada ao efeito anti-inflamatório do DFZ e do O-3, bem como pela proteção do sarcolema proveniente do DHA presente no ômega-3, visto a diminuição da mionecrose (Carvalho et al., 2013; Fogagnolo Mauricio et al., 2013).

Figura 29 – Diagrama dos efeitos do exercício e terapias nas vias de sinalização no músculo distrófico.



Efeitos do Exercício físico, associado ou não as terapias farmacológicas (DFZ e DFZ+O-3; em vermelho) nos eventos característicos da DMD (fibrose, inflamação, mionecrose, regeneração e estabilidade do sarcolema). O Exercício e terapias aumentaram o PGC1alpha, o qual atua em todos os eventos, aumentando (setas azuis) ou diminuindo (setas amarelas) marcadores moleculares. Eventos não avaliados neste estudo (em verde; stress oxidativo e biogênese mitocondrial) também podem ser afetados pelo PGC1alpha. De maneira geral, estes efeitos promovem melhora da estrutura e função muscular e diminuição da distrofinopatia.

6. CONCLUSÕES

O exercício em esteira, de baixa intensidade, melhorou a função muscular do animal *mdx* idoso, provavelmente por diminuir a mionecrose (redução da CK), bem como fatores associados a inflamação e fibrose. Estes efeitos podem ser devidos a ativação de mecanismos que envolvam vias do PGC-1α, molécula relacionada à preservação muscular.

As terapias com corticoide e O-3 não interferiram nos efeitos benéficos do exercício físico e não exacerbaram a distrofinopatia. A associação com as terapias resultou em melhores

efeitos que o exercício sozinho para a maioria dos parâmetros funcionais e moleculares analisados e no músculo diafragma.

Importante ressaltar que devemos ter cuidado na transposição de dados obtidos no modelo animal para os pacientes DMD. O presente estudo sugere que pacientes distróficos que estejam sob terapia com corticoide podem se beneficiar do exercício em esteira de baixa intensidade e da suplementação com O-3. Entretanto, a intensidade do exercício e a dose dos corticoides devem ser cuidadosamente analisadas e marcadores plasmáticos da evolução da doença acompanhados com cuidado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aartsma-Rus, A., & van Putten, M. (2014). Assessing functional performance in the mdx mouse model. *J Vis Exp* (85). doi: 10.3791/51303
- Abdel-Salam, E., Abdel-Meguid, I., & Korraa, S. S. (2009). Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*, 28 (3), 94-100.
- Abreu, P., Mendes, S. V., Ceccatto, V. M., & Hirabara, S. M. (2017). Satellite cell activation induced by aerobic muscle adaptation in response to endurance exercise in humans and rodents. *Life Sci*, 170, 33-40. doi: 10.1016/j.lfs.2016.11.016

- Abruzzo, P. M., Esposito, F., Marchionni, C., di Tullio, S., Belia, S., Fulle, S., Marini, M. (2013). Moderate exercise training induces ROS-related adaptations to skeletal muscles. *Int J Sports Med*, 34(8), 676-687. doi: 10.1055/s-0032-1323782
- Acharyya, S., Villalta, S. A., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, P. M., Carathers, M., Guttridge, D. C. (2007). Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 117(4), 889-901. doi: 10.1172/jci30556
- Alameddine, H. S. (2012). Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? *Neurobiol Dis*, 48(3), 508-518. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.023
- Allen, D. G., & Whitehead, N. P. (2011). Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int J Biochem Cell Biol*, 43(3), 290-294. doi: 10.1016/j.biocel.2010.11.005
- Alves Pereira, J., Matsumura, C., Minatel, E., Marques, M., & Santo Neto, H. (2014). *Understanding the beneficial effects of doxycycline on the dystrophic phenotype of the mdx mouse* (Vol. 50).
- Anderson, E., & Darrell Neuffer, P. (2006). *Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H(2)O(2) generation* (Vol. 290).
- Angelini, C. (2007). The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve*, 36(4), 424-435. doi: 10.1002/mus.20812
- Angelini, C., Pegoraro, E., Turella, E., Intino, M. T., Pini, A., & Costa, C. (1994). Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve*, 17(4), 386-391. doi: 10.1002/mus.880170405
- Angelini, C., & Peterle, E. (2012). Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myologica*, 31(1), 9-15.
- Apolinario, L. M., De Carvalho, S. C., Santo Neto, H., & Marques, M. J. (2015). Long-Term Therapy With Omega-3 Ameliorates Myonecrosis and Benefits Skeletal Muscle Regeneration in Mdx Mice. *Anat Rec (Hoboken)*, 298(9), 1589-1596. doi: 10.1002/ar.23177
- Argiles, J. M., Alvarez, B., Carbo, N., Busquets, S., Van Royen, M., & Lopez-Soriano, F. J. (2000). The divergent effects of tumour necrosis factor-alpha on skeletal muscle: implications in wasting. *Eur Cytokine Netw*, 11(4), 552-559.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into

- antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*, 204(5), 1057-1069. doi: 10.1084/jem.20070075
- Ascah, A., Khairallah, M., Daussin, F., Bourcier-Lucas, C., Godin, R., Allen, B. G., Burelle, Y. (2011). Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(1), H144-153. doi: 10.1152/ajpheart.00522.2010
- Baar, K., Wende, A. R., Jones, T. E., Marison, M., Nolte, L. A., Chen, M., Holloszy, J. O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb j*, 16(14), 1879-1886. doi: 10.1096/fj.02-0367com
- Babcock, T. A., & Carlin, J. M. (2000). Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*, 12(6), 588-594. doi: 10.1006/cyto.1999.0661
- Baldwin, K. M., Klinkerfuss, G. H., Terjung, R. L., Mole, P. A., & Holloszy, J. O. (1972). Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am J Physiol*, 222(2), 373-378. doi: 10.1152/ajplegacy.1972.222.2.373
- Barani, A. E., Durieux, A. C., Sabido, O., & Freyssenet, D. (2003). Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J Appl Physiol (1985)*, 95(5), 2089-2098. doi: 10.1152/japplphysiol.00437.2003
- Barresi, R., & Campbell, K. (2006). *Dystroglycan: From biosynthesis to pathogenesis of human disease* (Vol. 119).
- Barros Maranhao, J., de Oliveira Moreira, D., Mauricio, A. F., de Carvalho, S. C., Ferretti, R., Pereira, J. A., Marques, M. J. (2015). Changes in calsequestrin, TNF-alpha, TGF-beta and MyoD levels during the progression of skeletal muscle dystrophy in mdx mice: a comparative analysis of the quadriceps, diaphragm and intrinsic laryngeal muscles. *Int J Exp Pathol*, 96(5), 285-293. doi: 10.1111/iep.12142
- Bassett, D. R., Jr., & Howley, E. T. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc*, 32(1), 70-84.
- Beard, N. A., Laver, D. R., & Dulhunty, A. F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 85(1), 33-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.07.001>
- Bernasconi, P., Torchiana, E., Confalonieri, P., Brugnoli, R., Barresi, R., Mora, M., Mantegazza, R. (1995). Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest*, 96(2), 1137-1144. doi: 10.1172/jci118101

- Bianchi, K., Vandecasteele, G., Carli, C., Romagnoli, A., Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2006). Regulation of Ca²⁺ signalling and Ca²⁺-mediated cell death by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Cell Death Differ*, 13(4), 586-596. doi: 10.1038/sj.cdd.4401784
- Biggar, W. D., Gingras, M., Fehlings, D. L., Harris, V. A., & Steele, C. A. (2001). Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr*, 138(1), 45-50. doi: 10.1067/mpd.2001.109601
- Bonifati, M. D., Ruzza, G., Bonometto, P., Berardinelli, A., Gorni, K., Orcesi, S., Angelini, C. (2000). A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 23(9), 1344-1347.
- Brooke, M. H., Fenichel, G. M., Griggs, R. C., Mendell, J. R., Moxley, R., Florence, J., et al. (1989). Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology*, 39(4), 475-481.
- Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*, 10(7), 519-529. doi: 10.1038/nrn2652
- Buckley, J. D., Burgess, S., Murphy, K. J., & Howe, P. R. (2009). DHA-rich fish oil lowers heart rate during submaximal exercise in elite Australian Rules footballers. *J Sci Med Sport*, 12(4), 503-507. doi: 10.1016/j.jsams.2008.01.011
- Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., & Moore, K. J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(4), 1189-1192.
- Burdi, R., Rolland, J. F., Frayssse, B., Litvinova, K., Cozzoli, A., Giannuzzi, V., De Luca, A. (2009). Multiple pathological events in exercised dystrophic mdx mice are targeted by pentoxifylline: outcome of a large array of in vivo and ex vivo tests. *J Appl Physiol* (1985), 106(4), 1311-1324. doi: 10.1152/jappphysiol.90985.2008
- Burns, D. P., Edge, D., O'Malley, D., & O'Halloran, K. D. (2015). Respiratory Control in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Adv Exp Med Biol*, 860, 239-244. doi: 10.1007/978-3-319-18440-1_27
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., Constantin, C. (2010a). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*, 9(1), 77-93. doi: 10.1016/s1474-4422(09)70271-6
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., Constantin, C. (2010b). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2:

- implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*, 9(2), 177-189. doi: 10.1016/s1474-4422(09)70272-8
- Calder, P. C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 2), 423-427. doi: 10.1042/bst0330423
- Calder, P. C. (2008). Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*, 52(8), 885-897. doi: 10.1002/mnfr.200700289
- Calder, P. C. (2011). Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol*, 668 Suppl 1, S50-58. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.085
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 39(1 Suppl), 18s-32s. doi: 10.1177/0148607115595980
- Call, J. A., McKeehen, J. N., Novotny, S. A., & Lowe, D. A. (2010). Progressive resistance voluntary wheel running in the mdx mouse. *Muscle Nerve*, 42(6), 871-880. doi: 10.1002/mus.21764
- Calle, M. C., & Fernandez, M. L. (2010). Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract*, 4(4), 259-269. doi: 10.4162/nrp.2010.4.4.259
- Cao, L., Han, G., Lin, C., Gu, B., Gao, X., Moulton, H. M., Yin, H. (2016). Fructose Promotes Uptake and Activity of Oligonucleotides With Different Chemistries in a Context-dependent Manner in mdx Mice. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 5(6), e329-e329. doi: 10.1038/mtna.2016.46
- Carlson, C. G., Rutter, J., Bledsoe, C., Singh, R., Hoff, H., Bruemmer, K., McCarthy, L. (2010). A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength. *J Neurosci Methods*, 186(2), 226-230. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.11.006
- Carter, G. T., Wineinger, M. A., Walsh, S. A., Horasek, S. J., Abresch, R. T., & Fowler, W. M., Jr. (1995). Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*, 5(4), 323-332.
- Carvalho, S. C., Apolinario, L. M., Matheus, S. M., Santo Neto, H., & Marques, M. J. (2013). EPA protects against muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by promoting a shift from the M1 to M2 macrophage phenotype. *J Neuroimmunol*, 264(1-2), 41-47. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.09.007
- Chakkalakal, J. V., Michel, S. A., Chin, E. R., Michel, R. N., & Jasmin, B. J. (2006). Targeted inhibition of Ca²⁺/calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in mdx mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 15(9), 1423-1435. doi: 10.1093/hmg/ddl065

- Chan, M. C., Rowe, G. C., Raghuram, S., Patten, I. S., Farrell, C., & Arany, Z. (2014). Post-natal induction of PGC-1 α protects against severe muscle dystrophy independently of utrophin. *Skelet Muscle*, 4(1), 2. doi: 10.1186/2044-5040-4-2
- Chieffi, S., Messina, G., Villano, I., Messina, A., Valenzano, A., Moscatelli, F., Monda, M. (2017). Neuroprotective Effects of Physical Activity: Evidence from Human and Animal Studies. *Front Neurol*, 8, 188. doi: 10.3389/fneur.2017.00188
- Chytrova, G., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2010). Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. *Brain Res*, 1341, 32-40. doi: 10.1016/j.brainres.2009.05.018
- Connolly, A. M., Keeling, R. M., Mehta, S., Pestronk, A., & Sanes, J. R. (2001). Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin α 2-deficient mice. *Neuromuscul Disord*, 11(8), 703-712.
- Cotton, S., Voudouris, N. J., & Greenwood, K. M. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol*, 43(7), 497-501.
- Crestani, F., Low, K., Keist, R., Mandelli, M., Mohler, H., & Rudolph, U. (2001). Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol*, 59(3), 442-445.
- Cynthia Martin, F., Hiller, M., Spitali, P., Oonk, S., Dalebout, H., Palmblad, M., Hoen, P. A. (2014). Fibronectin is a serum biomarker for Duchenne muscular dystrophy. *Proteomics Clin Appl*, 8(3-4), 269-278. doi: 10.1002/prca.201300072
- Da Boit, M., Hunter, A. M., & Gray, S. R. (2017). Fit with good fat? The role of n-3 polyunsaturated fatty acids on exercise performance. *Metabolism*, 66, 45-54. doi: 10.1016/j.metabol.2016.10.007
- Daly, R. M., Duckham, R. L., & Gianoudis, J. (2014). Evidence for an interaction between exercise and nutrition for improving bone and muscle health. *Curr Osteoporos Rep*, 12(2), 219-226. doi: 10.1007/s11914-014-0207-2
- de Lateur, B. J., & Giacony, R. M. (1979). Effect on maximal strength of submaximal exercise in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med*, 58(1), 26-36.
- De Luca, A., Nico, B., Liantonio, A., Didonna, M. P., Frayssé, B., Pierno, S., Conte Camerino, D. (2005). A Multidisciplinary Evaluation of the Effectiveness of Cyclosporine A in Dystrophic Mdx Mice. *Am J Pathol*, 166(2), 477-489. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62270-5

- De Luca, A., Nico, B., Rolland, J. F., Cozzoli, A., Burdi, R., Mangieri, D., . . . Camerino, D. C. (2008). Gentamicin treatment in exercised mdx mice: Identification of dystrophin-sensitive pathways and evaluation of efficacy in work-loaded dystrophic muscle. *Neurobiol Dis*, 32(2), 243-253. doi: 10.1016/j.nbd.2008.07.009
- De Luca, A., Pierno, S., Liantonio, A., Cetrone, M., Camerino, C., Fraysse, B., Conte Camerino, D. (2003). Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(1), 453-463. doi: 10.1124/jpet.102.041343
- De Oliveira Moreira, D., Pereira, J. A., Taniguti, A. P., Matsumura, C. Y., Ramos, L. A., Areas, M. A., Marques, M. J. (2013). Suramin attenuates dystrophin-deficient cardiomyopathy in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 48(6), 911-919. doi: 10.1002/mus.23858
- Deconinck, N., & Dan, B. (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*, 36(1), 1-7. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016
- Dellorusso, C., Crawford, R. W., Chamberlain, J. S., & Brooks, S. V. (2001). Tibialis anterior muscles in mdx mice are highly susceptible to contraction-induced injury. *J Muscle Res Cell Motil*, 22(5), 467-475.
- DiLorenzo, F. M., Drager, C. J., & Rankin, J. W. (2014). Docosahexaenoic acid affects markers of inflammation and muscle damage after eccentric exercise. *J Strength Cond Res*, 28(10), 2768-2774. doi: 10.1519/jsc.0000000000000617
- Drachman, D. B., Toyka, K. V., & Myer, E. PREDNISONE IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY. *The Lancet*, 304(7894), 1409-1412. doi: 10.1016/S0140-6736(74)90071-3
- Dupont-Versteegden, E. E. (1996). Exercise and clenbuterol as strategies to decrease the progression of muscular dystrophy in mdx mice. *J Appl Physiol (1985)*, 80(3), 734-741. doi: 10.1152/jappl.1996.80.3.734
- Dupont-Versteegden, E. E., McCarter, R. J., & Katz, M. S. (1994). Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. *J Appl Physiol (1985)*, 77(4), 1736-1741. doi: 10.1152/jappl.1994.77.4.1736
- Dyerberg, J., Bang, H. O., & Hjerne, N. (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*, 28(9), 958-966. doi: 10.1093/ajcn/28.9.958
- Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, 17(2), 162-184. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.012

- Emery, A. E. (1980). Duchenne muscular dystrophy. Genetic aspects, carrier detection and antenatal diagnosis. *Br Med Bull*, 36(2), 117-122.
- Emery, A. E. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), 687-695. doi: 10.1016/s0140-6736(02)07815-7
- Erickson, K. I., Gildengers, A. G., & Butters, M. A. (2013). Physical activity and brain plasticity in late adulthood. *Dialogues in clinical neuroscience*, 15(1), 99-108.
- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*, 8(9), 1254-1266. doi: 10.7150/ijbs.4679
- Ervasti, J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1772(2), 108-117. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.05.010
- Faist, V., Konig, J., Hoger, H., & Elmadfa, I. (2001). Decreased mitochondrial oxygen consumption and antioxidant enzyme activities in skeletal muscle of dystrophic mice after low-intensity exercise. *Ann Nutr Metab*, 45(2), 58-66. doi: 10.1159/000046707
- Fernandes, J., Arida, R. M., & Gomez-Pinilla, F. (2017). Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 80, 443-456. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.012
- Ferraro, E., Giammarioli, A. M., Chiandotto, S., Spoletini, I., & Rosano, G. (2014). Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 21(1), 154-176. doi: 10.1089/ars.2013.5773
- Ferretti, R., Marques, M. J., Pertille, A., & Santo Neto, H. (2009). Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice. *Muscle Nerve*, 39(5), 609-615. doi: 10.1002/mus.21154
- Finley, L. W., Lee, J., Souza, A., Desquiret-Dumas, V., Bullock, K., Rowe, G. C., Haigis, M. C. (2012). Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(8), 2931-2936. doi: 10.1073/pnas.1115813109
- Finsterer, J., & Stöllberger, C. (2003). The Heart in Human Dystrophinopathies. *Cardiology*, 99(1), 1-19.
- Fitts, R. H., & Widrick, J. J. (1996). Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev*, 24, 427-473.

- Fluck, M. (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol*, 209(Pt 12), 2239-2248. doi: 10.1242/jeb.02149
- Fogagnolo Mauricio, A., Minatel, E., Santo Neto, H., & Marques, M. J. (2013). Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice. *Clin Nutr*, 32(4), 636-642. doi: 10.1016/j.clnu.2012.11.013
- Fogagnolo Mauricio, A., Pereira, J. A., Santo Neto, H., & Marques, M. J. (2016). Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice hearts at later stages of dystrophy. *Nutrition*, 32(7-8), 855-862. doi: 10.1016/j.nut.2016.01.015
- Franceschi, C. (2007). Inflammaging as a Major Characteristic of Old People: Can It Be Prevented or Cured? *Nutrition Reviews*, 65(suppl_3), S173-S176. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00358.x
- Frinchi, M., Macaluso, F., Licciardi, A., Perciavalle, V., Coco, M., Belluardo, N., Mudo, G. (2014). Recovery of damaged skeletal muscle in mdx mice through low-intensity endurance exercise. *Int J Sports Med*, 35(1), 19-27. doi: 10.1055/s-0033-1343405
- Fry, C. S., Noehren, B., Mula, J., Ubele, M. F., Westgate, P. M., Kern, P. A., & Peterson, C. A. (2014). Fibre type-specific satellite cell response to aerobic training in sedentary adults. *J Physiol*, 592(12), 2625-2635. doi: 10.1113/jphysiol.2014.271288
- Gelfo, F., Mandolesi, L., Serra, L., Sorrentino, G., & Caltagirone, C. (2018). The Neuroprotective Effects of Experience on Cognitive Functions: Evidence from Animal Studies on the Neurobiological Bases of Brain Reserve. *Neuroscience*, 370, 218-235. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.065
- Giannandrea, M., & Parks, W. C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech*, 7(2), 193-203. doi: 10.1242/dmm.012062
- Giannini, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 172(3), 367-379. doi: 10.1503/cmaj.1040752
- Gianola, S., Pecoraro, V., Lambiase, S., Gatti, R., Banfi, G., & Moja, L. (2013). *Efficacy of Muscle Exercise in Patients with Muscular Dystrophy: A Systematic Review Showing a Missed Opportunity to Improve Outcomes* (Vol. 8).
- Godin, R., Daussin, F., Matecki, S., Li, T., Petrof, B. J., & Burelle, Y. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator1- gene alpha transfer restores mitochondrial biomass and improves mitochondrial calcium handling in post-necrotic

- mdx mouse skeletal muscle. *J Physiol*, 590(21), 5487-5502. doi: 10.1113/jphysiol.2012.240390
- Gonzalez-Perez, O., Luquin, S., Garcia-Estrada, J., & Ramos-Remus, C. (2007). Deflazacort: a glucocorticoid with few metabolic adverse effects but important immunosuppressive activity. *Adv Ther*, 24(5), 1052-1060.
- Grady, R. M., Teng, H., Nichol, M. C., Cunningham, J. C., Wilkinson, R. S., & Sanes, J. R. (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90(4), 729-738.
- Granchelli, J. A., Pollina, C., & Hudecki, M. S. (2000). Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*, 10(4-5), 235-239.
- Grego, F., Vallier, J. M., Collardeau, M., Rousseu, C., Cremieux, J., & Brisswalter, J. (2005). Influence of exercise duration and hydration status on cognitive function during prolonged cycling exercise. *Int J Sports Med*, 26(1), 27-33. doi: 10.1055/s-2004-817915
- Grounds, M. D., Radley, H. G., Lynch, G. S., Nagaraju, K., & De Luca, A. (2008). Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*, 31(1), 1-19. doi: 10.1016/j.nbd.2008.03.008
- Grounds, M. D., Sorokin, L., & White, J. (2005). Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand J Med Sci Sports*, 15(6), 381-391. doi: 10.1111/j.1600-0838.2005.00467.x
- Gumerson, J. D., & Michele, D. E. (2011). The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 210797. doi: 10.1155/2011/210797
- Han, G., Lin, C., Ning, H., Gao, X., & Yin, H. (2018). Long-Term Morpholino Oligomers in Hexose Elicits Long-Lasting Therapeutic Improvements in mdx Mice. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 12, 478-489. doi: 10.1016/j.omtn.2018.06.005
- Handschin, C., Kobayashi, Y. M., Chin, S., Seale, P., Campbell, K. P., & Spiegelman, B. M. (2007). PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev*, 21(7), 770-783. doi: 10.1101/gad.1525107
- Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2008). The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*, 454(7203), 463-469. doi: 10.1038/nature07206
- Harper, C. R., & Jacobson, T. A. (2003). Beyond the Mediterranean diet: the role of omega-3 Fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Prev Cardiol*, 6(3), 136-146.

- Hathout, Y., Brody, E., Clemens, P. R., Cripe, L., DeLisle, R. K., Furlong, P., Gold, L. (2015). Large-scale serum protein biomarker discovery in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(23), 7153-7158. doi: 10.1073/pnas.1507719112
- Hayes, A., & Williams, D. A. (1998). Contractile function and low-intensity exercise effects of old dystrophic (mdx) mice. *Am J Physiol*, 274(4 Pt 1), C1138-1144.
- Heaton, L. E., Davis, J. K., Rawson, E. S., Nuccio, R. P., Witard, O. C., Stein, K. W., Baker, L. B. (2017). Selected In-Season Nutritional Strategies to Enhance Recovery for Team Sport Athletes: A Practical Overview. *Sports Med*, 47(11), 2201-2218. doi: 10.1007/s40279-017-0759-2
- Hendriksen, J. G., & Vles, J. S. (2006). Are males with Duchenne muscular dystrophy at risk for reading disabilities? *Pediatr Neurol*, 34(4), 296-300. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.08.029
- Hendriksen, J. G., & Vles, J. S. (2008). Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *J Child Neurol*, 23(5), 477-481. doi: 10.1177/0883073807309775
- Heydemann, A., Swaggart, K. A., Kim, G. H., Holley-Cuthrell, J., Hadhazy, M., & McNally, E. M. (2012). The superhealing MRL background improves muscular dystrophy. *Skeletal muscle*, 2(1), 26-26. doi: 10.1186/2044-5040-2-26
- Hindi, S. M., Shin, J., Ogura, Y., Li, H., & Kumar, A. (2013). Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves proliferation and engraftment of myogenic cells in dystrophic muscle of mdx mice. *PLoS One*, 8(8), e72121. doi: 10.1371/journal.pone.0072121
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), 919-928.
- Hollinger, K., & Selsby, J. T. (2013). The physiological response of protease inhibition in dystrophic muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 208(3), 234-244. doi: 10.1111/apha.12114
- Hollinger, K., & Selsby, J. T. (2015). PGC-1alpha gene transfer improves muscle function in dystrophic muscle following prolonged disease progress. *Exp Physiol*, 100(10), 1145-1158. doi: 10.1113/ep085339
- Houde, S., Filiatrault, M., Fournier, A., Dube, J., D'Arcy, S., Berube, D., Vanasse, M. (2008). Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. *Pediatr Neurol*, 38(3), 200-206. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.11.001

- Hussein, G., Mansour, L., Abdel Ghafar, H., Alzahraa Mostafa, F., & Fawaz, L. (2014). *Short-term Effects of Corticosteroid Therapy on Cardiac and Skeletal Muscles in Muscular Dystrophies* (Vol. 62).
- Hutton, C. P., Dery, N., Rosa, E., Lemon, J. A., Rollo, C. D., Boreham, D. R., Becker, S. (2015). Synergistic effects of diet and exercise on hippocampal function in chronically stressed mice. *Neuroscience*, 308, 180-193. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.005
- Hyzewicz, J., Ruegg, U. T., & Takeda, S. (2015). Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *J Neuromuscul Dis*, 2(4), 325-342. doi: 10.3233/JND-150106
- Hyzewicz, J., Tanihata, J., Kuraoka, M., Nitahara-Kasahara, Y., Beylier, T., Ruegg, U. T., Takeda, S. (2017). Low-Intensity Training and the C5a Complement Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation. *Am J Pathol*, 187(5), 1147-1161. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.019
- Ishizaki, M., Suga, T., Kimura, E., Shiota, T., Kawano, R., Uchida, Y., Uchino, M. (2008). Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul Disord*, 18(4), 342-348. doi: 10.1016/j.nmd.2008.02.002
- Jacka, F. N., & Berk, M. (2013). Depression, diet and exercise. *Med J Aust*, 199(6 Suppl), S21-23.
- Jakeman, J. R., Lambrick, D. M., Wooley, B., Babraj, J. A., & Faulkner, J. A. (2017). Effect of an acute dose of omega-3 fish oil following exercise-induced muscle damage. *Eur J Appl Physiol*, 117(3), 575-582. doi: 10.1007/s00421-017-3543-y
- James, M. J., Gibson, R. A., & Cleland, L. G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, 71(1 Suppl), 343s-348s.
- Jensen, L., Petersson, S. J., Illum, N. O., Laugaard-Jacobsen, H. C., Thelle, T., Jørgensen, L. H., & Schrøder, H. D. (2017). Muscular response to the first three months of deflazacort treatment in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 17(2), 8-18.
- Jiao, J., Li, Q., Chu, J., Zeng, W., Yang, M., & Zhu, S. (2014). Effect of n-3 PUFA supplementation on cognitive function throughout the life span from infancy to old age: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 100(6), 1422-1436. doi: 10.3945/ajcn.114.095315
- Joussen, A. M., Poulaki, V., Mitsiades, N., Kirchhof, B., Koizumi, K., Dohmen, S., & Adamis, A. P. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *Faseb j*, 16(3), 438-440. doi: 10.1096/fj.01-0707fje

- Jude, S., Roger, S., Martel, E., Besson, P., Richard, S., Bougnoux, P., Le Guennec, J. Y. (2006). Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog Biophys Mol Biol*, 90(1-3), 299-325. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.006
- Judge, D. P., Kass, D. A., Thompson, W. R., & Wagner, K. R. (2011). Pathophysiology and therapy of cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiovasc Drugs*, 11(5), 287-294. doi: 10.2165/11594070-000000000-00000
- Kapsa, R., Kornberg, A. J., & Byrne, E. (2003). Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol*, 2(5), 299-310.
- Keeling, R. M., Golumbek, P. T., Streif, E. M., & Connolly, A. M. (2007). Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. *Muscle Nerve*, 35(1), 43-48. doi: 10.1002/mus.20646
- Kelly, D. P., & Scarpulla, R. C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*, 18(4), 357-368. doi: 10.1101/gad.1177604
- Kim, S., Campbell, K. A., Fox, D. J., Matthews, D. J., Valdez, R., & STARnet, M. D. (2015). Corticosteroid Treatments in Males With Duchenne Muscular Dystrophy: Treatment Duration and Time to Loss of Ambulation. *J Child Neurol*, 30(10), 1275-1280. doi: 10.1177/0883073814558120
- Kobayashi, Y. M., Rader, E. P., Crawford, R. W., & Campbell, K. P. (2012). Endpoint measures in the mdx mouse relevant for muscular dystrophy pre-clinical studies. *Neuromuscul Disord*, 22(1), 34-42. doi: 10.1016/j.nmd.2011.08.001
- Kodama, S., Saito, K., Tanaka, S., Maki, M., Yachi, Y., Asumi, M., Sone, H. (2009). Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. *Jama*, 301(19), 2024-2035. doi: 10.1001/jama.2009.681
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3), 509-517.
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D., & Kempermann, G. (2006). Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging*, 27(10), 1505-1513. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.016

- Kumar, A., & Boriek, A. M. (2003). Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *Faseb j*, 17(3), 386-396. doi: 10.1096/fj.02-0542com
- Kurek, J., Bower, J., Romanella, M., & Austin, L. (1996). Leukaemia inhibitory factor treatment stimulates muscle regeneration in the mdx mouse. *Neurosci Lett*, 212(3), 167-170.
- Kurosaka, M., Naito, H., Ogura, Y., Kojima, A., Goto, K., & Katamoto, S. (2009). Effects of voluntary wheel running on satellite cells in the rat plantaris muscle. *J Sports Sci Med*, 8(1), 51-57.
- Kuznetsov, A. V., Winkler, K., Wiedemann, F. R., von Bossanyi, P., Dietzmann, K., & Kunz, W. S. (1998). Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol Cell Biochem*, 183(1-2), 87-96.
- Kyselova, V., Peknicova, J., Buckiova, D., & Boubelik, M. (2003). Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 30-30. doi: 10.1186/1477-7827-1-30
- L N Rodacki, C., Rodacki, A., Pereira, G., Naliwaiko, K., Coelho de Castro, I., Pequito, D., & Fernandes, L. (2012). *Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women* (Vol. 95).
- Landisch, R. M., Kosir, A. M., Nelson, S. A., Baltgalvis, K. A., & Lowe, D. A. (2008). Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by mdx mice. *Muscle Nerve*, 38(4), 1290-1303. doi: 10.1002/mus.21141
- Lanza, G. A., Dello Russo, A., Giglio, V., De Luca, L., Messano, L., Santini, C., Bellocci, F. (2001). Impairment of cardiac autonomic function in patients with Duchenne muscular dystrophy: relationship to myocardial and respiratory function. *Am Heart J*, 141(5), 808-812.
- Leary, R., Oyewole, A. O., Bushby, K., & Aartsma-Rus, A. (2017). Translational Research in Europe for the Assessment and Treatment for Neuromuscular Disorders (TREAT-NMD). *Neuropediatrics*, 48(04), 211-220. doi: 10.1055/s-0037-1604110
- Lefaucheur, J. P., Pastoret, C., & Sebillé, A. (1995). Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*, 242(1), 70-76. doi: 10.1002/ar.1092420109
- Li, H., Mittal, A., Makonchuk, D. Y., Bhatnagar, S., & Kumar, A. (2009). Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle

- regeneration in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 18(14), 2584-2598. doi: 10.1093/hmg/ddp191
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 1(6), 361-370. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418(6899), 797-801. doi: 10.1038/nature00904
- Lista, I., & Sorrentino, G. (2010). Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. *Cell Mol Neurobiol*, 30(4), 493-503. doi: 10.1007/s10571-009-9488-x
- Ljubicic, V., & J Jasmin, B. (2013). *AMP-activated protein kinase at the nexus of therapeutic skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy* (Vol. 19).
- Lynch, G. S., Hinkle, R. T., Chamberlain, J. S., Brooks, S. V., & Faulkner, J. A. (2001). Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J Physiol*, 535(Pt 2), 591-600.
- Lyons, P. R., & Slater, C. R. (1991). Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J Neurocytol*, 20(12), 969-981.
- Ma, Z.-Y., Zhong, Z.-G., Qiu, M.-Y., Zhong, Y.-H., & Zhang, W.-X. (2016). TGF- β 1 activates the canonical NF- κ B signaling to promote cell survival and proliferation in dystrophic muscle fibroblasts in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(4), 576-581. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.029>
- Macartney, M. J., Hingley, L., Brown, M. A., Peoples, G. E., & McLennan, P. L. (2014). Intrinsic heart rate recovery after dynamic exercise is improved with an increased omega-3 index in healthy males. *Br J Nutr*, 112(12), 1984-1992. doi: 10.1017/s0007114514003146
- Machado, R. V., Mauricio, A. F., Taniguti, A. P., Ferretti, R., Neto, H. S., & Marques, M. J. (2011). Eicosapentaenoic acid decreases TNF-alpha and protects dystrophic muscles of mdx mice from degeneration. *J Neuroimmunol*, 232(1-2), 145-150. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.10.032
- Magee, P., Pearson, S., & Allen, J. (2008). The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation. *Lipids Health Dis*, 7, 24. doi: 10.1186/1476-511X-7-24

- Mandolesi, L., Polverino, A., Montuori, S., Foti, F., Ferraioli, G., Sorrentino, P., & Sorrentino, G. (2018). Effects of Physical Exercise on Cognitive Functioning and Wellbeing: Biological and Psychological Benefits. *Frontiers in psychology*, 9, 509-509. doi: 10.3389/fpsyg.2018.00509
- Mann, C. J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A. L., & Munoz-Canoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*, 1(1), 21. doi: 10.1186/2044-5040-1-21
- Mann, I. A. (1964). THE EVOLUTION OF ENVIRONMENTAL CHAMBER DESIGN. *Biomed Instrum*, 1, 21-25.
- Manning, J., Kulbida, R., Rai, P., Jensen, L., Bouma, J., Singh, S. P., Yilmazer-Hanke, D. (2014). Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol*, 99(10), 1370-1386. doi: 10.1113/expphysiol.2014.079475
- Marcaletti, S., Thomas, C., & Feige, J. N. (2011). Exercise Performance Tests in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1(1), 141-154. doi: 10.1002/9780470942390.mo100160
- Marques, M. J., Oggiam, D. S., Barbin, I. C., Ferretti, R., & Santo Neto, H. (2009). Long-term therapy with deflazacort decreases myocardial fibrosis in mdx mice. *Muscle Nerve*, 40(3), 466-468. doi: 10.1002/mus.21341
- Martinez-Micaelo, N., Gonzalez-Abuin, N., Terra, X., Richart, C., Ardevol, A., Pinent, M., & Blay, M. (2012). Omega-3 docosahexaenoic acid and procyanidins inhibit cyclooxygenase activity and attenuate NF-kappaB activation through a p105/p50 regulatory mechanism in macrophage inflammation. *Biochem J*, 441(2), 653-663. doi: 10.1042/BJ20110967
- Matecki, S., Guibinga, G. H., & Petrof, B. J. (2004). Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(4), R961-968. doi: 10.1152/ajpregu.00146.2004
- Matsakas, A., Yadav, V., Lorca, S., & Narkar, V. (2013). Muscle ERRgamma mitigates Duchenne muscular dystrophy via metabolic and angiogenic reprogramming. *Faseb j*, 27(10), 4004-4016. doi: 10.1096/fj.13-228296
- Matsumura, C., Pertille, A., C P Albuquerque, T., Santo Neto, H., & Marques, M. (2009). *Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of MDX mice from degeneration: A potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability* (Vol. 39).

- Matsumura, K., Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., & Campbell, K. P. (1992). Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature*, *360*(6404), 588-591. doi: 10.1038/360588a0
- Mazzone, E., Martinelli, D., Berardinelli, A., Messina, S., D'Amico, A., Vasco, G., Mercuri, E. (2010). North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, *20*(11), 712-716. doi: 10.1016/j.nmd.2010.06.014
- McAdam, L. C., Mayo, A. L., Alman, B. A., & Biggar, W. D. (2012). The Canadian experience with long-term deflazacort treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*, *31*(1), 16-20.
- McDonald, A. A., Hebert, S. L., Kunz, M. D., Ralles, S. J., & McLoon, L. K. (2015). Disease course in mdx:utrophin(+/-) mice: comparison of three mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Physiological Reports*, *3*(4), e12391. doi: 10.14814/phy2.12391
- McDonald, C., Bauer, J., Capra, S., & Waterhouse, M. (2013). Muscle function and omega-3 fatty acids in the prediction of lean body mass after breast cancer treatment. *Springerplus*, *2*, 681. doi: 10.1186/2193-1801-2-681
- McDonald, C. M., Henricson, E. K., Han, J. J., Abresch, R. T., Nicorici, A., Elfving, G. L., Miller, L. L. (2010). The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, *41*(4), 500-510. doi: 10.1002/mus.21544
- McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A., & Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*, *8*(3), 195-213. doi: 10.1242/dmm.018424
- McNally, E. M., Kaltman, J. R., Benson, D. W., Canter, C. E., Cripe, L. H., Duan, D., Markham, L. W. (2015). Contemporary cardiac issues in Duchenne muscular dystrophy. Working Group of the National Heart, Lung, and Blood Institute in collaboration with Parent Project Muscular Dystrophy. *Circulation*, *131*(18), 1590-1598. doi: 10.1161/circulationaha.114.015151
- Mendell, J. R., & Lloyd-Puryear, M. (2013). Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, *48*(1), 21-26. doi: 10.1002/mus.23810
- Messina, S., Bitto, A., Aguenouz, M., Mazzeo, A., Migliorato, A., Polito, F., Vita, G. (2009). Flavocoxid counteracts muscle necrosis and improves functional properties in mdx mice: a comparison study with methylprednisolone. *Exp Neurol*, *220*(2), 349-358. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.09.015

- Mickleborough, T. D. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in physical performance optimization. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 23(1), 83-96.
- Miller, W. T., & Shah, R. M. (2005). Isolated Diffuse Ground-Glass Opacity in Thoracic CT: Causes and Clinical Presentations. *American Journal of Roentgenology*, 184(2), 613-622. doi: 10.2214/ajr.184.2.01840613
- Miura, P., Chakkalakal, J. V., Boudreault, L., Belanger, G., Hebert, R. L., Renaud, J. M., & Jasmin, B. J. (2009). Pharmacological activation of PPARbeta/delta stimulates utrophin A expression in skeletal muscle fibers and restores sarcolemmal integrity in mature mdx mice. *Hum Mol Genet*, 18(23), 4640-4649. doi: 10.1093/hmg/ddp431
- Mori, T. A., Beilin, L. J., Burke, V., Morris, J., & Ritchie, J. (1997). Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(2), 279-286.
- Morrison-Nozik, A., Anand, P., Zhu, H., Duan, Q., Sabeh, M., Prosdocimo, D. A., Haldar, S. M. (2015). Glucocorticoids enhance muscle endurance and ameliorate Duchenne muscular dystrophy through a defined metabolic program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(49), E6780-E6789. doi: 10.1073/pnas.1512968112
- Nagaraju, K., Raben, N., Loeffler, L., Parker, T., Rochon, P. J., Lee, E., Plotz, P. (2000). Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16), 9209-9214.
- Nigro, G., Comi, L. I., Politano, L., & Bain, R. J. (1990). The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*, 26(3), 271-277.
- Nishizawa, H., Shiba, N., & Nakamura, A. (2018). Importance of long-term motor function evaluation after prednisolone treatment for Duchenne muscular dystrophy. *J Phys Ther Sci*, 30(9), 1211-1214. doi: 10.1589/jpts.30.1211
- Okano, T., Yoshida, K., Nakamura, A., Sasazawa, F., Oide, T., Takeda, S., & Ikeda, S. (2005). Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle Nerve*, 32(2), 191-199. doi: 10.1002/mus.20351
- Ozawa, E., Hagiwara, Y., & Yoshida, M. (1999). Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem*, 190(1-2), 143-151.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 221-233. doi: 10.1038/nrm2125

- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20(2), 87-103.
- Pauly, M., Daussin, F., Burelle, Y., Li, T., Godin, R., Fauconnier, J., Petrof, B. J. (2012). AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am J Pathol*, 181(2), 583-592. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.004
- Payne, E. T., Yasuda, N., Bourgeois, J. M., Devries, M. C., Rodriguez, M. C., Yousuf, J., & Tarnopolsky, M. A. (2006). Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in mdx mice. *Muscle Nerve*, 33(1), 66-77. doi: 10.1002/mus.20436
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 88(4), 1379-1406. doi: 10.1152/physrev.90100.2007
- Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. A., Hen, R., McKhann, G. M., Small, S. A. (2007). An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13), 5638-5643. doi: 10.1073/pnas.0611721104
- Pertille, A., de Carvalho, C. L., Matsumura, C. Y., Neto, H. S., & Marques, M. J. (2010). Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Int J Exp Pathol*, 91(1), 63-71. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00688.x
- Pescatori, M., Broccolini, A., Minetti, C., Bertini, E., Bruno, C., D'Amico, A., Ricci, E. (2007). Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *Faseb j*, 21(4), 1210-1226. doi: 10.1096/fj.06-7285com
- Pinto, W. B. V. d. R., & Ko, G. M. (2013). Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidas e das ataxias cerebelares. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, 1(2), 10.
- Pound, E. M., Kang, J. X., & Leaf, A. (2001). Partitioning of polyunsaturated fatty acids, which prevent cardiac arrhythmias, into phospholipid cell membranes. *J Lipid Res*, 42(3), 346-351.
- Quinlan, J. G., Hahn, H. S., Wong, B. L., Lorenz, J. N., Wenisch, A. S., & Levin, L. S. (2004). Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord*, 14(8-9), 491-496. doi: 10.1016/j.nmd.2004.04.007
- Radley-Crabb, H., Terrill, J., Shavlakadze, T., Tonkin, J., Arthur, P., & Grounds, M. (2012). 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. *Neuromuscul Disord*, 22(2), 170-182. doi: 10.1016/j.nmd.2011.07.008
- Radley, H. G., De Luca, A., Lynch, G. S., & Grounds, M. D. (2007). Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(3), 469-477. doi: 10.1016/j.biocel.2006.09.009
- Rafael, J. A., & Brown, S. C. (2000). Dystrophin and utrophin: genetic analyses of their role in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*, 48(3-4), 155-166. doi: 10.1002/(sici)1097-0029(20000201/15)48:3/4<155::aid-jemt4>3.0.co;2-0
- Rommelink, E., Aartsma-Rus, A., Smit, A. B., Verhage, M., & Loos, M. (2016). Cognitive flexibility deficits in a mouse model for the absence of full-length dystrophin. *15*(6), 558-567. doi: 10.1111/gbb.12301
- Rezende, E. L., Gomes, F. R., Malisch, J. L., Chappell, M. A., & Garland, T., Jr. (2006). Maximal oxygen consumption in relation to subordinate traits in lines of house mice selectively bred for high voluntary wheel running. *J Appl Physiol* (1985), 101(2), 477-485. doi: 10.1152/japplphysiol.00042.2006
- Rocco, A. B., Levalley, J. C., Eldridge, J. A., Marsh, S. A., & Rodgers, B. D. (2014). A novel protocol for assessing exercise performance and dystrophophysiology in the mdx mouse. *Muscle Nerve*, 50(4), 541-548. doi: 10.1002/mus.24184
- Safdar, A., Bourgeois, J. M., Ogborn, D. I., Little, J. P., Hettinga, B. P., Akhtar, M., Tarnopolsky, M. A. (2011). Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(10), 4135-4140. doi: 10.1073/pnas.1019581108
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z. P., Lecker, S. H., Spiegelman, B. M. (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16260-16265. doi: 10.1073/pnas.0607795103
- Sasaoka, T., Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Ozawa, E. (2003). Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscul Disord*, 13(3), 193-206.
- Schlanger, S., Shinitzky, M., & Yam, D. (2002). Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia*, 43(1), 103-104.
- Schnyder, S., & Handschin, C. (2015). Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1alpha, myokines and exercise. *Bone*, 80, 115-125. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.008

- Scott, O. M., Hyde, S. A., Goddard, C., Jones, R., & Dubowitz, V. (1981). Effect of exercise in Duchenne muscular dystrophy. *Physiotherapy*, 67(6), 174-176.
- Seiler, S. (2010). What is best practice for training intensity and duration distribution in endurance athletes? *Int J Sports Physiol Perform*, 5(3), 276-291.
- Seixas, S. L., Lagrota-Candido, J., Savino, W., & Quirico-Santos, T. (1997). [The importance of mdx mouse in the physiopathology of Duchenne's muscular dystrophy]. *Arq Neuropsiquiatr*, 55(3b), 610-617.
- Selsby, J. T., Morine, K. J., Pendrak, K., Barton, E. R., & Sweeney, H. L. (2012). Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1alpha involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse. *PLoS One*, 7(1), e30063. doi: 10.1371/journal.pone.0030063
- Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardi, M., & Munoz-Canoves, P. (2008). Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*, 7(1), 33-44. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.011
- Serrano, A. L., Mann, C. J., Vidal, B., Ardite, E., Perdiguero, E., & Munoz-Canoves, P. (2011). Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr Top Dev Biol*, 96, 167-201. doi: 10.1016/b978-0-12-385940-2.00007-3
- Sesay, A. K., Errington, M. L., Levita, L., & Bliss, T. V. (1996). Spatial learning and hippocampal long-term potentiation are not impaired in mdx mice. *Neurosci Lett*, 211(3), 207-210.
- Shaaban, A. A., Shaker, M. E., Zalata, K. R., El-kashef, H. A., & Ibrahim, T. M. (2014). Modulation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis by olmesartan and omega-3. *Chem Biol Interact*, 207, 81-91. doi: 10.1016/j.cbi.2013.10.008
- Shefer, G., Rauner, G., Yablonka-Reuveni, Z., & Benayahu, D. (2010). Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One*, 5(10), e13307. doi: 10.1371/journal.pone.0013307
- Siddiqui, R. A., Harvey, K. A., Ruzmetov, N., Miller, S. J., & Zaloga, G. P. (2009). n-3 fatty acids prevent whereas trans-fatty acids induce vascular inflammation and sudden cardiac death. *Br J Nutr*, 102(12), 1811-1819. doi: 10.1017/s0007114509992030
- Smith, E. M., Cadet, P., Stefano, G. B., Opp, M. R., & Hughes, T. K., Jr. (1999). IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J Neuroimmunol*, 100(1-2), 140-148.
- Snigdha, S., de Rivera, C., Milgram, N. W., & Cotman, C. W. (2014). Exercise enhances memory consolidation in the aging brain. *Front Aging Neurosci*, 6, 3. doi: 10.3389/fnagi.2014.00003

- Snow, W. M., Anderson, J. E., & Jakobson, L. S. (2013). Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(5), 743-752. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.03.016
- Song, Y., Rosenblum, S. T., Morales, L., Petrov, M., Greer, C., Globerman, S., & Stedman, H. H. (2017). Suite of clinically relevant functional assays to address therapeutic efficacy and disease mechanism in the dystrophic mdx mouse. *J Appl Physiol (1985)*, 122(3), 593-602. doi: 10.1152/jappphysiol.00776.2016
- Spurney, C. F., Gordish-Dressman, H., Guerron, A. D., Sali, A., Pandey, G. S., Rawat, R., Nagaraju, K. (2009). Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. *Muscle Nerve*, 39(5), 591-602. doi: 10.1002/mus.21211
- St Pierre, B. A., & Tidball, J. G. (1994). Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol (1985)*, 77(1), 290-297. doi: 10.1152/jappl.1994.77.1.290
- Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., Maguire, H. C., Panettieri, R. A., Petrof, B., Kelly, A. M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 352(6335), 536-539. doi: 10.1038/352536a0
- Strle, K., McCusker, R. H., Tran, L., King, A., Johnson, R. W., Freund, G. G., Kelley, K. W. (2007). Novel activity of an anti-inflammatory cytokine: IL-10 prevents TNF α -induced resistance to IGF-I in myoblasts. *J Neuroimmunol*, 188(1-2), 48-55. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.05.003
- Su, H. M. (2010). Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem*, 21(5), 364-373. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.11.003
- Taniguti, A. P., Matsumura, C. Y., Rodrigues-Simioni, L., Santo Neto, H., & Marques, M. J. (2012). Suramin affects metalloproteinase-9 activity and increases beta-dystroglycan levels in the diaphragm of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Muscle Nerve*, 46(5), 810-813. doi: 10.1002/mus.23468
- Taniguti, A. P., Pertille, A., Matsumura, C. Y., Santo Neto, H., & Marques, M. J. (2011). Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- β 1 blocker. *Muscle Nerve*, 43(1), 82-87. doi: 10.1002/mus.21869
- Tartibian, B., Hajizadeh Maleki, B., Kanaley, J., & Sadeghi, K. (2011). Long-term aerobic exercise and omega-3 supplementation modulate osteoporosis through inflammatory

- mechanisms in post-menopausal women: a randomized, repeated measures study. *Nutr Metab (Lond)*, 8, 71. doi: 10.1186/1743-7075-8-71
- Tartibian, B., Maleki, B. H., & Abbasi, A. (2011). Omega-3 fatty acids supplementation attenuates inflammatory markers after eccentric exercise in untrained men. *Clin J Sport Med*, 21(2), 131-137. doi: 10.1097/JSM.0b013e31820f8c2f
- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J Vis Exp*(91), 51785. doi: 10.3791/51785
- Terada, S., Kawanaka, K., Goto, M., Shimokawa, T., & Tabata, I. (2005). Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 184(1), 59-65. doi:10.1111/j.1365-201X.2005.01423.x
- Tidball, J. G., & Villalta, S. A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298(5), R1173-1187. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009
- Tidball, J. G., & Wehling-Henricks, M. (2007). The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* (1985), 102(4), 1677-1686. doi: 10.1152/japplphysiol.01145.2006
- Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M., & Davies, K. (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*, 4(12), 1441-1444. doi: 10.1038/4033
- Tomic, R., Lassiter, C. C., Ritzenthaler, J. D., Rivera, H. N., & Roman, J. (2005). Anti-tissue remodeling effects of corticosteroids: fluticasone propionate inhibits fibronectin expression in fibroblasts. *Chest*, 127(1), 257-265. doi: 10.1378/chest.127.1.257
- Torres, L. F., & Duchon, L. W. (1987). The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, 110 (Pt 2), 269-299.
- Tsuchiya, Y., Yanagimoto, K., Nakazato, K., Hayamizu, K., & Ochi, E. (2016). Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids-rich fish oil supplementation attenuates strength loss and limited joint range of motion after eccentric contractions: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Eur J Appl Physiol*, 116(6), 1179-1188. doi: 10.1007/s00421-016-3373-3
- Tuazon, M. A., & Henderson, G. C. (2012). Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipid is altered in mdx mice and is predictive of disease markers. *Metabolism*, 61(6), 801-811. doi: 10.1016/j.metabol.2011.10.019

- Vaillend, C., Billard, J. M., Claudepierre, T., Rendon, A., Dutar, P., & Ungerer, A. (1998). Spatial discrimination learning and CA1 hippocampal synaptic plasticity in mdx and mdx3cv mice lacking dystrophin gene products. *Neuroscience*, 86(1), 53-66.
- Vaillend, C., Billard, J. M., & Laroche, S. (2004). Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiol Dis*, 17(1), 10-20. doi: 10.1016/j.nbd.2004.05.004
- Van Damme, P., Leyssen, M., Callewaert, G., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2003). The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 343(2), 81-84.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, 25(38), 8680-8685. doi: 10.1523/jneurosci.1731-05.2005
- van Putten, M., Kumar, D., Hulsker, M., Hoogaars, W. M., Plomp, J. J., van Opstal, A., Aartsma-Rus, A. (2012). Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. *Neuromuscul Disord*, 22(5), 406-417. doi: 10.1016/j.nmd.2011.10.011
- Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-452. doi: 10.1146/annurev.iy.10.040192.002211
- Vieira Ramos, G., Choqueta de Toledo-Arruda, A., Maria Pinheiro-Dardis, C., Liyoko Suehiro, C., Luiz de Russo, T., Vieira, R. P., Durigan, J. L. Q. (2018). Exercise Prevents Diaphragm Wasting Induced by Cigarette Smoke through Modulation of Antioxidant Genes and Metalloproteinases. *BioMed research international*, 2018, 5909053-5909053. doi: 10.1155/2018/5909053
- Villalta, S. A., Deng, B., Rinaldi, C., Wehling-Henricks, M., & Tidball, J. G. (2011). IFN-gamma promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J Immunol*, 187(10), 5419-5428. doi: 10.4049/jimmunol.1101267
- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T., & Tidball, J. G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 18(3), 482-496. doi: 10.1093/hmg/ddn376
- Villalta, S. A., Rosenthal, W., Martinez, L., Kaur, A., Sparwasser, T., Tidball, J. G., Bluestone, J. A. (2014). Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular

- dystrophy. *Science translational medicine*, 6(258), 258ra142-258ra142. doi: 10.1126/scitranslmed.3009925
- Wang, C., Liu, W., Yao, L., Zhang, X., Zhang, X., Ye, C., Ai, D. (2017). Hydroxyeicosapentaenoic acids and epoxyeicosatetraenoic acids attenuate early occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *174*(14), 2358-2372. doi: 10.1111/bph.13844
- White, J. P., Reecy, J. M., Washington, T. A., Sato, S., Le, M. E., Davis, J. M., Carson, J. A. (2009). Overload-induced skeletal muscle extracellular matrix remodelling and myofibre growth in mice lacking IL-6. *Acta Physiol (Oxf)*, 197(4), 321-332. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.02029.x
- Whitehead, N. P., Pham, C., Gervasio, O. L., & Allen, D. G. (2008). N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J Physiol*, 586(7), 2003-2014. doi: 10.1113/jphysiol.2007.148338
- Whitehead, N. P., Yeung, E. W., & Allen, D. G. (2006). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(7), 657-662. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04394.x
- Whittemore, L. A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., Wolfman, N. M. (2003). Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(4), 965-971.
- Williams-Bey, Y., Boularan, C., Vural, A., Huang, N. N., Hwang, I. Y., Shan-Shi, C., & Kehrl, J. H. (2014). Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF-kappaB activation and enhancing autophagy. *PLoS One*, 9(6), e97957. doi: 10.1371/journal.pone.0097957
- Willmann, R., De Luca, A., Benatar, M., Grounds, M., Dubach, J., Raymackers, J. M., & Nagaraju, K. (2012). Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 22(1), 43-49. doi: 10.1016/j.nmd.2011.04.012
- Wu, A., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2008). Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience*, 155(3), 751-759. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.05.061
- Yamada, H., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Zhong, D., Hase, A., Arai, K., Matsumura, K. (2001). Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet*, 10(15), 1563-1569.

- Yamori, Y., Nara, Y., Iritani, N., Workman, R. J., & Inagami, T. (1985). Comparison of serum phospholipid fatty acids among fishing and farming Japanese populations and American inlanders. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 31(4), 417-422.
- Yao, J., Lu, Y., Zhi, M., Hu, P., Wu, W., & Gao, X. (2017). Dietary n3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPARgamma/NFAT. *Mol Med Rep*, 16(6), 8315-8322. doi: 10.3892/mmr.2017.7673
- Yin, H., Saleh, A. F., Betts, C., Camelliti, P., Seow, Y., Ashraf, S., Wood, M. J. (2011). Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(7), 1295-1303. doi: 10.1038/mt.2011.79
- Zebrowska, A., Mizia-Stec, K., Mizia, M., Gasior, Z., & Poprzecki, S. (2015). Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and maximal oxygen uptake in endurance-trained athletes. *Eur J Sport Sci*, 15(4), 305-314. doi: 10.1080/17461391.2014.949310
- Zeiger, U., Mitchell, C. H., & Khurana, T. S. (2010). Superior calcium homeostasis of extraocular muscles. *Exp Eye Res*, 91(5), 613-622. doi: 10.1016/j.exer.2010.07.019
- Zhao, P., Iezzi, S., Carver, E., Dressman, D., Gridley, T., Sartorelli, V., & Hoffman, E. P. (2002). Slug is a novel downstream target of MyoD. Temporal profiling in muscle regeneration. *J Biol Chem*, 277(33), 30091-30101. doi: 10.1074/jbc.M202668200

ANEXO A



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Terapia farmacológica com deflazacorte e ômega-3 na distrofinopatias de camundongos mdx exercitados na esteira, registrada com o nº 4634-1/2017, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Julia Marques e Paula Andrea Saenz Suarez, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de 06 de julho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2017-01/03/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	06/07/2017-01/03/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10ScCr/PasUnib
No. de animais:	10
Peso / Idade:	11 meses / 30g
Sexo:	05 machos / 05 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib
No. de animais:	40
Peso / Idade:	11 meses / 30g
Sexo:	20 machos / 20 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBIO** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 06 de julho de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO B**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **TERAPIA FARMACOLOGICA COM DEFLAZACORTE E OMEGA-3 NA DISTROFINOPATIA DE CAMUNDONGOS mdx EXERCITADOS NA ESTEIRA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30/04/2019

Assinatura : Paula Andrea Saenz Suarez
Nome do(a) autor(a): **PAULA ANDREA SAENZ SUAREZ**
RG n.º G277210-T

Assinatura : Maria Julia Marques
Nome do(a) orientador(a): **MARIA JULIA MARQUES**
RG n.º 13939051