



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Reinaldo Carlos Bonjorno

Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e da melatonina nos músculos
esquelético e cardíaco de camundongos *mdx*.

São Carlos- SP

2023

Reinaldo Carlos Bonjorno

Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e da melatonina nos músculos esquelético e cardíaco de camundongos *mdx*.

Projeto de Pesquisa apresentado à Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, como requisito da defesa de Mestrado, no Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF.

Área de Concentração: Fisiologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

São Carlos- SP

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Reinaldo Carlos Bonjorno, realizada em 06/12/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anabelle Silva Comachione (UFSCar)

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma (UNIARA)

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq) – sob o processo nº131521/2021-7.

FICHA CATALOGRÁFICA

BONJORNO, Reinaldo C

Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e da melatonina nos músculos esquelético e cardíaco de camundongos *mdx*. Reinaldo Carlos Bonjorno. 2023.

76 p.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.
Área de concentração: Fisiologia. 2021. 1.

1. Distrofia Muscular de Duchenne.
2. Camundongos *mdx*.
3. Exercício Aeróbio de Baixa Intensidade.
4. Melatonina.
5. Células Satélites.
6. Imunofluorescência.

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa, que sinaliza o final de um ciclo, ciclo cheio de percalços que trouxe muito conhecimento e experiências maravilhosas, a minha filha amada **Cyndy Bonjorno** que foi, e é a minha maior motivação para continuar mesmo nos momentos mais difíceis!

Obrigado,
Amo você!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter me dado força para superar todas as dificuldades e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, principalmente nos últimos anos, sempre cuidando e me direcionando para que eu possa seguir em frente e lutar pelos meus sonhos.

Agradeço aos meus pais **Pedro Alcindo Bonjorno** (*in memoriam*) e **Sebastiana de Fatima de Oliveira**, exemplos de simplicidade, humildade e honestidade pessoas que sem eles nada disso seria possível.

Meu agradecimento mais **especial** vai à minha orientadora **Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione**, por ser a pessoa que mais me incentivou e me apoiou durante todo esse percurso, até mesmo quando as dificuldades e problemas passavam dos limites acadêmicos, quando o mundo parecia estar desabando, ela sempre tinha uma palavra de apoio, incentivo e uma direção para apontar. Agradeço por todos os ensinamentos, críticas e “puxadas de orelha” que me fizeram crescer. Com uma postura impecável, sempre otimista e alegre, um exemplo de pessoa, de docente e pesquisadora. Serei eternamente grato.

Agradeço a **CNPQ** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro, que teve grande importância no desenvolvimento deste projeto, sob o processo nº 131521/2021-7.

Agradeço também,

A todos os meus **familiares e amigos** por todo apoio, incentivo e compreensão durante todo o período de desenvolvimento desse projeto.

As colegas de laboratório que me ensinaram e auxiliaram durante todo o projeto, nas análises, pesquisas e treinamento, **Ms. Emilly Sigoli** e **Rosangela Aline Antão** que fizeram toda a diferença para o desenvolvimento desse estudo.

A técnica e colega de Laboratório **Ms. Tatiana passos de Araújo**, que me ensinou os primeiros passos dentro do laboratório e auxiliou durante todo o projeto.

Ao **Prof. Dr. Wladimir** do laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico, e aos seus alunos, pela troca de conhecimento e por todo auxílio.

Ao **Prof. Dr. Gerson** do laboratório de Farmacologia Cardiovascular por todo auxílio.

A **Profa. Dr. Heloisa** do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, por nos permitir utilizar o equipamento ImageXpress.

A **Profa. Dra. Daiane Leite da Roza**, Departamento de Epidemiologia - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.

“Não temas, por que eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”

(Isaias, 41,10)

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) afeta 1 a cada 5000 meninos nascidos vivos, atinge o cromossomo X, responsável pela síntese da proteína distrofina que mantém a estabilidade da membrana celular. Sua ausência causa rupturas, necroses e aumento dos níveis séricos de enzimas citoplasmáticas o que ativa as proteases estimulando a degeneração das fibras musculares. O diagnóstico é feito através de exames, tais como: biópsia muscular, dosagem de Creatina Quinase (CK) e DNA. Devido as lesões recorrentes, células satélites (CS) são constantemente ativadas. Dessa maneira as CS entram em exaustão, reduzindo o “pool” de células quiescentes, afetando o processo regenerativo. O exercício físico mostra ser eficiente na terapêutica de pacientes com DMD. Estudos com animais *mdx* mostraram que o exercício físico de baixa intensidade aumentou a expressão de CS, da massa muscular, de força e melhora na citoarquitetura tecidual. Em paralelo as terapias com exercício, a DMD também é alvo de terapias farmacológicas. A droga mais comum utilizada é o cortisol, pois é capaz de reduzir significativamente processo degenerativo das fibras musculares, porém apresenta muitos efeitos colaterais indesejáveis. Atualmente, a melatonina vem sendo foco de muitas investigações científicas, pois apresenta diversas funcionalidades no organismo, além de ação antioxidante e anti-inflamatória. Visando o poder antioxidante e anti-inflamatório, estudos mostraram que pacientes com DMD aumentaram a expressão de citocinas anti-inflamatórias e redução significativa de marcadores de necrose muscular. O uso de melatonina mostrou aumentar o número de células satélites, melhorar a força e a morfologia do músculo esquelético normal, após exercício. **Objetivo:** Analisar as características morfofuncionais e bioquímicas de músculos distróficos, esquelético e cardíaco, após tratamento com melatonina associada ao exercício. **Resultados:** O teste de preensão palmar mostrou que o exercício associado a melatonina induziu aumento de força de preensão significativa nos animais *mdx*TRM em relação aos *mdx*TR. Na análise morfológica dos músculos esqueléticos e cardíacos, mostrou melhora na morfologia tecidual dos animais tratados com melatonina em relação aos que não receberam. Com relação as células satélites o grupo *mdx*TR apresentou maior número de CS ativas em proliferação. Para CS em diferenciação os grupos *mdx* e *mdx*M, apresentaram maior número de CS, quando comparados aos grupos treinados. Na técnica de *Western Blot* mostrou aumento na expressão de utrofina no músculo cardíaco dos animais do grupo *mdx*TRM. **Conclusão:** Tanto exercício quanto a melatonina melhoraram a morfologia dos músculos psoas,

cardíaco e função muscular esquelética, quando associados essas características morfofuncionais foram ainda mais expressivas.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne, Camundongos *mdx*, Melatonina, exercício aeróbico de baixa intensidade, utrofina, células satélites, músculo esquelético e músculo cardíaco.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), affecting 1 in every 5,000 live births, affects the X chromosome, responsible for the synthesis of the dystrophin protein that maintains the stability of the cell membrane, making it resistant to mechanical forces. It causes ruptures, necrosis, and increased serum levels of cytoplasmic enzymes, which activate proteases, stimulating the degeneration of muscle fibers. The diagnosis is made through clinical examinations such as: muscle biopsy, Creatine Kinase (CK), and DNA measurement. Due to recurrent injuries, satellite cells are constantly activated to carry out the tissue repair process. In this way, these cells end up entering an exhaustion process, reducing the “pool” of quiescent cells, and affecting the regenerative process. Physical exercise is an important and low-cost therapy that has been explored in the rehabilitation of patients with DMD. Studies show that a lack of physical activity can determine changes in the functionality of the muscular, cardiac, and respiratory systems. Experimental studies with *mdx* mice have shown that low-intensity physical exercise increases the expression of CS, muscle mass, and strength and improves tissue cytoarchitecture. In parallel to therapies through physical exercise, DMD is also targeted by drugs. The most common of these is cortisol, a drug that is capable of significantly reducing the degenerative process of muscle fibers, but, on the other hand, causes side effects. Currently, melatonin has become the focus of research in the process of muscle regeneration after injury. Melatonin has several functions in the body, in addition to antioxidant and anti-inflammatory actions. Aiming at antioxidant and anti-inflammatory power, studies have shown that patients with DMD have increased expression of anti-inflammatory cytokines and these same authors have found a significant reduction in muscle necrosis markers. Exogenous administration of melatonin has been shown to increase the number of satellite cells and improve the strength and tissue morphology of normal skeletal muscles after physical exercise. **Objective:** Our objective was to analyze the morphofunctional and biochemical characteristics of dystrophic, skeletal, and cardiac muscles, after treatment with melatonin associated with low-intensity physical exercise. **Results:** The handgrip test showed that low-intensity aerobic exercise associated with melatonin induced a significant increase in grip strength in *mdx*TRM animals compared to *mdx*TR. In the morphological analysis of skeletal and cardiac muscles, it was possible to observe an improvement in the tissue morphology of the animals that were treated with melatonin in relation to the groups that did not receive the i.p. application. of melatonin. Regarding satellite cells, we can observe that the groups that completed the 21 training sessions presented greater PAX7 content, with the *mdx*TR group being the one that presented greater

content compared to all other groups. For myogenin, the *mdx* and *mdxM* groups showed higher CS content in the fusion and differentiation phase, when compared to the trained groups. Using the *Western Blot* technique, we obtained promising results regarding the expression of the utrophin protein in the heart muscle, even without statistical significance.” The procedures imposed separately showed an increase in utrophin content when compared to the *mdx* group. The association of exercise and melatonin proved to be more efficient in morphology and in increasing the expression of utrophin. **Conclusion:** Both low-intensity aerobic exercise and melatonin improved the morphology of the psoas and cardiac muscles and also skeletal muscle function and when combined, these morphofunctional characteristics were even more expressive.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, *mdx* mice, melatonin, low-intensity aerobic exercise, utrophin, satellite cells skeletal muscle, cardiac muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de diferenciação e desenvolvimento do músculo esquelético.....	26
Figura 2. Imagem ilustrativa da interação da proteína distrofina entre citoesqueleto e matriz extracelular.....	28
Figura 3. Imagem ilustrativa das fases da célula satélite (CS) no processo de reparo do músculo esquelético.....	29
Figura 4. Esquema de síntese da melatonina a partir do triptofano.....	38
Figura 5. Foto dos animais alocados em gaiolas.....	41
Figura 6. Foto da esteira e dos animais em treinamento.....	41
Figura 7. Foto Aplicação de Melatonina intraperitoneal.....	42
Figura 8. Foto do aparelho <i>grip strength</i> da Insight e do teste palmar em execução.....	43
Figura 9. Linha do tempo dos procedimentos com os camundongos <i>mdx</i> utilizados no estudo.....	44
Figura 10. Foto da técnica de criotomia sendo realizada no criostato Leica.....	45
Figura 11. Gráfico teste de preensão palmar.....	48
Figura 12. Fotos do músculo psoas corados em Hematoxilina e Eosina (HE).....	49
Figura 13. Fotos dos músculos cardíacos corados em Hematoxilina e Eosina (HE).....	50
Figura 14. Fotomicrografias de lâminas processadas com anticorpo para distrofina.....	51
Figura 15. Fotomicrografia de cortes transversais do músculo psoas de camundongos <i>mdx</i> marcados com o anticorpo para Laminina, PAX7 e sobreposição do DAPI para marcação dos núcleos.....	52
Figura 16. Quantificação de células satélites em fase de quiescência e ativação com anticorpo específico para marcação de PAX7.....	52
Figura 17. Fotomicrografia de cortes transversais do músculo psoas de camundongos <i>mdx</i> marcados com o anticorpo para Laminina, MIOGENINA e sobreposição do DAPI para marcação dos núcleos.....	53
Figura 18. Quantificação de células satélites em fase de diferenciação e fusão marcadas com anticorpo F5D anticorpos específicos para miogenina.....	53

Figura 19. Conteúdo de proteína utrofina presente no músculo cardíaco dos grupos em estudo.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações morfológicas do músculo psoas dos grupos estudados.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFMK:** N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina
- AMK:** N¹-acetil-5-metoxiquinuramina
- ATP:** Adenosina trifosfato
- CS:** Célula Satélite
- DMD:** Distrofia Muscular de Duchenne
- DAPC:** Complexo proteico associado à distrofina
- DAPI:** Diamidino-2-phenylindole
- ERN:** Espécies reativas de nitrogênio
- ERO:** Espécies reativas de oxigênio
- HE:** Hematoxilina e Eosina
- IF:** Imunofluorescência
- i.p.:** Intraperitoneal
- mdx*:** Modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne
- MOM:** Mouse on Mouse
- NAT:** Arilakitamina-N-acetiltransferase
- NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- PBS:** Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato salino)
- PV:** Peso Vivo
- ROR:** Receptores orfão para retinoide
- RZR:** Receptores Z para retinóides
- TNF:** Fator de necrose tumoral
- WT:** Wild type (Tipo selvagem)

LISTA DE SÍMBOLOS

cm: Centímetro

g: Grama

kg: quilograma

m: Metro

mm: Milímetro

m/min: Metros por minuto

min: Minuto

mg/kg: Miligramas por quilograma

s: Segundo

μm: Micrómetro

°C: Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	24
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	24
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 <i>Músculo Esquelético</i>	25
3.1.1 <i>Miogênese</i>	25
3.1.2 <i>Músculo esquelético adulto</i>	26
3.2 <i>Alterações do músculo esquelético</i>	28
3.2.1 <i>Lesão e Regeneração Muscular</i>	28
3.2.2 <i>DMD e camundongos mdx</i>	30
3.2.3 <i>Musculo Cardíaco na DMD</i>	31
3.3 <i>Recursos terapêuticos</i>	33
3.3.1 <i>Não farmacológicos</i>	33
3.3.2 <i>Farmacológicos</i>	35
3.3.3 <i>Farmacocinética e farmacodinâmica da melatonina</i>	37
4. MÉTODOS.....	40
4.1 <i>Animais</i>	40
4.2 <i>Treinamento</i>	41
4.3 <i>Administração intraperitoneal de Melatonina</i>	41
4.4 <i>Teste de prensão palmar</i>	42
4.5 <i>Histologia Básica</i>	45
4.6 <i>Imunofluorescência para distrofina e células satélite</i>	45
4.7 <i>Western Blotting para utrofina no músculo cardíaco</i>	46
4.8 <i>Estatística</i>	47
5. RESULTADOS	47

5.1	<i>Teste Preensão Palmar</i>	47
5.2	<i>Histologia Básica dos Músculos Esquelético e Cardíaco</i>	48
5.3	<i>Imunofluorescência</i>	51
5.3.1	<i>Distrofina no músculo psoas</i>	51
5.3.2	<i>Células Satélites no músculo psoas</i>	51
5.4	<i>Conteúdo Proteico de Utrofina no Músculo Cardíaco</i>	54
6.	DISCUSSÃO	54
6.1	<i>Os efeitos da melatonina associada ao exercício aeróbico de baixa intensidade no músculo esquelético</i>	55
6.2	<i>Os efeitos da melatonina associada ao exercício aeróbico de baixa intensidade no músculo cardíaco</i>	59
7.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	60
8.	IMPLICAÇÕES CLÍNICAS	61
9.	REFERÊNCIAS	61

1. Introdução

Distrofia Muscular (DM) é um grupo de doenças genéticas mais frequente em todo o mundo. De um modo geral, devido a uma mutação genética, os músculos perdem o movimento voluntário e enfraquecem significativamente. Afetando 01 em cada 5.000 meninos nascidos vivos a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), é a DM mais severa, que atinge o braço curto do cromossomo X, locus xp21s, sub banda Xp212, responsável pela síntese da proteína distrofina, encontrada no sarcolema da membrana das fibras musculares (CAROMANO 1999; BONILLA et al. 1988). A distrofina é uma proteína localizada na membrana plasmática cuja forma é alongada, sua região carboxi-terminal se liga com o complexo de glicoproteínas da membrana celular e sua região amino-terminal interage com os filamentos de actina nas fibras celulares (GILLIS, 1996), mantendo a estabilidade da membrana celular, tornando-a resistente as forças mecânicas.

A distrofina também é responsável pela ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular através de um complexo formado com outras proteínas e em conjunto com glicoproteínas age na maturação dos receptores e na junção neuromuscular (MATSUMURA et al., 1993). A ausência dessa proteína na membrana celular causa rupturas, necroses, aumento dos níveis séricos de enzimas citoplasmáticas, aumento dos níveis de cálcio intracelular, o que ativa as proteases estimulando a degeneração das fibras musculares (DE BACKER et al., 2002; GILLIS, 1996; GLESBY et al., 1988).

O diagnóstico da DMD é feito através de exames clínicos tais como: biópsia muscular, dosagem da proteína Creatina Quinase (CK) e DNA (SANTOS, REZENDE, TERNI, et al. 2006). A dosagem da CK é um exame laboratorial mais comumente utilizado para diagnóstico da DMD. Esta proteína é um importante marcador bioquímico pois, quando há lesões tanto no músculo esquelético como cardíaco, ela é liberada na corrente sanguínea, aumentando sua concentração sérica (FACHARDO, et al., 2004; CAROMANO, 1999; REED, 1996). Nos portadores de DMD é possível observar alta concentração desta proteína, devido às recorrentes lesões nas fibras musculares esqueléticas (THOMASSIAN et al., 2007; PASTORET; SEBILLE, 1995; GLESBY et al., 1988). Devido as lesões recorrentes, células satélites são constantemente ativadas para realizar o processo de reparo tecidual.

As CS são células mononucleadas não diferenciadas (indiferenciadas) que se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema da célula muscular. Essas células normalmente estão em estado de quiescência (inativas) e são ativadas quando uma fibra muscular sofre algum tipo de lesão, sendo assim elas se proliferam, se diferenciam e se fundem na célula lesada podendo determinar hipertrofia ou hiperplasia, quando se fundem entre si. Durante as fases de ativação, proliferação e diferenciação são expressos fatores de transcrição miogênicos ou fatores regulatórios miogênicos (MRFs). Esses fatores podem ser utilizados como marcadores para identificação dessas células nas diferentes fases, como é feito na técnica de imunofluorescência, por exemplo. O Pax-7 é expresso durante a fase de quiescência e ativação das CS, Myod (Myf-3) e Myf-5 são expressos durante a fase de proliferação, já os MRF-4 e a miogenina (Myf-1) são expressos durante a fase de diferenciação e fusão da CS (SIGOLI et al., 2022; QAISAR, 2021; SOUZA et al., 2015).

Na DMD o processo de reparo é bem similar quando comparado a um músculo saudável, porém devido a fragilidade da membrana celular e as recorrentes lesões, as CS são recrutadas frequentemente passando por um ciclo contínuo de lesão e regeneração. Dessa maneira essas células acabam entrando em um processo de exaustão reduzindo o “*pool*” de células quiescentes. Normalmente, quando ocorre uma lesão algumas células são ativadas e se proliferam para realizar o processo de reparo, enquanto outras retornam ao “*pool*” de quiescência, caso haja uma nova lesão. Contudo, por apresentarem limitação na capacidade proliferativa, esses ciclos contínuos de degeneração e regeneração, observados em músculos distróficos, levam ao envelhecimento das CS afetando todo o processo de reparo celular (FOSCHINI et al., 2004; RENAULT e t al., 2000). Os músculos distróficos são cada vez mais comprometido, na morfologia e função, com o passar do tempo. Contudo, existem alguns tratamentos que se mostrando promissores no retardo da evolução das alterações deletérias desse tecido, podendo assim, prolongar a sobrevida de portadores da DMD.

O exercício físico é uma terapêutica importante e de baixo custo que vem sendo explorada na reabilitação de pacientes com DMD. Apesar de estudos mostrarem que o exercício físico pode ser uma ferramenta importante na reabilitação de músculos distróficos, existem controvérsias na literatura científica, pois esses autores se apoiam na premissa que portadores da DMD são mais susceptíveis à lesão e apresentam dificuldades importantes no processo de regeneração (CARAMANO, 1999), não podendo assim serem

submetidos a exercícios físicos. Já está documentado na literatura científica que, o exercício físico determina microlesões no músculo esquelético, e conseqüentemente aumenta o conteúdo da CK no sangue onde, os maiores picos de concentração são após 24 a 72 horas (BAIRD, M.P., et al, 2012; UCHIDA, M.C., et al, 2009). Por outro lado, estudos mostram que a falta de atividade física pode determinar alterações na funcionalidade dos sistemas muscular, cardíaco e respiratório, dessa forma a prática de atividades físicas para portadores da DMD, quando elaborada e programada de forma cuidadosa baseando-se em avaliações funcionais do paciente, pode ser fundamental para garantir uma melhor qualidade de vida. Estudos experimentais com camundongos *mdx* tem mostrado que o exercício físico de baixa intensidade aumenta a expressão de CS, da massa muscular, de força e melhora a citoarquitetura tecidual (SIGOLLI et al., 2022; PEDRAZZANI, P.; CORNACHIONE, A.S, 2021; MCGREEVY et al., 2015; ALEMDAROGLU, et al., 2015; EAGLE, et al., 2002; DE LUCA et al., 2003; RENAULT e t al., 2000; BRUSSEE et al., 1997; WELLER et al., 1990).

Paralelamente às terapias através de exercício físico, a DMD também é alvo de fármacos. O mais comum deles no tratamento de pacientes com DMD é o cortisol. Esta droga é capaz de reduzir significativamente o processo degenerativo das fibras musculares, mas, por outro lado, determina efeitos colaterais que podem restringir o indivíduo de realizar com êxito suas atividades de vida diária (BELLO, L. et al., 2015; REITTER, B., 1995). Atualmente, a melatonina vem se tornando foco de investigação no processo de regeneração muscular após lesão, porém, poucos são os estudos que relacionam os efeitos da administração exógena desta droga em músculos distróficos.

A melatonina apresenta diversas funcionalidades no organismo, tais como: controle do ritmo circadiano, controle do sono, atua nos processos digestivos, tem ação antioxidantes e anti-inflamatórios, entre outras (CIPOLLA-NETO et al., 2014; TEODORO et al., 2014; PHILLIPSON, 2014; DEVAVRY et al., 2012; JOCKERS et al., 2008; CARLONI et al., 2008; KIREEV et al., 2008; CAballero et al., 2008; GHOSH et al., 2007; BOUTIN et al., 2005). Já é sabido que durante a contração de músculos distróficos ocorre aumento do stress oxidativo (hiperoxidatividade) (Reid; Durham, 2002) fato este, que torna o tecido mais susceptível a lesões devido ao aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (RANDO et al., 2008). Visando o poder antioxidante e anti-inflamatório, estudo conduzido por Chahnouni e colaboradores (2010), mostrou que pacientes com DMD aumentaram a expressão de citocinas anti-inflamatórias (interleucinas 1 β , 2, 6 (IL-1 β , IL-2, IL-6; fator de necrose tumoral - α (TNF- α)) após nove

meses de tratamento com melatonina. Chahnouni et al., (2010; 2011) observaram redução do stress oxidativo em paciente tratados por melatonina por 9 e 3 meses. Esses mesmos autores constataram redução significativa de marcadores de necrose muscular, como creatina quinase (CK) e mioglobinas.

A administração exógena de melatonina tem mostrado aumentar o número de células satélites, melhorar a força e a morfologia tecidual de músculos esqueléticos normais, após exercício físico. Do mesmo modo, este fármaco tem mostrado ser efetivo no músculo distrófico aumentando a força redução dos níveis de CK e apresentando melhoras morfológicas estruturais dos tecidos do musculo esquelético de camundongos *mdx* (MEHANNA et al., 2017; STRATOS et al., 2012; HIBAOUI et al., 2011).

Esses estudos sugerem que a melatonina pode ser uma importante terapia na melhora da evolução das doenças em crianças portadoras da DMD. Contudo, são escassos na literatura científica estudos que abordam os efeitos benéficos do exercício de baixa intensidade associado ao tratamento da melatonina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Nosso objetivo foi analisar as características morfofuncionais e bioquímicas de músculos distróficos, esquelético e cardíaco, após tratamento com melatonina associada ao exercício físico de baixa intensidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a força de pressão palmar de camundongos *mdx* que foram submetidos ao tratamento com melatonina e treino, através da técnica de *grip strength*;

- Analisar a citoarquitura dos músculos psoas e cardíaco de camundongos *mdx* que foram submetidos ao tratamento com melatonina e treino e seus respectivos controles, através da técnica de histologia básica;

- Identificar e quantificar células satélites do músculo psoas de camundongos *mdx* que foram submetidos ao tratamento com melatonina e treino e seus respectivos controles, através da técnica de imunofluorescência.

- Quantificar o conteúdo da proteína utrofina no músculo cardíaco de animais *mdx* submetidos ao tratamento de melatonina e exercício e seus respectivos controles, através de técnica de *Western Blotting*.

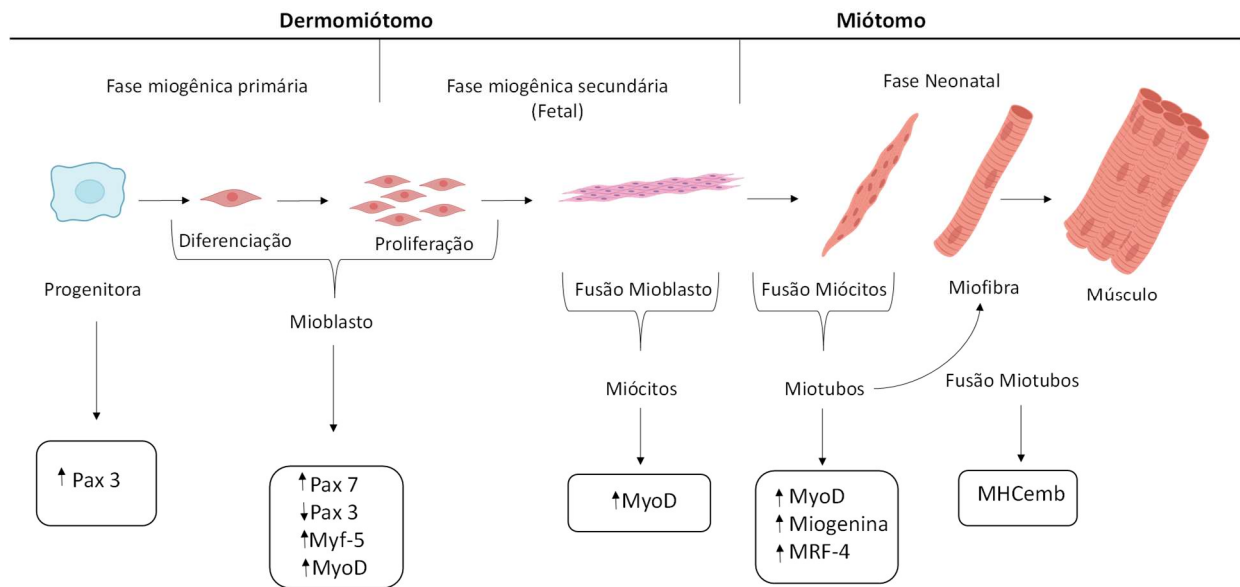
3. Revisão Da Literatura

3.1 Músculo Esquelético

3.1.1 Miogênese

O músculo esquelético em humanos, representa aproximadamente 40% da sua massa corporal, com funções estruturais, funcionais como movimento e locomoção, além de metabolismo energético (JUNG et al., 2019). Em vertebrados o músculo esquelético tem sua origem embrionária do dermomiótomo que é formado partir dos somitos derivados do mesoderma paraxial, com exceção os músculos craniofaciais e esofágicos que são formados a partir do mesoderma não segmentado (CARVALHO et al., 2019).

Durante as fases de diferenciação e desenvolvimento do músculo, são expressos alguns fatores de transcrição, conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRF's). Esses fatores são vias de sinalização para diferenciação e especificação das células mesodérmicas. Os MRF's são os responsáveis diretos em regular a migração, proliferação, diferenciação e maturação das células progenitoras durante a formação do músculo. O Pax3 é expresso na fase do dermomiótomo, também conhecida como fase embrionária ou miogênica primária. Na fase miogênica secundária ou fetal a expressão do Pax3 reduz concomitante ao aumento da expressão Pax 7 e Myf-5 pelos mioblastos. A fusão dos mioblastos dará início a formação dos miócitos, que posteriormente irão se fundir caracterizando a fase neonatal, ainda dentro da fase miogênica secundária. Os miócitos irão se proliferar e expressar MyoD onde na fase de diferenciação, eles se fundem dando origem aos miotubos multinucleados que expressam Miogenina e MRF-4. Por fim, a fusão dos miotubos formará as fibras musculares que expressarão cadeia pesada da miosina embrionária (MHCemb), e conseqüentemente ao músculo esquelético (FIGURA 1) (QAISAR, 2021; CARVALHO et al., 2019; CHANG e KIOUSSI, 2018; CHAL e PORQUIE, 2017; SOUZA et al., 2015).

Figura 1. Fases de diferenciação e desenvolvimento do músculo esquelético.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante a miogênese alguns mioblastos não se fundem dando origem as células satélites (CS), que permanecem no músculo adulto no estado de quiescência e irão participar diretamente do processo de reparo e desenvolvimento muscular pós-natal.

3.1.2 Músculo esquelético adulto

O músculo esquelético adulto é um tecido de controle voluntário, responsável por transformar energia química em energia mecânica promovendo o movimento, respiração, postura, proteção dos órgãos vitais e temperatura corporal (CIELO et al., 2011; PIOVESAN et al., 2009; CHARGÉ e RUDNICKI, 2004). O músculo é constituído por fascículos de fibras musculares que são células alongadas, cilíndricas e multinucleadas, formadas por milhares de miofibrilas, as quais tem como menor estrutura funcional os sarcômeros. Os sarcômeros são formados por um conjunto de proteínas, sendo que as principais são as proteínas contráteis actina e miosina arranjadas em paralelo, o que dará a aparência estriada a fibra muscular. Essa organização estrutural das proteínas origina bandas e linhas verticais. A linha Z limita as extremidades do sarcômero que durante a contração se aproximam da linha M, localizada no centro, encurtando (contração) o mesmo e gerando movimento da fibra e do próprio músculo.

A contração muscular é dependente de um potencial de ação gerado por um neurônio motor tipo alfa que quando tem sua membrana despolarizada libera acetilcolina

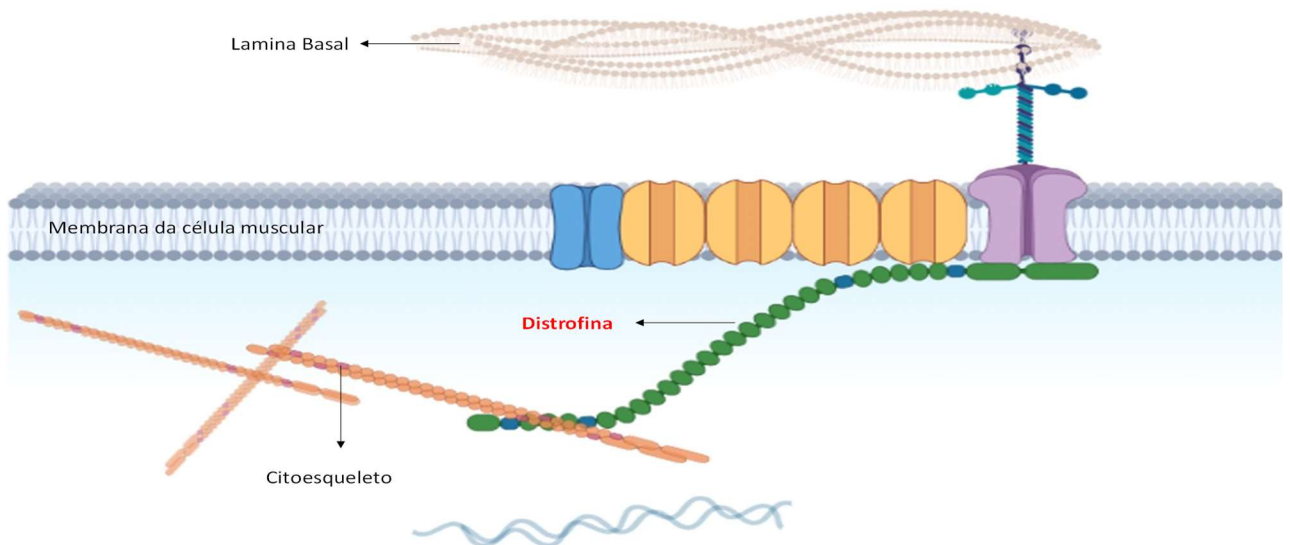
(neurotransmissor) na fenda sináptica da junção neuromuscular. Através da ligação da acetilcolina no receptor ionotrópico do tipo nicotínico, ocorrerá a despolarização da membrana muscular. A inversão abrupta de polaridade irá atingir os túbulos T, que são prolongamentos transversais da membrana da célula, ligados ao retículo sarcoplasmático, também conhecido como cisterna de íons cálcio (Ca^{2+}). O extravasamento de Ca^{2+} no citoplasma atingirá o sarcômero, onde se ligará à proteína troponina, que por sua vez sofre mudança conformacional e move a tropomiosina do sítio de ligação da actina, para que a miosina possa acoplar e formar as pontes cruzadas (GUYTON, 2011; SILVERTHORN, 2010).

Para que todos os mecanismos envolvidos na contração muscular ocorram com sucesso, é importante a integridade da membrana e das estruturas que a compõe. A membrana celular, também conhecida como sarcolema, é essencial para a sobrevivência da célula, ela é formada por uma bicamada lipídica que interagem com proteínas estruturais, transportadoras e receptoras. As proteínas estruturais fazem a ligação do citoesqueleto, local onde se encontra o aparato contrátil, à membrana e matriz extracelular para manter sua forma, estrutura, e integridade celular durante a contração. A distrofina faz parte do grupo de proteínas estruturais e apresenta função importante tanto no desenvolvimento muscular quanto no reparo tecidual (DE BACKER et al., 2002; GILLIS, 1996; GLESBY et al., 1988).

A distrofina é uma proteína de 427 kDa, codificada e sintetizada na região xp21, sub banda Xp212 do cromossomo X, encontrada no sarcolema das fibras musculares, apresenta forma alongada onde sua região carboxi-terminal se liga ao complexo de glicoproteínas da membrana celular, e sua região amino-terminal interage com os filamentos de actina, ligando o citoesqueleto com a matriz extracelular através um complexo de glicoproteínas (FIGURA 2). Todo esse arranjo é importante para manter a estabilidade, a estrutura e a forma da fibra muscular, tornando-a resistente as forças mecânicas. Além disso, a distrofina também tem ação na maturação dos receptores, em conjunto com glicoproteínas, e na junção neuromuscular (CAROMANO 1999; GILLIS, 1996; MATSUMURA et al., 1993; BONILLA et al. 1988).

A falta ou deficiência da distrofina no sarcolema pode causar rupturas da membrana determinando aumento nos níveis de enzimas citoplasmáticas e de cálcio intracelular. O aumento de cálcio no citoplasma irá ativar proteases que levam a degeneração e até mesmo, necrose das fibras musculares (DE BACKER et al., 2002; GILLIS, 1996; GLESBY et al., 1988).

Figura 2. Imagem ilustrativa da interação da proteína distrofina entre citoesqueleto e matriz extracelular.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Alterações do músculo esquelético

3.2.1 Lesão e Regeneração Muscular

Durante o processo de embrionário do desenvolvimento muscular uma subpopulação de mioblastos, não se diferencia e permanece associado a fibra muscular como célula satélite quiescente (CHARGÉ e RUDNICKI, 2004).

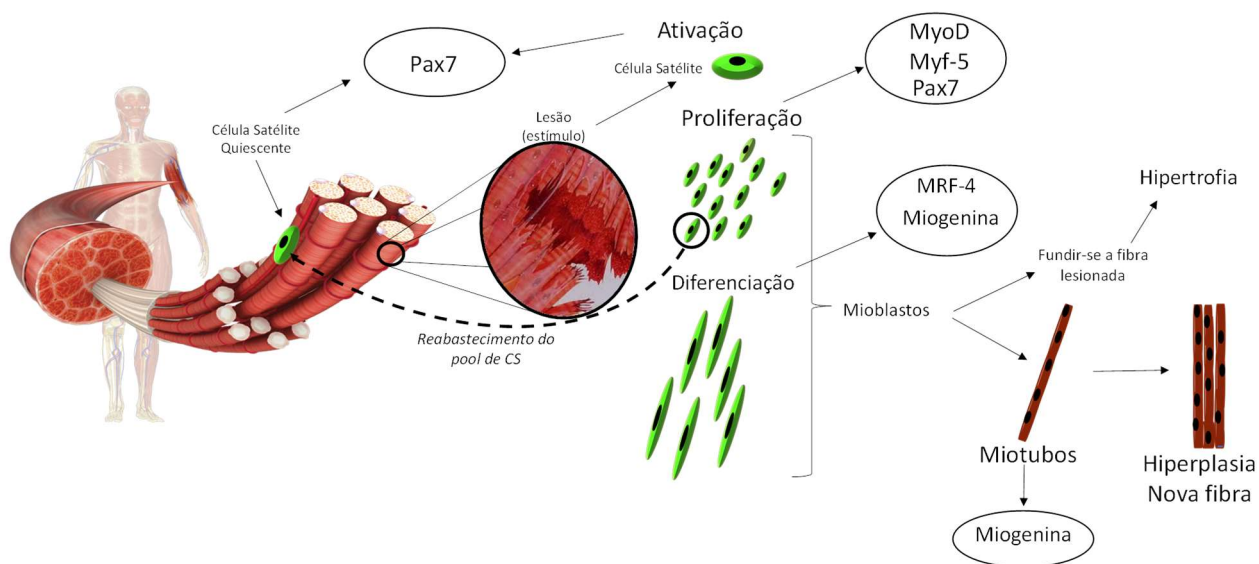
Em 1961 Alexandre Mauro descreve pela primeira vez as células satélites em estudos realizados em músculos de rãs. As CS são células mononucleadas indiferenciadas portanto são mioblastos que não se diferenciaram durante a miogênese embrionária e permaneceram associadas as fibras do músculo esquelético adulto entre o sarcolema e a lâmina basal em estado de quiescência até receberem um estímulo que irão ativá-las. Este estímulo pode ser do tipo lesão, remodelação ou crescimento. Quando ativadas as CS se proliferam até se diferenciarem em mioblastos, que posteriormente podem se fundir entre si dando origem a novas fibras ou se fundem ao local da lesão, reparando a fibra lesada. Durante todo este processo, assim como na miogênese, ocorrerá a expressão de fatores de regulação miogênica (MRFs). No início do ciclo de reparo, ou seja, na fase de proliferação das CS outra CS é gerada e retorna à quiescência reestabelecendo o “pool” de células entre o sarcolema e a membrana basal da fibra muscular, até que um novo estímulo as

ativem e reinicie novo ciclo de reparo (FOSCHINI et al., 2004; CHARGÉ e RUDNICKI, 2004).

Devido a expressão dos MRFs é possível identificar as diferentes fases em que as CS se encontram no ciclo de regeneração. A Figura 3 ilustra as diferentes fases das CS após uma lesão muscular. Na fase de quiescência/ativação as CS expressam Pax7, na fase seguinte de proliferação é possível identificá-las através da expressão de MyoD e Myf-5 e o reabastecimento do *pool* de CS no músculo. Já na fase de diferenciação é expresso a Miogenina e MRF-4. Por fim, quando já diferenciadas em mioblastos, esses irão se fundir entre si, dando origem a novas células (Hiperplasia) ou se fundirão na célula lesada, reparando o tecido danificado, podendo determinar hipertrofia da célula muscular (SIGOLI et al., 2022; ASFOUR, et al., 2018; ZANOU e GAILLY, 2013).

O processo de reparo realizado pelas CS também é dependente da integridade da membrana celular. Qualquer déficit, como ausência ou deficiência de proteínas estruturais poderão comprometer toda regeneração muscular, podendo até culminar em morte celular. Um exemplo clássico deste tipo de alteração é a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), caracterizada pela ausência da distrofina.

Figura 3. Imagem ilustrativa das fases da célula satélite (CS) no processo de reparo do músculo esquelético.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.2 DMD e camundongos mdx

A ausência ou deficiências de proteínas no músculo esquelético podem determinar miopatias severas, tais como: Distrofia Muscular de Becker e de Duchenne, pela ausência parcial ou total da proteína distrofina; Miopatia Nemalínica, pela ausência da nebulina, entre outras. Contudo, a mais severa delas é a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), descrita pela primeira vez em 1868 por Guillaume Benjamin Amand Duchenne. A DMD é caracterizada pela ausência da proteína distrofina o que determina uma desestruturação da membrana da célula muscular, causando lesões e necroses progressivas. Nesta distrofia ocorre uma mutação na região Xp 21 do cromossomo X, determinando a ausência da síntese da proteína distrofina. Essa mutação pode ser espontânea ou hereditária, onde 01 entre 03 casos dessa mutação ocorre espontaneamente, enquanto os demais são de caráter hereditário, herdados da mãe que é portadora do gene mutante, e que tem uma possibilidade de 25% de dar à luz a um menino afetado, e os outros 25% de dar à luz a uma menina portadora (JULIE et al., 2018; MCGREEVY et al., 2015)

Atualmente a DMD acomete 1 a cada 5000 meninos nascidos vivos, os primeiros sintomas são identificados logo no início da vida da criança, pois apresentam dificuldades para começar a engatinhar e andar, posteriormente entre 3 e 5 anos, essas crianças apresentam dificuldades para deambular (normalmente nas pontas dos pés), pular, correr, subir escadas, quedas recorrentes e dificuldades para se levantar apresentando o sinal de Gowers, que é caracterizado pela necessidade ficar em decúbito ventral e escalar o próprio corpo para conseguir ficar em pé. A DMD também é caracterizada pela fraqueza muscular, atrasos na coordenação motora, perda da deambulação (necessidade de cadeira de rodas e acamamento), implicação dos sistemas cardíaco e respiratório levando a óbito por insuficiência cardiorrespiratória por volta da segunda ou terceira década de vida. Sem qualquer tipo de tratamento o portador da DMD perde a capacidade de deambular por volta dos 10 anos de idade e desenvolvem cardiomiopatias por volta dos 16 e vão a óbito por volta dos 20 anos de vida (SIGOLI et al., 2022; PEDRAZZANI, P.; CORNACHIONE, A.S, 2019; MCGREEVY et al., 2015; ZATZ, 2002; GOWERS, W. R. 1879).

Na tentativa de prolongar e oferecer uma melhor qualidade de vida para os portadores da DMD, alguns experimentos se fazem necessários, porém são inviáveis para os testes em humanos, pois há risco de acelerar e piorar o quadro da doença. No entanto

em 1980 na colônia de linhagem C57BL/10ScSn foi identificado o camundongo *mdx* com mutação espontânea, devido aos seus altos níveis de creatina quinase (CK). No ser humano a mutação ocorre na região xp21 do cromossomo X, que é responsável pela codificação da proteína distrofina, já no camundongo *mdx* a região responsável por essa codificação é a região xp23 no mesmo cromossomo, e assim como nos humanos a mutação desta região determina a ausência da síntese distrofina no camundongo.

Nos camundongos *mdx* também é possível observar outras alterações com características semelhantes às que ocorrem em humanos, como células com núcleos centralizados (ciclo lesão/regeneração), fibrose, necrose, perda da função muscular, entre outras. Apesar de apresentarem características semelhantes entre as espécies, nos camundongos a doença é menos severa e sua expectativa de vida é reduzida apenas em 25% enquanto no ser humano afetado a expectativa de vida é reduzida em aproximadamente 75%. Outra característica que difere a evolução da doença entre eles (humanos e camundongos) é que entre a 3^a e a 6^a semana de vida, é possível observar no músculo esquelético de camundongos *mdx* maior pico de necrose, que se estabiliza durante 2 semanas, apresentando focos de regeneração e posteriormente, volta a progredir com mais degeneração. O músculo diafragma é uma exceção no avanço da doença no camundongo, tendo deterioração progressiva das fibras da mesma forma como ocorre em humanos afetados (SIGOLI et al., 2022; MCGREEVY et al., 2015; HIBAOUY et al., 2011)

3.2.3 Musculo Cardíaco na DMD

Como mencionado o músculo cardíaco também é foco de alterações morfofuncionais na DMD, que determinam disfunções severas no coração. A cardiomiopatia é a disfunção mais relatada em casos de DMD, geralmente é observada entre o meio e o final da adolescência, tendo uma apresentação clínica insidiosa, uma vez que os pacientes já estão em cadeira de rodas e não apresentam saúde física e motora para realizarem uma carga de trabalho cardíaca aumentada (MCNALLY et al., 2015). A incidência geral de cardiomiopatia pode chegar a 25% em portadores de DMD aos 6 anos de idade e 59% aos 10 anos (NIGRO et al., 1990). Geralmente, há a necessidade de um exame cardíaco detalhado nos pacientes com DMD para uma adequada identificação de seus problemas cardíacos (AMARIO et al., 2017), o que gera um atraso significativo não só no desenvolvimento de uma avaliação adequada quanto no início de um tratamento

farmacológico (MCNALLY et al., 2015). Portanto, para prevenir o aparecimento precoce da insuficiência cardíaca, sugere-se iniciar o tratamento antes que a disfunção ventricular seja detectada (ŁOBODA; DULAK, 2020).

O desenvolvimento da cardiomiopatia é inevitável em pacientes com DMD, decorrência da ausência da proteína distrofina, a qual desempenha o mesmo papel biológico tanto nas células musculares esqueléticas quanto nos cardiomiócitos (WALLACE; MCNALLY, 2009). Conseqüentemente, a falta de distrofina acaba resultando no aumento da vulnerabilidade estrutural dos cardiomiócitos, em instabilidade da membrana celular, na interrupção da homeostase do Ca^{2+} , na produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e em disfunção mitocondrial (WESTERING; BETTS; WOOD, 2015). O músculo cardíaco distrófico apresenta alterações em sua capacidade de batimento, as quais resultam não apenas da deficiência de distrofina dos cardiomiócitos, mas também de deficiências na expressão dessa proteína em células endoteliais, células do músculo liso vascular e fibroblastos, comprometendo o bom funcionamento cardíaco, o que leva a complicações cardíacas (ŁOBODA; DULAK, 2020).

A alteração patológica do miocárdio ventricular na DMD é heterogênea, e provavelmente é resultado da combinação da perda de massa muscular miocárdica (atrofia) (LEE et al., 2014; MATSUOKA et al., 1986) e remodelação miocárdica secundária (dilatação ventricular e fibrose) (KONSTAM et al., 2011). No processo de remodelação tecidual cardíaca há uma associação entre a infiltração gordurosa secundária e o processo de fibrose no interior do tecido miocárdico (SILVA et al., 2007). Embora a cardiomiopatia na DMD seja convencionalmente abordada como cardiomiopatia dilatada, observa-se que os corações afetados nem sempre mostram aumento ventricular (GIGLIO, 2006). Na verdade, alguns apresentam tamanho cardíaco pequeno a normal com parede ventricular significativamente fina (SU; RAMOS-PLATT; MENTEER, 2015; VAN DEN BERGEN et al., 2014; JEFFERIES et al., 2005). Assim sendo, tanto os ventrículos finos quanto os dilatados acarretam desvantagens, pois há um aumento do estresse da parede sem hipertrofia ventricular compensatória.

Outro assunto de extremo interesse relacionado à cardiomiopatia em portadores de DMD é a importância da proteína utrofina para melhoria cardíaca. A utrofina é um homólogo autossômico da distrofina que possui uma sequência gênica com alta taxa de identidade e similaridade com a mesma (N-terminal = 73% de identidade e 79% de similaridade; C-terminal = 72% de identidade e 78% de similaridade) (GUIRAUD;

ROBLIN; KAY, 2018). Ademais, o gene da utrofina codifica uma proteína com 80% de identidade (de aminoácidos) em relação à distrofina (GUIRAUD; ROBLIN; KAY, 2018). Fato interessante é que, diferentemente da distrofina, a utrofina é expressa de forma ubíqua no organismo (PERRONNET; VAILLEND, 2010), uma expressão que é anterior à da distrofina, e a qual auxilia no desenvolvimento e na regeneração do músculo esquelético (TINSLEY; DAVIES, 1993).

Durante o desenvolvimento dos primeiros músculos no ser humano, a utrofina é encontrada essencialmente no sarcolema, sendo progressivamente substituída pela distrofina até o nascimento, o que acarreta a ausência no músculo esquelético maduro, sendo sua expressão confinada à junção neuromuscular e à vasculatura (GUIRAUD; ROBLIN; KAY, 2018; OHLENDIECK et al., 1991). Sabe-se que em um homem adulto, a utrofina é expressa nos tecidos dos pulmões, rins, fígado e baço, também podendo ser encontrada em vasos sanguíneos em processo de regeneração (GUIRAUD; ROBLIN; KAY, 2018). Além disso, foi observado que em algumas miopatias, incluindo as distrofinopatias, a utrofina pode ser expressa no sarcolema (BLAKE; TINSLEY; DAVIES, 1996). Kennedy e colaboradores (2018) demonstraram que a utrofina pode retardar a progressão da patologia cardíaca em camundongos *mdx*, e que modulações em sua expressão têm o potencial de aumentar a qualidade de vida de todos os pacientes com DMD.

Sendo assim, a utrofina vem sendo alvo de investigações científicas como uma possível proteína que possa fazer o papel da distrofina, ausente na DMD, e assim, proteger o coração de disfunções severas que levam o portador ao óbito precoce.

3.3 Recursos terapêuticos

3.3.1 Não farmacológicos

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) por se tratar de uma doença genética recessiva sem cura, tem despertado o interesse em estudos sobre os recursos terapêuticos que têm como foco retardar a sua evolução. Existem diversos estudos focados em buscar terapias que não façam utilização de fármacos, mas que possam retardar e até mesmo regredir a progressão da doença. Essas terapias têm como agente principal o exercício físico, que além de ser uma terapia barata e muito eficaz na manutenção da saúde e na prevenção de doenças como doenças coronariana, obesidade, doenças respiratórias,

depressão e músculo esqueléticas, pelos seus diversos benefícios físicos e psicológicos que proporciona aos seus praticantes, como aumento de força, melhora da flexibilidade e mobilidade, controle do peso corporal, da hipertensão arterial e do diabetes tipo 2, manutenção e melhora da densidade óssea e da capacidade funcional, e nos processos cognitivos auxiliando na depressão e ansiedade (ZELIKOVICH, et al.; 2019; WU et al., 2019; WILLIAMSON e PAHOR, 2010).

Porém o exercício físico de baixa intensidade como terapia não foi aceito com unanimidade e alguns profissionais da saúde hesitam em aplicar essa terapia em pacientes diagnosticados com DMD, por receio de piorar ou acelerar o processo de evolução da doença, pois a prática de exercício físico pode causar um aumento de espécies reativas de oxigênio, de processos inflamatórios, rompimento de fibras musculares, necrose e apoptose celular, esses processos são importantes para o músculo sadio, por que ativam o processo de regeneração levando a hipertrofia e a formação de novas fibras musculares (miogênese), dando maior volume e força ao músculo (HYZEWICZ et al., 2015).

No músculo afetado pela DMD, esses processos e lesões podem causar maiores danos a estrutura muscular que já é debilitada, e por fim acelerar o progresso da doença, lembrando que os processos de regeneração da fibra muscular são efetuados pelas CS, e esses ciclos de lesão e regeneração podem acelerar o estado de exaustão dessas células, reduzindo a sua quantidade e fazendo com aumente a expressão de tecido conjuntivo e de tecido adiposo no músculo, prejudicando os processos de contração muscular e reduzindo a força (função) pela perda de fibras musculares, contribuindo para o avanço da doença, levando a uma redução na qualidade e no período de vida do paciente. (FONSECA et al., 2012; CRUZAT et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; FOSCHINI et al., 2004; RENAULT et al., 2000; CARAMANO, 1999).

Por outro lado, estudos com exercícios de baixa intensidade tem mostrado resultados positivos na melhora da condição de força e funcionalidade do músculo esquelético de humanos e de animais, como os camundongos *mdx*, modelo experimental da DMD. Esses estudos mostram que o exercício físico de baixa intensidade pode aumentar a expressão de células satélites que são responsáveis pelo processo de regeneração das fibras musculares trazendo também melhora na morfologia, funcionalidade e também tem se mostrado como um dos principais reguladores da plasticidade do músculo esquelético afetado, os estudos também mostraram melhora nas funções de contrações cardíacas e respiratórias sem alterações nos níveis de marcadores de estresse oxidativo o que acaba retardando a evolução da doença, determinando um

prolongamento e uma melhor qualidade de vida (SIGOLI et al., 2022; FRINCHI, et al., 2021; ZELIKOVICH, et al.; 2019; PEDRAZZANI, P.; CORNACHIONE, A.S, 2019; RAMACCIOTTI e DO NASCIMENTO, 2001). O exercício físico de baixa intensidade pode sim ser uma terapia não invasiva com resultados positivos para os pacientes afetados pela mutação genética do cromossomo X, a DMD.

Paralelamente à aplicação do exercício físico, existem fármacos que podem conter e minimizar a ação dos ROS devido ao seu alto poder antioxidante e anti-inflamatório, como a melatonina.

3.3.2 Farmacológicos

As terapias mais comumente utilizadas são os tratamentos com recursos farmacológicos através de glicocorticoides, por serem classificados como potentes anti-inflamatórios. A recomendação para iniciar o tratamento é durante a fase de platô (pico degenerativo) que está entre os 04 e 06 anos de idade, período que o paciente reduz o progresso motor. A medicação é capaz de frear a evolução da doença, promovendo um aumento de massa e força muscular (GUIRAUD e DAVIES, 2017; SALAS, 2014; DE LOS ANGELES BEYTÍA et al., 2012).

Os principais fármacos, da classe dos corticoides, utilizados para o tratamento da DMD são a prednisona e o deflazacorte. Estudos mostraram que eles foram capazes de prolongar a deambulação entre 02 e 05 anos a mais em pacientes tratados quando comparados aos não tratados. Além disso, foi observado melhora nas funcionalidades do cotidiano, da função pulmonar, manutenção da função cardíaca, redução da necessidade de cirurgias de escoliose, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes tratados com esses medicamentos. Apesar de atingir o objetivo de retardar a evolução da doença, é preciso considerar que o uso contínuo desses glicocorticoides tem seus efeitos colaterais, tais como: redução da altura, inchaço, aumento do risco de fraturas pela perda de densidade óssea (osteoporose), ganho de peso que também é resultado da redução da mobilidade, diabetes, catarata, insônia, distúrbios de comportamento (alterações de humor), gastrite, atraso na puberdade e hipertensão arterial, esses sintomas são característicos da síndrome de Cushing. (GUIRAUD e DAVIES, 2017; SALAS, 2014; DE LOS ANGELES BEYTÍA et al., 2012).

Sendo assim, gradativamente mais cientistas estão em busca de outros fármacos que possam proporcionar resultados positivos frente a evolução da doença sem que

tenham efeitos colaterais tão expressivos, como os observados com os corticoides. A melatonina é um hormônio que vem sendo cada vez mais investigado como tratamento para portadores de DMD. Produzida principalmente pela glândula pineal, a melatonina também pode ser administrada de maneira exógena, como tem ocorrido em diversos estudos que procuram entender mensurar os efeitos benéficos da melatonina, alguns estudos utilizaram a melatonina exógena como um agente antioxidante e anti-inflamatório para prolongar a adaptação frente ao exercício em modelos experimentais e em humanos, e em estudos com músculos lesionados por esmagamento a melatonina reduziu a apoptose, acelerou a regeneração das células satélites, aumentou a força de contração e reduziu os marcadores inflamatórios, as alterações oxidativas e os danos aos tecidos. E apesar do uso crônico e da administração da melatonina por várias vias, não foram registrados efeitos colaterais clinicamente significativos nesses estudos (SOUZA ET AL., 2022; PANYATIP ET AL., 2020; STACCHIOTTI ET AL., 2020, KLESZCZYNSKI ET AL. 2020).

Estudos sobre a melatonina tanto endógena quanto exógena, mostram que ela tem a capacidade de mediar as ocitocinas pró-inflamatórias e neutralizar os radicais livres até mesmo antes que suas ações tóxicas sejam executadas, atuando como doador de elétrons se transforma em um radical que além de detoxificar os radicais reativos, não sofre a auto-oxidação na reciclagem redox. A ambiguidade do poder antioxidante da melatonina se dá pelos mecanismos de inibição da geração de espécies reativas de oxigênio e com ação direta sobre as espécies reativas, levando a formação de artefatos finais estáveis que serão posteriormente excretados majoritariamente pela urina (VAINER et al., 2021; SILVA, 2016).

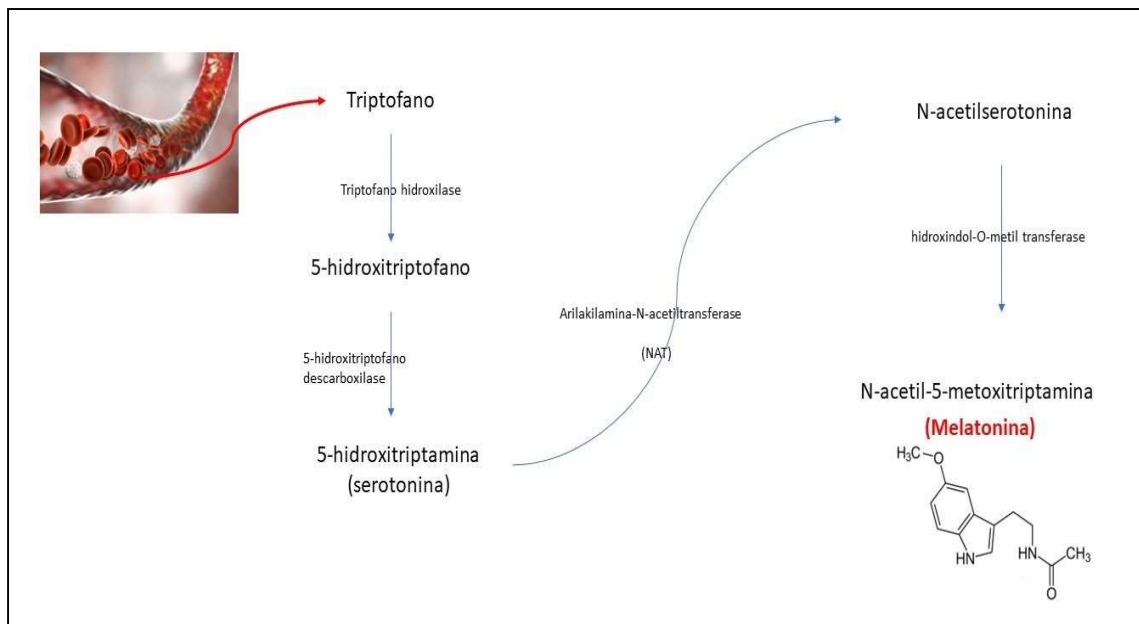
É importante lembrar que a contração dos músculos afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne promove um aumento do estresse oxidativo ou seja da hiperoxidatividade que é um aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), deixando o tecido muscular muito mais susceptível a lesões, porém estudos relacionados a Distrofia Muscular de Duchenne e a melatonina, mostraram que a melatonina foi capaz de aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias (interleucinas 1β , 2, 6 (IL- 1β , IL-2, IL-6; fator de necrose tumoral $-\alpha$ (TNF- α)), e reduzir os processos inflamatórios e hiperoxidativos em indivíduos afetados, o que retardou os processos degenerativos no músculo. Em modelos animais foi relatado a redução na expressão de creatina quinase (marcadores de necrose muscular), aumentou os níveis de glutathiona e reduziu sua

concentração na forma oxidada/reduzida (glutathione oxidada/reduzida), elevando a capacidade da melatonina em recuperar o status redox, ou seja, o equilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes no músculo distrófico (SALUCCI et al., 2021; CHAHNOUNI et al., 2011; CHAHNOUNI et al., 2010; RANDO et al., 2008; REID; DURHAM, 2002).

Dessa maneira acreditamos que os benefícios do exercício físico de baixa intensidade associado aos efeitos benéficos da melatonina, principalmente os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, podem ser um tratamento muito promissor para os pacientes afetados pela DMD. Sendo assim, nossa hipótese é que a associação dos procedimentos (exercício e melatonina) irá proporcionar melhora nas características morfofuncionais e bioquímicas do músculo psoas e cardíaco.

3.3.3 *Farmacocinética e farmacodinâmica da melatonina*

A melatonina é um hormônio sintetizado e secretado principalmente pela glândula pineal, mas também existem secreções que ocorrem em outros órgãos e tecidos, como por exemplo, na retina, útero, medula óssea, plaquetas, leucócitos, trato gastrointestinal entre outros. (ELMAHALLAWY et al., 2020; BONOMINI et al., 2018; TORDJMAN, 2017; SLOMINSKI et al., 2012; REITER, 2003). A síntese da melatonina, ocorre inicialmente com a conversão do triptofano que é um aminoácido essencial. Presente na corrente sanguínea, o triptofano é “capturado” e sofre ação da enzima triptofano hidroxilase, que o converte em 5-hidroxitriptofano, o qual irá passar pela ação 5-hidroxitriptofano descarboxilase, sendo convertida em 5-hidroxitriptamina (Serotonina), a serotonina irá sofrer ação da arilacetiltransferase (AAT) sendo convertida em N-acetilserotonina, que por fim terá a ação da hidroxindol-O-metil transferase, e será convertida em N-acetil-5-metoxitriptamina que é a melatonina. (TORDJMAN, 2017; BONOMINI et al., 2018; ANDERSEN, P., 2016; CLAUSTRAT et al., 2015; SLOMINSKI et al., 2012) (Figura 4).

Figura 4. Esquema de síntese da melatonina a partir do triptofano.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A ausência de luminosidade, é o estímulo para produção de melatonina, a partir da glândula pineal. Esse estímulo, é detectado por células especializadas (células fotorreceptoras que despolarizam no escuro) (TOSINI et al., 2003), que transmitem esses estímulos pela via retino-hipotalâmica, até o núcleo supraquiasmático (NSQ), passando pelo gânglio cervical superior e, seguindo até a glândula pineal, onde ocorre todo o processo de síntese e secreção da melatonina. Já quando a luminosidade é detectada, a síntese de melatonina pela glândula pineal é suprimida, o que leva a queda nos níveis de melatonina circulante (KRAUSE et al., 1990; LEWY et al., 1980). Os níveis circulantes de melatonina no período claro e escuro, é respectivamente por cerca de 10 e 60 pg/ml, sendo a concentração no período claro muito baixa, podendo ser até indetectável, e no período escuro estará entre 10 e 20 vezes maior que no período claro, porém, com uma variabilidade individual de organismo para organismo. o pico de secreção ocorre entre as 02h e 04h da manhã (BOTAS, 2014; CLAUSTRAT et al., 2015; REITER, 2003).

Após ser sintetizada pela glândula pineal, a melatonina é imediatamente liberada para o líquido cefalorraquidiano e circulação sanguínea, não ficando armazenada na glândula pineal. Sendo uma molécula lipofílica, tem alta solubilidade a lipídios, sendo assim a melatonina atravessa facilmente as camadas celulares, podendo chegar rapidamente aos mais diversos tecidos (HARDELAND, 2009; SOUSA E CASTRO, 2008; SILVA, 2005). Nos tecidos alvo, a melatonina poderá exercer suas ações mediada

pela interação com seus receptores MT1 e MT2, que são acoplados a proteína G_i, essa interação garante ações mais específicas, mesmo em quantidades mínimas de melatonina, potencializando a sua ação (SILVA, 2005). No entanto, por se tratar de uma molécula lipofílica, a melatonina nem sempre precisa se ligar aos receptores MT1 e MT2 para desempenhar sua respectiva função. Podendo assim, atravessar diretamente a bicamada lipídica da membrana celular, e interagir com a enzima quinona redutase II, (anteriormente conhecida como receptores MT3), e ainda com receptores nucleares ROR/RZR (receptores orfão para retinoide/ receptores Z para retinóides) (BOTAS, 2014; SLOMINSKI et al., 2012; HARDELAND, 2009; DUBOCOVICH et al., 2005).

A metabolização da melatonina, ocorre principalmente no fígado, que metaboliza cerca de 90% dos níveis que estão na circulação sanguínea, onde é hidrolizada e convertida em 6-hidroximelatonina pelo citocromo P450 1A2 (CYP1A2), 90% desse produto se liga ao ácido sulfúrico e 10% se liga ao ácido glicurônico, o que vem a formar o 6-sulfatoximelatonina. Além do fígado, a melatonina também é metabolizada diretamente no cérebro sem passar por processos mediados por receptores, com reações envolvendo outros radicais livres formando a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), e em seguida a N¹-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), que são potentes antioxidantes, (BOTAS, 2014; MA et al., 2005; SILVA, 2005; RESSMEYER et al., 2003; SKENE et al., 2001). Essa capacidade dos metabólitos secundários da melatonina em neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) e conhecida como reação em cascata da melatonina, pois uma única molécula pode neutralizar até 10 EROs ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) sucessivamente em comparação a outros antioxidantes clássicos, que tem a capacidade de eliminar apenas 01 ou menos ERO (TAN et al., 2015).

O poder antioxidante da melatonina, se dá pela sua ação contra os radicais livres, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), liberadas principalmente durante a produção de adenosina trifosfato (ATP) na mitocôndria. A melatonina é descrita por ser um excelente doador de elétrons, que por sua vez irá neutralizar os radicais livres, diminuindo o potencial oxidante (SOUZA et al., 2022; PANYATIP et al., 2020; ALVAREZ-ARTIME et al., 2020). Na ação receptor-dependente, a melatonina interage com os receptores MT1 e MT2 que por sua vez estimulam enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase, glutatona redutase, superóxido dismutase e a enzima catalase, que são enzimas que metabolizam as EROs (SOUZA et al., 2022, FERLAZZO et al., 2020). No sistema imune, a melatonina tem ação

no controle de produção de citocinas pró-inflamatórias, as interleucinas 1 e 2 e fator de necrose tumoral (TNF), auxílio na defesa contra microorganismos, na ativação, proliferação e inibição de apoptose de glóbulos brancos entre outras diversas ações (SOUZA et al., 2022; ELMAHALLAWY et al., 2020; PAHECO et al., 2013).

Após a metabolização no fígado, a melatonina é excretada na urina na forma de 6-sulfatoximelatonina, que é um excelente biomarcador pois reflete fielmente a atividade biossintética da glândula pineal. Além da 6-sulfatoximelatonina, cerca de 2% da melatonina circulante pode ser excretada na urina sem ser metabolizada ou seja na sua forma original (SOUZA et al., 2022; HARDELAND et al., 2009; NETO e CASTRO, 2008; MA et al., 2006).

4. Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 4740230518) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

4.1 Animais

O estudo conta com a utilização de 24 animais *mdx* com 6 semanas de idade, adquiridos no Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (CEMIB). A Faixa etária foi escolhida devido o músculo esquelético apresentar alterações morfofuncionais importantes (LOWE WILLIAMS et al. 2006), equiparando-se a idade de pacientes jovens com DMD (MATHUR, LOTT et al. 2010). Os animais foram divididos em 04 grupos: sendo um grupo controle (*mdx*), que não receberam nenhum tipo de manipulação, um grupo sedentário com Melatonina (*mdxM*), que receberam apenas a aplicação intraperitoneal de melatonina, um grupo treinado com melatonina (*mdxTRM*), esse grupo foi submetido a treinos de baixa intensidade e em seguida a aplicação intraperitoneal de Melatonina e um grupo treinado, esse grupo também foi submetido a treinos de baixa intensidade (*mdxTR*). Os animais foram alocados em caixas (gaiolas) (n=4) (Figura 5) no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (DCF-UFSCar) em ciclo invertido 12/12h, com livre acesso a água e a comida. As caixas (gaiolas) foram higienizadas de acordo com os procedimentos do Biotério.

Figura 5. Foto dos animais alocados em gaiolas.



4.2 Treinamento

Os animais dos grupos treinados iniciaram as sessões de treinamento de baixa intensidade quando completaram 6 semanas de idade. O treinamento foi realizado em esteira motorizada sem inclinação. Os animais foram familiarizados com a esteira no início do treinamento. Antes de cada sessão eles passaram por um período de aquecimento de 2 minutos a uma velocidade de 7m/mim. Após este período os animais foram exercitados em baixa intensidade em uma velocidade entre 09 e 10m/min durante 30 minutos. Os treinamentos foram realizados 3x/semana até completarem 21 sessões de treinamento (GAIAD et al., 2017), (Figura 6).

FIGURA 6. Foto da esteira e dos animais em treinamento.



4.3 Administração intraperitoneal de Melatonina

Os animais dos grupos *mdxTRM* foram submetidos a injeções intraperitoneais logo após cada sessão de treinamento. Os animais do grupo *mdxM* foram medicados nos

mesmos dias que os animais do grupo *mdxTRM* porém, não foram submetidos ao exercício. A administração intraperitoneal (i.p.) contou com injeções de melatonina na dose de 30mg/Kg, assim como o estudo que obtiveram os melhores resultados submetendo os animais a essa dose de melatonina e aplicando via i.p. (HIBAOUÏ et al., 2011) (Figura 7). A solução foi preparada semanalmente pela dissolução da melatonina em pó (Sigma Aldrich) em etanol (100%) e posteriormente diluída em solução salina (NaCl 0,9%) para administração.

FIGURA 7. Foto Aplicação de Melatonina intraperitoneal.



4.4 Teste de preensão palmar

Como forma de medir a eficácia dos treinamentos e ação da melatonina nos camundongos, foram realizados testes de preensão nas patas dianteira dos animais por meio do aparelho *grip strength* da Insight. A aplicação dos testes ocorreu nos momentos pré-treino (antes do animal começar a treinar), e pós-treino (quando se encerrou o último treino do animal). Quanto à execução do teste, foram feitas três séries de cinco puxadas, e entre cada série um descanso de 1 minuto (KEELING et al., 2007). No fim de cada série, foi feita a média das forças de preensão das cinco puxadas, de modo que obtivemos três médias por animal ao final de cada teste (Figura 8).

Após os procedimentos, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilasina (100 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Para retirada do coração, foi feita uma incisão no tórax dos camundongos para acesso da caixa torácica. As costelas foram desinseridas do osso esterno e o órgão (músculo cardíaco) foi retirado. Já para retirada do

músculo psoas a incisão foi feita na região abdominal, onde os intestinos foram arrebatados, expondo o músculo para excisão.

Já está bem estabelecido, na literatura científica que, músculos glicolíticos (predomínio de fibras tipo II) são mais acometidos pela DMD. O músculo psoas desempenha a função de estabilizar a coluna lombar e a articulação sacroilíaca (origem T12 a L5) além de, auxiliar na abdução e rotação lateral do quadril (inserção trocânter menor do fêmur). Na DMD este músculo é um dos mais afetados, determinando os primeiros sinais e sintomas no portador, que são: perda da deambulação, dificuldade de manter a coluna estabilizada, entre outros (ARBANAS, et al., 2009; WILLIAMS e NEWLL, 2005). Sendo assim, por se tratar de um músculo alvo da DMD, nosso estudo focou analisar suas características morfológicas frente aos procedimentos farmacológico e não-farmacológico.

Após a retirada dos músculos, ambos congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C. A Figura 9 ilustra a linha do tempo relacionada aos procedimentos aplicados nos diferentes grupos.

FIGURA 8. Foto do aparelho *grip strength* da Insight e do teste palmar em execução.

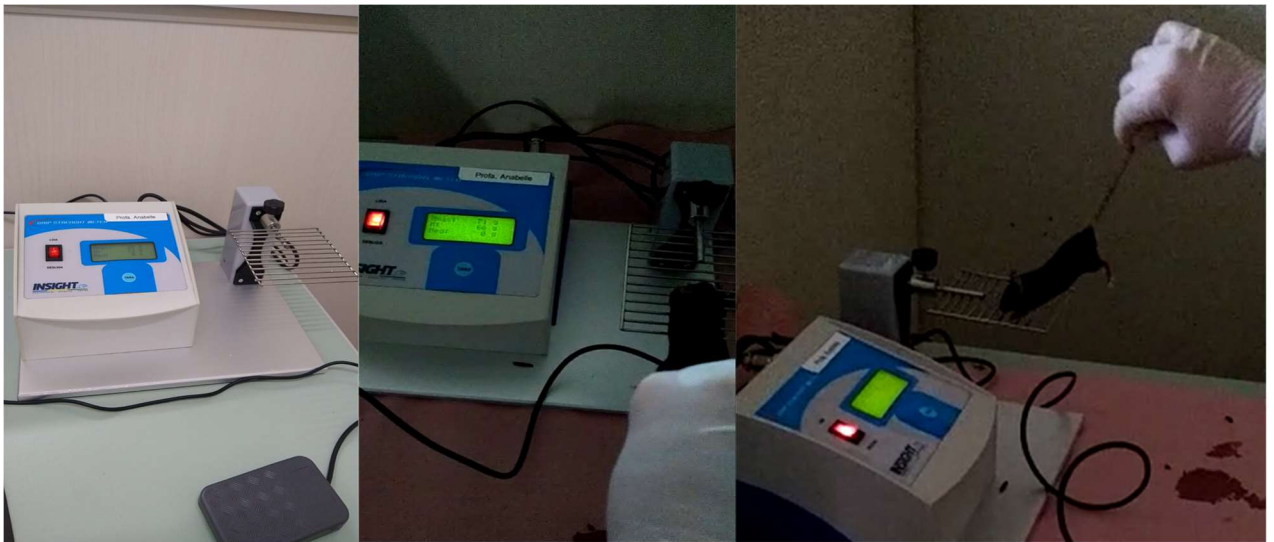
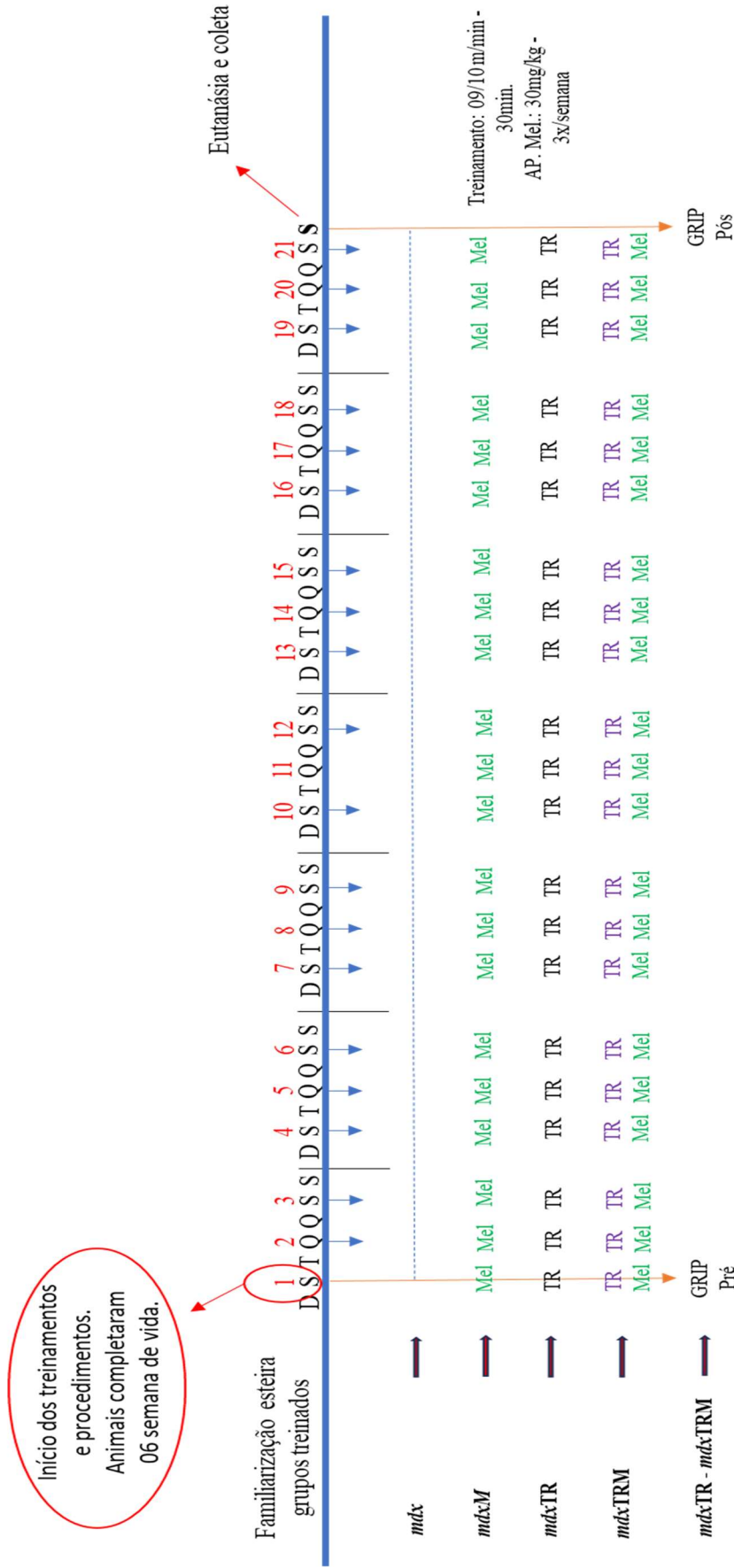


Figura 9. Linha do tempo dos procedimentos com os camundongos *mdx* utilizados no estudo.



TR – Treinamento; AP. Mel – Aplicação de melatonina; GRIP Pré – teste de força antes de iniciar o treinamento; GRIP Pós – Teste de força após a última sessão de treinamento.

4.5 Histologia Básica

Os fragmentos dos músculos esquelético (psoas) e cardíaco, previamente congelados, foram submetidos ao processamento histológico. Com auxílio do Criostato Leica CM 1850 UV a uma temperatura de -25°C (Figura 10) as amostras foram seccionadas em cortes transversos, (espessura $6\mu\text{m}$). Os cortes foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE) para análise dos aspectos genéricos das fibras. A análise morfológica contou com a utilização de um microscópio de Luz.

Figura 10. Foto da técnica de criotomia sendo realizada no criostato Leica.



4.6 Imunofluorescência para distrofina e células satélite

Para confirmação da mutação dos animais *mdx* foi feita aplicação de anticorpo primário, Dys-ab15277 (1:400 - primário) e o Anti-Rabbit 488 (1:1000-secundário). Foi utilizado um animal *wild type* como controle positivo.

Para identificação das células satélites está sendo utilizado o anticorpo primário Pax-7, para identificação de células quiescentes e ativas, (Sigma, 1:10) com secundário Alexa Fluor 488 e Miogenina (DSHB, 1:1) para identificação de células em diferenciação e fusão com secundário Alexa Fluor 488. Essas marcações são feitas juntamente com o anticorpo primário para laminina para localização das CS (1:200) com secundário Alexa Fluor 647. As lâminas são montadas com meio de montagem com DAPI para corar os núcleos em azul. Para quantificação das células foram utilizadas imagens capturadas pelo equipamento ImageXpress XLS System (Molecular Device). A contagem das células e fibras foram feitas através do programa Image J, onde foram contadas todas as CS abaixo da laminina com dupla marcação para Pax-7 ou miogenina com seu respectivo núcleo. Nas mesmas imagens foram contadas as fibras musculares para posteriormente realizar a relação CS/fibra.

4.7 Western Blotting para utrofina no músculo cardíaco

Uma parte do músculo cardíaco (30mg) foi homogeneizada em tampão de extração composto por 1 M Tris-HCl pH 7.4; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA pH 8.0; 0,001 M dodecilsulfato de sódio (SDS); 0,1% de inibidores de fosfatase; 0,2 M ortovanadato de sódio (Na₃VO₄); 0,25 M fluoreto de sódio (NaF); 0,0005 M pirofosfato de sódio (Na₄P₂O₇) e inibidores de proteases (AMRESCO). A homogeneização foi feita através do equipamento FastPrep (FastPrep-24; MP) com a utilização de tubos de 2 ml (FastPrep Tubes; código 5076-400; MP) contendo beads de alumínio (3 ciclos de 30 segundos a 4 m/s). Posteriormente, os tubos contendo os tecidos homogeneizados foram centrifugados (Centrifuge 5430 R; eppendorf) por 15 minutos a 4 °C e 13000 rpm, e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80 °C para posterior quantificação. A quantificação proteica foi determinada por meio de ensaio colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA) seguindo instruções do fabricante (Thermo Scientific). As proteínas foram misturadas ao tampão de Laemmli e fervidas a 100 °C por 5 minutos. Aliquotas contendo 25 µg de proteína de cada grupo foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 4% (SDS-PAGE) (80 V; 1h40) e transferidas para membranas de PVDF (Immun-Blot PVDF Membranes; código 1620177; Bio-Rad) (400 mA; 2h40). A transferência foi confirmada através do corante Ponceau S. Posteriormente, foi feito o bloqueio das membranas (bloqueio de ligações inespecíficas) com tampão Tween-TBS (140 mM de NaCl; 2,6 mM de KCl; 25 mM de Tris pH 7.4 e 0,05% de Tween-20) em 5% de leite desnatado por 1 hora (4 °C em agitação). O ensaio de Western Blotting foi realizado utilizando-se o anticorpo primário anti-utrofina (400 kDa; 1:50; Mancho3; código 8A4; DSHB) (incubação overnight). Vinculina (~125 kDa; 1:5000; ab73412, Abcam) foi utilizado como controle de carregamento (normalização). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com Tween-TBS (3x de 5 minutos cada) e incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados com HRP (horseradish peroxidase; 1:10000; Abcam) durante 1 hora, a 4 °C, sob agitação. Posteriormente, as membranas foram reveladas através de reagente quimioluminescente (Clarity™ Western ECL Substrate; Bio-Rad). As bandas foram visualizadas no equipamento ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) e quantificadas por análise densitométrica (semi-quantitativa) por meio do software ImageJ Fiji (versão 1.53c) (SCHINDELIN et al., 2012).

4.8 Estatística

Estatística para teste de preensão palmar e células satélites.

Os dados foram analisados utilizando modelos lineares generalizados (McCullagh e Nelder, 1989). Múltiplas comparações foram realizadas por contrastes ortogonais. Para cada um dos modelos lineares, a normalidade dos resíduos foi verificada por meio de gráficos de probabilidade normal. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS versão 9.4 e os gráficos no software R. Utilizou-se um nível de significância de 0,05. Essa análise contou com a colaboração da Profa. Dra. Daiane Leite da Roza do Departamento de Epidemiologia - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.

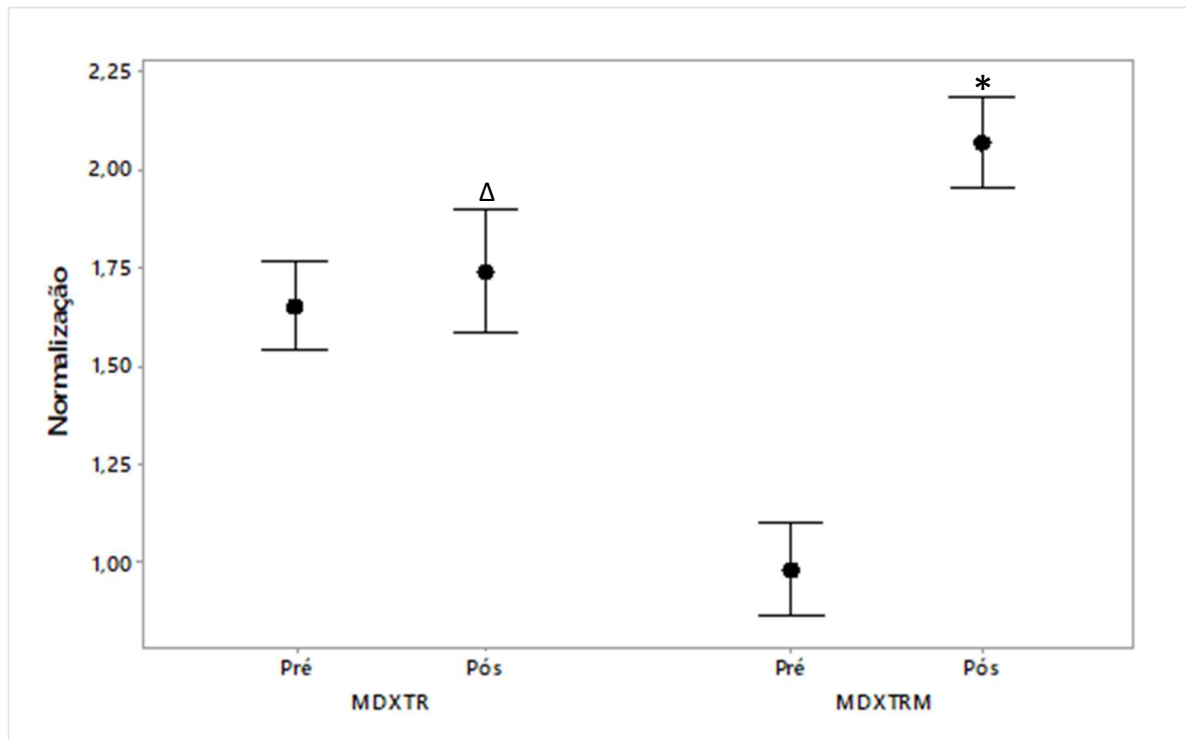
Estatística para *Western Blotting*

Na análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism (versão 8.0.2; GraphPad Software, www.graphpad.com). Para os achados semi-quantitativos da proteína utrofina (Western Blotting) no músculo cardíaco foi aplicado o teste de variância ANOVA de uma via (One-Way) com posthoc de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

5. Resultados

5.1 Teste Preensão Palmar

A figura 11 mostra as médias do teste de preensão palmar nos grupos *mdxTR* e *mdxTRM*, nas situações de pré e pós procedimentos (treino e melatonina). O exercício físico mostrou induzir um aumento da força de preensão palmar nos animais após 21 sessões de treinamento aeróbico de baixa intensidade, porém quando associado às aplicações de melatonina a força foi significativamente maior (*mdxTR*(pós) x *mdxTRM*(pós), $p < 0,05$), ou seja, os animais que apenas treinaram não tiveram um aumento de força, em relação a situação pré-, tão expressivo quanto os animais treinados e submetidos a melatonina (*mdxTR*(pós) x *mdxTR*(pré), $p < 0,33$; (*mdxTRM*(pós) x *mdxTRM*(pré), $p < 0,05$).

Figura 11. Gráfico teste de prensão palmar.

**mdxTRM* pós > *mdxTRM* pré ($p < 0,0001$); Δ *mdxTR* pós < *mdxTRM* pós ($p = 0,0003$)

5.2 Histologia Básica dos Músculos Esquelético e Cardíaco

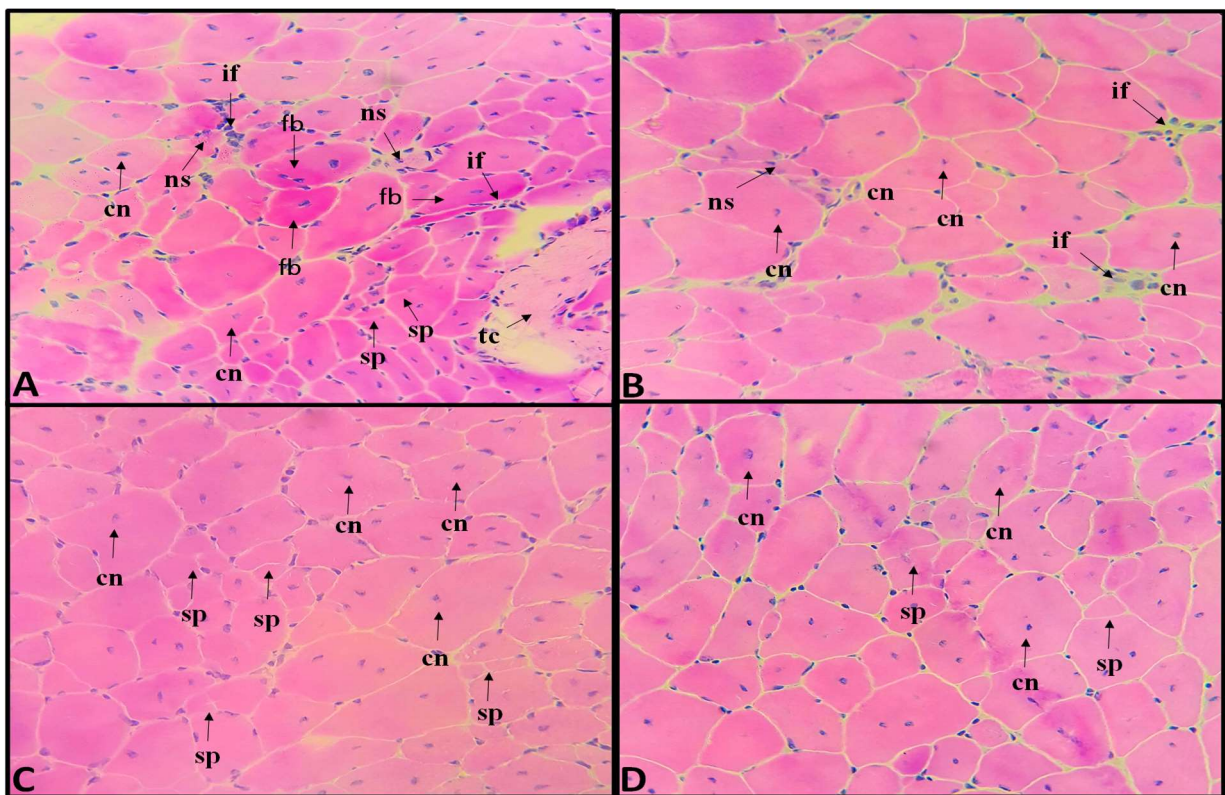
A Tabela 1 mostra as principais alterações morfológicas encontradas no músculo psoas dos animais *mdx* dos diferentes grupos analisados. O grupo *mdx* apresentou diversas alterações citoarquiteturais, tais como: aumento de tecido conjuntivo, centralização nuclear, fibras basofílicas, infiltrado inflamatório, necrose, entre outras. Após os animais serem submetidos aos procedimentos, foi possível observar uma atenuação dessas alterações. Nos grupos *mdxTRM* e *mdxM* a redução do tecido conjuntivo foi o que mais se destacou quando comparado aos grupos *mdx* e *mdxTR* e ainda, houve redução quantitativa de fibras basofílicas no *mdxTRM*. No aspecto geral das lâminas coradas em HE o grupo *mdxTRM* também mostrou melhor organização tecidual, como mostra a Figura 12.

Tabela 1 - Alterações morfológicas do músculo psoas dos grupos estudados.

Alterações	<i>mdx</i>	<i>mdxM</i>	<i>mdxTRM</i>	<i>mdxTR</i>
Aumento de Tecido Conjuntivo	100%	67,4%	67,4%	83,3%
Centralização Nuclear	100%	100%	100%	100%
Fibras Basofílicas	67,4%	67,4%	50,0%	83,3%
Infiltrado inflamatório	100%	100%*	100%*	100%*
Necrose	100%	100%*	100%*	100%*
<i>Splitting</i>	100%	100%	100%	100%
Variação de Tamanho	100%	100%	100%	100%

% referencia o número de camundongos que apresentaram anomalia no grupo

*representa menos de 5% das células.

Figura 12. Fotos do músculo psoas corados em Hematoxilina e Eosina (HE).

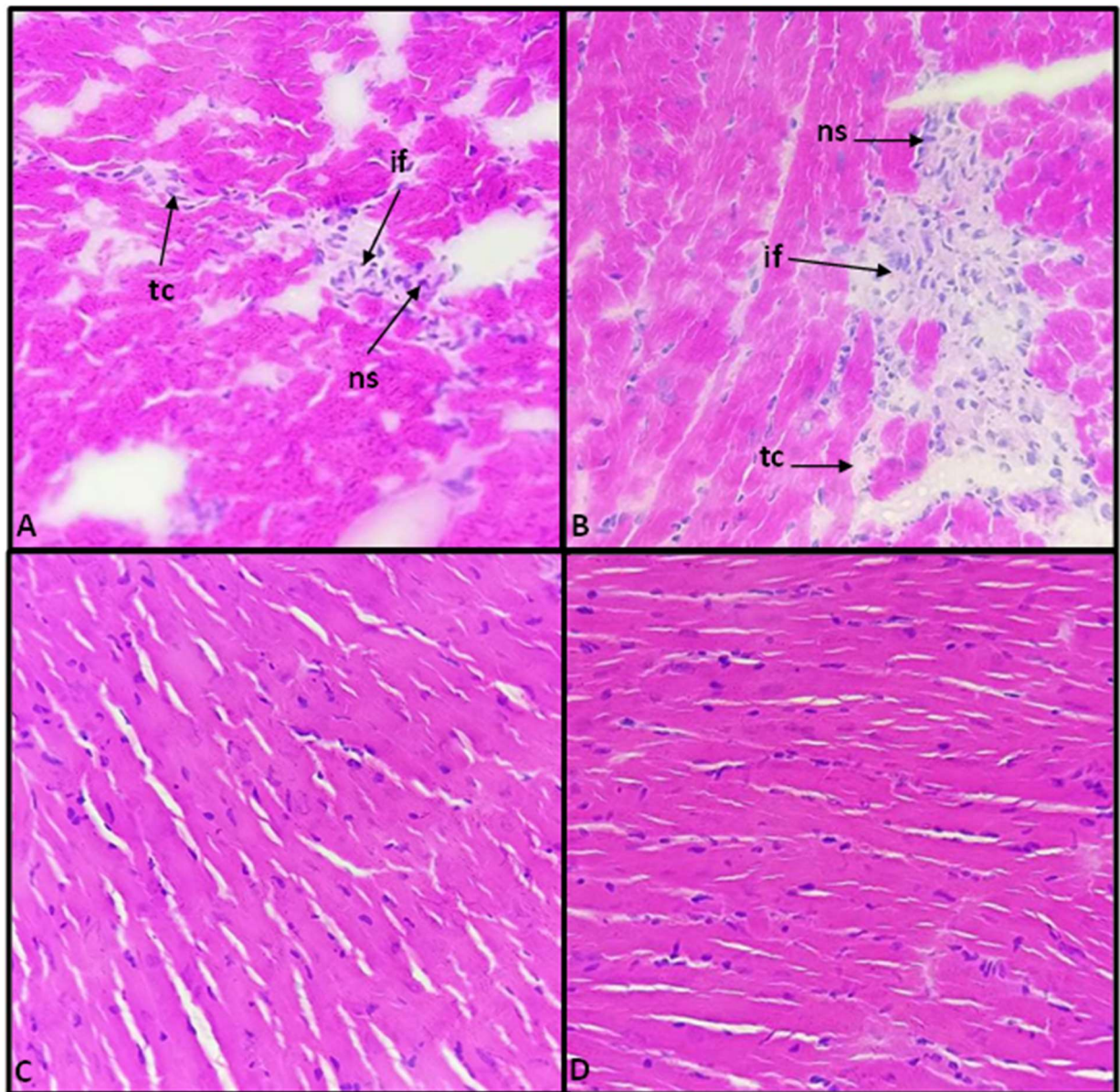
A - Grupo *mdx*: Alterações morfológicas expressivas foram observadas no músculo psoas dos camundongos, tais como: Aumento de tecido conjuntivo (**tc**), centralização nuclear (**cn**), fibras basofílicas (**fb**), infiltrado inflamatório (**if**), necrose (**ns**), *Splitting* (**sp**) e variação no tamanho das fibras (**tf**). **B - Grupo *mdx* treinado, C - Grupo *mdx* melatonina e D - Grupo *mdx* treinados com melatonina :** apresentaram melhora na citoarquitetura do tecido muscular após os procedimentos com melatonina e exercício, centralização nuclear (**cn**) e *Splitting* (**sp**).

Já no músculo cardíaco a ausência da distrofina mostrou determinar alterações morfológicas de caráter degenerativo mais evidentes do que no músculo esquelético. Na Figura 13A é possível observar que o grupo *mdx* apresenta alterações citoarquiteturais importantes, tais como: aumento de tecido conjuntivo, infiltrados inflamatórios, necrose

e alteração da morfologia da célula. Após as 21 sessões de treinamento de baixa intensidade, essas alterações mostraram-se mais expressivas no grupo *mdxTR* (Figura 13B), quando comparadas ao grupo sedentário (*mdx*).

Contudo, é notável a melhora das características citoarquiteturais nos animais que foram submetidos as doses de melatonina, independente do treino aeróbico de baixa intensidade (*mdxM* e *mdxTRM*) (Figuras 13C e 13D)

Figura 13. Fotos dos músculos cardíacos corados em Hematoxilina e Eosina (HE).



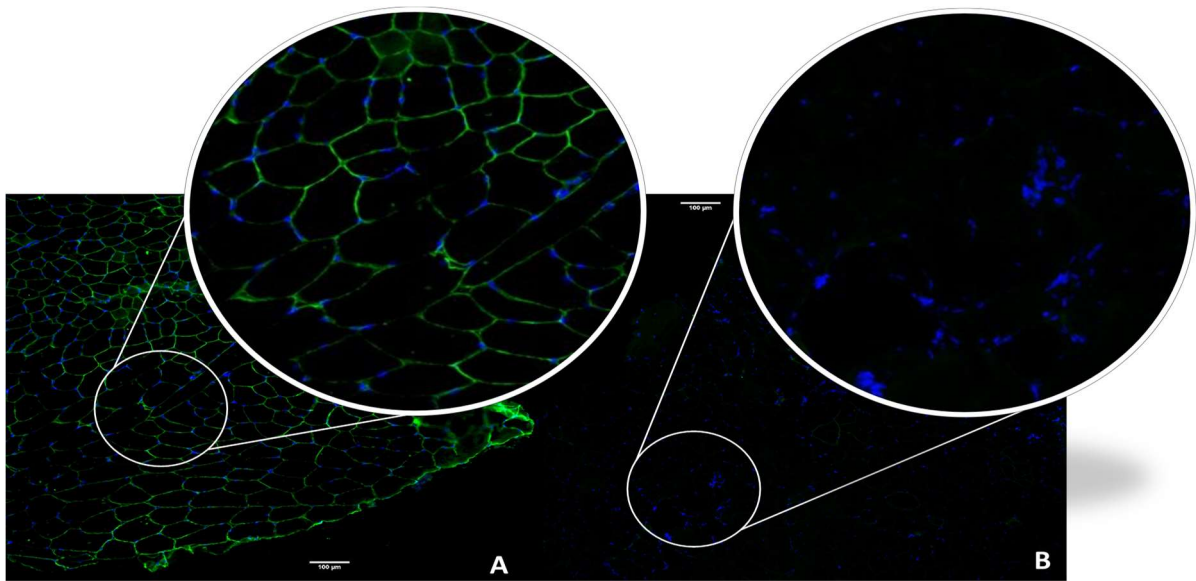
A - Grupo *mdx*: corte histológico de um animal representando o músculo cardíaco com Duchenne, o qual apresenta uma área de tecido conjuntivo (**tc**), com infiltrado inflamatório (**if**) e necrose (**ns**); **B-Grupo *mdxTR*:** observamos uma grande área de **tc** com **if** e **ns**; **C-Grupo *mdxM*:** observação de fibras organizadas, sem a presença de **tc**, **if** ou **ns**; **D-Grupo *mdxTRM*:** observação de fibras organizadas, sem a presença de **tc**, **if** ou **ns**.

5.3 Imunofluorescência

5.3.1 Distrofina no músculo psoas

Para certificação da ausência da distrofina nos animais *mdx* foi realizada a técnica de imunofluorescência para distrofina. Como controle positivo foi utilizado o músculo psoas de camundongo *wild-type* (Figura 14).

Figura 14. Fotomicrografias de lâminas processadas com anticorpo para distrofina.

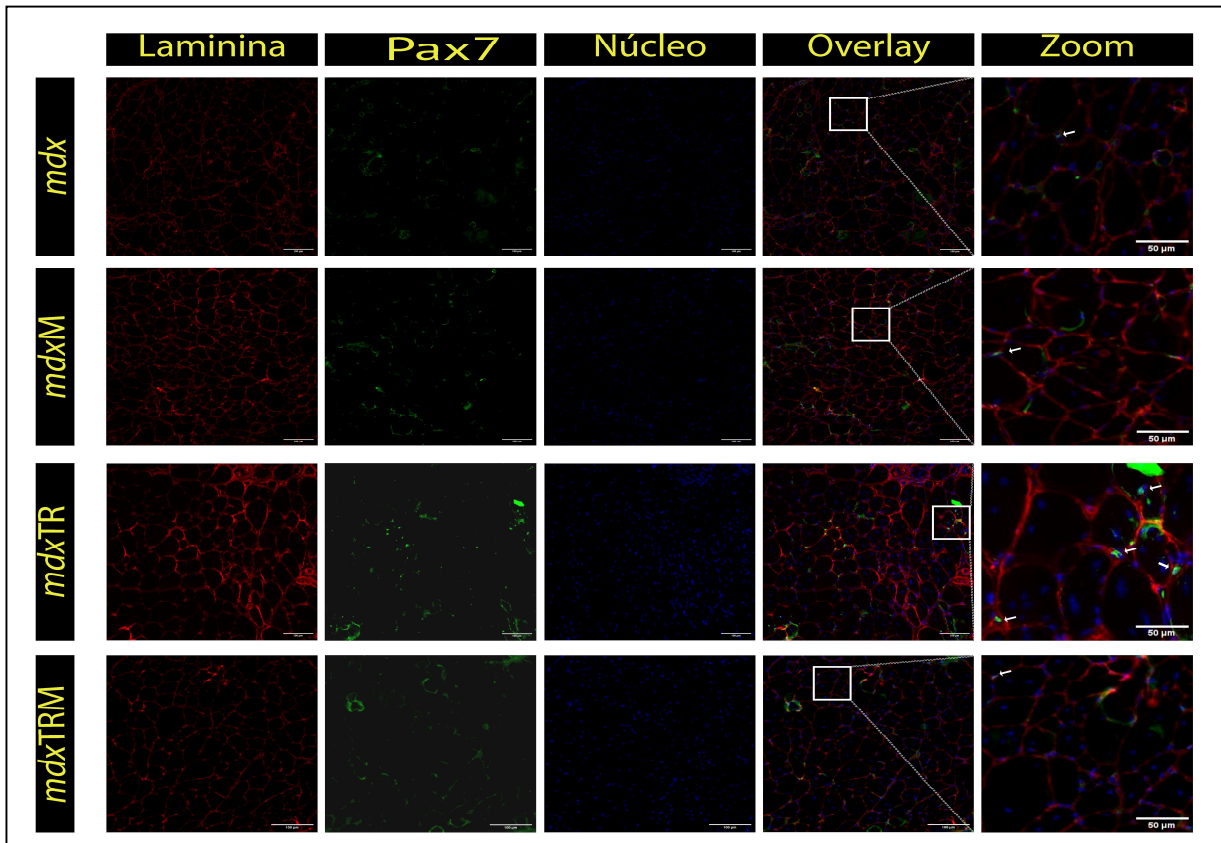


A – Imunomarcção para distrofina no músculo psoas de camundongo *wild-type*. **B** – Ausência de marcação para distrofina no músculo psoas de camundongo *mdx*.

5.3.2 Células Satélites no músculo psoas

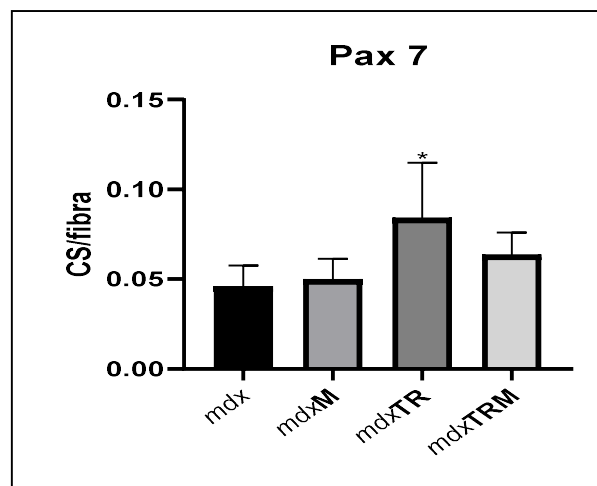
A Figura 15 ilustra através da técnica de imunofluorescência com anticorpo pax-7 as células satélites quiescentes e ativadas (verde) no tecido muscular esquelético. Como era esperado, após o treinamento houve aumento quantitativo das CS no músculo psoas desses animais distróficos (*mdx* x *mdxTR*, $p < 0.05$), sugerindo aumento de lesão muscular (Figura 16). Do mesmo modo esperávamos que as aplicações de melatonina intraperitoneal determinariam redução das CS. Contudo, é possível observar que os grupos submetidos as doses de melatonina não apresentaram diferenças quando comparados aos respectivos controles (*mdx* x *mdxM*; *mdxTR* x *mdxTRM*, $p > 0.05$) (Figura 16).

Figura 15. Fotomicrografia de cortes transversais do músculo psoas de camundongos *mdx* marcados com o anticorpo para Laminina, PAX7 e sobreposição do DAPI para marcação dos núcleos.



Grupo *mdx* com poucas marcações de CS. Grupo *mdxM*. Também apresentou poucas marcações de CS. Grupo *mdxTR* e grupo *mdxTRM*, apresentaram um número maior de marcações de CS. Marcação em vermelho (laminina), verde (PAX7) e em azul (núcleo); **setas brancas** apontando para as células satélites (PAX7), barra de escala 100µm.

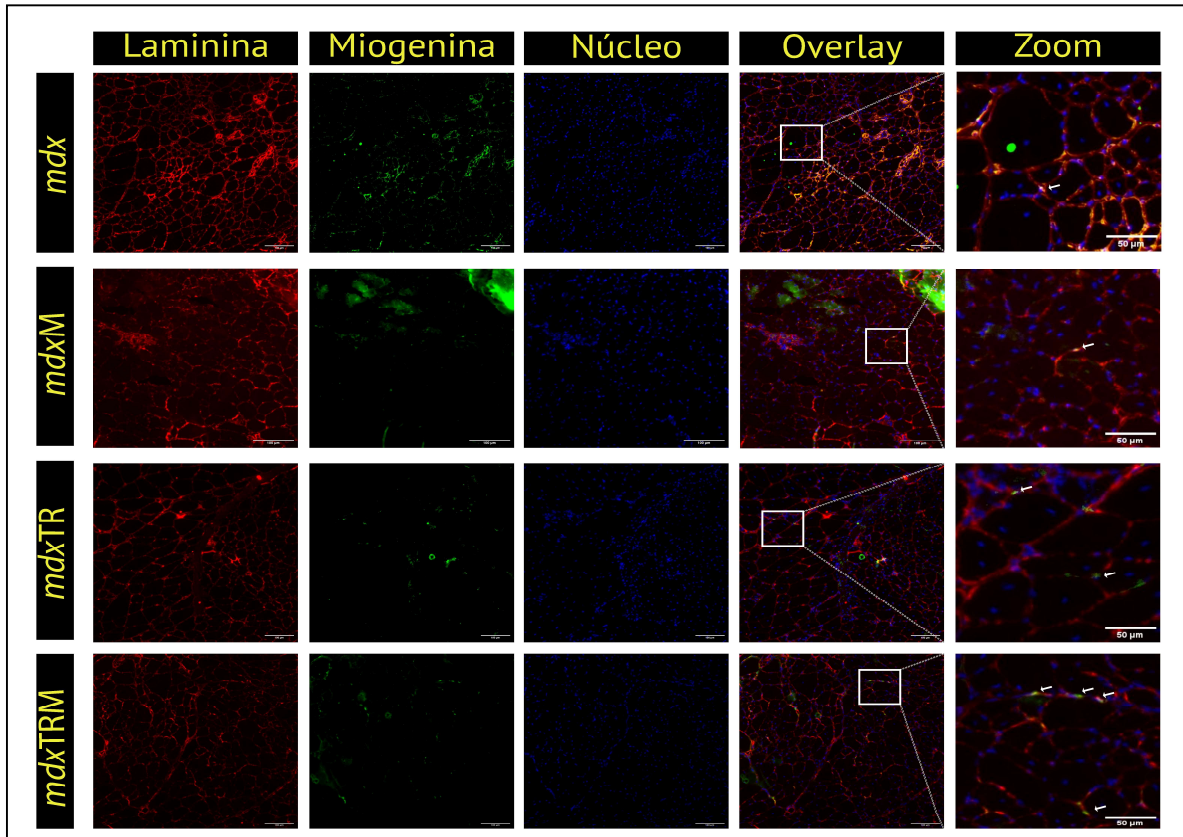
Figura 16. Quantificação de células satélites em fase de quiescência e ativação.



Os grupos *mdx* e *mdxM* apresentaram uma menor quantidade de CS quando comparados aos grupos treinados. Os grupos *mdxTR* e *mdxTRM* que fizeram 21 seções de treinamento apresentaram maior conteúdo de CS, porém o grupo que apresentou um aumento significativo em relação ao grupo *mdx* foi o grupo *mdxTR**

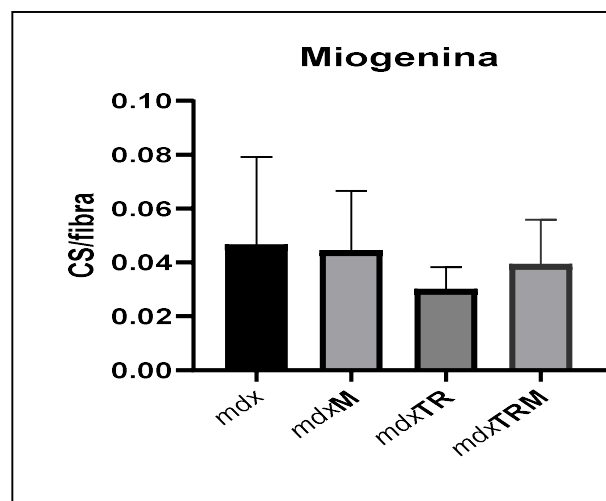
A Figura 17 ilustra a imunomarcação das CS através do marcador F5D (miogenina - verde). A análise quantitativa, das CS na fase de diferenciação e fusão, não mostrou diferença entre os grupos estudados (Figura 18).

Figura 17. Fotomicrografia de cortes transversais do músculo psoas de camundongos *mdx* marcados com o anticorpo F5D (miogenina) e com sobreposição do DAPI para marcação dos núcleos.



Os grupos *mdx* e *mdxM*, apresentaram poucas marcações de CS. Já os grupos *mdxTR* e grupo *mdxTRM*, apresentaram um número pouco maior de marcações de CS. Marcação em vermelho (laminina), verde (miogenina) e azul (núcleo); **setas brancas** apontando para as células satélites na fase de diferenciação e fusão (miogenina), barra de escala branca 100 e 50µm

Figura 18. Quantificação de células satélites em fase de diferenciação e fusão.

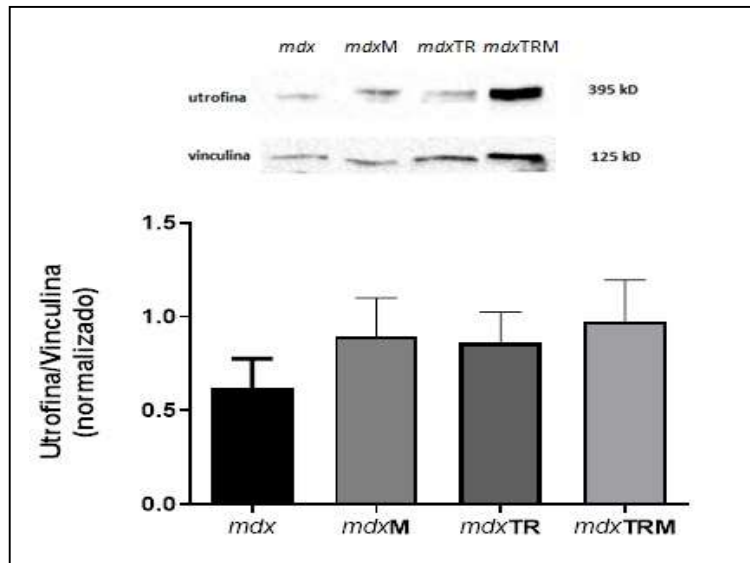


Os grupos *mdx* e *mdxM* apresentaram maior quantidade de CS em fase de fusão e diferenciação do que os grupos treinados *mdxTR* e *mdxTRM*. Porém não possível observar diferença estatística na comparação em nenhum dos grupos

5.4 Conteúdo Proteico de Utrofina no Músculo Cardíaco

Após a realização da técnica de *Western Blotting*, foi possível observar, mesmo sem significância estatística, aumento da utrofina em todos os grupos que foram submetidos aos procedimentos quando comparado ao grupo *mdx*, destacando-se mais uma vez, o grupo que teve a associação de ambos (*mdxTRM*) (Figura 19).

Figura 19. Conteúdo de proteína utrofina presente no músculo cardíaco dos grupos em estudo.



Western Blotting para a proteína utrofina (imagem representativa da membrana de blot e gráfico da semi-quantificação). Observamos que o treinamento aeróbio de baixa intensidade associado à aplicação de melatonina aumenta o conteúdo de utrofina no músculo cardíaco de camundongos *mdx*. A vinculina foi utilizada como controle de carregamento (normalizador).

6. Discussão

Que a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) não tem cura, é um fato amplamente conhecido pelo mundo científico. A progressão da DMD impacta de maneira expressiva em meninos portadores na faixa etária entre 7 e 12 anos (BELLO et al., 2016; FOWLER, et al., 2018). O exercício aeróbico vem sendo sugerido como uma terapia importante para esses pacientes, pois, mostram resultados benéficos para membros inferiores e superiores, além da melhora cardiovascular e pulmonar a longo prazo (ALEMDAROGLU et al., 2015; JANSEN et al., 2013). Além disso, já está documentado que o exercício aeróbico de baixa intensidade também melhora as características morfofuncionais de animais *mdx*, modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne (SANTOS et al., 2022; SIGOLI et al., 2022; FRINCHI, et al., 2021; ZELIKOVICH, et al.; 2019; PEDRAZZANI, et al., 2019).

Outras terapias, como as farmacológicas, também são amplamente investigadas e aplicadas em busca de aumento na qualidade e na sobrevivência desses portadores. Atualmente, os glicocorticóides são os mais utilizados como terapia farmacológica com objetivo de retardar a progressão da doença, levando os indivíduos a uma sobrevivência maior, porém, com efeitos colaterais importantes pelo uso prolongado, como já foi citado neste trabalho. Em busca de minimizar os efeitos colaterais de corticóides e um melhor resultado morfofuncional para os músculos esquelético e cardíaco, a melatonina vem sendo explorada no âmbito científico como uma terapia alternativa, pois seus efeitos colaterais são mínimos ou até mesmo ausentes (HIBAOUÏ et al., 2011; Mc CORNICK; VASILAKI, 2018). Contudo, não há relatos de estudo que associem ambas as terapias, melatonina e exercício aeróbico de baixa intensidade como terapia para o tratamento da DMD. Nesse estudo mostramos que a interação dessas terapias pode trazer melhoras para o músculo esquelético e cardíaco de camundongos *mdx*.

6.1 Os efeitos da melatonina associada ao exercício aeróbico de baixa intensidade no músculo esquelético

Nossos dados para teste funcional (preensão palmar) mostraram melhora significativa na força após 21 sessões de treinamento aeróbico (fase pós-treino) quando comparado com a fase pré-treino. Notoriamente, o grupo submetido a aplicações de melatonina se sobressaiu em relação ao grupo apenas treinado, mostrando maior força de pressão palmar. Por se tratar de um estudo novo não existe na literatura científica referências da associação dessas terapias que corroboram com nossos achados, porém estudos com essas terapias aplicadas de forma individualizada mostraram resultados similares aos aqui encontrados (SANTOS et al., 2022; ZELIKOVICH, et al., 2019).

Outro achado importante observado em nosso estudo, que pode justificar a melhora funcional, foi a melhora na morfologia do músculo psoas. Ambos os procedimentos impostos aos animais (melatonina e treino aeróbico de baixa intensidade), de maneira independente, mostraram ser efetivos na reestruturação tecidual, porém, quando associados os achados citoarquiteturais foram mais homogêneos e com menores alterações. Como já citado o exercício aeróbico de baixa intensidade tem mostrado ser importante no reestabelecimento da morfologia muscular. Já é sabido que o exercício aeróbico aumenta a expressão da proteína PGC-1 α , via da síntese da utrofina, proteína homóloga a distrofina, que tem função importante na estabilização da membrana celular.

Existem estudos referentes que observaram aumento da utrofina, no músculo esquelético após aplicação do exercício físico como terapia (SU e SONG, 2022; GUIRAUD et al., 2018; GORDON et al., 2014). Apesar deste estudo não ter quantificado a PGC-1 α nem a utrofina, nossa hipótese, baseada na literatura e estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, é que essa via esteja influenciando na proteção celular (SANTOS et al., 2022; SIGOLI et al., 2022; FARIA et al., 2022; FRINCHI, et al., 2021; ZELIKOVICH, et al.; 2019; PEDRAZZANI, et al., 2019).

No músculo esquelético, a melatonina preserva a função mitocondrial e na DMD é possível observar disfunções importantes que aumentam de maneira exponencial, como as ERO. Além disso, estudos mostraram que a melatonina é capaz de regular a homeostase do cálcio (SALUCCI et. Al., 2017; 2016; YEUNG et al., 2008; GOMEZ-PINILLA, et al., 2008). Essas afirmações podem justificar a redução observada em células basofílicas no grupo treinado e submetido as doses de melatonina neste estudo. Células basofílicas são aquelas que apresentam um citoplasma ácido e um dos desencadeantes é o excesso do influxo de cálcio intracelular. Na coloração de H.E a hematoxilina, por ser um corante básico, cora meios ácidos, por este motivo o citoplasma das células basofílicas apresentam-se roxeados. Assim como no exercício de baixa intensidade, a melatonina também mostra ser um fator estimulante da biogênese mitocondrial, um potente antioxidante e anti-inflamatório, via PGC-1 α (STACCHIOTTI et al., 2020).

Apesar da literatura científica não reportar estudos que tenham analisado músculos distróficos submetidos a treinos aeróbicos de baixa intensidade e doses exógenas de melatonina, estudos que envolvem análises dos procedimentos isolados mostram que ambos tem grande potencial de ativação de via PGC-1 α , o que pode sugerir que quando aplicados em associação podem potencializar os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e assim, melhorar a estruturação e estabilização da membrana celular, justificando nossos achados para redução de alterações morfológicas e reestabelecimento da força de preensão.

Outros alvos do exercício aeróbico de baixa intensidade e da melatonina que podem favorecer o restabelecimento morfofuncional muscular, são as células precursoras de miogênese, também conhecidas como células satélites. Nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade na população de células

satélites durante ativação, fusão e diferenciação das mesmas no processo de reparação de músculos distróficos. Em estudo recente, observamos aumento no número de células satélites (CS) ativadas (expressão Pax-7) no músculo psoas de camundongos *mdx*, após 37 sessões de exercício aeróbio de baixa intensidade (SIGOLI, et al., 2022). Esse achado corrobora com nossos atuais achados, mesmo após 21 sessões de exercício. O aumento de CS ativas já era esperado, independente se o músculo é distrófico ou normal, após situações de estresse, como o exercício físico. Nos casos de músculos distróficos o dano muscular é crônico, independente do exercício, e essas lesões constantes determinam ativação recorrentes do ciclo de degeneração-regeneração, ativando inúmeras vezes CS, podendo levá-las a exaustão (SIGOLI, et al., 2022; MEADOWS, et al. 2011; JIN, et al., 2000).

Positivamente, é possível observar que o aumento dessas células pode estar relacionado ao desempenho normal de suas funções, após situações de estresses. Contudo, não sabemos a longo prazo se as lesões determinadas pelo exercício físico, mesmo que de baixa intensidade, possa levar a exaustão completa dessas células e o músculo vir a perder sua capacidade regenerativa. Por outro lado, não observamos aumento na expressão de CS em diferenciação (fase que libera miogenina como fator de transcrição miogênico). Uma hipótese que pode justificar os dados para miogenina é baseada em estudos que afirmam que este fator de transcrição é expresso temporariamente na fase de diferenciação e além disso, esta fase é acelerada em músculos distróficos, ou seja, as células musculares são reparadas em menor tempo, devido a constância na ativação do ciclo degeneração-regeneração, quando comparado aos músculos normais, apresentando assim, uma morfologia mais adequada ao tecido (YABLONKA-REUVENI e ANDERSON, 2006; WHITE et al., 2000; SABOURIN et al., 1999).

Curiosamente, estudo afirma que a miogenina não é essencial na viabilidade da regeneração do músculo de camundongos *mdx*. Após, 6 meses de nocautear o gene para miogenina em camundongos *mdx*, observaram que os camundongos não apresentaram alterações fenotípicas, mantiveram peso corporal e exibiram mobilidade normal quando comparados aos animais selvagens. Esses autores também submeteram esses animais *mdx* ao treino de alta intensidade para analisar a fadiga muscular. Foi identificado que os animais *mdx*-miogenina⁻ são mais propensos a exaustão quando comparados aos animais selvagens, porém mais resistentes aos animais *mdx*-miogenina⁺. Sendo assim, eles acreditam que a falta de distrofina neste contexto genético misto causa trauma muscular

suficiente em camundongos adultos *mdx*, limitando assim a sua resistência ao exercício e que a manutenção e regeneração muscular ocorrem normalmente após o exercício de animais adultos sem miogenina sugerindo que, a miogenina não desempenha um papel crítico durante a manutenção do músculo esquelético adulto (MEADOWS, 2010). Esses achados podem justificar nossos resultados para miogenina após exercício de baixa intensidade.

Em busca de potencializar os efeitos benéficos do exercício de baixa intensidade frente as CS e conter aqueles que podem estimular o fenótipo da doença, como aumento de inflamação e de ERO, nosso estudo contou com doses de melatonina visando seu poder anti-inflamatório e antioxidante. Chahbouni et al, (2020) observaram normalização plasmática de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo em pacientes portadores da DMD, após tratamento com melatonina. Nossos resultados mostraram que a melatonina associada ao exercício de baixa intensidade reduziu o número de CS na expressão de Pax-7, porém, essa diferença não apresentou significância “estatística” quando comparada aos grupos *mdx* e *mdxTR*. Contudo, clinicamente esse achado pode ser importante, pois sugere que a melatonina possa ter mediado um efeito protetor ao músculo, ou seja, impedindo mais danos teciduais durante a execução do exercício. Essa hipótese pode ser fortalecida pelos nossos resultados da morfologia e da função muscular, que se apresentaram nitidamente melhores quando comparados aos outros grupos.

A associação da melatonina com exercício de baixa intensidade ainda é um procedimento com poucos ou nenhum resultado científico quando se trata de análise quantitativa de células satélites. Contudo, existem evidências consideráveis que apoiam os efeitos benéficos da melatonina na função do músculo esquelético em lesões traumáticas agudas ou doenças metabólicas, onde a melatonina atua positivamente na regeneração muscular e previne a disfunção mitocondrial. Músculos sarcopenicos mostraram melhora significativa na função, trofismo, morfologia e redução de CS após a associação de melatonina e exercício aeróbico em esteira (MONKHONG et al., 2023; TEODORO, et al., 2014; STRATOS, et al., 2012). Esses estudos corroboram parcialmente com nossos achados, pois também observamos resultados positivos no quesito morfofuncional e para CS após a interação dos procedimentos, porém não podemos nos apoiar totalmente nesses estudos, já que esses animais sarcopenicos apresentam a proteína distrofina na membrana. Por outro lado, o exercício e a melatonina podem estar estimulando a via PGC-1 α , que por sua vez ativa a via da síntese da utrofina

determinando estabilização da membrana e conseqüentemente, menos lesão e menor recrutamento de células satélites.

6.2 Os efeitos da melatonina associada ao exercício aeróbico de baixa intensidade no músculo cardíaco

Assim como o músculo esquelético, o músculo cardíaco também é afetado pela ausência da proteína distrofina na DMD. Essa ausência leva os pacientes a desenvolverem cardiomiopatias que podem levá-los a óbito, por insuficiência cardíaca (KENNEDY et al., 2018; BIRNKRANT DJ et al., 2016). Assim como mencionado acima no tópico para o músculo esquelético, a utrofina, proteína homóloga a distrofina, também exerce um papel semelhante na estabilização e estruturação das fibras musculares cardíacas durante o processo mecânico de contração muscular (SU e SONG, 2022; GUIRAUD et al., 2018; KENNEDY et al., 2018; GORDON et al., 2014). Porém, a utrofina está presente apenas na fase inicial de desenvolvimento muscular, após essa fase, no músculo adulto (maduro), a utrofina é paulatinamente substituída pela distrofina no sarcolema (GUIRAUD et al., 2018; GUIRAUD et al., 2015; CLERK A, et al., 1993; OHLENDIECK et al., 1991). Grady et al., (1997) afirmam que a utrofina aumenta no músculo dos camundongos *mdx* como um efeito protetor pela ausência da distrofina.

A literatura nos traz que o exercício aeróbico de baixa intensidade também pode ser eficiente na função e morfologia do músculo cardíaco (FRINCHI et al., 2021; MORICI et al., 2017; FRINCHI et al., 2014; SELSBY et al., 2013), porém esses estudos não corroboram com os nossos achados, pois, nossas análises mostraram uma piora frente a morfologia dos músculos cardíacos dos camundongos que foram submetidos apenas ao exercício físico, porém, vale salientar que esses estudos tiveram uma metodologia diferente, o que pode ter corroborado para essa diferença de resultados. Por outro lado, os camundongos que receberam a aplicação i.p. de melatonina, mesmo sem serem submetidos a terapia com o exercício físico, já mostraram uma melhora significativa em sua apresentação morfológica, melhora essa que ficou ainda mais evidente quando associamos as duas terapias (exercício/melatonina), como mostra a Figura 13. No entanto outros estudos nos trazem que o exercício pode acelerar as alterações patológicas no músculo cardíaco quando empregado em altas intensidades (MORRONI et al., 2021). São escassos os estudos que envolvem análise da utrofina no músculo cardíaco distrófico após treino aeróbico de baixa intensidade.

Nosso estudo mostrou através da técnica de *Western Blot* resultados promissores frente a expressão da proteína utrofina no músculo cardíaco, mesmo sem significância estatística”, porém clínica. Os procedimentos impostos de maneira separada mostraram aumento no conteúdo da utrofina quando comparado ao grupo *mdx*. Já a associação do exercício e da melatonina mostrou ser mais eficiente na morfologia e no aumento da expressão da utrofina. Infelizmente, não há relatos científicos que fomentam nossos achados para o músculo cardíaco distrófico. Contudo, acreditamos que, da mesma maneira observada no músculo esquelético, esses procedimentos podem estar influenciando vias que sintetizam a utrofina, como a PGC-1 α .

Apesar dos músculos aqui analisados serem distintos e a análise para utrofina não ter sido realizada no músculo esquelético, os achados morfológicos para ambos os músculos estudados mostraram que o emprego das terapias associadas atuou de maneira positiva, já que o desfecho final (morfologia) apresentou melhora qualitativa, ou seja, o exercício aeróbico de baixa intensidade pode estar estimulando junto com a melatonina vias que sintetizam proteínas estruturais (utrofina), mantendo a membrana estável evitando mais lesões e ainda, a melatonina pode estar atuando como principal agente antioxidante e anti-inflamatório, determinando assim, melhora na estrutura morfológica de ambos os músculos.

7. Conclusão e Perspectivas Futuras

Os nossos achados morfológicos mostraram que o emprego das terapias associadas (exercício aeróbico de baixa intensidade/melatonina) atuou de maneira positiva, apresentando melhora qualitativa, ou seja, as terapias podem ter estimulado vias que sintetizam proteínas estruturais como a via da utrofina, mantendo a estabilidade da membrana evitando mais lesões e ainda, a melatonina pode ter atuado como principal agente antioxidante e anti-inflamatório, determinando assim melhora na estrutura morfológica de ambos os músculos. Para tanto concluímos que as terapias associadas puderam melhorar a morfologia dos músculos psoas e cardíaco e ainda a função muscular esquelética.

Algumas limitações no estudo impediram que concluíssemos com mais convicção que essas terapias quando associadas podem ser eficientes no tratamento de músculos distróficos, foram elas: (1) quantificação da creatina quinase, onde está proteína sérica

poderia confirmar a redução de lesão da membrana celular, observada na morfologia ; (2) quantificação da utrofina no músculo esquelético, que poderia confirmar nossas hipóteses sugestivas apresentadas na discussão; (3) quantificação da PCG-1 α em ambos os músculos, pois acreditamos que esta via está sendo diretamente estimulada pelo exercício e pela melatonina. Devido a esses entraves metodológicos acreditamos que poderemos responder essas questões levantadas através de novos estudos experimentais que serão desenvolvidos no nosso grupo no futuro.

8. Implicações Clínicas

Até o momento não existe na literatura científica, estudos que associem o exercício físico de baixa intensidade e a melatonina, como possível tratamento para Distrofia Muscular de Duchenne, mas essas terapias de forma individualizada já estão bem documentadas como modalidades terapêuticas para retardar o processo degenerativo de músculos distróficos. Para os portadores dessa mutação genética, esses estudos são de extrema importância, pois, os tratamentos atuais a base de corticoides, apesar de retardar a progressão da doença, traz junto diversos efeitos colaterais. No entanto deve-se ter cautela na sua prescrição, pois, devem ser prescritas de forma individual e baseando-se sempre em avaliações físicas e funcionais do portador da DMD. Para tanto, ainda se faz necessário mais estudos, para avaliar os benefícios desta associação primeiramente em animais modelo para DMD, visto que teste em humanos é inviável devido ao risco de agravar o quadro da doença.

9. Referências

1. Alemdaroglu, I., Karaduman, A., Yilmaz, O. T. & Topaloglu, H. Different types of upper extremity exercise training in Duchenne muscular dystrophy: effects on functional performance, strength, endurance, and ambulation. *Muscle & nerve* 51, 697–705, <https://doi.org/10.1002/mus.24451> (2015).
2. Alvarez-Artime, Alejandro et al. Melatonin-induced cytoskeleton reorganization leads to inhibition of melanoma cancer cell proliferation. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 2, p. 548, 2020
3. ABCAM. Loading Control Guide. [s. l.], 2016. Disponível em: <http://www.abcam.com/primary-antibodies/loading-control-guide>. Acesso em: 23 set. 2021.

4. Andersen, Lars P.H. e colab. Pharmacokinetics of high-dose intravenous melatonin in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 56, n. 3, p. 324–329, 2016.
5. Andersen, Lars Peter. The analgesic effects of exogenous melatonin in humans. *Dan Med J*, v. 63, n. 10, p. B5289, 2016.
6. AMARIO, D. D. *et al.* A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy. p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311269>
7. Annexstad, E. J.; Lund-Petersen, I.; Rasmussen, M. Duchenne muscular dystrophy. n. 14, p. 1361–1364, 2014.
8. Arbanas J, Klasan GS, Nikolic M, Jerkovic R, Miljanovic I, Malnar D. Fibre type composition of the human psoas major muscle with regard to the level of its origin. *J Anat.* 2009 Dec;215(6):636-41. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01155.x. PMID: 19930517; PMCID: PMC2796786.
9. Araújo Apqc. Distúrbios respiratórios na distrofia muscular de Duchenne. *Arq Bras Med.* 1992; 66(5):441-3.
10. Asfour HA, Allouh MZ, Said RS. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Experimental Biology and medicine.* 2018;243(2):118-128. doi:10.1177/1535370217749494
11. Associação Brasileira De Distrofia Muscular. Distrofia muscular tipo Duchenne. In: São Paulo, 2002. ABDIM. Disponível em: <https://abdimviverbemsem limite.org.br>. Acesso em: 18 de setembro de 2022.
12. Baird, Marianne F. e colab. Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 2012, 2012.
13. Bello L, Gordish-Dressman H, Morgenroth LP, et al. Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology* 2015;85(12):1048–55.
14. Bimkrant DJ, Ararat E., Mhanna MJ O fenótipo cardíaco determina a sobrevivência na distrofia muscular de Duchenne. *Pediatr. Pulmonol.* 2016; 51 :70–76.
15. Biorad. Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting Instruction Manual. 2010.
16. BLAKE, D. J.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E. Utrophin: A Structural and Functional Comparison to Dystrophin. p. 37–47, 1996.
17. Bonilla E., Lamitt C.E., Miranda A.F. et al.: Duchenne Muscular Dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, 54/4 (447-452), 1988.
18. Bonomini, F. et al. Dietary Melatonin Supplementation Could be a Promising Preventing/Therapeutic Approach for a Variety of Liver Diseases. *Nutrients*, v. 10, 1135, 2018.
19. Botas, Filipe Manuel Carvalho. O papel da melatonina. Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz, p. 1–68, 2016.
20. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangre P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 26(8):412-419, 2005.
21. Brussee V, Tardif F, Tremblay JP. Muscle fibers of *mdx* mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscular disorders: NMD.* 1997; 7(8):487–492.

22. BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy , part 1 : diagnosis , and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, v. 9, n. 1, p. 77–93, 2010 a. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6)
23. BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy , part 2 : implementation of multidisciplinary care. *The Lancet Neurology*, v. 9, n. 2, p. 177–189, 2010 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70272-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70272-8)
24. Bulfield, G.; Siller, W. G.; Wight, P.A.; Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci*, 81:1189-1192, 1984.
25. Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res*. 45(3):302–311, 2008.
26. Canteras NS, Ribeiro-Barbosa ER, Goto M, Cipolla Neto J, Swanson LW. The retinohypothalamic tract: comparison of axonal projection patterns from four major targets. *Brain Res Brain Res Rev*. 2011;65(2): 150–183
27. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res*. 44(2):157–164, 2008.
28. Caromano FA. Características do portador de distrofia muscular de Duchenne: Revisão. *Arq Cienc Saude Unipar* 1999;3(3):211-218.
29. Casares, Doralicia e Escribá, Pablo V. e Rosselló, Catalina Ana. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 9, 2019.
30. Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, García JA, López LC, et al. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res* 2010;48: 282–9.
31. Chahbouni, M.; Escames, G.; López, L. C.; Sevilla, B.; Doerrier, C.; Muñoz-Hoyos, A.; Molina-Carballo, A.; Acuña-Castroviejo, D. Melatonin treatment counteracts the hyperoxidative status in erythrocytes of patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Clinical Biochemistry*, v. 44, n. 10–11, p. 853–858, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.04.001>
32. Chargé, Sophie BP; Rudnicki, Michael A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.
33. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. 56:371-81, 2014.

34. Cielo, Carla Aparecida et al. Músculo tiroaritenóideo e som basal: uma revisão de literatura. *Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia*, v. 16, n. 3, p. 362–369, 2011.
35. Claustrat, B.; Leston, J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, v. 61, n. 2-3, p. 77-84, 2015.
36. Clerk A, Morris GE, Dubowitz V, et al. Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem J*. 1993 Aug;25(8):554–561.
37. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, et al. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 1995; 270:1681-1683
38. Crisafulli, S.; Sultana, J.; Fontana, A.; Salvo, F.; Messina, S.; Messina, S.; Trifirò, G. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: An updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 15, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01430-8>
39. Cruzat, V.F. et al. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 13, n. 5, p. 304–310, 2007.
40. DE BACKER, F.; VANDEBROUCK, C.; GAILLY, P.; GILLIS, M. Long-term study of Ca^{2+} homeostasis and survival in collagenase-isolated muscle fibers from normal and *mdx* mice. *Journal of Physiology*, v. 543, n. 3, p. 855-865, 2002.
41. Deconinck, N.; Dan, B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>
42. De Luca A, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Fraysse B, Mirabella M, Servidei S, Ruegg UT, Conte Camerino D. Enhanced dystrophic progression in *mdx* mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003; 304(1):453–463
43. Devavry S, Legros C, Brasseur C, Cohen W, Guenin SP, Delagrangé P, Malpoux B, Ouvry C, Cogé F, Nosjean O, Boutin JA. Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT_1 and MT_2 . *Eur J Pharmacol*. 29;677(1-3):15-21, 2012.
44. Drijfhout WJ, van der Linde AG, Kooi SE, Grol CJ, Westerink BH. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem*. 1996;66(2):748–755.
45. Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT_1 and MT_2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine*, 27(2), 101–110.
46. Duan, D.; Goemans, N.; Takaeda, S.; Mercuri, E.; And Aartsma-Rus, A. Duchenne muscular dystrophy. *Indian Pediatrics*, v. 7, n. 8, p. 429–441, 2021
47. Emery AEH. The muscular dystrophies (Fortnightly Review). *BMJ* 1998;317(7164):991-996.
48. Elmahallawy, Ehab Kotb et al. Melatonin and mesenchymal stem cells as a key for functional integrity for liver cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 4521, 2020.

49. Fachardo GA, Carvalho SCP, Vitorina DFM. Tratamento hidroterápico na distrofia muscular de Duchenne: Relato de um caso. *Rev Neurociências* 2004;12(4):16
50. Ferlazzo, Nadia et al. Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century. *Antioxidants*, v. 9, n. 11, p. 1088, 2020.
51. Ferreira, Alice Teixeira. Fisiologia da Contração Muscular. *Revista Neurociências*, v. 13, p. 60–62, 2019.
52. Ferreira, Filipe e Ferreira, Rita e Duarte, José Alberto. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, v. 2007, n. 2, p. 257–275, 2007
53. Filgueiras MQ. Glândula Pineal: revisão da anatomia e correlações entre os marca-passos e fotoperíodos na sincronização dos ritmos circadianos. *HU revista, Juiz de Fora*, 32(2):47-50, 2006.
54. Fonseca, Jakeline Gordinho e Machado, Marcella Jardim da Franca e Ferraz, Cristiane Leal de Moraes e Silva. Distrofia muscular de Duchenne: complicações respiratórias e seu tratamento. *Revista de Ciências Médicas*, v. 16, n. 2, p. 109–120, 2012.
55. Foschini, Rosália Maria Simões Antunes e Ramalho, Fernando Silva e Bicas, Harley E. A. Células satélites musculares. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 67, n. 4, p. 681–867, 2004.
56. Frinchi, M.; Macaluso, F.; Licciardi, A.; Perciavalle, V.; Coco, M.; Belluardo, N.; Morici, G.; Mudo, G. Recovery of damaged skeletal muscle in mdx mice through low-intensity Endurance exercise. *Int. J. Sports Med.* 2014,35,19–27. [CrossRef][PubMed]
57. Frinchi, M.; Morici, G.; Mudó, G.; Maria, R.; Liberto, V. D. Beneficial Role of Exercise in the Modulation of *mdx* Muscle Plastic Remodeling and Oxidative Stress. *Antioxidants*, 10: 558, 2021.
58. Gaiad, T. P. et al. Low-intensity training provokes adaptive extracellular matrix turnover of a muscular dystrophy model. *Journal of Exercise Rehabilitation*, v. 13, n. 6, p. 693–703, 2017.
59. Gander PH, Moore-Ede MC. Light-dark masking of circadian temperature and activity rhythms in squirrel monkeys. *Am J Physiol.* 245(6):R927-R934, 1983.
60. Ghosh G, De K, Maity S, Bandyopadhyay D, Bhattacharya S, Reiter RJ, Bandyopadhyay A. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J Pineal Res.* 42(1):71–82, 2007.
61. Gielen, S.; Laughlin, M. H.; Conner, C. O.; Duncker, D.; Balady, G. Exercise Training in Patients with Heart Disease: Review of Beneficial Effects and Clinical Recommendations. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2014.10.001>

62. GIGLIO, V. Left Ventricular Function and Response to Enalapril in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy During the Second Decade of Life. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.10.007>
63. Gillis, J. M. Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the *mdx* mouse, na animal modelo f the Duchenne muscular dystrophy: a review. *Acta physiologica Scandinavica*, v. 156, n. 3, p. 397 – 405, 1996.
64. Glesby, M. J.; Rosenmann, E.; Nylen, E. G.; Wrogemann, K. Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in *mdx* mouse muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, v. 11, n. 8, p. 852 – 856, 1988.
65. Gomez-Pinilla PJ, Camello PJ, Pozo MJ. Protective effect of melatonin on Ca²⁺ homeostasis and contractility in acute cholecystitis. *J Pineal Res* 2008; 44: 250-260.
66. Górecki, D. C. Dystrophin : The dead calm of a dogma. v. 5511, n. March, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1153777>
67. Gowers W. Clinical lecture on pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet* 2: 1–2, 37–39, 73–35, 113–116, 1879.
68. Goyenvalle, A.; Seto, J. T.; Davies, K. E.; And Chamberlain, J. Therapeutic approaches to muscular dystrophy. v. 20, n. 1, p. 69–78, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr105>
69. Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):729-38. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80533-4. PMID: 9288752.
70. Grounds, M. D. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11): 1621-1625, 2008.
71. Guiraud, S. et al. Second-generation compound for the modulation of utrophin in the therapy of DMD. v. 24, n. 15, p. 4212–4224, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv154>
72. Guiraud, S.; Roblin, D.; Kay, D. E. The potential of utrophin modulators for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, v. 6, n. 3, p. 179–192, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21678707.2018.1438261>
73. Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
74. Hardeland, Rüdigger. Melatonin: Signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *BioFactors*, v. 35, n. 2, p. 183–192, 2009.
75. Hardeland, R., Tan, D.-X., Reiter, R. J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *Journal of Pineal Research*, 2009. 47(2), 109–126. doi:10.1111/j.1600- 079X.2009.00701.x

76. Heran, B.; Chen, J.; Ebrahim, S.; Moxham, T.; Oldridge, N.; Rees, K.; Thompson, D.; Taylor, R. Exercise-based cardiac rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2016, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001800.pub3>
77. Hyzewicz, Janek e Ruegg, Urs T. e Takeda, Shin'Ichi. Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for *mdx* Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Journal of Neuromuscular Diseases*, v. 2, n. 4, p. 325–342, 2015.
78. Hibaoui, Youssef et al. Melatonin improves muscle function of the dystrophic *mdx* 5Cv mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Pineal Research*, v. 51, n. 2, p. 163–171, 2011.
79. Jefferies, J. L.; Eidem, B. W.; Belmont, J. W.; Craigen, W. J.; Ware, S. M.; Fernbach, S. D.; Neish, S. R.; Smith, E. O. B.; Towbin, J. A. Genetic Predictors and Remodeling of Dilated Cardiomyopathy in Muscular Dystrophy. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/Circulationaha.104.528281>
80. Jin, Y.; Murakami, N.; Saito, Y.; Goto, Y.I.; Koishi, K.; Nonaka, I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. *Acta Neuropathol.* 2000, 99, 619–627.
81. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangre P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol.* 154(6):1182-95, 2008.
82. Julie, Youssef Hibaoui et al. Melatonin Improves Muscle Function of the Dystrophic *mdx* Mouse, a Model for Duchenne Muscular Dystrophy. v. 123, n. 24, p. 4757–4763, 2018.
83. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1960;52(2): 163–215.
84. Kennedy TL, Guiraud S, Edwards B, Squire S, Moir L, Babbs A, Odom G, Golebiowski D, Schneider J, Chamberlain JS, Davies KE. Micro-utrophin Improves Cardiac and Skeletal Muscle Function of Severely Affected D2/*mdx* Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018 Oct 16;11:92-105. doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.005. PMID: 30417024; PMCID: PMC6216100.
85. Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res.* 45(4):394–402, 2008.
86. Klein DC, Schaad NL, Namboodiri MA, YuL, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem Soc Trans.* 1992;20(2): 299–304.
87. Kleszczyński, Konrad et al. Clinical trials for use of melatonin to fight against COVID-19 are urgently needed. *Nutrients*, v. 12, n. 9, p. 2561, 2020.
88. Kogelman, B.; Putker, K.; Hulsker, M.; Winter, C. T.; Van Der Weerd, L.; Aartsma-Rus, A.; Van Putten, M. Voluntary exercise improves muscle function and does not exacerbate muscle and heart pathology in aged Duchenne muscular dystrophy mice. *Journal of Molecular and*

- Cellular Cardiology, v. 125, n. August, p. 29–38, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.008>
89. Konstam, M. A.; Kramer, D. G.; Patel, A. R.; Maron, M. S.; Udelson, J. E. Left Ventricular Remodeling in Heart Failure: Current Concepts in Clinical Significance and Assessment. *JCMG*, v. 4, n. 1, p. 98–108, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2010.10.008>.
90. Krause, Diana N. E Dubocovich, Margarita L. Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends in Neurosciences*, v. 13, n. 11, p. 464–470, 1990.
91. Lee, T. H.; Eun, L. Y.; Choi, J. Y.; Kwon, H. E.; Lee, Y.; Kim, H. D.; Kang, S.-W. Myocardial atrophy in children with mitochondrial disease and Duchenne muscular dystrophy. v. 57, n. 5, p. 232–239, 2014.
92. Łoboda, A.; Dulak, J. Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: past, present, and future. [S. l.]: Springer International Publishing, 2020. v. 72E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00134-x>
93. Lefaucheur, J. P.; Pastoret, C.; Sebille, A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. *Anat Rec*, 242(1):70-6, 1995.
94. Lowe, D, A. Williams, B, O. Thomas, D, D. Grange, R, W. “Molecular and cellular Contractile Dysfunction of Dystrophic Muscle from Young Mice.” *Muscle Nerve*.34(1): 92-100. 2006.
95. Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., & Gonzalez, F. J. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metabolism and Disposition*, 2005. 33(4), 489–494. doi:10.1124/dmd.104.002410.not
96. Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., Tan, D.-X., Ceraulo, L., & Gonzalez, F. J. Urinary metabolites and antioxidant products of exogenous melatonin in the mouse. *Journal of Pineal Research*, 2006. 40(4), 343–349. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00321.x
97. Mallia, A. K.; Frovenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.; Company, P. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid’. v. 85, p. 76–85, 1985.
98. Manchini, M. T.; Boiati, R. F.; Malaguti, C.; Nascimento, J. W. L. Repercussões musculares do uso de glicocorticóides na distrofia muscular de Duchenne e na DPOC. *Ter. man*, v. 8, n. 35, p. 70–77, 2021.
99. Mankhong S, Kim S, Moon S, Lee JS, Cho EJ, Kwak HB, Park DH, Ryu JK, Kang JH. Melatonin and Exercise Counteract Sarcopenic Obesity through Preservation of Satellite Cell Function. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 23;24(7):6097. doi: 10.3390/ijms24076097. PMID: 37047070; PMCID: PMC10094434.
100. Mariam Chahbouni, Germaine Escames, Luis C. López, Belén Sevilla, Carolina Doerrier, Antonio Muñoz-Hoyos, Antonio Molina-Carballo, Darío Acuña-Castroviejo. Melatonin treatment counteracts the hyperoxidative status in erythrocytes of patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Clinical Biochemistry*, 44 (2011) 853–858.

101. Matsuoka, S.; Ii, K.; Akita, H.; Tomimatsu, T.; Miyao, M. Clinical Features and Cardiopulmonary Function of Patients with Atrophic Heart in Duchenne Muscular Dystrophy. p. 687–694, 1986.
102. Mcgreevy, Joe W. e colab. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: From basic mechanisms to gene therapy. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 8, n. 3, p. 195–213, 2015.
103. McNally, E. M. et al. Contemporary Cardiac Issues in Duchenne Muscular Dystrophy. p. 1590–1598, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.015151>
104. Matsumura, K.; Tomé, F. M.S.; Lonasescu, V.; Ervasti, J. M.; Anderson, R.D; Romero, N.B.; Simon, D.; Kaplan, J.; Fardeau, M.; Campbell, K. P. Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 92, n. 2 p. 866 – 871, 1993.
105. Maronde E, Wicht H, Task'en K, Genieser HG, Dehghani F, Olcese J, Korf HW. CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J Pineal Res.* 1999;27(3): 170–182.
106. Mathur, S. Lott, D, J. Senesac, C. Germain, S, A. Vohra, R, S. Sweeney, H, L. Walter, G, A. Vandeborne, K. "Age-Related Differences in Lower-Limb Muscle Cross-Sectional Area and Torque Production in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy." *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.* 91(7): 1051- 1058. 2010.
107. Mead S, Ebling FJ, Maywood ES, Humby T, Herbert J, Hastings MH. A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci.* 12(7):2516–2522, 1992.
108. Meadows, E.; Flynn, J.M.; Klein, W.H. Myogenin regulates exercise capacity but is dispensable for skeletal muscle regeneration in adult mdx mice. *PLoS ONE* 2011, 6, e16184.
109. Mercuri, E.; Bönnemann, C. G.; Muntoni, F. Muscular dystrophies. *The Lancet*, v. 394, n. 10213, p. 2025–2038, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)
110. Mehanna, Radwa A. e colab. Protective role of melatonin on skeletal muscle injury in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 10, n. 1, p. 1490–1501, 2017.
111. Mistlberger RE, Skene DJ. Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms.* 20(4):339-352, 2005.
112. Moreira-Marconi, E. Et Al. Whole-Body Vibration Exercise Is Well Tolerated In Patients With Duchenne Muscular Dystrophy : A Systematic Review. v. 14, p. 2–10, 2017.
113. Moore RY, Heller A, Wurtman RJ. Visual pathway mediating pineal response to environmental light. *science.* 155(3739):220-223, 1967.

114. Morici, G.; Frinchi, M.; Pitruzzella, A.; DiLiberto, V.; Barone, R.; Pace, A.; DiFelice, V.; Belluardo, N.; Cappello, F.; Mudo, G.; et al. Mild Aerobic Exercise Training Hardly Affects the Diaphragm of mdx Mice. *J. Cell. Physiol.* 2017, 232, 2044–2052. [CrossRef] 77.
115. Morroni J, Schirone L, Vecchio D, Nicoletti C, D'Ambrosio L, Valenti V, Sciarretta S, Lozanoska-Ochser B, Bouchè M. Accelerating the Mdx Heart Histo-Pathology through Physical Exercise. *Life (Basel)*. 2021 Jul 17;11(7):706. doi: 10.3390/life11070706. PMID: 34357078; PMCID: PMC8306456.
116. Muntoni, F.; Torelli, S.; Ferlini, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. v. 44, n. 0, p. 731–740, 2003.
117. McCormick R, Vasilaki A. Age-related changes in skeletal muscle: changes to life-style as a therapy. *Biogerontology*. 2018 Dec;19(6):519-536. doi: 10.1007/s10522-018-9775-3. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30259289; PMCID: PMC6223729.
118. Neto, J A S E De Castro, B F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Neurologia*, v. 44, n. 1, p. 5–11, 2008. Disponível em: <<http://lildbi.bireme.br/lildbi/docsonline/lilacs/20090300/151-LILACS-UPLOAD.pdf>>
119. Nigro, G.; Comi, L. I.; Politano, L.; Bain, R. J. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. v. 26, p. 271–277, 1990.
120. Ohlendieck, K.; Ervasti, J. M.; Matsumura, K.; Kahl, S. D.; Leveille, C. J.; Campbell, K. P. Dystrophin-Related Protein Is localized to Neuromuscular Junctions of Adult Skeletal Muscle. v. 7, p. 499–508, 1991.
121. Pacheco, M. B., Oliveira, M.S., Rodrigues, L. B., Rocha, K. P. Propriedades Da Melatonina Como Fator De Neuroproteção Em Doenças Neurodegenerativas, COPEC. P. 87-91, 2013.
122. Panyatip, Panyada; Nunthaboot, Nadtanet; Puthongking, Ploenthip. In *Silico Adme, Metabolism Prediction and Hydrolysis Study of Melatonin Derivatives*. *International Journal of Tryptophan Research*, v. 13, p. 1178646920978245, 2020.
123. Perronnet, C.; Vaillend, C. Dystrophins, Utrophins, and Associated Scaffolding Complexes: Role in Mammalian Brain and Implications for Therapeutic Strategies. v. 2010, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/849426>
124. Pedrazzani, P. S., Cornachione, A.S. Efeitos do exercício excêntrico na reabilitação do músculo esquelético de camundongos *mdx* após 3 e 21 dias de treinamento. *Avaliações morfológica, funcional e molecular*. São Carlos – SP. 2019.
125. Phillipson OT. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 35:847-57, 2014.
126. Piovesan, R F et al. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. *Fisioter Mov*, v. 22, n. 2, p. 211–220, 2009.
127. Protein gel electrophoresis handbook. ThermoFisher scientific, 2021.

- 128.Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. Neurociências. 4 Ed. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2010.
- 129.Qaisar, Rizwan. Cellular and Molecular Mechanisms of Muscle Regeneration. Khyber Medical University Journal, v. 13, n. 3, p. 173–178, 2021.
- 130.Ramacciotti, Eduardo Costa e Do Nascimento, Carla Ferreira. Efeito do exercício resistido na função motora do paciente com Distrofia Muscular de Duchenne. Revista Neurociências, v. 18, n. 3, p. 341–346, 2001.
- 131.Rando TA, Disatnik MH, Yu Y, Franco A. Muscle cells from *mdx* mice have an increased susceptibility to oxidative stress. Neuromuscul Disord 1998;8:14–21.
- 132.Reed UC. Miopatias.In: Reed UC. Neurologia Infantil. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p.1103-1127.
- 133.Reid MB, Durham WJ. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. Ann NY Acad Sci 2002;959: 108–16.
- 134.Reitter, B. Deflazacort vs. prednisone in Duchenne muscular dystrophy: trends of an ongoing study Brain Develop, 17 (suppl) (1995), pp. 39-43
- 135.REITER, R. J. Melatonin: Clinical Relevance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 17, n. 2, p. 273 – 285, 2003.
- 136.RENAULT, V. e colab. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. Experimental Gerontology, v. 35, n. 6–7, p. 711–719, 2000.
- 137.Ressmeyer, Anna Rebekka E Colab. Antioxidant Properties Of The Melatonin Metabolite N1-Acetyl-5-Methoxykynuramine (Amk): Scavenging Of Free Radicals And Prevention Of Protein Destruction. Redox Report, V. 8, N. 4, P. 205–213, 2003.
- 138.Robbins, R.; e colaboradores. Patologia – estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, p. 1268.
- 139.Ryder, S.; Leadley, R. M.; Armstrong, N.; Westwood, M.; Kock, S. De; Butt, T.; Jain, M.; Kleijnen, J. The burden , epidemiology , costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy : an evidence review. p. 1–21, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0631-3>
- 140.Sabourin, L.A.; Girgis-Gabardo, A.; Scale, P.; Asakura, A.; Rudnicki, M.A. Reduced differentiation potential of primary MyoD-/-myogenic cells derived from adult skeletal muscle. J. Cell Biol. 1999, 144, 631–643. [CrossRef]
- 141.Santos, Ana Flavia et al. Treino de baixa intensidade mantém a funcionalidade fibrose em camundongos *mdx*. Revista Neurociências, v. 30, p. 1-28, 2022.

- 142.Santos NM, Rezende MM, Terni A, et al. Perfil clínico e funcional dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne assistidos na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). *Rev Neurocienc* 2006; 14:15-22.
- 143.Salucci S, Baldassarri V, Canonico B, Burattini S, Battistelli M, Guescini M, Papa S, Stocchi V, Falcieri E. Melatonin behavior in restoring Chemical damaged C2C12 myoblasts. *Microsc Res Tech* 2016; 79: 532-540.
- 144.Salucci S, Battistelli M, Baldassarri V, Burini D, Falcieri E, Burattini S. Melatonin prevents mitochondrial dysfunctions and death in differentiated skeletal muscle cells. *Microsc Res Tech* 2017; 80: 1174-1181.
- 145.Salucci, S.; Taurone, S.; Burattini, S.; Gobbi, P.; Clausi, J. Battistelli, M. Melatonin role in skeletal muscle disorders. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 25, n. 2, p. 1024–1033, 2021.
- 146.Schindelin, J. et al. Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. v. 9, n. 7, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- 147.Sicinski, P.; Geng, Y.; Ryder-Cook, A. S.; Barnard, E. A.; Darlison, M. G.; Barnard, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science*, 244(4912): 1578-80, 1989.
- 148.Silva, Carolina Solon da. A ação do TNF-alfa na glândula pineal de roedores está envolvida na redução da produção de melatonina na obesidade. 2016. 92 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016
- 149.Silva, M. C.; Maria, Z.; Meira, A.; Giannetti, J. G.; Moreira, M.; Félix, A.; Campos, O.; Ferreira, R. D. A.; Zatz, M.; Rochitte, C. E. Myocardial Delayed Enhancement by Magnetic Resonance Imaging in Patients With Muscular Dystrophy. v. 49, n. 18, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.10.078>
- 150.SILVA, Sueli de oliveira. Oxidação de melatonina e formação de N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina: possíveis efeitos biológicos. P. 1-81, 2005.
- 151.Silverthorn, D. U. “Fisiologia Humana: Uma abordagem Integrada. *Artmed*. 5ª Edição. 2010.
- 152.Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in animals: time and food. *J Biol Rhythms*. 18(3):250–260, 2003.
- 153.Schill, K. E. et al. Muscle damage, metabolism, and oxidative stress in *mdx* mice: Impact of aerobic running. *Muscle and Nerve*, v. 54, n. 1, p. 110–117, 2016.
- 154.Sigoli, Emilly et al. Effects of Low-Intensity and Long-Term Aerobic Exercise on the Psoas Muscle of *mdx* Mice: An Experimental Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 9, 2022.

155. Skene, D. J., Papagiannidou, E., Hashemi, E., Snelling, J., Lewis, D. F. V., & Fernandez, M. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *Journal of Pineal Research*, 2001. 31(4), 333–342.
156. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Apr 4;351(2):152-66. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004. Epub 2012 Jan 8. PMID: 22245784; PMCID: PMC3288509.
157. Souza, D.K. et al. Regulação e Ativação das Células Satélites Durante a Regeneração Muscular. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 23, n. 3, p. 170–180, 2015.
158. Souza, Elisberto Nogueira De et al. A Fisiofarmacologia da Melatonina no Desenvolvimento e Terapêutica do Câncer / The physiopharmacology of melatonin in cancer development and therapy. ID on line. *Revista de psicologia*, v. 16, n. 60, p. 754–777, 2022.
159. Souza S, Melo E. Distrofias musculares. In: Werneck L. *Tratamento das doenças neuromusculares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.534-536.
160. Stacchiotti, Alessandra e Favero, Gaia e Rodella, Luigi Fabrizio. Impact of melatonin on skeletal muscle and exercise. *Cells*, v. 9, n. 2, p. 1–23, 2020.
161. StratoS, Ioannis e colab. Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats. *Journal of Pineal Research*, v. 52, n. 1, p. 62–70, 2012.
162. Su, J. A.; Ramos-Platt, L.; Mentee, J. Left Ventricular Tonic Contraction as a Novel Biomarker of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatric Cardiology*, v. 37, n. 4, p. 678–685, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00246-015-1331-1>
163. Su, Yuhui e Song, Yafeng. The new challenge of “exercise + X” therapy for Duchenne muscular dystrophy-Individualized identification of exercise tolerance and precise implementation of exercise intervention. *Frontiers in Physiology*, v.13, n. August, p. 1-11, 2022.
164. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*. 2015 Oct 16;20(10):18886-906. doi: 10.3390/molecules201018886. PMID: 26501252; PMCID: PMC6332205.
165. Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araujo MB, Lima T, Akira Uyemura S, Silveira LR, Vieira E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Pineal Res*. 57(2):155-167, 2014.
166. Texas, The E Colab. *Digitalcommons @ Tmc Myogenin Modulates Exercise Endurance By Altering Skeletal Muscle Metabolism*. 2010.
167. Tidball, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Comprehensive Physiology*, v. 1, n. 4, p. 2029-2062, 2011.

168. Tinsley, J. M.; Davies, K. E. Utrophin: A Potential Replacement For Dystrophin? v. 3, n. 5, p. 537–539, 1993.
169. Tjondrokoesoemo, A.; Schips, T. G.; Sargent, M. A.; Vanhoutte, D.; Kanisicak, O.; Prasad, V.; Lin, S. J.; Maillet, M.; Molkenin, J. D. Cathepsin S Contributes to the Pathogenesis of Muscular Dystrophy in Mice. *Journal Biological Chemistry*, v. 291, n. 19, p. 9920–9928, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719054>
170. Tordjman, S. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, n. 15, p. 434 – 443, 2017.
171. Tosini G, Fukuhara C. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J Neuroendocrinol.* 2003 Apr;15(4):364-9. doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.00973.x. PMID: 12622835.
172. VAINER, Alessandra Meyer e ROCHA, Victória Silvino e JUVENALE, Michelangelo. Melatonina e sistema imune: uma relação com duas vias regulatórias/ Melatonin and the immune system: a two-way relationship regulator.y. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 1, p. 2906–2929, 2021.
173. Van Den Bergen, J. C. et al. Forty-Five Years of Duchenne Muscular Dystrophy in The Netherlands. v. 1, p. 99–109, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JND-140005>
174. Vignos PJ, Archibald KC. Maintenance of ambulation in childhood muscular dystrophy. *J. Chron. Dis* 1960;12(2):273-289.
175. Wallace, G. Q.; McNally, E. M. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163216>
176. Weller B, Karpati G, Carpenter S. Dystrophin-deficient *mdx* muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions.
177. Wen, C. P.; Pui, J.; Wai, M.; Tsai, M. K.; Yang, Y. C.; Yuan, T.; Cheng, D.; Lee, M.; Chan, H. T.; Tsao, C. K. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *The Lancet*, v. 378, n. 9798, p. 1244–1253, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60749-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60749-6)
178. Westering, T. L. E. Van; Betts, C. A.; Wood, M. J. A. Current Understanding of Molecular Pathology and Treatment of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. p. 8823–8855, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules20058823>
179. White, J.D.; Scaffidi, A.; Davies, M.; McGeachie, J.; Rudnicki, M.A.; Grounds, M.D. Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: Studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice. *J. Histochem. Cytochem.* 2000, 48, 1531–1543.

180. Williams A, Newell RLM. Pelvic girdle, gluteal region and hip joint. In: Standring S, editor. Gray's Anatomy. 39th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh: Elsevier; 2005. pp. 1444–1446.
181. Williamson, Jeff e Pahor, Marco. Evidence regarding the benefits of physical exercise. Archives of Internal Medicine, v. 170, n. 2, p. 124–125, 2010.
182. Wu, Ne N. et al. Physical exercise and selective autophagy: Benefit and risk on cardiovascular health. Cells, v. 8, n. 11, p. 3–5, 2019.
183. Yablonka-Reuveni, Z.; Anderson, J. E. Satellite cells from dystrophic (Mdx) mice display accelerated differentiation in primary. cultures and in isolated myofibers. Dev. Dyn. 2006, 235, 203–212.
184. Yeung HM, Hung MW, Fung ML. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats. J. Pineal Res 2008; 45: 373-382.
185. Zatz, Mayana. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. Molecular biology contribution to the understanding and prevention of genetic disorders. Ciência & Saúde Coletiva, v. 7, n. 1, p. 85–99, 2002.
186. Zelikovich, Aaron S. e colab. Moderate exercise improves function and increases adiponectin in the *mdx* mouse model of muscular dystrophy. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

ANEXOS

Anexo I– Carta Comprovante da versão Final da Dissertação



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

São Carlos, 29 de janeiro de 2024.

Ref: Carta comprovante da versão final de teses e dissertações

Eu Prof(a). Dr(a). Anabelle Silva Cornachione, Orientador(a) do(a) pós-graduando(a) Reinaldo Carlos Bonjorno, do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Associação ampla UFSCar/UNESP, venho por meio desta, AUTORIZAR os trâmites para a homologação da tese/dissertação do(a) supracitado(a) aluno(a), e ATESTAR que a tese/dissertação intitulada "Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e da melatonina nos músculos esquelético e cardíaco de camundongos *mdx*", é a **versão final** com as alterações sugeridas pela Banca Examinadora, estando o arquivo tecnicamente correto em sua forma e estrutura e com os devidos agradecimentos aos órgãos de fomento à pesquisa, no caso de recebimento de bolsa e/ou financiamento.

Solicito as devidas providências para o encaminhamento em questão, subscrevo-me.

Atenciosamente,

Assinatura orientador



Documento assinado digitalmente

ANABELLE SILVA CORNACHIONE

Data: 30/01/2024 10:58:06-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

UFSCar - CCBS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Via Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676,
CEP: 13565-905, São Carlos, SP
Tel 16 3351 8328
ppgcf@ufscar.br / pipgcf@gmail.com

UNESP-FOAr
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14801-903 - Araraquara/SP
Tel: 16 3301-6527/6528 – posgradu.foar@unesp.br

UNESP-FCFar
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, Caixa Postal 502
CEP: 14800-903- Araraquara/SP
Tel 16 3301-6900/6901 – pg.fcf@unesp.br