



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

EMILLY SIGOLI

Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e de longa duração no músculo psoas de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne.

São Carlos - SP
2021

EMILLY SIGOLI

Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e de longa duração no músculo psoas de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne.

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 do Exercício.

Orientadora:

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

São Carlos - SP
2021

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 da candidata Emily Sigoli, realizada em 31/05/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione (UFSCar)

Profa. Dra. Mônica Rosa da Costa Lemma (UNIARA)

Profa. Dra. Patty Karla dos Santos (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
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 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

FICHA CATALOGRÁFICA

SIGOLI, Emilly

Efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e de longa duração no músculo psoas de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne. Emilly Sigoli. 2021.

83 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

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

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

DEDICATÓRIA

Com gratidão, dedico esta pesquisa que marca um final de um percurso cheio de experiências inesquecíveis, aos meus pais **Ademar** e **Claudina**, por todo apoio, amor e carinho, tudo que sou e que conquistei devo a eles!

Obrigada,
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, pela minha vida, pelas oportunidades, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades, nunca me abandonou nos momentos de necessidades e angústias.

Agradeço hoje e sempre, aos meus pais **Ademar e Claudina**, os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos, muito obrigada por todo apoio, incentivo e amor incondicional, nada seria possível sem vocês.

Agradeço especialmente a minha orientadora **Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione** pela orientação, apoio e confiança, por toda motivação e incentivo ao longo de todo o projeto, pela sua postura impecável, sempre presente cheia de alegria e otimismo, você é um exemplo, que eu quero seguir. Serei eternamente grata.

Agradeço a **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro, que teve grande importância no desenvolvimento deste projeto. Código de Financiamento 001

Agradeço,

Aos meus irmãos, **Roberta, Juliana e Danilo**, por todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado e amigo **Marcos**, por todo companheirismo, sempre me apoiando nas minhas decisões.

A técnica do laboratório de fisiologia do exercício, **Tatiana**, que também se tornou companheira de laboratório e amiga, obrigada por toda ajuda e ensinamentos, você foi essencial para a realização deste trabalho.

As alunas de Iniciação Científica **Rosangela e Maria Paula** por toda dedicação e ajuda neste projeto.

Aos amigos do **Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular**, por todo companheirismo.

Aos amigos do **Departamento de Ciências Fisiológicas**, por todos momentos de distração e ensinamentos.

A amiga **Dr. Patty**, por toda ajuda, conselhos e ensinamentos.

As amigas **Bruna e Flávia**, pelos momentos de distração, conselhos e todo o carinho.

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

Ao técnico do laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico, seu **Sergio**, pela realização dos sacrifícios dos animais desse projeto.

Ao Professor **Dr. Gerson** do laboratório de Farmacologia Cardiovascular e aos seus alunos, pela troca de conhecimento e por todo auxílio.

A professora **Dr. Heloisa** do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e a suas alunas, por nos permitir utilizar o equipamento ImageXpress, e pela troca de conhecimento e auxílio.

Ao professor **Dr. Thiago** do Departamento de Fisioterapia, por nos permitir utilizar o equipamento Criostato Leica.

A estatística **Daiane Leite da Roza**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela ajuda com os dados estatísticos.

Aos integrantes da banca de qualificação e defesa, pela participação e pelas dicas de melhorias neste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, sintam se agradecidos!

“Concedei-me, Senhor a serenidade necessária, para aceitar as coisas que não posso modificar. Coragem para modificar aquelas que posso e Sabedoria para conhecer a diferença entre elas. Vivendo um dia de cada vez, desfrutando um momento de cada vez, aceitando que as dificuldades constituem o caminho à paz...”

Reinhold Niebuhr

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular hereditária causada por uma mutação do cromossomo X, caracterizada pela ausência da proteína distrofina. Esta deficiência ocasiona instabilidade e perda da integridade do sarcolema, determinando lesões recorrentes nas fibras musculares e perda de função. Com o passar do tempo, as fibras perdem a sua capacidade regenerativa, o que pode estar relacionado com a exaustão das células satélites (CS). As CS são essenciais nos processos de regeneração muscular. Em resposta a estímulos como o crescimento ou o trauma, as CS quiescentes são ativadas, se proliferam e se diferenciam em mioblastos para que ocorra o reparo do dano causado. Adicionalmente, as CS expressam marcadores miogênicos que possibilitam a identificação das mesmas nas diferentes fases de reparação tecidual. **Objetivos:** Avaliar os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade sobre a população de células satélites, na distribuição e no trofismo de diferentes tipos de fibras e na expressão da PGC-1 α do músculo psoas de camundongos *mdx*, após 37 sessões de treinamento. **Resultados:** Os aspectos morfológicos dos animais *mdx* mostraram alterações significativas como variação no tamanho das fibras, centralização nuclear, necrose, entre outras. Já na análise quantitativa foi possível observar redução do número de CS e da expressão de PGC-1 α nos músculos psoas desses animais. Por outro lado, após longo período de treinamento (37 sessões), foi observado melhora na citoarquitetura das fibras, aumento de proporção de células satélites quiescentes/ativação, aumento da expressão de PGC-1 α e aumento do diâmetro menor das fibras musculares em camundongos distróficos treinados (*MDX-TR*) quando comparado aos animais distróficos sedentários (*MDX-SED*). **Conclusão:** O treinamento aeróbio de baixa intensidade aplicado durante longo período de tempo parece ser capaz de melhorar a citoarquitetura e aumentar a ativação de células satélites no músculo psoas de camundongos *mdx*, bem como, ativar vias de sinalização que promovem aumento do metabolismo oxidativo, o que representa uma via terapêutica viável para o tratamento da DMD.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne, Camundongos *mdx*, Células Satélites, Exercício Aeróbio de Baixa Intensidade, Imunofluorescência.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a hereditary muscle disease caused by a mutation in the X chromosome, characterized by the absence of dystrophin protein. This deficiency causes instability and loss of sarcolemma integrity, causing recurrent lesions in muscle fibers and loss of function. As time passes, fibers lose their ability to regenerate, which can be related to the depletion of satellite cells (SC). SC are essential in muscle regeneration processes. In response to stimuli such as growth or trauma, quiescent SC are activated, proliferate and differentiate into myoblasts so that the damage caused can be repaired. SC express myogenic markers that make it possible to identify them in the different phases of tissue repair. **Objectives:** Evaluation of the effects of low-intensity aerobic exercise on the population of satellite cells, on the distribution and trophism of different types of fibers and on the expression of PGC-1 α of the psoas muscle of *mdx* mice, after 37 training sessions. **Results:** The morphological aspects of the *mdx* animals indicated significant changes such as variation in the size of the fibers, nuclear centralization, necrosis, among others. In the quantitative analysis, it was possible to observe a reduction in the number of SC and in the expression of PGC-1 α in the psoas muscles of the *mdx* animals. On the other hand, after a long period of training, it was observed an improvement in the cytoarchitecture of the fibers, an increase in the proportion of quiescent satellite cells/activation, an increase in PGC-1 α expression and an increase in the diameter in trained dystrophic mice (MDX-TR) when compared to sedentary dystrophic ones (MDX-SED). **Conclusion:** Low-intensity aerobic training over a long period seems to be able to improve the cytoarchitecture and increase the activation of satellite cells in the psoas muscle of *mdx* mice, as well as activate signaling pathways that promote an increase in oxidative metabolism, which represents a viable therapeutic route for the treatment of DMD.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy, *mdx* Mice, Satellite Cells, Low-Intensity Aerobic Exercise, Immunofluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da estrutura do músculo esquelético.....	26
Figura 2. Esquema ilustrativo da localização da célula satélite no músculo esquelético.....	29
Figura 3. Imunofluorescência para Células Satélites.....	29
Figura 4. Representação dos fatores miogênicos envolvidos na ativação, proliferação e diferenciação das células satélites durante a miogênese pós-natal.	31
Figura 5. Papel do PGC-1 α na coordenação da expressão de genes mitocondriais durante o exercício físico.....	32
Figura 6. Representação ilustrativa da localização da distrofina no músculo esquelético.	33
Figura 7. Efeitos da corrida em esteira de baixa intensidade no <i>mdx</i>	37
Figura 8. Esquema de divisão dos grupos dos animais.	38
Figura 9. Esteira motorizada para camundongos.	39
Figura 10. Camundongos em treinamento na esteira motorizada.	39
Figura 11. Criostato Leica CM 1850 UV.	41
Figura 12. Equipamento ImageXpress XLS System com o <i>software</i> MetaXpress.	42
Figura 13. Cortes histológicos do músculo psoas corados em Hematoxilina e Eosina (HE).....	46
Figura 14. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcagem da distrofina em músculo psoas de camundongos.	47
Figura 15. Quantificação de células satélites pelo marcador Pax7 no músculo psoas de camundongos.....	48
Figura 16. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcagem de CS em quiescência/ativação através do anticorpo Pax7. .	49
Figura 17. Quantificação de células satélites pelo marcador F5D (miogenina) no músculo psoas de camundongos.	50
Figura 18. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcagem de CS em diferenciação/fusão através do anticorpo F5D (miogenina).	50
Figura 19. Quantificação da expressão da PGC-1 α	51

Figura 20. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção do PGC-1 α	52
Figura 21. Médias do diâmetro menor das fibras do músculo psoas de camundongos <i>wild type</i> e <i>mdx</i>	53
Figura 22. Proporção dos tipos de fibras no músculo psoas de camundongos <i>wild type</i> e <i>mdx</i>	54
Figura 23. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção dos diferentes tipos de fibras.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados com suas respectivas informações e concentrações.	42
Tabela 2. Alterações patológicas das fibras do músculo psoas de camundongos WT-TR e MDX-TR 37 sessões e WT-SED e MDX-SED 37 sessões, identificadas pela técnica de coloração Hematoxilina e Eosina.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne

CS: Célula Satélite

PGC-1 α : Coativador-1 α de receptor-gama ativado por proliferador de peroxissoma

MHC: Cadeia Pesada da miosina

FTI: Fibras do tipo I

FTII: Fibras do tipo II

WT: *wild type* (Tipo selvagem)

MDX: Modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne

DAPC: Complexo proteico associado à distrofina

ERO: Espécies reativas *de* oxigênio

MOM: *Mouse on Mouse*

PBS: *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato salino)

DAPI: *Diamidino-2-phenylindole*

HE: Hematoxilina e Eosina

IF: Imunofluorescência

PV: Peso Vivo

LISTA DE SÍMBOLOS

m/min: Metros por minuto

cm: Centímetro

mg/kg: Miligramas por kilograma

°C: Graus Celsius

mm: Milímetro

m: Metro

g: Grama

s: Segundo

kg: kilograma

min: Minuto

µm: Micrómetro

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	20
2- OBJETIVOS	24
3- REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1- MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	25
3.1.1- Características do músculo esquelético	25
3.1.2- Classificação das fibras musculares	26
3.1.3- Miogênese	27
3.2- LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR.....	28
3.2.1- Células Satélites	28
3.2.2- PGC-1α	31
3.3.1- Modelo experimental da DMD, os Camundongos <i>mdx</i>	34
3.4- AVANÇOS NO TRATAMENTO DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	35
3.5- EXERCÍCIO AERÓBICO, UMA ESTRATEGIA TERAPÊUTICA PARA DMD	35
4- MATERIAS E MÉTODOS	37
4.1- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.2- TREINAMENTO.....	38
4.2.1- Esteira Motorizada	38
4.2.2- Treino aeróbio de baixa intensidade	39
4.2.3- Obtenção dos músculos	40
4.3- PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	40
4.4- ANÁLISE DIÂMETRO MENOR.....	41
4.5- PROCESSAMENTO IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	41
4.6- ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
5- RESULTADOS	45
5.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
5.2- ANÁLISE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	47
5.2.1- Distrofina	47
5.2.2- Células Satélites	48
5.2.3- PGC1-α	51
5.2.4- Alterações do diâmetro menor das células musculares	52
5.2.5- Distribuição dos diferentes tipos de fibras	53
6- DISCUSSÃO	56
6.1- ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO MÚSCULO PSOAS	57

6.2- ALTERAÇÕES NA POPULAÇÃO DE CÉLULAS SATÉLITES	58
6.3- ALTERAÇÕES NA IMUNOMARCAÇÃO DA PROTEÍNA PGC-1 α	60
6.3- ALTERAÇÕES NO DIÂMETRO MENOR	62
6.4- MUDANÇAS NA PROPORÇÃO DE FIBRAS	63
6.5- ELUCIDANDO OS RESULTADOS	65
7- CONCLUSÃO	65
8- IMPLICAÇÃO CLÍNICA	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	82

1- INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular hereditária causada por uma mutação do cromossomo X que acomete 1:5.000 recém-nascidos do sexo masculino, sendo a forma mais comum de distrofia muscular (DIETZ, *et al.*, 2020). Ela é caracterizada pela ausência da proteína distrofina, cuja função é proporcionar estabilidade e manutenção do músculo esquelético. Essa miopatia determina instabilidade e perda da integridade do sarcolema, levando as fibras musculares a processos necróticos importantes (INFANTE e HUSZAGH, 1999; DECONINCK e DAN, 2007). As manifestações clínicas aparecem na infância, geralmente nos três primeiros anos de vida, sendo a fraqueza muscular um dos primeiros sinais, o qual ocorre gradualmente, tornando-se evidente por volta dos cinco anos de idade. Com a evolução da doença, o indivíduo perde a capacidade de deambular e há o surgimento de sérias complicações, o que leva esses pacientes ao óbito por insuficiência respiratória ou cardíaca (SOUZA e MELO, 2000).

Já está documentado na literatura científica que músculos glicolíticos, predominantemente compostos por fibras tipo II (FTII), são mais susceptíveis a lesões na DMD quando comparados aos músculos oxidativos, os quais apresentam predomínio de fibras do tipo I (FTI) (TALBOT e MAVES, 2016; LYNCH, *et al.*, 2001). O músculo psoas, por ser composto principalmente por fibras do tipo II (glicolíticas) e devido a sua importante função dinâmica como principal flexor da articulação do quadril, é um dos músculos mais acometidos pela doença (ARBANAS, *et al.*, 2009). Essa diferença entre os músculos, em relação à predominância de acometimento da doença, pode estar diretamente relacionada a distintas características celulares e bioquímicas, como a presença/quantidade de células satélites (CS) e os tipos de fibras.

As CS são pequenas células miogênicas mononucleadas e fusiformes que se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra do músculo esquelético, e são essenciais nos processos de regeneração muscular (MOURIKIS e RELAX, 2016). Enquanto os tecidos musculares mantêm-se livres de agressões, as CS permanecem em estado de quiescência (repouso) nas periferias das fibras musculares multinucleadas maduras, podendo ser identificadas através de

marcadores celulares para fator miogênico 5 (Myf-5) e Proteína de caixa emparelhada Pax-7 (Pax7), os quais são fatores de transcrição miogênicos liberados pelas CS quiescentes e/ou em fase inicial de proliferação. Porém, em resposta a estímulos como o crescimento, a remodelação ou o trauma, as CS são ativadas, proliferam-se e expressam outros tipos de fatores miogênicos, tais como: a proteína 1 para determinação de mioblastos (MyoD) na fase de diferenciação e miogenina (MyoG) na fase de fusão e diferenciação terminal (SCHULTZ e McCORMICK, 1994; ALMEIDA, *et al.*, 2016).

As CS são mais abundantes durante o desenvolvimento pós-natal, sendo responsáveis pelo crescimento muscular nessa fase, onde compõe cerca de 32% dos núcleos sub laminares. Elas começam a declinar e se estabilizam (1 a 5% em composição) na idade adulta (CHEN e GOLDHAMER, 2003). A presença e a distribuição das células satélites na fibra muscular estão relacionadas a diversos fatores, como o tipo de fibra muscular, a topografia da fibra e a idade do indivíduo. Em adultos saudáveis, a quantidade de células satélites encontrada em fibras de contração lenta e oxidativas (tipo I) geralmente é maior do que a encontrada nas fibras de contração rápida e glicolíticas (tipo II) (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013). Segundo SCHMALBRUCH e HELLHAMMER (1976), o músculo sóleo contém cerca de 5.000 células satélites/mm³, enquanto que o tibial anterior apresenta apenas 900 células satélites/mm.

Esses achados podem justificar, parcialmente, o motivo pelo qual músculos compostos predominantemente por FTII (glicolíticas) são mais acometidos pela DMD quando comparados aos predominantemente FTI. WEBSTER, *et al.*, (1988) observaram que as FTI parecem ser mais resistentes na DMD, o que pode ser uma abordagem terapêutica para retardar a progressão da doença. Além disso, devido à fragilidade ocasionada pela ausência da distrofina, as constantes lesões levam as fibras musculares a ciclos constantes de degeneração/regeneração, resultando na exaustão das CS (RENAULT, *et al.*, 2000). Este fato pode ocorrer devido à incapacidade que as CS têm de acompanhar a alta demanda da regeneração muscular que ocorre na DMD, resultando em uma eventual perda da capacidade regenerativa dessas células (CHANG, *et al.*, 2016). Outros estudos corroboraram com esses achados e ainda ressaltaram que o esgotamento das células satélites, durante os ciclos recorrentes de reparação, acabam reduzindo a população dessas células (número), fazendo com que, em determinado momento,

as células musculares não consigam mais se regenerar, contribuindo para a perda da função muscular (força), a qual, como dito anteriormente, é uma das características mais marcantes da DMD (COLLINS, *et al.*, 2005; BIRESSI e RANDO, 2010).

RENAULT, *et al.*, (2000) mostraram que a sobrevida das células satélites de um paciente de nove anos com DMD era aproximadamente um terço da sobrevida de células satélites de um indivíduo saudável com a mesma idade. Por outro lado, WOZNIAK e ANDERSON (2007) observaram altos níveis de ativação de células satélites em fibras musculares de camundongos *mdx* quando comparadas com fibras normais.

Outra justificativa que pode vir a esclarecer o acometimento preferencial de músculos glicolíticos pela DMD, além da relação tipo de fibra e CS, é a redução da proteína coativadora-1 α de receptor-gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α). A PGC-1 α desempenha importante papel na manutenção da integridade muscular, participando de várias vias de proteção, como no aumento do número de mitocôndrias, promovendo assim a regulação do cálcio intracelular (SUNTAR, *et al.*, 2020). A descontinuidade da membrana celular na DMD é fator determinante para a desorganização estrutural da fibra muscular, o que leva a alterações na mecanotransdução de forças durante a contração. Além disso, a lesão do sarcolema permite tanto o efluxo quanto o influxo de substâncias e íons entre o meio interno e o externo (STRAUB, *et al.*, 1997). O cálcio é o principal íon de influxo na DMD (BLAKE, *et al.*, 2002). O aumento da concentração de cálcio no sarcoplasma ativa vias importantes de degradação proteica devido à sobrecarga mitocondrial que eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativa proteases cálcio-dependentes que aceleram o processo de degradação celular (PINTO, 2010; WHITEHEAD, *et al.*, 2006; TURNER, *et al.*, 1991). Outra função importante do PGC-1 α está diretamente relacionada à resistência a fadiga e ao fenótipo das fibras musculares. Na DMD, os músculos mostram-se menos resistentes à fadiga, principalmente os de contração rápida, e sabe-se que o PGC-1 α pode promover a transição de fibras de contração rápida para fibras de contração lenta (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008). Este fato também pode ser importante como foco de investigação para buscar tratamentos promissores que possam retardar a progressão da DMD.

Atualmente, existem inúmeros estudos que buscam terapêuticas para minimizar ou até mesmo reverter as alterações causadas na DMD. O exercício físico vem sendo cada vez mais estudado como uma ferramenta importante na reabilitação de pacientes, dentro do aspecto reabilitação. Estudos mostraram que indivíduos normais que se exercitaram regularmente por um longo período parecem possuir adaptações crônicas morfológicas ao nível das fibras musculares e ao nível do tecido conjuntivo intramuscular (EAGLE, *et al.*, 2002; ALEMDAROGLU, *et al.*, 2013). Entretanto, são poucos os estudos que abordam o exercício físico em seres humanos portadores de DMD, e por isso, o foco de investigação desta doença é o camundongo *mdx*, considerado o modelo experimental da DMD (BOPPART, *et al.*, 2013). Esses animais apresentam deficiência da proteína distrofina e alterações na morfologia muscular similares às encontradas na DMD em humanos, porém, as características clínicas são distintas (BULFIELD, *et al.*, 1984). Na literatura científica são escassos os estudos que correlacionam a ativação, a proliferação e a diferenciação de células satélites, após um longo período de treinamento aeróbio de baixa intensidade, a esses animais distróficos.

Diferentemente, já é bem documentado na literatura científica que a aplicação do exercício físico de baixa intensidade e longa duração em músculos normais, aumenta a capacidade oxidativa das fibras musculares, induzindo a conversão de fibras rápidas em fibras lentas, ou seja, promovendo a transição de fibras do tipo II (glicolíticas) para as do tipo I (oxidativas) (CAMPOS, *et al.*, 2002). Em músculos normais foi observado que a corrida em esteira, de intensidade moderada à 0° de inclinação, determina um aumento na proporção de miofibras contendo mais células satélites quando comparados aos músculos de camundongos não exercitados (SHEFER, *et al.*, 2014). MANAF, *et al.*, (2006) observaram em músculos de camundongos *mdx*, que o transplante de mioblastos associado ao exercício aeróbio determina a expressão de até 26% da proteína distrofina, indicativo de que as CS podem ter alto potencial para restaurar músculos distróficos. Este mesmo estudo também observou um aumento significativo de fibras híbridas com características mais oxidativas após treino aeróbico em camundongos *mdx*, concluindo que a conversão do tipo de fibras pode influenciar positivamente na fisiopatologia da DMD.

Outro efeito benéfico importante do exercício físico sobre os músculos distróficos é o aumento na expressão do PGC-1 α (ABREU, *et al.*, 2017; FRY, *et al.*,

2014; SHEFER, RAUNER, *et al.*, 2010; KUROSAKA, *et al.*, 2009; FITTS e WIDRICK, 1996). O aumento desta proteína pode justificar o efeito positivo do exercício físico devido à mudança de fibras de contração mais rápida para contração mais lenta, além do aumento de uma proteína homóloga à distrofina conhecida como utrofina. Estudos mostraram que o aumento do PGC-1 α , induzido por exercício físico, estimula a síntese de utrofina no músculo distrófico de camundongos (MATSUMURA, *et al.*, 1992; AL AI-REWASHDY, *et al.*, 2015). AL-REWASHDY, *et al.*, (2015) e GORDON, *et al.*, (2013) observaram maior expressão da utrofina em músculos predominantemente oxidativos quando comparados a músculos glicolíticos.

Sendo assim, estudos têm mostrado que o exercício físico, quando aplicado de forma efetiva e cautelosa, pode determinar mudanças importantes na evolução da DMD, retardando o processo de degeneração. Portanto, compreender as adaptações e as alterações que ocorrem nos músculos distróficos de contração lenta e contração rápida, frente ao estímulo do exercício físico do tipo aeróbio, pode nos trazer mais conhecimentos na deliberação de recursos terapêuticos mais autênticos e promissores para a reabilitação de pacientes acometidos por essa distrofia muscular. Dessa forma, o objetivo desse estudo é investigar e explorar os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade, realizado durante um período de 37 sessões de treinamento, sobre o músculo psoas de camundongos distróficos.

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade sobre a população de células satélites, na distribuição e no trofismo de diferentes tipos de fibras e na expressão da PGC-1 α do músculo psoas de camundongos *mdx*, após 37 sessões de treinamento (longa duração).

Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar as células satélites no músculo psoas de camundongos *wild type* e *mdx*, sedentários e após 37 sessões de treinamento de baixa intensidade em esteira, através de técnicas de imunofluorescência;

- Identificar e quantificar a expressão do PGC-1 α no músculo psoas de camundongos *wild type* e *mdx*, sedentários e após 37 sessões de treinamento de baixa intensidade em esteira, através de técnicas de imunofluorescência.

- Quantificar o diâmetro menor dos diferentes tipos de fibras no músculo psoas de camundongos *wild type* e *mdx*, sedentários e após 37 sessões de treinamento de baixa intensidade em esteira, através de técnicas de imunofluorescência;

- Identificar e quantificar os diferentes tipos de fibras no músculo psoas de camundongos *wild type* e *mdx*, sedentários e após 37 sessões de treinamento de baixa intensidade em esteira, através de técnicas de imunofluorescência.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- MÚSCULO ESQUELÉTICO

3.1.1- Características do músculo esquelético

O músculo esquelético compõe cerca de 40% do peso corporal em seres humanos, sendo controlado pelo sistema nervoso e sustentando o sistema esquelético. Sua principal função é transformar energia química em energia mecânica, produzindo calor, força e movimento, auxiliando também na respiração, na postura, na proteção de órgãos vitais e servindo para o armazenamento de substâncias importantes, sendo um sistema fundamental para a sobrevivência e a independência funcional (FRONTERA e OCHALA, 2015) (Figura 1).

O músculo esquelético é constituído por milhares de fibras musculares multinucleadas que estão envolvidas por tecido conjuntivo. Cada fibra é composta por miofibrilas que permanecem agrupadas formando os sarcômeros, uma unidade fundamental da fibra muscular. Cada sarcômero contém miofilamentos contráteis chamados de actina e miosina, os quais se mantêm em uma sequência repetida causando o padrão estriado do músculo esquelético (DAVE e VARACALLO, 2019) (Figura 1). São essas proteínas as responsáveis pela contração muscular, onde a força contrátil é produzida através das pontes cruzadas que se formam entre a actina e a miosina na presença de cálcio (Ca^{2+}) e ATP (POWERS, *et al.*, 2016). As células musculares são inervadas por neurônios motores, e com a ação do neurotransmissor acetilcolina, ocorre a propagação de um potencial de ação que despolariza as células, liberando o cálcio do retículo sarcoplasmático para o interior

da célula. O cálcio liga-se a uma proteína reguladora chamada troponina C, a qual, junto com a tropomiosina, sofre uma mudança conformacional, expondo os sítios de ligação da actina, permitindo o acoplamento da cabeça energizada da miosina, tracionando os filamentos de actina, e conseqüentemente levando ao encurtamento do sarcômero, e produzindo a contração muscular (SCHNYDER e HANDSCHIN, 2015; FRONTERA e OCHALA, 2015).

Figura 1. Esquema ilustrativo da estrutura do músculo esquelético.

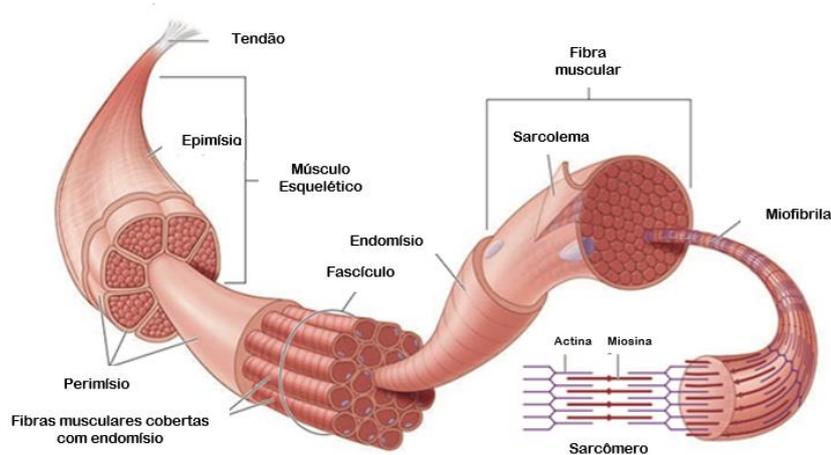


Imagem adaptada de IESPE, 2016. Fonte: <https://www.iespe.com.br/blog/o-musculo-e-suas-estruturas/>

3.1.2- Classificação das fibras musculares

O músculo esquelético é um tecido de grande heterogeneidade, e por isso apresenta fibras musculares com uma variedade de propriedades contráteis, as quais permitem que o músculo sofra remodelação em resposta a várias demandas metabólicas e mecânicas (CANEPARI, *et al.*, 2010). As fibras musculares podem ser classificadas de acordo com (1) seu metabolismo, ou seja, oxidativas e/ou glicolíticas; (2) sua cor, ou seja, em fibras vermelhas ou brancas; e (3) pela velocidade de contração em fibras de contração lenta e fibras de contração rápida. Essas características estão relacionadas às isoformas da cabeça pesada da miosina (MHC), e diante disso, as fibras podem ser puras, por apresentarem apenas uma isoforma da MHC (sendo representadas por fibras do tipo I, IIA, IIB, IID ou IIX), ou podem ser híbridas por apresentarem duas ou mais isoformas da MHC (sendo representadas por fibras do tipo IIBD, IIAD, IC, IIC) (TALBOT e MAVES, 2016; QAIZAR, *et al.*, 2016).

As fibras do Tipo I, caracterizadas pela cor vermelha, são mais oxidativas e resistentes à fadiga, além de apresentarem velocidade de contração mais lenta quando comparadas às fibras do tipo IIB que são mais glicolíticas e de contração mais rápida, sendo caracterizadas pela cor branca. As fibras do tipo IIA são intermediárias, e por isso são fibras mais glicolíticas do que as do tipo I, sendo por outro lado mais oxidativas do que as fibras do tipo IIB. Contudo, as fibras musculares podem se adaptar para atender às atividades extrínsecas, o que chamamos de plasticidade muscular, na qual é possível a transição entre as fibras, onde há a alteração na expressão das isoformas da MHC. Essa transição se atribui a uma organização linear das fibras puras, as quais estão intercaladas por fibras híbridas, podendo transitar das fibras mais lentas (oxidativas) para as mais rápidas (glicolíticas) ou vice-versa (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB) (PETTE e STARON, 2001; SOUKUP e SMERDU, 2015).

Vários fatores podem influenciar na transição das fibras (PETTE e STARON, 2001), como, por exemplo, o envelhecimento, os hormônios, o exercício e a atividade física, assim como a inatividade física e as distrofias musculares. Segundo WEBSTER, *et al.* (1988), as fibras rápidas do tipo II, mais especificamente as do tipo IIB, são as primeiras fibras a degenerarem e se regenerarem no músculo distrófico de indivíduos com Distrofia Muscular de Duchenne. Esse processo acontece antes do acometimento das fibras do tipo I, que também serão afetadas pela doença, porém de forma mais tardia, e por isso, os músculos com predominância de fibras tipo II são primeiramente afetados. Ainda não está totalmente claro o porquê das fibras lentas serem mais resistentes na DMD, e uma explicação pode ser o aumento da utrofina em fibras do tipo I. A utrofina é uma proteína homóloga à distrofina, podendo compensar a falta desta, e por isso pode ser um possível alvo para terapêuticas na DMD, bem como na promoção da transição para fibras lentas, o que levaria ao retardo da doença (WEBSTER, *et al.*, 1988; TALBOT e MAVES, 2016).

3.1.3- Miogênese

A miogênese embrionária é responsável pela formação e crescimento dos músculos esqueléticos durante o desenvolvimento dos vertebrados. Os músculos da cabeça se originam do mesoderma craniano, enquanto as primeiras células

musculares do tronco e dos membros se originam dos somitos de uma região específica chamada de dermomiótomo (ZAMMIT, 2017). Após a maturação dos somitos, as células progenitoras musculares expressam os fatores de transcrição Pax3 e Pax7 que apresentam papéis importantes durante o desenvolvimento. O Pax3 é responsável pela formação muscular embrionária, enquanto que a função do Pax7 é mais significativa no crescimento muscular pós-natal. Ambos os fatores de transcrição se articulam com a família de fatores reguladores miogênicos, a qual compreende as proteínas Myf-5, MyoD, Mrf4 e Miogenina (MyoG) (COLLINS, *et al.*, 2009; RELAIX, *et al.*, 2005).

Os fatores reguladores miogênicos, MyoD e Myf-5, são os primeiros a serem expressados, e são necessários para a subsequente expressão de Miogenina e Mrf4, os quais são responsáveis pela proliferação e diferenciação dos mioblastos em miócitos, amadurecendo-os em miofibras. O MyoD, que persiste nos miotubos, colabora com a Miogenina na regulação da expressão dos genes necessários para a diferenciação terminal (BLAIS, *et al.*, 2005).

3.2- LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR

Dependendo da localização e da proporção do músculo esquelético, ele está mais sujeito a sofrer lesões no cotidiano, sendo o trauma mecânico, tanto externo quanto interno, a causa mais comum de lesão muscular. Esse tipo de lesão destrói a integralidade do sarcolema e da lâmina basal, resultando no influxo de cálcio extracelular, o que futuramente leva à necrose e à degeneração muscular. Entretanto, graças a capacidade de regeneração do músculo, as funções musculares e as miofibrilas lesionadas podem ser restauradas. Para que isso ocorra, a regeneração depende de vários processos, começando pela ativação das células miogênicas, conhecidas como células satélites (TIDBALL, 2017; SHIAFFINO, *et al.*, 2017).

3.2.1- Células Satélites

As células satélites (CS) foram identificadas pela primeira vez em 1961 por Alexander Mauro que ao detectar essas células mononucleadas as chamou de “Células Satélites” devido à sua localização anatômica entre o sarcolema e a lâmina

basal das fibras musculares (MAURO, 1961) (Figuras 2 e 3). No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que as células satélites podem ser encontradas também em posições não típicas, como no interstício e próximo a membrana basal de outras estruturas, como pequenos vasos e nervos (BANKOLE, *et al.*, 2013; LINDSTROM; TJUST; DOMELLOF, 2015). Estudos mostraram que há uma maior quantidade de células satélites em fibras do tipo I quando comparadas com fibras do tipo II (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013).

Figura 2. Esquema ilustrativo da localização da célula satélite no músculo esquelético.

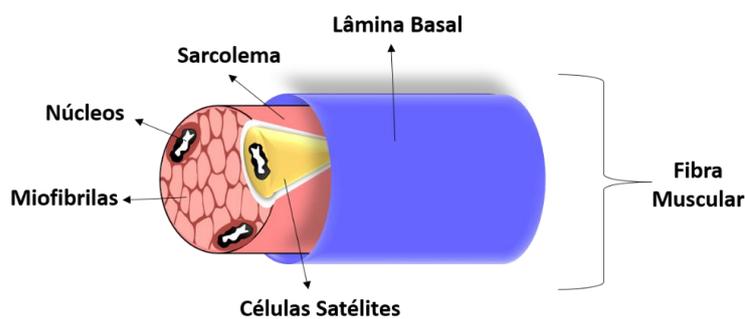
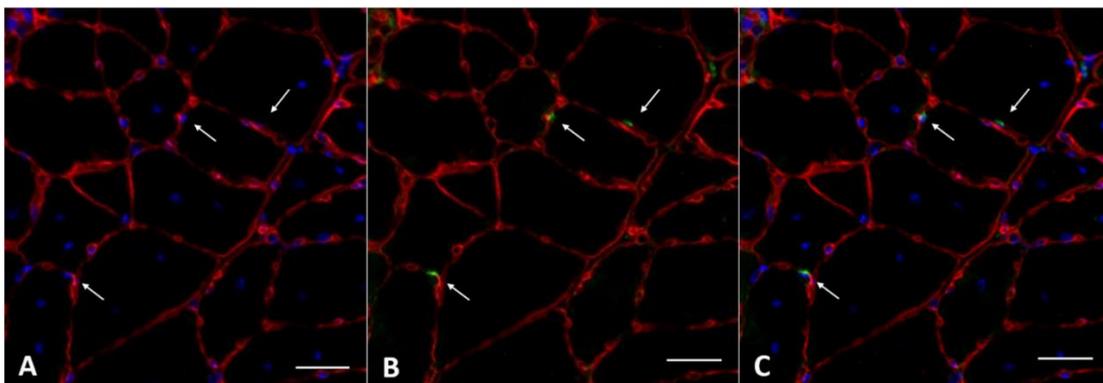


Imagem adaptada de SKUK, 2013.

Figura 3. Imunofluorescência para Células Satélites.



Localização Clássica das Células Satélites no músculo esquelético. **Vermelho:** Laminina; **Azul:** Núcleos; **Verde:** Pax7. **A-** Núcleos da célula, DAPI (setas). **B-** Células satélites identificadas pelo Pax7 (setas). **C-** Sobreposição do núcleo com as células satélites (setas). Imagens de imunofluorescência de lâminas do músculo psoas adquiridas através do equipamento ImageXpress (Molecular Devices) durante o presente projeto de pesquisa. (Barra = 50 μ m).

As CS funcionam como precursoras miogênicas para o crescimento e o reparo muscular no músculo esquelético adulto, e normalmente permanecem inativas, em estado de repouso. Contudo, na presença de um estímulo, como, por

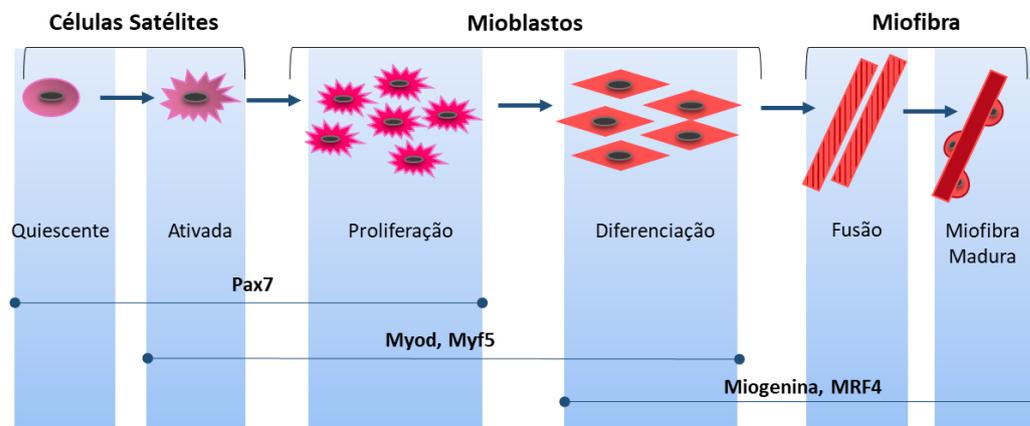
exemplo, a lesão muscular, as CS se ativam, proliferam, diferenciam e se fundem para formar miotubos, ou apenas se fundem com fibras danificadas para que haja reparação enquanto reabastecem o *pool* de células satélites (MOURIKIS; RELAIX, 2016; SNIJDERS, *et al.*, 2015).

As CS envolvidas no processo de regeneração pós-natal passam por um processo semelhante ao do desenvolvimento, pois estão sob a mesma hierarquia genética nos dois processos. A identificação das CS envolve o uso de marcadores que caracterizam esse tipo de célula, sendo o Pax7 o mais definidor. Entretanto, há vários outros marcadores para CS, como os fatores regulatórios miogênicos, Barx2, M-caderina, proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão de células neurais 1 (NCAM-1), entre muitas outras (ALMEIDA, *et al.*, 2016).

A regeneração das fibras musculares ocorre pela ação das CS, as quais, ainda inativas, expressam Pax7, e então se ativam e migram para o local da lesão, onde proliferam pela alta expressão de MyoD e Myf-5. A partir desta fase, as CS são conhecidas como mioblastos. A próxima etapa é a diferenciação, a qual é marcada pela regulação negativa de Pax7 e pela regulação positiva de Mrf4 e Miogenina. Nessa fase, os mioblastos podem se diferenciar em novas miofibras multinucleadas, processo chamado de hiperplasia, ou podem se fundir às miofibras danificadas, processo chamado de hipertrofia. Após estes passos, as miofibras regeneradas amadurecem e desempenham a sua função contrátil (Figura 4) (BROEK; GREFFE; HOFF, 2010).

No músculo saudável, este reparo acontece normalmente, mas no caso de algumas doenças, como a Distrofia Muscular de Duchenne, as funções das CS são indiretamente afetadas. Isso ocorre devido ao recrutamento constante dessas células para a regeneração muscular, o que leva ao seu esgotamento com consequente perda de capacidade regenerativa nos músculos distróficos (BOLDRIN; ZAMMIT; MORGAN, 2015).

Figura 4. Representação dos fatores miogênicos envolvidos na ativação, proliferação e diferenciação das células satélites durante a miogênese pós-natal.



As células satélites permanecem quiescentes no músculo adulto normal e podem ser ativadas, por exemplo, por lesão muscular. Uma vez ativadas, as células satélites se proliferam e se diferenciam em mioblastos e se fundem para formar miofibras, os quais amadurecem em miofibras. Pax7 é expresso principalmente em células satélites quiescentes e ativadas. As células satélites são marcadas pelo MyoD e Myf5 principalmente nas fases de ativação e proliferação, enquanto que a miogenina e o Mrf4 marcam a diferenciação e a fusão. Imagem adaptada de ZAMMIT, *et al.* 2006.

3.2.2- PGC-1 α

O músculo esquelético se adapta às necessidades do corpo por meio de vários processos que controlam a biogênese mitocondrial, a angiogênese e a composição dos tipos de fibras musculares, e o PGC-1 α desempenha um papel essencial nessa adaptação fisiológica, sendo muito importante para a manutenção da função metabólica muscular, ativando e sendo ativado por várias cascatas de sinalizações (BALDELLI, *et al.*, 2014).

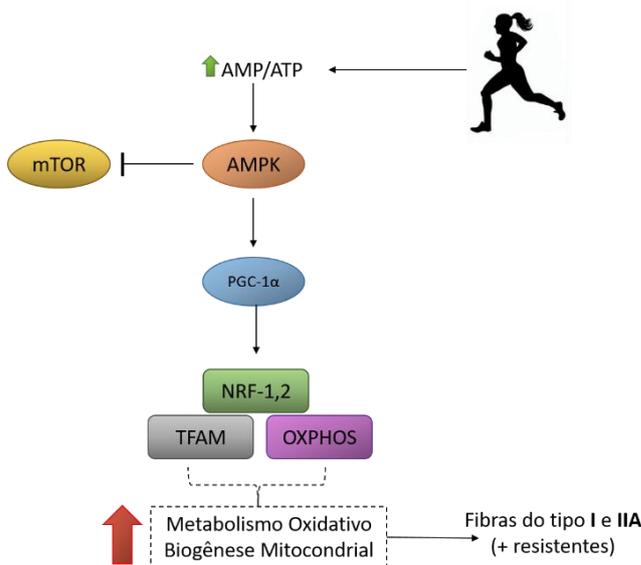
O PGC-1 α é membro da família de coativadores transcricionais do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma 1 (PGC-1) e é altamente expresso em tecidos oxidativos, sendo a sua principal função estimular o aumento da quantidade de mitocôndrias e aumentar o metabolismo oxidativo, tendo papel muito importante na angiogênese, na inflamação, na formação de junção neuromuscular e nos tipos de fibras musculares (SUNTAR, *et al.*, 2020).

A expressão do PGC-1 α é induzida tanto por fatores fisiológicos quanto pelo exercício físico, frio e jejum (AUSTIN; ST-PIERRE, 2012; ARNOLD, 2007). O exercício físico depende da capacidade oxidativa do músculo esquelético, que por sua vez é dependente da função mitocondrial e do suprimento sanguíneo. O exercício físico aeróbio aumenta a captação máxima de oxigênio, esgota os

estoques de glicogênio e aumenta a razão ADP/ATP, levando à ativação da AMPK e promovendo a fosfoativação do PGC-1 α que, por sua vez, interage com fatores de transcrição NRF1 e NRF2, os quais induzem a expressão de genes mitocondriais, incluindo aqueles que codificam TFAM e OXPHOS, diferente do treinamento de força, com a ativação da via mTOR, levando a resultados metabólicos diferentes (Figura 5) (VILLALVAZO, *et al.*, 2019; BALDELLI, *et al.*, 2014). O PGC-1 α é encontrado em maior quantidade nas fibras musculares do tipo I e IIA, como por exemplo no músculo sóleo (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008).

Na DMD, a capacidade de fosforilação oxidativa e a função mitocondrial são reduzidas, podendo ocorrer também intoxicação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e anormalidades na sinalização do cálcio, entre outros. Esses fatores, os quais se encontram desregulados, estão associados à expressão e função da proteína PGC-1 α (HANDSCHIN, *et al.*, 2007). ARNOLD (2007) observou que a expressão de PGC-1 α no músculo esquelético de camundongos *mdx* (modelo animal experimental para a Distrofia Muscular de Duchenne) sedentários reduz os níveis de creatina quinase, de necroses, e apresenta um menor comprometimento das fibras musculares, melhorando a função muscular, o que sugere que o PGC-1 α pode ser um novo alvo terapêutico para DMD.

Figura 5. Papel do PGC-1 α na coordenação da expressão de genes mitocondriais durante o exercício físico.



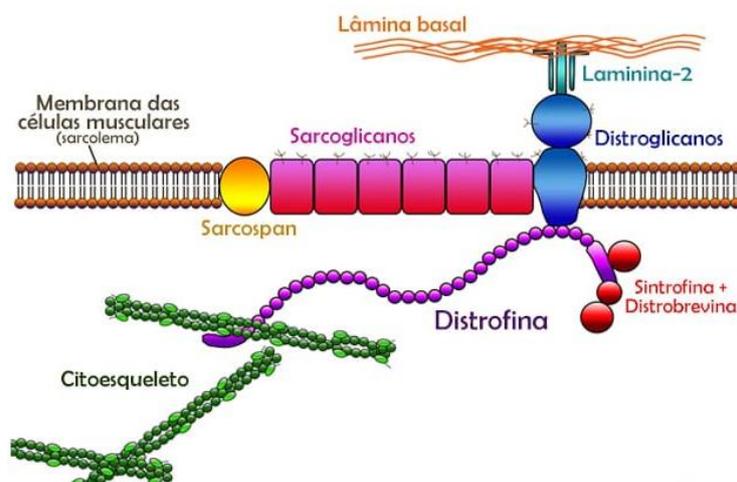
Durante o exercício físico aeróbio, a AMPK ativada é responsável pela fosforilação de PGC-1 α que interage com NRF1 e NRF2, os quais induzem a expressão de genes mitocondriais, incluindo aqueles que codificam TFAM e OXPHOS. A via mTOR é inibida nessa situação (Imagem adaptada de VILLALVAZO, *et al.*, 2019; BALDELLI, *et al.*, 2014).

3.3- DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), a mais comum e severa entre as distrofias, tem incidência de 1:5000 nascidos vivos do sexo masculino, e ocorre devido a uma mutação na região Xp21 do cromossomo sexual X, resultando na ausência da proteína distrofina, cuja função é de manutenção e estabilidade do músculo esquelético (DIETZ, *et al.*, 2020). A falta dessa proteína acarreta em uma degeneração progressiva das fibras musculares, e os indivíduos têm como principal sintoma a fraqueza muscular (WALDROP; FLANIGAN, 2019). Os indivíduos do sexo feminino, por apresentarem dois cromossomos X, não desenvolvem a doença, e em geral são assintomáticas desde que sejam compensadas pelo outro cromossomo X normal (NOZOE, *et al.*, 2016).

A distrofina é uma proteína estrutural essencial no músculo esquelético, e localiza-se no sarcolema, onde se associa a várias proteínas para formar o complexo proteico associado à distrofina (DAPC). Sua principal função é ligar a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina, proporcionando estabilidade e manutenção para a membrana, protegendo-a contra o estresse mecânico e prevenindo rupturas (Figura 6). A distrofina é uma proteína complexa e grande (427 kDa), característica que a deixa mais suscetível a mutações (EHMSEN; POON; DAVIES, 2002). A desestabilização do DAPC na ausência da distrofina acarreta em danos nas fibras musculares, e posteriormente leva a perda da função muscular e necrose, como acontece na DMD (MANNING; O'MALLEY, 2015).

Figura 6. Representação ilustrativa da localização da distrofina no músculo esquelético.



Interação da distrofina com proteínas citoplasmáticas, transmembrana e extracelulares no músculo esquelético (Imagem reformulada a partir de RAVINDRAN, 2018).

As manifestações clínicas da DMD se tornam evidentes entre os 3 e 5 anos de idade, quando a criança começa a apresentar alguns sinais que são característicos da doença, tais como: atraso do início da marcha, quedas frequentes, marcha típica (anserina), dificuldade para subir escadas ou levantar-se do chão (sinal de Gowers), e pseudo-hipertrofias de panturrilha devido à substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo. Com o decorrer do tempo, os portadores da DMD perdem a capacidade de deambulação, na qual se faz necessário a utilização da cadeira de rodas por volta dos 12 anos de idade. A progressão da doença pode levar ao óbito no final da adolescência por insuficiência cardíaca e/ou respiratória devido ao acometimento do miocárdio e do diafragma (YIU; KORNBERG, 2015).

3.3.1- Modelo experimental da DMD, os Camundongos *mdx*

Para entender melhor a fisiopatologia da DMD, as alterações no músculo esquelético, e testar possíveis protocolos terapêuticos, pesquisadores têm utilizado o modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne, o camundongo *mdx*, o qual também apresenta uma mutação no cromossomo X, porém na região Xp23, ocasionando a deficiência da distrofina. Isto faz com que o *mdx* seja um modelo apropriado para o estudo da doença, pois estes camundongos também são afetados por degeneração e necrose.

Os camundongos *mdx* apresentam progressão da doença semelhante aos humanos, e por isso vivem menos do que os animais controle. O músculo esquelético do *mdx* apresenta infiltração de células inflamatórias, fibrose, perda da função muscular, entre outras características que são vistas no músculo humano, porém de forma menos agressiva quando comparadas aos humanos com DMD. A necrose nos músculos dos membros posteriores atingem o pico por volta das 3-4 semanas de idade, mas depois estabilizam (YUCEL, *et al.*, 2018), com exceção do músculo diafragma que sofre deterioração progressiva, como também visto em humanos com DMD (MCGREEVY, *et al.*, 2015). Outro motivo que leva à utilização do camundongo *mdx*, é por não ser possível testar possíveis estratégias terapêuticas em crianças com DMD, pelo fato desta ser uma doença degenerativa e progressiva, o que implica em riscos de lesionar ainda mais a musculatura e agravar a situação dessas crianças (PARTRIDGE, 2013; MANNING; O'MALLEY, 2015).

3.4- AVANÇOS NO TRATAMENTO DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Atualmente ainda não se tem a cura para a DMD, mas há tratamentos que têm como objetivo proporcionar melhor qualidade de vida e retardar a progressão da doença, aumentando a taxa de sobrevivência. Sabe-se que um indivíduo com DMD pode passar dos 25 anos de idade quando tratado de maneira correta, diferentemente do que ocorria na década de 60, época em que esses indivíduos iam a óbito aos 14 anos de idade (MAH, 2016). Entretanto, a DMD ainda está associada à morte precoce, e por isso os estudos continuam a avançar com o propósito de descobrir novas estratégias terapêuticas para trazer mais benefícios aos pacientes com DMD.

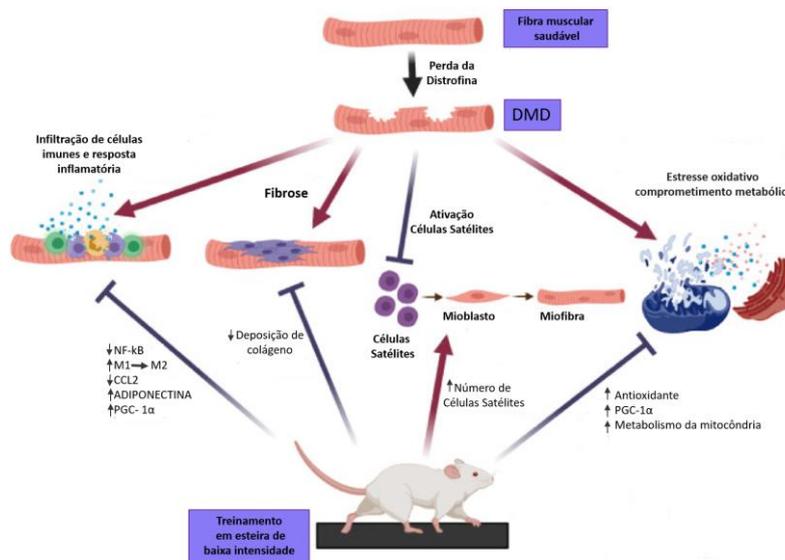
O uso de glicocorticoides (medicamentos para insuficiência cardíaca), cirurgia para escoliose, fisioterapia, e o uso da ventilação não invasiva, são estratégias utilizadas para aumentar a sobrevivência de pacientes com DMD (MORENA, *et al.*, 2019). Segundo COWEN, *et al.* (2019), os glicocorticoides mais prescritos atualmente são a prednisona e o deflazacort, ambos considerados tratamento padrão da DMD e trazendo múltiplos benefícios, incluindo atraso da perda da função muscular e melhora na força e na mobilidade. Todavia, o uso prolongado desses medicamentos traz vários efeitos colaterais. Segundo o “*The Duchenne Registry*” dos Estados Unidos, uma proporção considerável de pacientes com DMD não faz a terapia recomendada, e as principais razões para o não uso das medicações, é que eles não foram prescritos ou recomendados, bem como preocupações com os efeitos colaterais (GLOSS, *et al.*, 2016; COWEN, *et al.*, 2019). Por isso é de extrema importância, além de necessário, que haja outras opções de tratamentos eficazes para os indivíduos afetados por essa doença (RANGEL *et al.*, 2012; COWEN, *et al.*, 2019).

3.5- EXERCÍCIO AERÓBICO, UMA ESTRATEGIA TERAPÊUTICA PARA A DMD

Como a DMD é uma doença caracterizada pela perda de força muscular, o treinamento aeróbio pode ser uma terapia adequada, sendo que esse tipo de exercício é conhecido por melhorar a força e resistência muscular em indivíduos saudáveis. Entretanto, o benefício do exercício físico para DMD ainda é desconhecido e muito debatido, e se encontra limitado a modelos animais, pois o

próprio exercício pode exacerbar os danos musculares da doença, e é necessário e de extrema importância estabelecer limites antes de prescrever esse tipo de tratamento aos pacientes (GRANGE; CALL, 2007).

Aos indivíduos com DMD, o aumento de estresse mecânico nas fibras musculares deve ser evitado, por isso estudos têm aconselhado evitar exercícios de alta intensidade, e optar pelo exercício de baixa intensidade logo no estágio inicial da doença, no qual os danos mecânicos são evitados e as propriedades contráteis são otimizadas (FRINCHI, *et al.*, 2021). O exercício físico na DMD pode aumentar a expressão da proteína utrofina (GORGON, *et al.*, 2013), além da quantidade de células satélites, como observado por KUROSAKA (2009) e SHEFER (2010) em modelos de roedores que usaram tanto a roda voluntária quanto a corrida forçada em esteira, exercícios que promoveram a transição de fibras do tipo II (glicolíticas) para as do tipo I (oxidativas) (CAMPOS, *et al.*, 2002). Outro benefício é o aumento na expressão do PGC-1 α (ABREU, *et al.*, 2017; FRY, *et al.*, 2014). A partir destes resultados, espera-se que o treinamento aeróbio de baixa intensidade em indivíduos com DMD traga aumento de massa muscular, aumento da força e diminuição da fadiga, contribuindo para o retardo da doença e uma melhor qualidade de vida. Contudo, é necessário a realização de estudos que avaliem os benéficos do exercício físico primeiramente em animais distróficos (*mdx*) para determinar os limites funcionais visando maximizar os benefícios do exercício e minimizar os danos da distrofia, e assim, permitir prescrições de confiança para pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (KOSTEK; GORDON, 2018). A figura 7 mostra alguns dos efeitos da corrida em esteira de baixa intensidade em camundongos *mdx*.

Figura 7. Efeitos da corrida em esteira de baixa intensidade no modelo *mdx*.

O exercício de baixa intensidade pode reverter: (1) A resposta inflamatória, induzindo um deslocamento da população de macrófagos do tipo pró-inflamatório M1 para o tipo M2 e modulando as vias e moléculas inflamatórias, incluindo NF-kB (fator nuclear-kB), CCL2 (Proteína quimioatraente de monócitos-1), Adiponectina e PGC-1 α ; (2) A fibrose, pela redução da deposição de colágeno; (3) A degeneração muscular, pela ativação de células satélites; (4) O estresse oxidativo e o comprometimento metabólico por indução da ativação de antioxidantes, do metabolismo mitocondrial e da via do PGC-1 α (Imagem adaptada de FRINCHI et al., 2021).

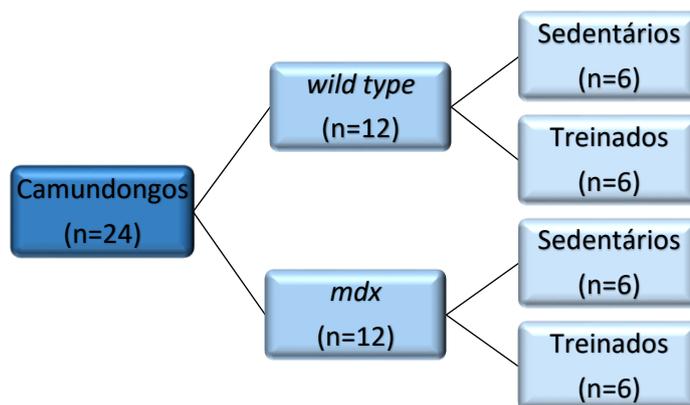
4- MATERIAS E MÉTODOS

4.1- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 4740230518) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (Anexo 1). Foram utilizados 24 animais, sendo 12 camundongos selvagem (*wild type*: C57BL-10) e 12 camundongos *mdx* (Background: C57BL-10), modelo experimental para a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (CEMIB), e separados em 4 animais por gaiola, com acesso livre à água e comida. As gaiolas foram higienizadas de acordo com os procedimentos do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular (LFBM). O ciclo claro/escuro foi invertido, sendo que as luzes se apagavam às 07h e se acendiam às 19h. Durante os treinamentos e manuseio dos animais era acendida a luz vermelha para evitar interferência no ciclo sono-vigília dos mesmos, os quais se caracterizam como noturnos.

Os camundongos foram divididos entre sedentários e treinados, originando 4 grupos experimentais: *WT-SED*: *wild type* Sedentário, *WT-TR*: *wild type* treinado, *MDX-SED*: *mdx* sedentário, e *MDX-TR*: *mdx* treinado, com cada grupo sendo composto por 6 animais (Figura 8). Os procedimentos foram iniciados quando os animais completaram 6 semanas de idade, com os animais sedentários respeitando a idade dos animais treinados nos respectivos dias de treinamento (37 sessões). A faixa etária foi escolhida devido ao músculo esquelético apresentar alterações morfofuncionais importantes (LOWE, WILLIAMS, *et al.*, 2006), equiparando-se à idade de pacientes jovens com DMD (MATHUR, LOTT, *et al.*, 2010).

Figura 8. Esquema de divisão dos grupos dos animais.



4.2- TREINAMENTO

4.2.1- Esteira Motorizada

Os animais dos grupos *WT-TR* e *MDX-TR* foram treinados em uma esteira motorizada da *Insight*. A esteira era equipada com um painel de controle com regulador de velocidade, chave liga-desliga, mostrador digital para o tempo, a distância percorrida e botões para reiniciar o relógio e o contador de distância (Figura 9).

Figura 9. Esteira motorizada para camundongos.



4.2.2- Treino aeróbio de baixa intensidade

Os animais dos grupos treinados (*WT-TR* e *MDX-TR*) iniciaram as sessões de treinamento quando completaram 6 semanas de idade. Os mesmos foram submetidos ao exercício aeróbio de baixa intensidade em esteira motorizada sem inclinação (0° de inclinação), e antes de cada sessão, eles passaram por um período de aquecimento de 2 minutos à uma velocidade de 7m/min. Após este período, os animais foram exercitados a uma velocidade entre 9-10m/min durante 30 minutos (Figura 10). Esses valores foram escolhidos de acordo com a literatura (FRINCHI, *et al.*, 2021; SCHILL, *et al.*, 2015). O protocolo de exercício foi realizado durante três dias da semana, de maneira intervalada (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira), até completarem 37 sessões de treinamento. Enquanto isso, os grupos *WT-SED* e *MDX-SED* passaram o mesmo período de tempo em suas gaiolas, seguindo o protocolo de sedentarismo, sendo manuseados apenas para higienização das gaiolas.

Figura 10. Camundongos em treinamento na esteira motorizada.



4.2.3- Obtenção dos músculos

Após os períodos de experimento, todos os animais foram pesados e anestesiados com Xilasina 100 mg/kg PV + Ketamina 100 mg/kg PV. Em seguida foi realizada a eutanásia por método de decapitação em uma guilhotina própria para camundongos.

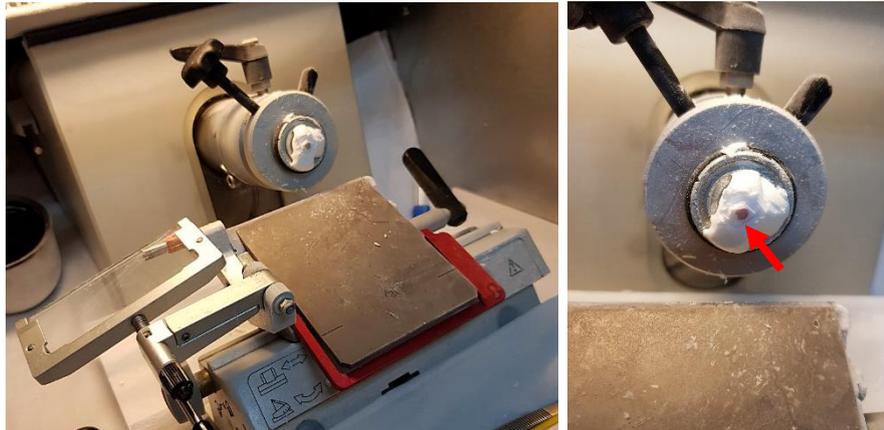
Uma incisão na região ventral direita e esquerda do animal foi realizada e o músculo psoas foi exposto e retirado de ambos os lados. Os fragmentos foram envolvidos em talco e submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido. A estocagem dos mesmos ocorreu em freezer à -80 °C até o processamento do material.

Vale ressaltar que esse músculo foi escolhido devido a suas características bioquímicas, visando que a doença torna os músculos de contração mais rápida mais susceptíveis à lesão quando comparados aos de contração mais lenta.

4.3- PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O processamento histológico contou com o seccionamento dos fragmentos em cortes transversos de espessura de 6 µm, com auxílio do Criostato Leica CM 1850 UV (equipamento multiusuário) a uma temperatura de -25 °C (Figura 11). Os cortes para histologia básica foram colhidos em lâminas de 76x26 mm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise dos aspectos genéricos das fibras musculares. A análise morfológica contou com a utilização de microscópio de luz da Kasvi (lente de 40x), seguindo orientações fornecidas na literatura (CORNACHIONE, CACAO-BENEDINI, *et al.*, 2008; CORNACHIONE, CACAO-BENEDINI, *et al.*, 2011). A hematoxilina é um corante básico de cor azul púrpura, responsável por corar substâncias ácidas do tecido, como por exemplo os núcleos, enquanto que a eosina é um corante ácido de cor rósea/vermelho que tem atração por substâncias básicas como o citoplasma.

Figura 11. Criostato Leica CM 1850 UV.



Seta vermelha: Músculo psoas de camundongo fixo e pronto para a realização dos cortes.

4.4- ANÁLISE DO DIÂMETRO MENOR

A análise do diâmetro menor das fibras do músculo psoas de cada animal foi realizada a partir da mensuração de 4 campos aleatórios em cada amostra com imunomarcagem para MHC (os mesmos campos utilizados para quantificação de fibras). Foi utilizado o programa Image J (versão:1.52a java 1.8.0_112, 64-bit) para as mensurações, pelo parâmetro geométrico 'diâmetro de Feret' mínimo (PEDRAZZANI, 2019).

4.5- PROCESSAMENTO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

O processamento para imunofluorescência também contou com o seccionamento dos fragmentos em cortes transversos na mesma espessura. A técnica de imunofluorescência (IF) utilizada foi a indireta, na qual foi aplicado um anticorpo primário específico não fluorescente, e um anticorpo secundário ligado ao fluoróforo fluorescente que se associa somente ao anticorpo primário, o qual reage com um antígeno específico.

Para a realização do procedimento, a amostra foi retirada do freezer para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, foi utilizado o bloqueador de ligações inespecíficas *mouse on mouse* (MOM, Vector Laboratories), o qual permaneceu por 1 hora nas amostras. Em seguida, o MOM foi removido e as amostras foram lavadas 1x com PBS 1%. O tecido foi incubado com os anticorpos

primários (Tabela 1) e levado à estufa 37 °C por 45 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas 3x com PBS 1% com um intervalo de 5 min entre as lavagens. Logo após, os tecidos foram incubados com os anticorpos secundários (Tabela 1) e levados à estufa 37 °C por 35 minutos, seguido de novas lavagens com PBS 1% em intervalos de 5 min cada. Por fim, foi utilizado o meio de montagem (com ou sem DAPI – marcador nuclear), e as lâminas foram devidamente guardadas em freezer -20 °C. Para a visualização da IF foi utilizado o sistema de imagens *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) (equipamento multiusuário) (Figura 12).

Tabela 1. Anticorpos utilizados com suas respectivas informações e concentrações.

Primários	Isótipo	Hospedeiro	Fabricante	Concentração
Anti-Laminina	IgG	Anti-Rabbit	Abcam	1:200
Pax-7	IgG1	Anti-Mouse	Santa Cruz	1:10
F5D (Miogenina)	IgG1	Anti-Mouse	DSHB	1:1
PGC-1 α	IgG2a	Anti-Mouse	Santa Cruz	1:50
Anti-Distrofina	IgG	Anti-Rabbit	Abcam	1:400
SC-71 (MHC IIA)	IgG1	Anti-Mouse	DSHB	1:50
BF-F3 (MHC IIB)	IgM	Anti-Mouse	DSHB	1:100
Secundários	Isótipo	Hospedeiro	Fabricante	Concentração
Alexa Fluor 488	IgG	Anti-Rabbit	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 488	IgG1	Anti-Mouse	Jackson	1:200
Alexa Fluor 647	IgG	Anti-Rabbit	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 647	IgG2a	Anti-Mouse	Santa Cruz	1:1000
Alexa Fluor 647	IgM	Anti-Mouse	Abcam	1:500

Figura 12. Equipamento ImageXpress XLS System com o *software* MetaXpress.



A imunofluorescência é uma técnica que permite visualizar estruturas e reações específicas da ligação antígeno–anticorpo através de diferentes marcadores. Nesse estudo foram utilizados diversos anticorpos (Tabela 1) que serviram para identificar proteínas e células musculares importantes durante a miogênese, as quais estão descritas a seguir.

- **Distrofina**

Para a imunomarcção da proteína distrofina, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário **Dys-ab15277 (1:400)** e secundário **Alexa Fluor 488 (1:1000)**. Sendo assim, conseguimos visualizar a distrofina pela cor verde. As lâminas foram montadas com DAPI, marcando os núcleos em azul. As imagens para imunomarcção da proteína distrofina foram adquiridas na lente de 10x no equipamento *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices).

- **Células Satélites**

Para identificação das células satélites quiescentes e em ativação foi utilizado como anticorpo primário o **Pax7 (1:10)** e secundário o **Alexa fluor 488 (1:200)**. Para marcar as CS em diferenciação e fusão foi utilizado o anticorpo primário **F5D (1:1)** e o secundário **Alexa Fluor 488 (1:200)**. Em ambas as marcações, foi atribuída a cor verde às CS. Para marcação de núcleos foi utilizado o meio de montagem DAPI, o qual cora os núcleos em azul. Adicionalmente, utilizamos o anticorpo primário **Anti-Laminina (1:200)** e o secundário **Alexa Fluor 647 (1:200)** para visualização da membrana muscular em vermelho. As marcações para Pax7 e Miogenina não foram feitas em um mesmo experimento, devido as características dos anticorpos serem iguais. Para a quantificação das CS foram utilizadas imagens adquiridas na lente de 10x no equipamento *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices). Através do programa Image J (versão:1.52a java 1.8.0_112, 64-bit) foram contadas todas as CS, localizadas abaixo da marcação da laminina, ou seja, abaixo da lamina basal com seu respectivo núcleo, corado pelo DAPI. Nas mesmas imagens foram contadas todas as fibras musculares para posteriormente ser feita a relação CS/fibra.

Para melhor visualização das CS, imagens foram adquiridas na lente de 20x no mesmo equipamento.

- **PGC-1 α**

O PGC-1 α foi identificado através do anticorpo primário **PGC-1 α (1:50)**, e posterior incubação com o anticorpo secundário **Alexa Fluor 647 (1:1000)**, resultando em uma marcação em vermelho. Adicionalmente, utilizamos o anticorpo primário **Anti-laminina (1:200)** e o anticorpo secundário **Alexa Fluor 488 (1:200)** para marcação da laminina em verde. O fluoróforo DAPI foi utilizado para marcação dos núcleos em azul.

Para a quantificação da proteína PGC-1 α foi utilizado o programa Image J (versão:1.52a java 1.8.0_112, 64-bit). Quatro campos ($w = 100/h = 100$) foram selecionados, evitando as bordas e possíveis artefatos para cada amostra marcada com PGC-1 α , e assim os dados foram coletados a partir da unidade de fluorescência. As imagens quantificadas foram adquiridas na lente de 10x no equipamento *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices). Para melhor visualização da presença do PGC-1 α , imagens foram adquiridas na lente de 20x no mesmo equipamento.

- **MHC – Tipo De Fibras**

Para a identificação dos diferentes tipos de fibras, foi utilizada a aplicação de dois anticorpos diferentes: o **SC-71 (1:50)** para marcação das fibras tipo IIA (FTIIA) e **BF-F3 (1:100)** para marcação das fibras tipo IIB (FTIIB). Posteriormente, foi aplicado dois anticorpos secundários: **Alexa Fluor 488 (1:200)** e **Alexa Fluor 647 (1:500)**, os quais marcaram as FTIIA em verde e FTIIB em vermelho. As fibras do tipo IID (FTIID) não foram submetidas à aplicação de anticorpos primário e secundário, apresentando-se assim na cor preta, ou seja, sem marcação. Já as fibras do tipo I (FTI) não foram marcadas, pois o músculo psoas de camundongo não contém esse tipo de fibra (SARTORIUS, *et al.*, 1998). O fluoróforo DAPI foi utilizado para marcação dos núcleos em azul.

Para a quantificação dos diferentes tipos de fibras foi utilizado o programa Image J (versão:1.52a java 1.8.0_112, 64-bit). Foram contadas as fibras IIA (verde), IIAD/DA (verde com preto), IID (preto), IIDB/BD (vermelho com

preto) e as IIB (vermelho), e as mensurações foram realizadas a partir de 4 campos aleatórios em cada amostra com imunomarcção para MHC. As imagens quantificadas foram adquiridas na lente de 4x no equipamento *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices). Para melhor visualização das fibras, imagens foram adquiridas na lente de 40x no mesmo equipamento.

4.6- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações quantitativas para Imunofluorescência de Pax7, miogenina e PGC-1 α foram feitas através da análise de variância ANOVA utilizando-se o teste *One-Way* com *post-hoc* de *Bonferroni* ou *Brown-Forsythe and Welch*, no programa estatístico *GraphPad Prism* 5.01.

Para a análise dos dados de diâmetro menor, foi realizado o modelo linear de efeitos mistos, através do procedimento PROC MIXED, seguido de transformação logarítmica natural dos dados para proporção de fibras, para que a variabilidade fosse mais homogênea e a distribuição teórica da média da amostra fosse consistente com uma distribuição normal (CURRAN-EVERETT, 2018). Essas análises foram realizadas através do *software* estatístico SAS® 9.4, com a ajuda da estatística Daiane Leite da Roza da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Para todas as análises foram adotados os índices de significância de 5% ($\alpha=5\%$) com um intervalo de confiança de 95% (IC=95%); ($p < 0,05$).

5- RESULTADOS

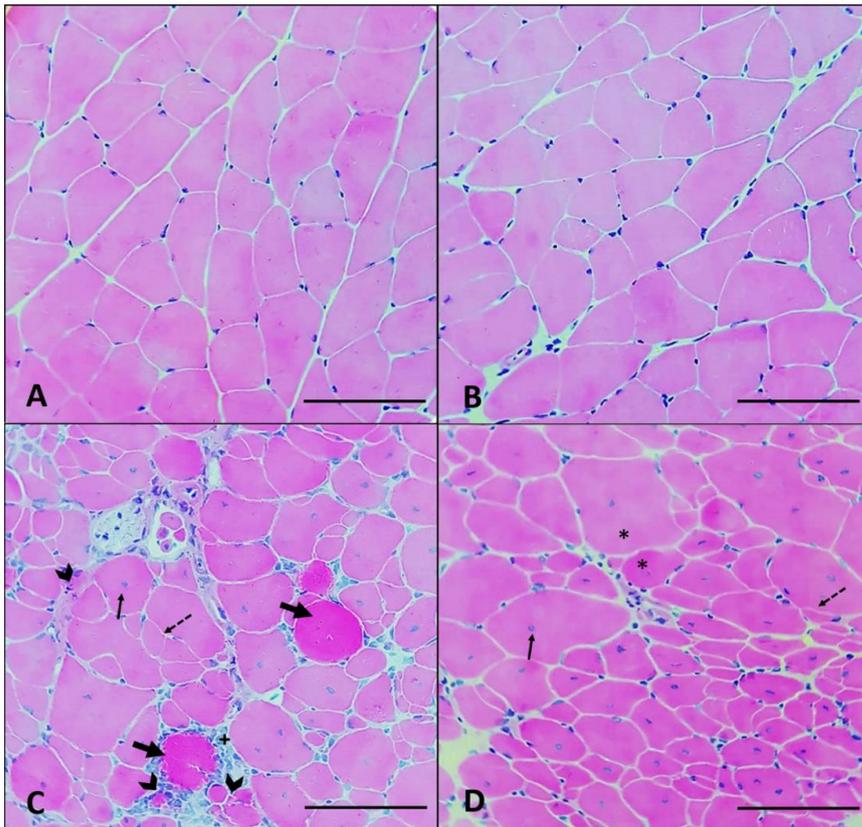
5.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA

Pela análise morfológica do músculo psoas, o qual foi corado com Hematoxilina e Eosina (HE), foi observado uma estrutura muscular saudável, com fibras poliédricas, núcleos na periferia e sem alterações patológicas nos grupos controles *WT-SED* e *WT-TR* (Figura 13, A e B).

No grupo *MDX-SED* (Figura 13, C), além da estrutura muscular apresentar núcleos centralizados em todos os animais na maioria das fibras, indicando degeneração e regeneração muscular, também foi encontrada uma

variação no tamanho das fibras, além de fibras basofílicas, *splitting*, necrose, aumento de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório. O grupo *MDX-TR* (Figura 13, D) apresentou alterações similares às do grupo *MDX-SED*, porém menos expressivas. A Tabela 2 destaca em porcentagem quantos animais de cada grupo apresentaram as anomalias.

Figura 13. Cortes histológicos do músculo psoas corados em Hematoxilina e Eosina (HE).



A-Citoarquitetura normal do músculo psoas de camundongos *WT-SED*. **B-**Citoarquitetura normal do músculo psoas de camundongos *WT-TR*. **C-** Alterações patológicas no músculo psoas de camundongos *MDX- SED*, **seta grossa:** Célula basofílica, **seta fina:** núcleo centralizado, **seta pontilhada:** *Splitting*, **ponta de seta:** Necrose. **sinal de mais:** infiltrado inflamatório. **D-** Alterações patológicas no músculo psoas de camundongos *MDX-TR*, **seta fina:** núcleo centralizado, **seta pontilhada:** *Splitting*, **asteriscos:** variação no tamanho das fibras. (Barra = 50 μ m).

Tabela 2. Alterações patológicas das fibras do músculo psoas de camundongos *WT-TR* e *MDX-TR* 37 sessões e *WT-SED* e *MDX-SED* 37 sessões, identificadas pela técnica de coloração Hematoxilina e Eosina.

<i>Alterações Patológicas</i>	<i>wtSED</i>	<i>wtTR</i>	<i>mdxSED</i>	<i>mdxTR</i>
Centralização Nuclear	50%*	83%*	100%	100%
Variação de tamanho de fibras	0%	66%	100%	100%
Fibras Basofílicas	0%	0%	83%*	66%*
Aumento de Tecido Conjuntivo	0%	16%*	33%*	50%*
Splitting	16%*	66%*	100%	100%
Necrose	0%	0%	100%*	100%*
Infiltrado Inflamatório	0%	16%*	100%	100%

% Referência o número de camundongos que apresentaram a anomalia no grupo

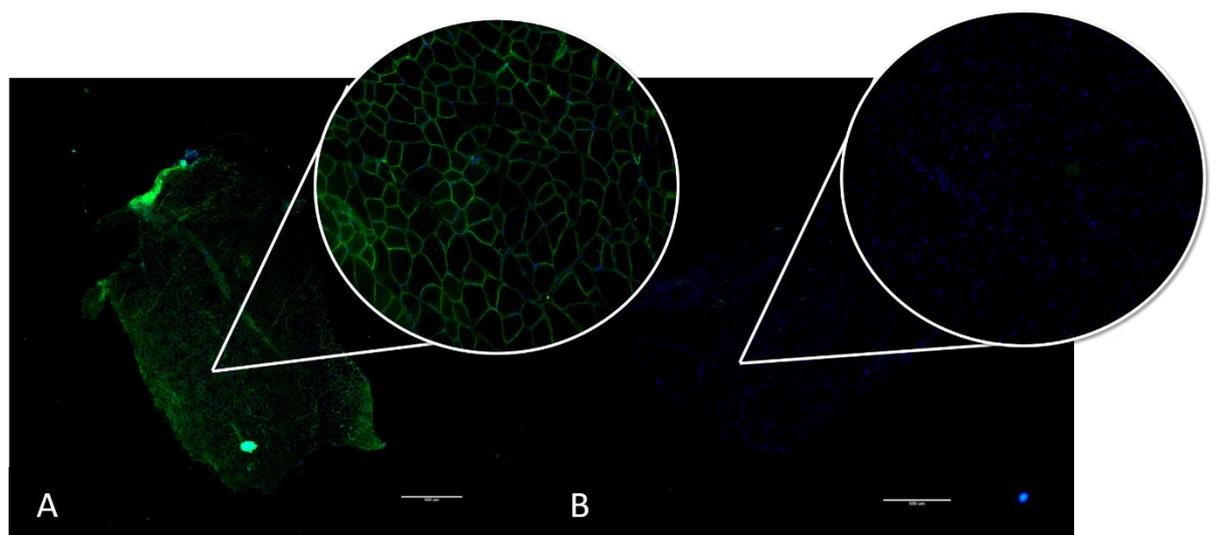
* Menos de 5% de células

5.2- ANÁLISE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

5.2.1- Distrofina

O ensaio de Imunofluorescência para distrofina foi realizado para certificação de que os animais *mdx* não apresentavam a proteína distrofina, diferentemente dos animais *wild-type*, os quais expressam a proteína normalmente (Figura 14).

Figura 14. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcagem da distrofina em músculo psoas de camundongos.

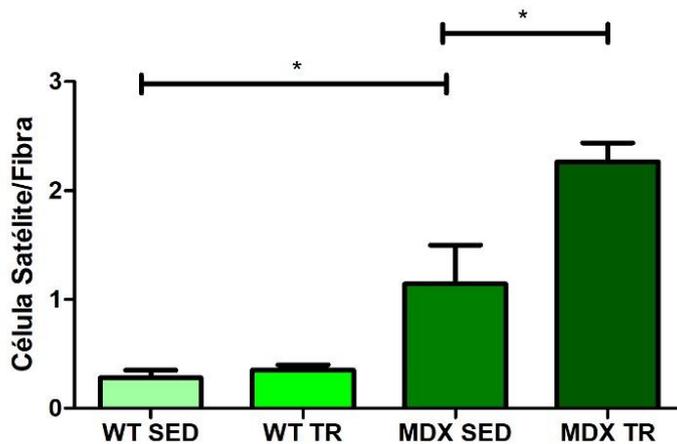


A- Camundongo *wild type* (controle), distrofina presente em verde. **B-** Camundongo *mdx* (distrófico), distrofina ausente. Marcação de núcleos em azul (DAPI). (Barra = 100 μ m).

5.2.2- Células Satélites

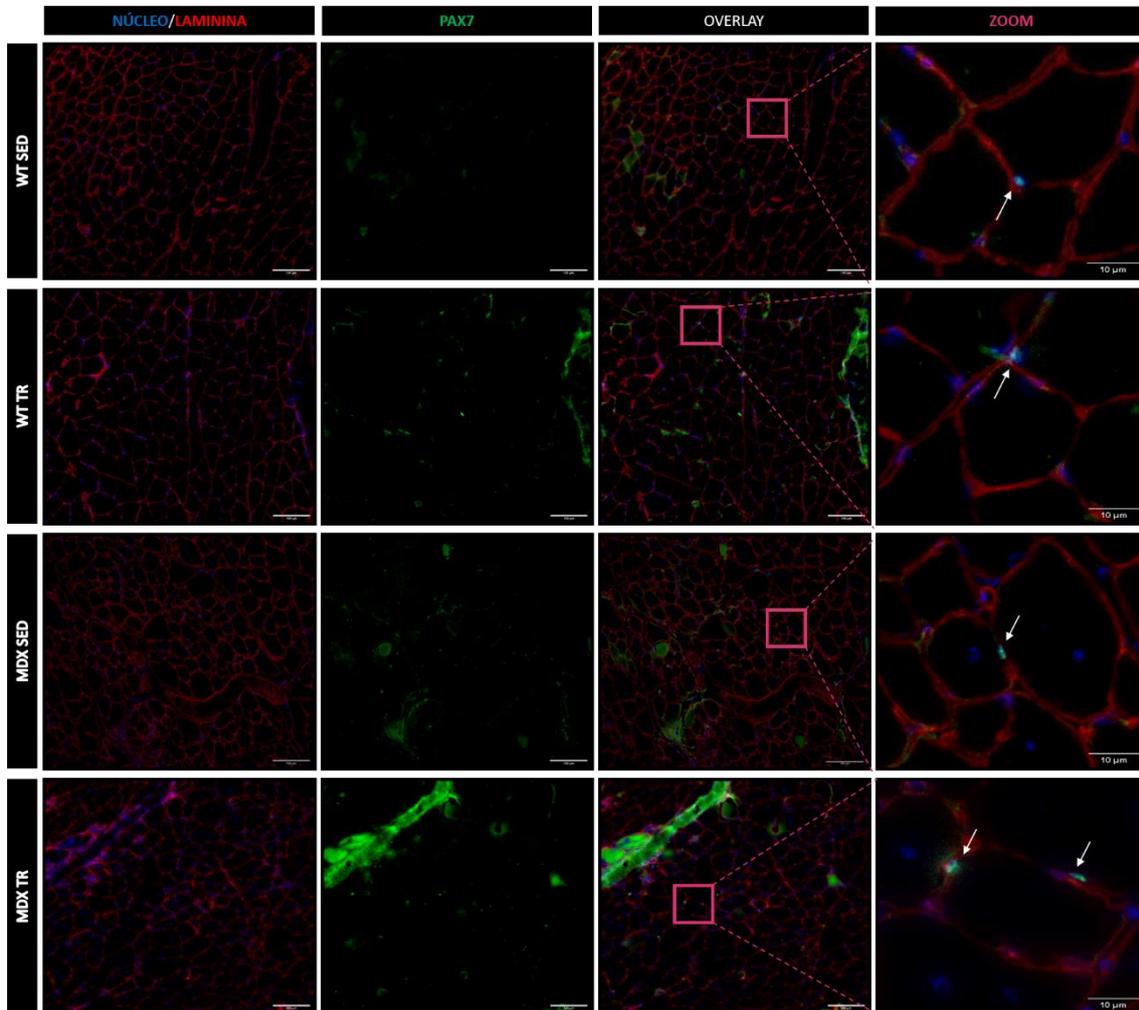
A Figura 15 ilustra a quantificação das células satélites quiescentes e ativadas identificadas através do marcador Pax7. Como esperado, o grupo *WT-SED* apresentou poucas CS quiescentes/ativadas quando comparado ao grupo *MDX-SED* (*WT-SED* x *MDX-SED*, $p < 0.05$). Após o treinamento, os resultados mostraram aumento quantitativo das CS nos camundongos *mdx* quando comparados ao respectivo grupo sedentário, resultado também esperado (*MDX-SED* x *MDX-TR*, $p < 0.05$). A Figura 16 ilustra a presença das CS quiescentes/ativadas através da técnica de Imunofluorescência.

Figura 15. Quantificação de células satélites pelo marcador Pax7 no músculo psoas de camundongos.



Como esperado, o grupo *WT-SED* apresentou poucas CS quiescentes/ativadas quando comparado ao grupo *MDX-SED*. Após treinamento de baixa intensidade durante 37 sessões, os camundongos do grupo *MDX-TR* apresentaram aumento de CS quando comparado com o grupo *MDX-SED*. * $p < 0.05$.

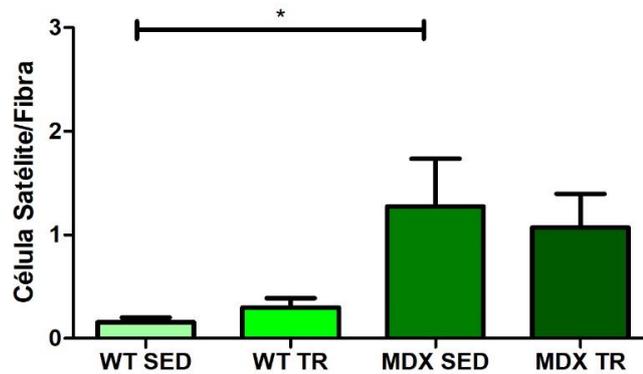
Figura 16. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção de CS em quiescência/ativação através do anticorpo Pax7.



Os grupos *mdx* apresentaram maior quantidade de CS quando comparados aos *wild type*. O grupo *WT-SED* apresentou poucas CS quiescentes/ativadas quando comparado ao grupo *MDX-SED*. Após treinamento de baixa intensidade durante 37 sessões, os camundongos do grupo *MDX-TR* apresentaram aumento de CS quando comparado com o grupo *MDX-SED*. Vermelho: Laminina. Azul: núcleos. Verde: Pax7. **Setas brancas: Células Satélites.** (Barra = 100 μ m / 10 μ m).

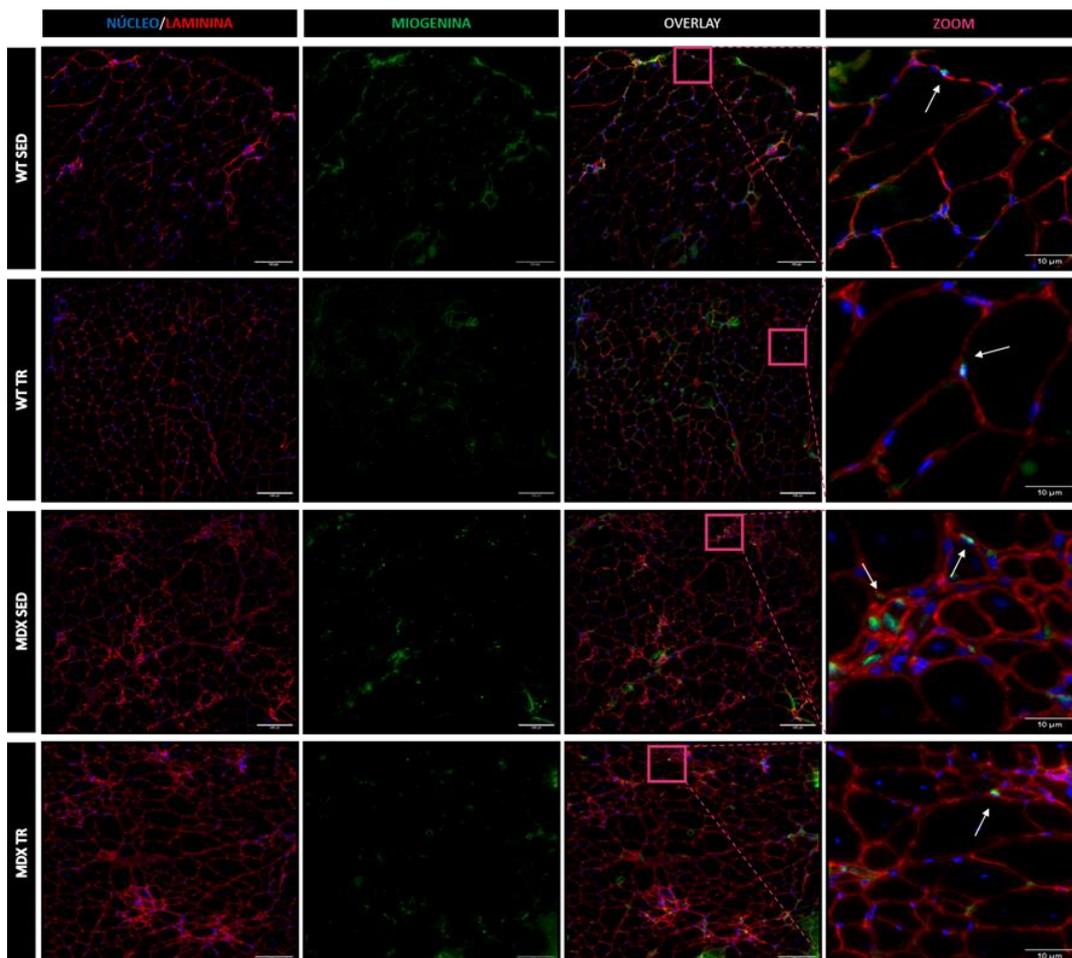
A Figura 17 ilustra a quantificação das células satélites em diferenciação e fusão identificadas através do marcador F5D (miogenina). Como esperado, o grupo *WT-SED* apresentou poucas CS em diferenciação/fusão quando comparado ao grupo *MDX-SED* (*WT-SED* x *MDX-SED*, $p < 0.05$). A imunomarcção das CS pelo anticorpo F5D (miogenina) está representada na Figura 18.

Figura 17. Quantificação de células satélites pelo marcador F5D (miogenina) no músculo psoas de camundongos.



Como esperado, o grupo *WT-SED* apresentou poucas CS em diferenciação/fusão quando comparado ao grupo *MDX-SED*. * $p < 0.05$.

Figura 18. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcagem de CS em diferenciação/fusão através do anticorpo F5D (miogenina).

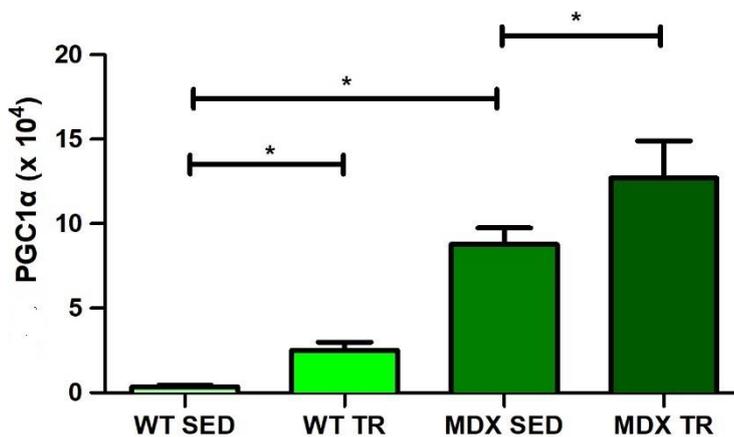


O grupo *WT-SED* apresentou poucas CS em diferenciação/fusão quando comparado ao grupo *MDX-SED*. Vermelho: Laminina. Azul: núcleos. Verde: Miogenina. **Setas brancas: Células Satélites.** (Barra = 100 µm / 10 µm).

5.2.3- PGC-1 α

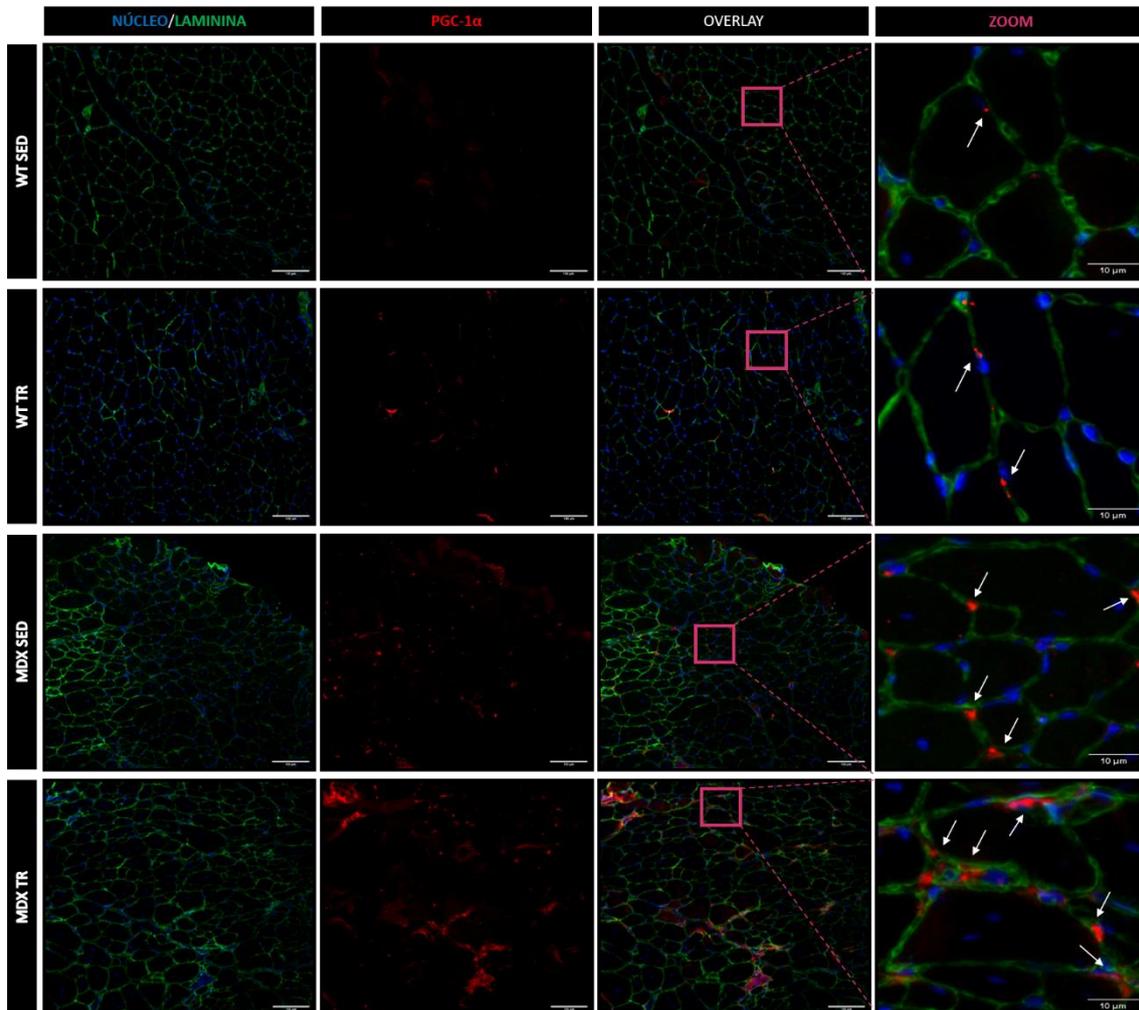
As medidas de fluorescência para a proteína PGC-1 α mostrou que a doença aumentou as características oxidativas do músculo psoas, pois observamos quantidade mais elevada no grupo *MDX-SED* (7.550,96) quando comparado ao grupo *WT-SED* (438,17) (*WT-SED* x *MDX-SED*, $p < 0.05$). Como esperado, o treinamento aeróbio de baixa intensidade aplicado por longo período aumentou a densitometria desta proteína em ambos os grupos treinados, *WT-TR* (2.194,67) e *MDX-TR* (10.985,33), quando comparados aos respectivos grupos sedentários (Figura 19). A Figura 20 ilustra a presença da proteína PGC-1 α em todos os grupos.

Figura 19. Quantificação da expressão da PGC-1 α .



O grupo *MDX-SED* apresentou maior expressão de PGC-1 α quando comparado ao grupo *WT-SED*. Após treinamento de baixa intensidade durante 37 sessões, os camundongos dos grupos *WT-TR* e *MDX-TR* apresentaram aumento na expressão de PGC-1 α quando comparados aos grupos sedentários. * $p < 0.05$.

Figura 20. Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcação do PGC-1 α .



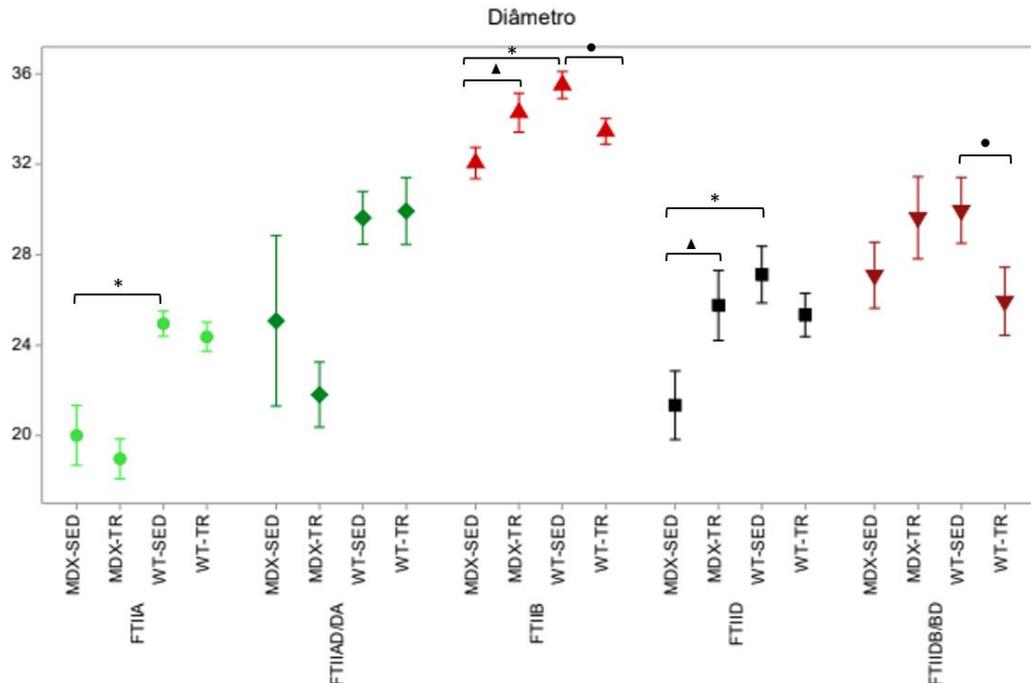
Os grupos *mdx* apresentaram maior expressão de PGC-1 α quando comparados aos *wild type*. Após treinamento de baixa intensidade durante 37 sessões, os camundongos dos grupos *WT-TR* e *MDX-TR* apresentaram aumento na expressão de PGC-1 α quando comparados aos grupos sedentários. Verde: Laminina. Azul: Núcleos. Vermelho: PGC-1 α . **Setas brancas: PGC-1 α .** (Barra = 100 μ m / 10 μ m).

5.2.4- Alterações do diâmetro menor das células musculares

Nossas análises para o diâmetro menor mostraram redução significativa no trofismo das fibras dos tipos FTIIA, FTIIB e FTIID do músculo psoas dos animais do grupo *MDX-SED* quando comparado aos animais do grupo *WT-SED* (*WT-SED* x *MDX-SED*, $p < 0.05$). Contudo, após 37 sessões de treinamento foi possível observar aumento do diâmetro FTIIB e FTIID (*MDX-TR*) quando comparado ao grupo sedentário (*MDX-SED* x *MDX-TR*, $p < 0.05$). Por outro lado, nos animais *wild type* o treinamento reduziu o diâmetro das FTIIB e FTIID/BD no grupo *WT-TR* quando

comparado ao grupo WT-SED (WT-SED x WT-TR, $p < 0.05$). A figura 21 mostra as diferenças estatísticas entre esses grupos.

Figura 21. Médias do diâmetro menor das fibras do músculo psoas de camundongos *wild type* e *mdx*.



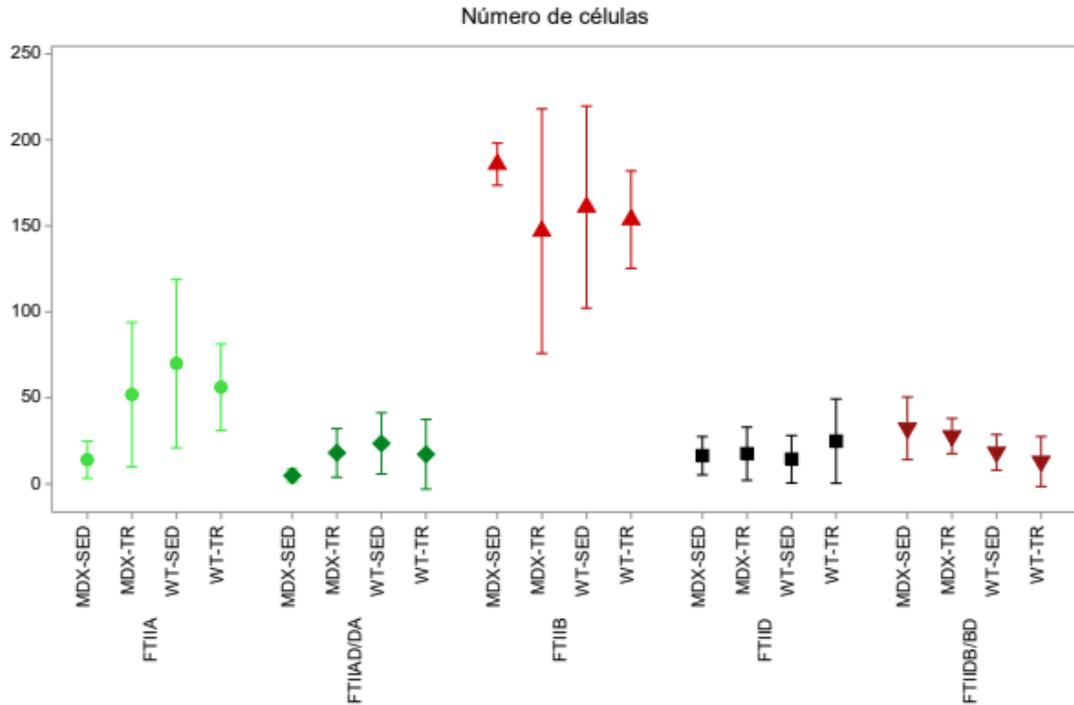
Médias do diâmetro menor das fibras musculares dos animais *wild type* e *mdx*. (*): O grupo WT-SED mostrou maior diâmetro nas FTIIA, FTIIB e FTIID quando comparado com o grupo MDX-SED. (Δ): O grupo MDX-TR mostrou maior diâmetro nas FTIIB e FTIID quando comparado com o grupo MDX-SED. (●): O grupo WT-TR mostrou diminuição do diâmetro nas FTIIB e FTIIDB/BD quando comparado ao grupo WT-SED. $p < 0.05$.

5.2.5- Distribuição dos diferentes tipos de fibras

Na análise de proporção de fibras foi encontrado uma predominância de FTIIB em todos os grupos, o que já era esperado pelo fato do psoas ser um músculo glicolítico e caracterizado pela dominância dessas fibras. Também foi verificada a presença de fibras híbridas (FTIAD/DA e FTIIDB/BD). Adicionalmente, foi possível observar um aumento da proporção de FTIIA e uma diminuição de FTIIB no grupo MDX-TR quando comparado ao grupo MDX-SED, mostrando que o exercício físico de baixa intensidade durante 37 sessões de treinamento pode ter efeito positivo nas fibras do músculo distrófico mesmo não apresentando diferença estatística (Figura 22). A figura 23 ilustra os resultados encontrados de maneira qualitativa, mostrando

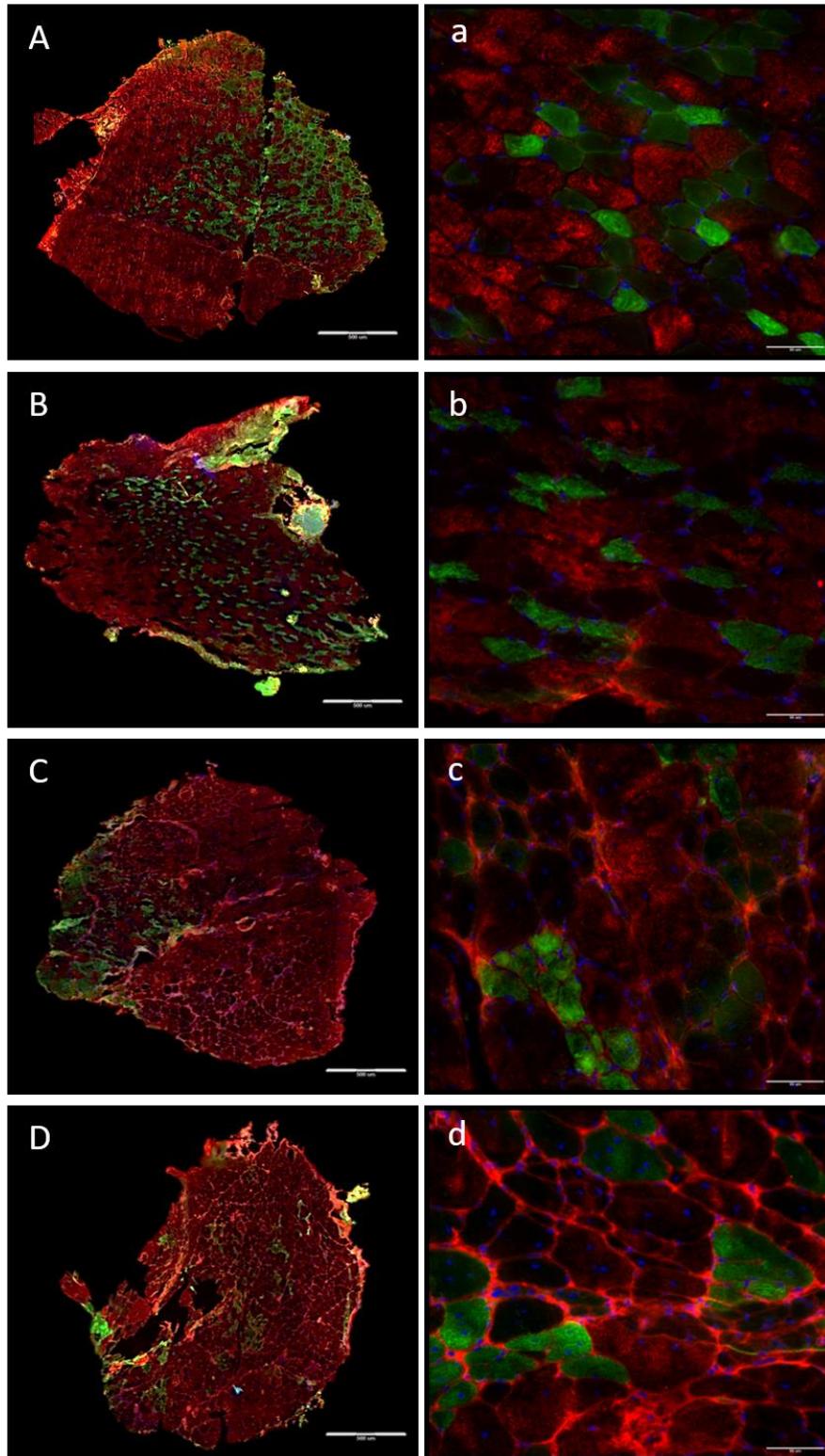
os cortes do músculo psoas representativos de cada grupo (aumentos = 4x e 40x). É possível visualizar a distribuição e a proporção dos diferentes tipos de fibras no músculo psoas.

Figura 22. Proporção dos tipos de fibras no músculo psoas de camundongos *wild type* e *mdx*.



Médias das FTIIA, FTIID/DA, FTIID, FTIIB/BD e FTIIB do músculo psoas nos diferentes grupos analisados.

Figura 23. – Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcação dos diferentes tipos de fibras.



A- Grupo *WT-SED*. **B-** Grupo *WT-TR*. **C-** Grupo *MDX-SED*. **D-** Grupo *MDX-TR*. As letras maiúsculas (A, B, C e D) mostram o músculo psoas inteiro para melhor visualização da distribuição das fibras, (Barra = 500 µm). Já as letras minúsculas (a, b, c e d) mostram as fibras em maior aumento. Verde: FTIIA. Verde com preto: FTIIAD/DA. Preto: FTIID. Preto com vermelho: FTIIB/BD. Vermelho: FTIIB, (Barra = 50 µm).

6- DISCUSSÃO

Atualmente sabemos que não há cura para a Distrofia Muscular de Duchenne. No entanto, com o avanço das pesquisas e com o atendimento multidisciplinar, a progressão da doença pode ser retardada e a expectativa de vida dos indivíduos afetados pode ser prolongada. O uso de glicocorticoides e de suportes ventilatórios estão associados ao aumento da expectativa de vida, mas ainda assim, a DMD está associada com a mortalidade precoce, geralmente antes dos 30 anos de idade por insuficiência cardíaca ou respiratória, sendo que antes a expectativa de vida era por volta de 19 anos de idade (VERHAART, *et al.*, 2019).

A terapia com glicocorticoides oferece vários benefícios, retardando a perda de força muscular e assim melhorando a força e a mobilidade dos indivíduos com DMD. Entretanto, o uso desses fármacos a longo prazo pode resultar em várias reações adversas, incluindo ganho de peso, mudanças comportamentais e na aparência, como também crescimento anormal do cabelo e osteoporose (MATTHEWS, *et al.*, 2016; BELL, *et al.*, 2017). Por essa razão, existe uma necessidade de incluir tratamentos adicionais mais eficazes para a DMD, ou que apresentam menos efeitos adversos.

O exercício físico aeróbio de baixa intensidade vem sendo uma ferramenta muito estudada pelos cientistas (PEDRAZZANI, *et al.*, 2021; ABREU, *et al.*, 2017; FRY, *et al.*, 2014; GORGON, *et al.*, 2013) como uma estratégia importante na reabilitação de músculos distróficos, quando aplicado de maneira efetiva e cautelosa. Logo, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade, aplicado por longo período de treinamento, sobre a população de células satélites, a expressão da proteína PGC-1 α , o trofismo e os diferentes tipos de fibras do músculo psoas de camundongos *mdx*. Este projeto mostrou algumas alterações negativas determinadas pela ausência da distrofina e alterações positivas após 37 sessões de treinamento, e por isso, nossos resultados mostraram ser importantes e promissores. Para justificar nossos achados, estudos científicos que corroboram ou contradizem os nossos resultados, nos amparam na discussão a seguir.

6.1- ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO MÚSCULO PSOAS

A falta da distrofina provoca uma fragilidade no sarcolema, causando ruptura da membrana muscular, alterações a níveis celulares e moleculares, determinando perda da função muscular (GROUNDS, *et al.*, 2020) assim como diversos sinais e sintomas característicos de um indivíduo com DMD (DIETZ, *et al.*, 2020; SOUZA e MELO, 2000).

Nossos achados para análise qualitativa da morfologia do músculo psoas de camundongos *mdx* mostraram alterações condizentes com as características da doença documentadas na literatura científica, tais como: centralização nuclear, infiltrado inflamatório, necrose, variação no tamanho das fibras, aumento do tecido conjuntivo, *splitting*, entre outras (NAKAMURA e TAKEDA 2011; MILAD, *et al.*, 2017 e PEDRAZZANI, *et al.*, 2021). A centralização nuclear é um indicativo de regeneração muscular, pois este processo ocorre devido à ativação das Células Satélites (CS) após trauma ou estímulos danosos. As CS, depois de ativadas, proliferarão até o local da lesão, se diferenciarão e se fundirão, reparando o dano tecidual. Nesta etapa de fusão é possível observar a centralização nuclear, já que com a maturação da fibra recém reparada, o núcleo migra para a periferia (ALMEIDA, *et al.*, 2016; CORNACHIONE, *et al.*, 2008).

Outros achados histológicos observados e que também são condizentes com o processo degenerativo evolutivo da doença foram: infiltrado inflamatório, necrose e aumento de tecido conjuntivo, processos relacionados ao aumento do influxo de cálcio ocasionado pelas rupturas na membrana muscular (BOZYCKI, *et al.*, 2018). É bem documentado na literatura científica que o processo inflamatório ocasionado em um músculo distrófico determina degeneração do tecido contrátil e que este, por sua vez, é substituído por tecido não contrátil, o tecido conjuntivo (ZELIKOVICH, *et al.*, 2019). Outra alteração marcante da DMD é a variação no tamanho das fibras musculares, e essa alteração acontece devido à atrofia muscular que ocorre com a progressão da doença e ao processo de divisão das células pela sobrecarga funcional ou aumento de volume, conhecido como *splitting* (ISAACS, *et al.*, 1973; MURACH, *et al.*, 2019). Tanto a variação no tamanho das fibras como o *splitting* foram encontrados no músculo psoas de camundongos *mdx* analisado neste estudo. Também foram encontradas outras alterações como células basofílicas, atributo da acidose citosólica, a qual pode ser identificada após coloração com

hematoxilina devido à afinidade do corante básico por estruturas ácidas (JUNQUEIRA, *et al.*, 2017). Essa acidose também é determinada pelo influxo exacerbado de cálcio do meio extracelular, consequência da ruptura da membrana celular.

Após 37 sessões de treinamento aeróbio de baixa intensidade, o músculo psoas dos animais *mdx* apresentaram alterações histológicas similares às descritas anteriormente para os animais *mdx* sedentários, porém de forma mais branda, o que caracteriza que o exercício determinou uma melhora nos aspectos gerais da citoarquitetura muscular desses animais. Esses resultados corroboram com os de PEDRAZZANI, *et al.*, (2021) que observaram melhora da citoarquitetura no músculo sóleo de animais distróficos após treinamento de baixa intensidade em esteira motorizada. Já FRINCHI, *et al.*, (2014) observaram diminuição de necrose e infiltrado inflamatório nos músculos gastrocnêmio e quadríceps de camundongos *mdx* após treinamento de baixa intensidade em esteira motorizada, e segundo GAIAD, *et al.*, (2017), o exercício físico de baixa intensidade levou a um reparo positivo do músculo tibial anterior (TA) de camundongos *mdx*. Além disso, de acordo com o estudo de PINTO, *et al.*, (2018), o treinamento de baixa intensidade em esteira motorizada provocou efeitos positivos no músculo gastrocnêmio de camundongos *mdx*, com redução da deposição de fibrose intramuscular, sem exacerbação de marcadores de lesão muscular.

6.2- ALTERAÇÕES NA POPULAÇÃO DE CÉLULAS SATÉLITES

Por definição, as células satélites (CS) estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema da miofibrila. Elas são células mononucleadas, e na maioria das vezes seus núcleos estão alinhados aos núcleos da fibra muscular adjacente (CHARGE e RUDNICKI, 2004). Um estudo mostrou que é possível encontrar as CS fora da sua clássica localização, como por exemplo no interstício, em pequenos vasos e próximo à lâmina basal, porém mais de 80% das células se encontravam intimamente associada às miofibrilas (LINDSTROM, TJUST e DOMELLOF, 2015). Em nossos achados, as CS foram identificadas, através da técnica de imunofluorescência, na sua clássica localização, apresentando imunomarcação, para Pax7 e Miogenina, concomitante ao núcleo.

Uma melhor compreensão da capacidade regenerativa do músculo de camundongos *mdx* pode fornecer informações importantes sobre a doença da distrofia muscular de Duchenne, e por isso é de suma importância investigar a atuação das CS desde a fase inicial, na participação da regeneração muscular (quiescência e ativação), até a fase final, de diferenciação e fusão, onde acontece o processo de reparo e de formação de novas miofibras (SNIJDERS, *et al.*, 2015; MOURIKIS e RELAX, 2016). Diante disso, neste estudo foram utilizados o Pax7 e a Miogenina para a marcação das CS nessas fases, respectivamente. As CS positivas para Pax7 representam células quiescentes ou ativadas precocemente, enquanto que as CS positivas para Miogenina representam mioblastos em estágio avançado de diferenciação (ZAMMIT, *et al.*, 2006).

Após nossas análises, como esperado, foi observado uma grande quantidade de CS no grupo *MDX-SED* positivas para Pax7 e Miogenina, consequência dos inúmeros danos musculares que ocorrem cronicamente, ativando as CS para reparação, corroborando com dados da literatura (MEADOWS, *et al.*, 2011; JIN, *et al.*, 2000). Do mesmo modo, WOZNIAK e ANDERSON (2007); REIMANN, IRINTCHEV e WERNIG (2000); SEALE, *et al.*, (2000); ISHIMOTO, *et al.*, 1983; KOTTLORS e KIRSCHNER, 2010 observaram altos níveis de CS ativadas em músculos distróficos de camundongos *mdx* e biópsias musculares de pacientes com DMD quando comparados aos músculos controles. Contudo, há um conceito de “exaustão” das CS, causada pelos ciclos repetitivos de degeneração e regeneração que ocorre em músculos distróficos, no qual as CS com o tempo são incapazes de acompanhar a alta demanda de regeneração, resultando em uma circunstancial perda da capacidade regenerativa (CHANG, CHEVALIER e RUDNICKI, 2016; BLAU, *et al.*, 1983; SACCO, *et al.*, 2010). Portanto, aumentar a quantidade e a funcionalidade das CS nos músculos distróficos pode contribuir com o processo de regeneração muscular, que eventualmente é prejudicada pela disfunção dessas células.

Já está bem documentado na literatura que o exercício físico do tipo aeróbio ativa as CS e melhora a função delas em músculos saudáveis, tanto em humanos como em roedores (JOANISSE, *et al.*, 2018; ABREU, *et al.*, 2017; FRY, *et al.*, 2014). Por outro lado, são escassos os estudos que correlacionam animais distróficos com a ativação e a diferenciação de CS após um longo período de treinamento aeróbio de baixa intensidade. Nossos resultados mostraram que

camundongos distróficos, após treinamento de baixa intensidade durante 37 sessões, apresentaram aumento da ativação de CS (positivas para Pax7) quando comparado ao grupo sedentário. Esse resultado corrobora com os de FRINCHI, *et al.*, (2014); MORICI, *et al.*, (2016) e SHEFER, *et al.*, (2014). Segundo MORICI, *et al.*, (2016), a corrida de baixa intensidade induziu um forte efeito benéfico no processo de degeneração-regeneração do músculo *mdx* e uma mudança em favor da regeneração, tanto nos músculos gastrocnêmio e quadríceps quanto no diafragma.

Em contrapartida, nossos resultados indicaram que não houve aumento de CS positivas para Miogenina após treinamento de baixa intensidade durante 37 sessões, algo que já era esperado. Para tentar justificar esse achado, estudos discutem que a Miogenina é expressa temporariamente durante a diferenciação, e a interpretação dos dados em relação ao número de núcleos positivos para Miogenina é limitada em um momento no tecido muscular (WHITE, *et al.*, 2000; YABLONKA-REUVENI, *et al.*, 1999 e SABOURIN, *et al.*, 1999). YABLONKA-REUVENI e ANDERSON (2006) relataram uma aceleração na diferenciação em células satélites de camundongos *mdx* quando comparadas aos músculos normais. Sendo assim, nossa hipótese é que algumas fibras já foram reparadas após o treinamento, ou seja, as CS não expressaram Miogenina por já terem passado da fase de diferenciação. Nossa hipótese é amparada pelos nossos resultados de histologia, os quais mostraram uma melhora significativa na citoarquitetura do tecido muscular e alto número de centralização nuclear nos camundongos do grupo MDX-TR quando comparado ao grupo MDX-SED. Porém, estudos mais detalhados serão necessários para testar essa hipótese em músculos esqueléticos distróficos.

6.3- ALTERAÇÕES NA IMUNOMARCAÇÃO DA PROTEÍNA PGC-1 α

Nossos resultados mostraram que a doença aumentou as características oxidativas dos músculos distróficos, pois observamos quantidades mais elevadas de PGC-1 α no grupo MDX-SED quando comparado ao grupo WT-SED, diferente do que é relatado literatura. De acordo com GORDON, *et al.*, (2013) e CHAKKALAKAL, *et al.*, (2006), o avanço da doença está associado à redução na expressão da PGC-1 α . Um estudo de CHAN, *et al.*, (2014) mostrou níveis mais baixos da PGC-1 α em camundongos *mdx* quando comparado ao grupo *wt*. Não sabemos os motivos do aumento da PGC-1 α no grupo MDX-SED, já que os músculos esqueléticos de

indivíduos com DMD têm uma capacidade reduzida de fosforilação oxidativa, e disfunção mitocondrial com diminuição da produção de energia (KUZNETSOV, *et al.*, 1998; CHEN, *et al.*, 2000). Segundo GODIN, *et al.*, (2012), no início do curso da doença, uma perda de densidade mitocondrial é o principal fator que contribui para o comprometimento da capacidade oxidativa no músculo distrófico.

Por outro lado, como esperado, o treinamento aeróbio de baixa intensidade aplicado por longo período aumentou a densitometria da proteína PGC-1 α em ambos os grupos treinados, *WT-TR* e *MDX-TR*, quando comparados aos respectivos grupos sedentários. Já está bem descrito na literatura que o exercício físico induz a expressão da PGC-1 α , principalmente em músculos exercitados cronicamente, e que a superexpressão da PGC-1 α aumenta a biogênese mitocondrial, aumentando assim a capacidade oxidativa nos músculos, controlando a perda muscular (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008; JAHNKE, *et al.*, 2012; THIRUPATHI e SOUZA, 2017). Vários estudos têm demonstrado que o aumento da expressão da PGC-1 α melhora a função muscular e reduz a patologia em camundongos *mdx* (ZELIKOVICH, *et al.*, 2019; ABREU, *et al.*, 2017; FRY, *et al.*, 2014; CHAN, *et al.*, 2014). Após treinamento de baixa intensidade, ARNOLD (2007) observou que a expressão da PGC-1 α no músculo esquelético de camundongos *mdx* reduziu os níveis de creatina quinase e de necroses, e apresentou um menor comprometimento das fibras musculares, melhorando a função muscular quando comparado ao grupo sedentário.

Não está claro como o aumento da PGC-1 α melhora a degeneração muscular e a função muscular em músculos distróficos, e por isso, alguns mecanismos vêm sendo estudados. Um deles é que a PGC-1 α induz a produção de utrofina, a qual está entre as estratégias mais promissoras para o tratamento da DMD por ser uma proteína homóloga à distrofina, podendo compensar a sua ausência (HIRST, *et al.*, 2005; RODINO-KLAPAC, *et al.*, 2013; MCGREEVY, *et al.*, 2015). O estudo de MIURA, *et al.*, (2009) demonstrou que a estimulação da expressão da PGC-1 α aumentou a regulação da utrofina nas fibras musculares de camundongos *mdx*, aliviando o dano muscular. Estudo realizado em nosso laboratório (dados ainda não publicados) mostrou o aumento do conteúdo de utrofina em animais *mdx* após treinamento aeróbio de baixa intensidade durante 37 sessões realizado em esteira, bem como uma melhora nos aspectos morfológicos do músculo (histologia), e redução da expressão da proteína creatina quinase,

efeitos que, conseqüentemente, proporcionaram uma melhora na função muscular desses animais. Sendo assim, novos estudos estão sendo realizados em nosso laboratório, com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos no aumento da utrofina associado à superexpressão da PGC-1 α em músculos de camundongos *mdx*, após longo período de treino em baixa intensidade.

Uma hipótese sugestiva, que deverá ser investigada em estudos futuros, seria um aumento da expressão da PGC-1 α como efeito protetor nos músculos distróficos. Alguns estudos que induziram a superexpressão da PGC-1 α observaram melhora significativa na função e na morfologia de músculos deficientes para a distrofina (HANDSCHIN, *et al.*, 2007; HOLLINGER, *et al.*, 2013; HOLLINGER e SELSBY, 2015; SELSBY, *et al.*, 2012).

6.3- ALTERAÇÕES NO DIÂMETRO MENOR

Os músculos distróficos apresentam grande variação no tamanho das fibras musculares, sendo esta uma característica marcante na DMD (BRIGUET, *et al.*, 2004; FARDEAU, *et al.*, 1997). As fibras glicolíticas mostram ser mais acometidas pela evolução da doença do que as fibras oxidativas. Na literatura científica são escassos, ou quase inexistentes, os estudos que analisam o músculo psoas, classificado como músculo predominantemente glicolítico. Nossos resultados mostraram que a doença determinou uma redução significativa no diâmetro das fibras puras FTIIA, FTIID e FTIIB do músculo psoas. Estudo de SACCO, *et al.*, 2010 mostrou acentuada atrofia no músculo gastrocnêmio de camundongos *mdx* com a progressão da doença. BOTZENHART, *et al.*, (2020) observaram redução do diâmetro das fibras no músculo masseter de camundongos *mdx*. SCHÄFER, *et al.*, (2005) também encontraram redução no diâmetro das fibras musculares do músculo sóleo de camundongos *mdx*.

Após longo período de treinamento de baixa intensidade, foi observado um aumento do diâmetro das fibras FTIID e FTIIB no psoas dos animais *mdx*. Esses achados podem ser importantes frente à prevenção e/ou melhora da evolução das lesões musculares encontradas em pacientes com DMD, pois essas fibras glicolíticas podem ser capazes de resistir a cargas mecânicas impostas durante a contração muscular (WEBSTER, *et al.*, 1988; GEHRIG, *et al.*, 2010). Assim como nos animais sedentários, o músculo psoas é pouco investigado em animais *mdx*

treinados. Uma hipótese que pode explicar o aumento do diâmetro das fibras é o aumento da expressão da PGC-1 α .

Já é bem documentado na literatura científica que a PGC-1 α protege as fibras de processos de atrofia, sendo esses mais evidentes nas fibras glicolíticas do que nas oxidativas por apresentarem menor conteúdo da proteína (WANG e PESSIN, 2015). A atrofia está associada à disfunção mitocondrial e à redução da expressão da PGC-1 α no músculo esquelético de camundongos *mdx*. Do mesmo modo, a superexpressão da PGC-1 α aumenta o conteúdo mitocondrial e a resistência à fadiga, reduzindo a atrofia muscular em casos de desnervação (SANDRI, *et al.*, 2006 e SPAULDING, *et al.*, 2020). No presente estudo, houve aumento da PGC-1 α após 37 sessões de exercício de baixa intensidade, caracterizado como um treino do tipo oxidativo. Apesar de não ter sido realizada a associação entre os dados de tipos de fibras e a expressão da proteína PGC-1 α , nossos achados sugerem que as fibras glicolíticas possam ter tido um aumento no conteúdo da PGC-1 α e, conseqüentemente, houve proteção ou até mesmo síntese de proteínas contráteis, caracterizando o aumento no diâmetro do grupo *mdx* treinado.

Segundo THEILEN, KUNKEL e TYAGI (2016), o exercício aeróbio desempenha efeitos de prevenção à atrofia no músculo esquelético, podendo servir como tratamento prévio a situações atroficas, como no caso da DMD, a qual apresenta intensa atrofia com o passar do tempo. Por outro lado, SCHUARTZ (2002) acredita que a atividade muscular de baixa intensidade, mesmo quando mantida por longos períodos, não resulta em uma hipertrofia significativa.

6.4- MUDANÇAS NA PROPORÇÃO DE FIBRAS

O músculo psoas de camundongo contém fibras do tipo IIA, IID e IIB (JANSEN, *et al.*, 1996; SARTORIUS, *et al.*, 1998; LAURE, *et al.*, 2009), além de uma distribuição espacialmente desigual dos tipos de fibras, com uma região do músculo contendo fibras do tipo IIA, IID e IIB e uma região composta quase exclusivamente por fibras do tipo IIB (HÄMÄLÄINEN e PETTE, 1995; SARTORIUS, *et al.*, 1998). Nossos resultados mostram essa predominância de FTIIB em todos os grupos, sendo possível também observar uma distribuição desigual das fibras conforme descrito nos estudos acima (Figura 22). Além dessas fibras puras, também foi

identificada a presença de fibras híbridas do tipo IIAD/DA e IIDB/BD, sugerindo uma combinação de cadeias pesadas da miosina (MHC) que podem sofrer transformação de um tipo de fibra para outro com maior facilidade (MINAMOTO, 2004).

De acordo com a literatura, as fibras glicolíticas são as mais afetadas pela doença e sofrem mais com o processo de degeneração quando comparadas com as fibras oxidativas que parecem ser mais resistentes (AL-REWASHDY, *et al.*; 2014; WEBSTER, *et al.*, 1988). LINDSAY, *et al.*, (2019) acreditam que a resistência das fibras mais oxidativas ocorra devido ao aumento da expressão da utrofina. SELSBY, *et al.*, (2012) observaram que o aumento da expressão de PGC-1 α está relacionado com a mudança de fibras glicolíticas para oxidativas em músculos distróficos.

Também sabemos que o exercício físico pode aumentar a capacidade oxidativa de todas as fibras musculares, promovendo uma transição de fibras mais glicolíticas para mais oxidativas (CAMPOS, *et al.*, 2002). No estudo de LANDISCH, *et al.*, (2008), após 60 dias de corrida em roda, ocorreu uma mudança de fibras do tipo IIB em direção às fibras do tipo IIA nos músculos de camundongos *mdx*. BALTGALVIS, *et al.*, (2012) observaram uma transição de fibras mais glicolíticas para mais oxidativas em flexores plantares de camundongos *mdx* após longo período de treinamento de baixa intensidade. PEDRAZZANI, *et al.*, (2021) observaram um aumento das fibras oxidativas no sóleo de camundongos *mdx* após 21 sessões de treino de baixa intensidade em esteira motorizada. Nossos resultados não mostraram diferenças estatísticas na proporção das fibras entre os grupos treinado e sedentário dos camundongos *mdx*, porém, apesar de resultados não significativos, clinicamente a redução do número de FTIIB concomitante ao aumento das FTIIA pode significar uma adaptação positiva do músculo psoas, e talvez este músculo necessite de estímulo mecânico, de baixa intensidade, por um período mais prolongado para apresentar mudança na proporção de fibras condizentes com as relatadas na literatura.

De modo geral, a transição de fibras mais glicolíticas para mais oxidativas em músculos distróficos pode levar ao retardo da degeneração muscular, já que as fibras glicolíticas são primeiramente acometidas pela doença. BALTGALVIS, *et al.*, (2012) e LANDISCH, *et al.*, (2008) acreditam que o longo período de treinamento de baixa intensidade pode determinar adaptações significativas nas mitocôndrias, aumentando assim a capacidade oxidativa das fibras e a resistência à fadiga. O

estudo de CHAN, *et al.*, 2014 mostrou que a regulação positiva do programa miogênico oxidativo melhorou a força e a função muscular em camundongos *mdx*.

6.5- ELUCIDANDO OS RESULTADOS

Após o treinamento aeróbio de baixa intensidade durante 37 sessões, os músculos psoas de camundongos *mdx* mostraram aumento do caráter oxidativo. O aumento da expressão da proteína PGC-1 α pode ter sido o fator chave da melhora das características morfológicas (histologia) e morfométricas (número de CS e diâmetro menor) do tecido muscular. A PGC-1 α modula a ativação das CS no músculo esquelético e pode contribuir para a melhora da função dessas células após exercício físico (DINULOVIC, *et al.*, 2016), com concomitantemente melhora da citoarquitetura. Segundo MANAF, *et al.*, (2006), o transplante de mioblastos associado ao exercício aeróbio em camundongos *mdx* determina expressão de até 26% da proteína distrofina, portanto, aumentar a ativação das CS pode contribuir na restauração de músculos distróficos. Apesar de não ter sido analisada neste estudo, a utrofina também pode estar contribuindo para a melhora do tecido distrófico, já que o aumento da expressão da PGC-1 α em camundongos *mdx* pode aumentar os níveis de utrofina (HANDSCHIN e SPIEGELMAN 2008; SELSBY *et al.*, 2012).

Como já mencionado no decorrer desta dissertação, são poucos e muito escassos os estudos que investigam o músculo psoas de camundongos *mdx*, principalmente quando associado ao exercício físico. Portanto, são necessários mais estudos que explorem as diversas características deletérias que esta doença pode causar no músculo psoas, assim como os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade e de longa duração nesse músculo distrófico.

7- CONCLUSÃO

Concluimos que o exercício aeróbio de baixa intensidade após 37 sessões foi capaz de reverter alterações deletérias determinadas pela distrofia muscular, melhorando a morfologia e o trofismo celular através da ativação de CS e aumento da expressão da proteína PGC-1 α no músculo psoas de camundongos *mdx*. A PGC-1 α parece contribuir para a melhora da função das CS devido ao

aumento da proteína utrofina, em vista disso essa associação deverá ser melhor investigada em estudos futuros.

8- IMPLICAÇÃO CLÍNICA

O exercício aeróbio de baixa intensidade aplicado cronicamente pode ser considerado uma modalidade terapêutica não invasiva e sem efeitos colaterais, para melhorar ou retardar a degeneração de músculos distróficos de indivíduos com DMD. Entretanto, os parâmetros para prescrição desses exercícios devem ser feitos cautelosa- e individualmente para cada paciente. É necessário a realização de estudos que avaliem os benefícios do exercício físico primeiramente em animais distróficos (*mdx*), visando minimizar os danos e maximizar os efeitos positivos do mesmo.

REFERÊNCIAS

AL-REWASHDY, H.; LJUBICIC, V.; LIN, W.; RENAUD, J.M.; JASMN, B. J. “Utrophin A is Essential in Mediating the Functional Adaptations of MDX Mouse Muscle Following Chronic AMPK Activation.” *Human Molecular Genetics*. 24(5):1243-1255. doi: doi.org/10.1093/hmg/ddu535. 2014.

ABREU, P.; MENDES, S. V. D.; CECCATTO, V. M.; HIRABARA, S. M. Satellite cell activation induced by aerobic muscle adaptation in response to endurance exercise in humans and rodents. *Life Sciences*, 170: 33-40, 2017.

ALMEIDA, C. F.; FERNANDES, S. A.; RIBEIRO JUNIOR, A. F.; OKAMOTO, O. K.; VAINZOF, M. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells International*, 2016.

ARAÚJO, T. O. P. Efeitos do treinamento aeróbio no conteúdo da proteína utrofina e nas propriedades contráteis do músculo tibial anterior de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas. 2020.

ARBANAS, J.; KLASAN, G. S.; NIKOLIC, M.; JERKOVIC, R.; MILJANORCC, I.; MALNAS, D. Fibre type composition of the human psoas major muscle with regard to the level of its origin. *J Anat*, 6: 635-41, 2009.

ARNOLD, A. S. PGC-1 α régule la jonction neuromusculaire et améliore la dystrophie musculaire de Duchenne. *Med Sci (Paris)*. 23: 1034–1036. 2007.

AUSTIN, S.; ST-PIERRE, J. PGC1 α and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of Cell Science*, 125: 4963-4971. 2012.

BANKOLE, L. C.; FEASSON, L.; PONSOT, E.; KADI, F. Fibre type-specific satellite cell content in two models of muscle disease. *Histopathology*, 63: 826–832. 2013.

BALTGALVIS, K. A.; CALL, J. A.; COCHRANE, G. D.; LAKER, R. C.; YAN, Z.; LOWE, D. A. Exercise training improves plantar flexor muscle function in *mdx* mice. *Medicine and science in sports and exercise*, 44(9), 1671–1679, 2012.

BELL, J. M.; SHIELDS, M. D.; WATTERS. J.; HAMILTON. A.; BERINGER, T.; ELLIOTT, M.; QUINLIVAN, R.; TIRUPATHI, S.; BLACKWOOD, B. Interventions to prevent and treat corticosteroid-induced osteoporosis and prevent osteoporotic fractures in Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017.

BIRESSI, S.; RANDO, T. A. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin Cell Dev Biol*, 21:845-54, 2010.

BLAIS, A.; TSIKITIS, M.; ACOSTA-ALVEAR, D.; SHARAN, R.; KLUGER, Y.; DYNLACHT, B. D. An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes & Dev*, 19: 553-569. 2005.

BLAU, H. M. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 4856-4860, 1983.

BOLDRIN, L.; ZAMMIT, P. S.; MORGAN, J. E. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Research*, 14: 20 – 29. 2015.

BOTZENHART, U. U.; GREDES, T.; GERLACH, R.; ZEIDLER-RENTZSCH, I.; GEDRANGE, T.; KEIL, C. Histological features of masticatory muscles after botulinum toxin A injection into the right masseter muscle of dystrophin deficient (*mdx*-) mice. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 229, 2020.

BOPPART, M.D.; DE LISIO, M.; ZOU, K.; HUNTSMAN, H.D. Defining a role for non-satellite stem cells in the regulation of muscle repair following exercise, *Front. Physiol.*, 4: 310, 2013.

BOUCHENTOUF, M.; BENABDALLAH, B. F.; MILLS, P.; TREMBLAY, J. P. Exercise improves the success of myoblast transplantation in *mdx* mice. *Neuromuscular Disorders*, 16: 518-529, 2006.

BOZYCKI, L.; ŁUKASIEWICZ, K.; MATRYBA, P.; et al. Whole-body clearing, staining and screening of calcium deposits in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*, 8:21, 2018.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J. P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscular Disorders*, 14: 675-682. 2004.

- BROEK, R. W. T.; GREFFE, S.; HOFF, J. W. V. D. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *Cellular Physiology*, 224: 7-16. 2010.
- CANEPARI, M.; PELLEGRINO, M. A.; D'ANTONA, G.; BOTTINELLI, R. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. *Acta Physiol*, 199: 465–476. 2010.
- CAMPOS, G. E.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K; et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European Journal of Applied Physiology* ,88: 50–60, 2002.
- CARTER, G. T.; WINEINGER, M. A.; WALSH, S. A.; HORASEK, S. J.; ABRESCH, R. T.; FOWLER JR, W. M. Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the *mdx* mouse. *Neuromuscular Disorders*. 5: 323-332, 1995.
- CHAKKALAKAL, J. V.; MICHEL, S. Z.; CHIN, E. R.; MICHEL, R. N.; JASMIN, B. J. Targeted inhibition of Ca²⁺/calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in *mdx* mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 15: 1423 – 1435, 2006.
- CHAN, M.C.; ROWE, G.C.; RAGHURAM, S.; et al. Post-natal induction of PGC-1 α protects against severe muscle dystrophy independently of utrophin. *Skeletal Muscle*, 4, 2, 2014.
- CHANG, N.C.; CHEVALIER, F. P.; RUDNICKI, M. A. Satellite Cells in Muscular Dystrophy – Lost in Polarity. *Trends in molecular medicine*, 22: 479-496, 2016.
- CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation. *Physiological Reviews*, Baltimore, 84: 209-238, 2004.
- CHEN, Y.; ZHAO, P.; BORUP, R.; HOFFMAN, E. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol*, 151: 1321– 1336, 2000.
- CHEN, J. C.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 13:1-101, 2003
- COLLINS, C. A.; GNOCCHI, V. F.; WHITE, R. B; BOLDRIN, L.; PEREZ-RUIZ, A.; RELAIX, F. Integrated Functions of Pax3 and Pax7 in the Regulation of Proliferation, Cell Size and Myogenic Differentiation. *PLOS ONE*. 4: 4475. 2009.

COLLINS, C. A.; OLSEN, I.; ZAMMIT, P. S.; HESLOP, L.; PETRIE, A.; PARTRIDGE, T.; MORGAN, J. E. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 122: 289-301, 2005.

CORNACHIONE, A.; CACAO-BENEDINI, L. O.; MARTINEZ, E. Z.; NEDER, L.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. *Acta Histochem*, 277-282, 2011.

CORNACHIONE, A.; CACAO-BENEDINI, L. O.; SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. *Scand J Med Sci Sports*, 453-461, 2008.

COWEN, L.; MANCINI, M., MARTIN, A. Variability and trends in corticosteroid use by male United States participants with Duchenne muscular dystrophy in the Duchenne Registry. *BMC Neurol*, 19, 84, 2019.

CURRAN- EVERETT, D. Explorations in statistics: the log transformation. *Adv Physiol Educ* 42: 343–347, 2018.

DAVE, H. D.; VARACALLO M. *Anatomy, Skeletal Muscle*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.

DIETZ, A. R.; CONNOLLY, A.; DORI, A.; ZAIDMAN, C. M. Intramuscular blood flow in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy: Quantitative power Doppler sonography relates to disease severity. *Clinical Neurophysiology*. 2020.

DINULOVIC, I.; FURRER, R.; BEER, M.; FERRY, A.; CARDEL, B.; HANDSCHIN, C. Muscle PGC-1 α modulates satellite cell number and proliferation by remodeling the stem cell niche. *Skeletal Muscle*, 6: 39, 2016.

EAGLE, M. Report on the Muscular Dystrophy Campaign workshop: Exercise in neuromuscular diseases Newcastle, workshop report, 12: 975-983, 2002.

EHMSEN, J.; POON, E.; DAVIES, K. The dystrophin-associated protein complex. *Journal of Cell Science*, 115: 2801-2803, 2002.

FARDEAU, M.; TOMÉ F.M.S.; VILQUIN, J.T.; GUICHENEY, P. Congenital muscular dystrophies. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1997.

FITTS, R. H.; WIDRICK, J. J. Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 24:427-473, 1996.

FRINCHI, M.; MACALUSO, F.; LICCIARDI, A.; PERCIAVALLE, V.; COCO, M.; BELLUARDO, N.; MORICI, G.; MUDÒ, G. Recovery of damaged skeletal muscle in *mdx* mice through low-intensity endurance exercise. *Int J Sports Med*, 35:19–27, 2014.

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.

FRY, K. S.; GOODWIN, M. L.; JIN, H.; STRAESSLER, K.; ZHU, J. F. Modeling Alveolar Soft Part Sarcomagenesis in the Mouse: A Role for Lactate in the Tumor Microenvironment. *Cancer cell*, 26: 851-862, 2014.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int*, 96: 183, 2015.

GEHRIG, S. M.; KOOPMAN, R.; NAIM, T.; TJOAKARFA, C.; LYNCH, G. S. Making Fast-Twitch Dystrophic Muscles Bigger Protects Them from Contraction Injury and Attenuates the Dystrophic Pathology, *The American Journal of Pathology*, 176: 29-33, 2010.

GIBSON, M. C.; SCHULTZ, E. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec*, 37: 202-329, 1982.

GLOSS, D.; MOXLEY, R. T.; ASHWAL, S.; OSKOU, M. Summary of updated practice guidelines: treatment with Duchenne muscular dystrophy corticosteroids: report by the American Academy of Neurology guidelines development subcommittee. *Neurology*, 86: 465–472, 2016.

GODIN, R.; DAUSSIN, F.; MATECKI, S.; LI, T.; PETROF, B. J.; BURELLE, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α gene transfer restores mitochondrial biomass and improves mitochondrial calcium handling in post-necrotic *mdx* mouse skeletal muscle. *J Physiol*, 590.21: 5487–5502, 2012.

GORDON, B. S.; DIAZ, D. C. D.; KOSTEK, M. C. Resveratrol decreases inflammation and increases utrophin gene expression in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Clinical Nutrition*, 32:104-111, 2013.

GORDON, B. S.; LOWE, D. A.; KOSTEK, M. V. Exercise increases utrophin protein expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle e Nerve*. 2013.

GRANGE, R. W.; CALL, J. A. Recommendations to Define Exercise Prescription for Duchenne Muscular Dystrophy. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 35: 12-17, 2007.

GROUNDS, M. D.; TERRIL, J. R.; AL-MSHHDANI, B. A.; DUONG, M. N.; RADLEY-CRABB, H. G.; ARTHUR, P. G. Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Dis Model Mech*, 13 (2), 2020.

HALL, J. E.; KACZOR, J. J.; HETTINGA, B. P.; ISFORT, R. J.; TARNOPOLSKY, M. A. Effects of a CRF2R agonist and exercise on mdx and wildtype skeletal muscle. *Muscle & Nerve*. 2007.

HANDSCHIN, C.; KOBAYASHI, Y. M.; CHIN, S; SEALE, P.; CAMPBELL, K. P.; SPIEGELMAN, B. M. PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes & Development*, 21:770–783, 2007.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*, 454: 463–469, 2008.

HIRST, R. C.; MCCULLAGH, K. J.; DAVIES, K. E. Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*, 24: 209–216, 2005.

HOLLINGER, K.; GARDAN-SALMON, D.; SANTANA, C.; RICE, D.; SNELLA, E.; SELSBY, J. T. Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 alpha involves restored expression of dystrophin-associated protein complex components and satellite cell signaling. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2013.

HOLLINGER, K.; SELSBY, J. T. PGC-1alpha gene transfer improves muscle function in dystrophic muscle following prolonged disease progress. *Experimental Physiology*, 100: 1145–1158, 2015.

INFANTE, J. P.; HUSZAGH, V. A. Mechanisms of resistance to pathogenesis in muscular dystrophies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 195:155–167, 1999.

ISAACS, E. R.; BRADLEY, W. G.; HENDERSON, G. Longitudinal fibre splitting in muscular dystrophy: a serial cinematographic study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 36: 813–819, 1973.

ISHIMOTO, S.; GOTO, I.; OHTA, M.; KUROIWA, Y. A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders. *J Neurol Sci*, 62:303–314, 1983.

JANSEN, G.; GROENEN, P.; BÄCHNER, D.; et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316–324, 1996.

JAHNKE, V.E.; VAN DER MEULEN, J.H.; JOHNSTON, H.K.; et al. Metabolic remodeling agents show beneficial effects in the dystrophin- deficient *mdx* mouse model. *Skeletal Muscle* 2, 16, 2012.

JIN, Y.; MURAKAMI, N.; SAITO, Y.; GOTO, Y.; KOISHI, K.; NONAKA, I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. *Acta Neuropathol*, 99 :619–627, 2000.

JOANISSE, S.; SNIJDERS, T.; NEDERVEEN, J. P.; PARISE, G. The Impact of Aerobic Exercise on the Muscle Stem Cell Response, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 46:180-187, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. “Histologia Básica”. 13ªEd. Guanabara Koogan.2017.

KOHLER, M.; CLARENBACH, C. F.; BAHLER, C. Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 80:320-325, 2009.

KOTTLORS, M.; KIRSCHNER, J. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell and Tissue Research*, 340: 541–548, 2010.

KOSTEK, M. C.; GORDON, B. Exercise Is an Adjuvant to Contemporary Dystrophy Treatments. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 46: 34–41. 2018.

KUZNETSOV, A. V.; WINKLER, K.; WIEDEMANN, F. R.; BOSSANYI, V. P.; DIETZMANN, K.; KUNZ, W. S. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient *mdx* mouse. *Mol Cell Biochem*, 183: 87–96, 1998.

LANDISCH, R. M.; KOSIR A. M.; NELSON, S. A.; BALTGALVIS, K. A.; LOWE, D. A. Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by *mdx* mice. *Muscle & nerve*, 2008.

LAURE, L.; SUEL, L.; ROUDAUT, C.; BOURG, N.; OUALI, A.; BARTOLI, M.; RICHARD, I.; DANIELE, N. Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodeling. *The febs journal*, 276: 669-684, 2009.

LIN, J.; WU, H.; TARR, P. T.; ZHANG, C. Y.; WU, Z.; BOSS, O.; MICHAEL, L. F.; PUIGSERVER, P.; ISOTANI, E.; OLSON, E. N. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418:797–801. 2002.

LINDSAY, A.; SOUTHERN, W. M.; MCCOURT, P.M.; LARSON, A.A.; HODGES, J.S.; A. LOWE, D.A.; ERVASTI, J. M. Variable cytoplasmic actin expression impacts the sensitivity of different dystrophin-deficient *mdx* skeletal muscles to eccentric contraction. *The febs journal*, 2019.

LINDSTROM, M.; TJUST, A. E.; DOMELLOF, F. P. Pax7-Positive Cells/Satellite Cells in Human Extraocular Muscles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56: 6132-6143, 2015.

LYNCH, G.; HINKLE, R. T.; CHAMBERLAIN, J. S.; BROOKS, S. V.; FAULKNER, J. A. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from *mdx* mice 6-28 months old. *J Physiol*, 591–600, 2001.

MAH, J. K. Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12:1795-807, 2016.

MANNING, J.; O'MALLEY, D. J. What has the *mdx* mouse model of duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease?. *Muscle Res Cell Motil*, 36: 155, 2015.

MANAF, B; BASMA, F; PHILIPPE, M; JACQUES, P. Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice. *Neuromuscular Disorders*. p. 518– 529. 2006.

MATHUR, S.; LOTT, D. J.; SENESAC, C.; GERMAIN, S. A.; VOHRA, R. S.; SWEENEY, H. L.; WALTER, G. A.; VANDENBORNE, 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: 1051-1058, 2010.

MATTHEWS, E.; BRASSINGTON, R.; KUNTZER, T.; JICHI, F.; MANZUR, A. Y. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016.

MAUNDER-SEWRYV, C. A.; DUBOWITZ. Needle muscle biopsy for carrier detection in Duchenne muscular dystrophy: Part. 1. Light microscopy — Histology, histochemistry and quantitation. *Journal of the Neurological Sciences*. 49: 305-324, 1981.

MAURO, A. Satellite Cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Cytol.*, 9: 493-495, 1961.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCFI, V. L. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

MCGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; MCINTOSH, M. A.; DUAN, D. *Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy: From Basic Mechanisms to Gene Therapy*. *Disease Models & Mechanisms*, 2015.

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.

MILAD, N.; WHITE, Z.; TEHRANI, A. Y. Increased plasma lipid levels exacerbate muscle pathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*, 2017.

MINAMOTO, VB. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. *Fisioterapia e Pesquisa*, 12: 50-5, 2004.

MORENA, C. P.; MARTINEZ-VIZCAINO, V.; ALVAREZ-BUENO, C.; RODRIGUEZ, R. F.; LÓPEZ, E. J.; TORRES-COSTOSO, A. I.; CAVERO-REDONDO, I. Effectiveness of pharmacological treatments in Duchenne muscular dystrophy: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 2019.

MORICI, G.; FRINCHI, M.; PITRUZZELLA, A.; LIBERTO, V. D.; BARONE, R.; PACE, A.; FELICE, V. D.; BELLUARDO, N.; CAPPELLO, F.; MUDÒ, G.; BONSIGNORE, M. R. Mild Aerobic Exercise Training Hardly Affects the Diaphragm of *mdx* Mice. *Journal of cellular physiology*, 2016.

MOURIKIS, P.; RELAIX, F. Activated Muscle Cells Chase Ghosts. *Cell Stem Cell*, 18: 160-162, 2016.

MURACH, K. A.; DUNGAN, C. M.; PETERSON, C. A.; MCCARTHY, J. J. Muscle Fiber Splitting Is a Physiological Response to Extreme Loading in Animals. *Exercise and sport sciences reviews*, 47:108–115, 2019.

NAKAMURA, A.; TAKEDA, S. Mammalian Models of Duchenne Muscular Dystrophy: Pathological Characteristics and Therapeutic Applications. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

NOZOE, K. T.; AKAMINE, R. T.; MAZZOTTI, D. R.; POLESEL, D. N.; GROSSKLAUSS, L. F.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L.; MOREIRA, G. A. Phenotypic contrasts of Duchenne Muscular Dystrophy in women: Two case reports. *Sleep Science*, 9: 129-133, 2016.

OZYCKI, L.; LUKASIEWICZ, K.; MATRYBA, P.; PIKULA, S. Whole-Body Clearing, Staining and Screening of Calcium Deposits in the MDX Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Skeletal Muscle*, 2018.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Further aspects of muscular dystrophy in *mdx* mice. *Neuromuscular Disorders*, 3: 471-475, 1993.

PARTRIDGE, T. A. The *mdx* mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. *FEBS Journal*, 280: 4177–4186, 2013.

PEDRAZZANI, P. 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. Universidade federal de São Carlos, Departamento de fisioterapia, 2019.

PEDRAZZANI, P. S.; ARAÚJO, T. O. P.; SIGOLI, E.; SILVA, I. R.; ROZA, D. L.; CHESCA, D. L.; RASSIER, D. E.; CORNACHIONE, A. S. Twenty-one days of low-intensity eccentric training improve morphological characteristics and function of soleus muscles of *mdx* mice. *Scientific Reports*, 11:3579, 2021.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoform, muscle fiber type s and transition. *Microscopy research and technique*, New York, 50: 500-509, 2000.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem cell boil*, 115:359-372, 2001.

PINTO, P. I. S.; MATSUMURA, H.; THORNE, M. A. S.; POWER, D. M.; TERAUCHI, R.; REINHARDT, R.; CANÁRIO, A. V. M. Gill transcriptome response to changes in environmental calcium in the green spotted puffer fish. *BMC Genomics*, 11: 476, 2010.

PINTO, P. A. V.; et al. Low Intensity Training Provokes Adaptations on Muscle Fibrosis of a Muscular Dystrophy Model. *Int. J. Morphol.*, Temuco, 36: 471-477, 2018

POWERS, K.; NISHIKAWA, K.; JOUMAA, V.; HERZOG, W. Decreased force enhancement in skeletal muscle sarcomeres with a deletion in titin. Published by The Company of Biologists Ltd. *Journal of Experimental Biology*, 219: 1311-1316, 2016.

QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; REMMEN, H. V. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 98, 56-67, 2016.

RANGEL, V.; MARTIN, A. S.; PEAY, H. L. Duchenne Connect registry report. *PLOS Curr*, 2012.

RENAULT, V.; PIRON-HAMELIN, G.; FORESTIER, C.; DIDONNA, S.; DECARY, S.; HENTATI, F. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol*, 35:711-9, 2000.

REIMANN, J.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice. *Neuromuscular Disorder*, 10: 276-282, 2000.

RELAIX, F.; ROCANCOURT, D.; MANSOURI, A. Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 435:948–953, 2005.

RODINO-KLAPAC, L. R.; MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Update on the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13: 332, 2013.

SABOURIN, L. A.; GIRGIS-GABARDO, A.; SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M. A. Reduced Differentiation Potential of Primary MyoD^{-/-} Myogenic Cells Derived from Adult Skeletal Muscle. *J Cell Biol*, 144 (4): 631–643, 1999.

SACCO, A. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, 143: 1059-1071, 2010.

SANDRI, M.; LIN, J.; HANDSCHIN, C.; YANG, W.; ARANY, Z. P.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; SPIEGELMAN, B. M. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44): 16260–16265, 2006.

SARTORIUS, C. A., LU, B. D.; ACAKPO-SATCHIVI, L.; JACOBSEN, E. P.; BYRNES, W. C.; LEINWAND, L. A. Myosin Heavy Chains IIa and IIb Are Functionally Distinct in the Mouse. *J Cell Biol*, 141 (4): 943–953, 1998.

SCHMALBRUCH, H.; HELLHAMMER, U. The number of satellite cells in normal human muscle. *Anat Rec*, 185: 279-87, 1976..

SCHÄFER, R.; ZWEYER, M.; KNAUF, U.; MUNDEGAR, R. R.; WERNIG, A. The ontogeny of soleus muscles in mdx and wild type mice. *Neuromuscular Disorders*, 15: 57-64, 2005.

SCHNYDER, S.; HANDSCHIN, C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone*, 80: 115-125, 2015.

SCHULTZ, E.; MCCORMICK, K. M. Role of satellite cells in altering myosin expression during avian skeletal muscle hypertrophy. *Dev. Dyn.* 199:52-63, 1994.

SCHUARTZ, F. C. HIPERTROFIA E HIPERPLASIA MUSCULAR EM RESPOSTA AO TREINAMENTO DE FORÇA MÁXIMA. Departamento de Educação, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná. 2002.

SEALE, P.; SABOURIN, L. A.; GIRGIS-GABARDO, A.; MANSOURI, A.; GRUSS, P.; RUDICKI, M. A. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell*, 102: 777-786, 2000.

SELSBY, J. T.; MORINE, K. J.; PENDRAK, K.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L. Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves a fast to slow fiber type shift in the *mdx* mouse. *PLOS One*, 2012.

SHEFER, G., RAUNER, G.; YABLONKA-REUVENI, Z.; BENAYAHU, D. Reduced Satellite Cell Numbers and Myogenic Capacity in Aging Can Be Alleviated by Endurance Exercise, 2010.

SHIAFFINO, S.; PEREIRA, M. G.; CICILIOT, S.; ROVERE-QUERINI, P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. *The FEBS Journal*, 284: 517–524, 2017.

SNIJDERS, T.; NEDERVEEN, J. P.; MCKAY, B. R.; et al. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front. Physiol.*, 2015.

SKUK, D. Cell Transplantation and “Stem Cell Therapy” in the Treatment of Myopathies: Many Promises in Mice, Few Realities in Humans. *ISRN Transplantation*. 2013.

SMYTHE, G. M.; WHITE, J. D. Voluntary wheel running in dystrophin-deficient (*mdx*) mice: Relationships between exercise parameters and exacerbation of the dystrophic phenotype. *PLoS CurR*, 2012.

SOUKUP, T.; SMERDU, V. Effect of altered innervation and thyroid hormones on myosin heavy chain expression and fiber type transitions: a mini-review. *Histochem Cell Biol*, 143-123, 2015.

SOUZA, S.; MELO, E. Distrofias musculares. In: Werneck L. Tratamento das doenças neuromusculares. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 534-536, 2000.

SPAULDING, H. R.; LUDWIG, A. K.; HUDSON, M. B.; SELSBY, J. T. PGC-1 α overexpression increases transcription factor EB nuclear localization and lysosome abundance in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Physiol Rep*, 2020.

STRAUB, V.; CAMPBELL, K. P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*, 10:168-75, 1997.

SUNTAR, I.; SUREDA, A.; BELWAL, T.; SILVA, A. S. Natural products, PGC-1 α , and Duchenne muscular dystrophy, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10:734-745, 2020.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *WIREs Dev Biol*, 5: 518–534, 2016.

TIDBALL, J. G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17: 165–178, 2017.

THIRUPATHI, A.; SOUZA, C. T. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 α , and AMPK-SIRT1 during exercise. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 73: 487–494, 2017.

THEILEN, N. T.; KUNKEL, G. H.; TYAGI, S. C. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. 2016.

TORRE-VILLALVAZO, I.; ALEMÁN-ESCONDRIILLAS, G.; VALLE-RÍOS, R.; NORIEGA, L. G. Protein intake and amino acid supplementation regulate exercise recovery and performance through the modulation of mTOR, AMPK, FGF21, and immunity, *Nutrition Research*, 72: 1-17, 2019.

TURNER, P. R.; FONG, P. Y.; DENETCLAW, W. F.; STEINHARDT, R. A. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *Journal of cell biology*, 115 :1701–1712, 1991.

VERHAART, I. E. C.; AARTSMA-RUS, A. Therapeutic development for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Neurol*, 15: 373–386, 2019.

WANG, Y.; PESSINA, J. E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(3): 243–250, 2013.

WALDROP, M. A.; FLANIGAN, K. M. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disease*, 32: 722-727, 2019.

WEBSTER, C.; SILBERSTEIN, L.; HAYS, P.; BLAU, M. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 1988.

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. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(11):1531-1543, 2000.

WOZNIAK, A. C.; ANDERSON, J. E. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 236:240–250, 2007.

YABLONKA-REUVENI, Z.; ANDERSON, J.E. Satellite cells from dystrophic (Mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 235:203–212, 2006.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RUDNICKI, M. A.; RIVERA, A. J.; PRIMIG, M.; ANDERSON, J. E.; NATANSON, P. The Transition from Proliferation to Differentiation Is Delayed in Satellite Cells from Mice Lacking MyoD, *Developmental Biology*, 2: 440-455, 1999.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 51: 759 – 764, 2015.

YIN, H.; FEODOR, P.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*, 93: 23-67, 2013.

YUCEL, N.; CHANG, A. C.; DAY, J. W. Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. *Regen Med*, 2018.

ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T.A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold *J Histochem Cytochem*, 54:1177- 1191, 2006.

ZAMMIT, P. S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 72: 19-32, 2017.

ZELIKOVICH, A. S.; QUATTROCELLI, M.; SALAMONE, I. M.; KUNTZ, N. L.; MCNALLY, E. M. Moderate Exercise Improves Function and Increases Adiponectin in the mdx Mouse Model of Muscular Dystrophy. *9: 5770*, 2019.

ANEXOS

Anexo I – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do treinamento aeróbio no conteúdo da proteína utrofina e nas propriedades contráteis do músculo tibial anterior de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne", protocolada sob o CEUA nº 4740230518, sob a responsabilidade de **Anabelle Silva Cornachione** e equipe; Tatiana Oliveira Passos de Araújo - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 27/06/2018.

We certify that the proposal "Effects of aerobic training in the content of the utrophin protein and contractile properties of the anterior tibial muscle of *mdx* mice: experimental model of Duchenne Muscular Dystrophy", utilizing 48 Transgenics mice (48 males), protocol number CEUA 4740230518, under the responsibility of **Anabelle Silva Cornachione** and team; Tatiana Oliveira Passos de Araújo - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 06/27/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 07/2018 a 07/2020

Área: **Centro de Ciências Biológicas E da Saúde**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos transgênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 6 semanas**

N: **48**

Linhagem: **C57BL10**

Peso: **15 a 20 g**

Resumo: A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum e mais severa distrofia muscular que acomete em torno de 3.500 meninos nascidos vivos. Causada pela mutação da região Xp21 no cromossomo X, esta doença é caracterizada pela ausência da proteína distrofina que determina perda progressiva das fibras musculares (degeneração) e consequentemente, fraqueza muscular. A utrofina é uma proteína expressa no sarcolema, durante a fase de desenvolvimento, que é substituída, por sua homóloga distrofina e, mantém-se na junção neuromuscular do músculo esquelético durante a vida adulta. Estudos tem mostrado que a terapia com genes da utrofina pode ser um tratamento promissor para pacientes portadores de DMD pois, esta atua similarmente a distrofina na reparação do músculo lesado, minimizando lesões e retardando a evolução da doença. Alguns pesquisadores observaram um aumento na expressão da utrofina no músculo esquelético de camundongos *mdx*. Esses autores também acreditam que este aumento pode minimizar a degeneração muscular, como resposta protetora do tecido muscular. Outros estudos mostraram, que o aumento da utrofina pode ser exacerbado quando o músculo esquelético de camundongos *mdx* é submetido a treinamento aeróbio. Serão utilizados 48 camundongos machos (n= 24 Wild Type: C57BL-10) e *mdx* (n=24 Background:C57BL-10) divididos em grupos controles e experimentais como descrito a seguir no delineamento experimental.

Local do experimento: Sala Experimental Laboratório de Fisiologia do Exercício no Depto de Ciências Fisiológicas

São Carlos, 27 de junho de 2018

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Anexo II– Carta Comprovante da versão Final da Dissertação



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

São Carlos, 10 de Junho de 2021.

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) Emily Sigoli, do Programa 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 de longa duração no músculo psoas de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne.", 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(a)

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
ppgc@ufscar.br / ppgcf@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 - posgrada.foar@unesp.br

UNESP-FCFar
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rodovia Araraquara-Juá, Km 1, Caixa Postal 502
CEP: 14806-903- Araraquara/SP
Tel 16 3301-6900/6901 - pg.fc@unesp.br