

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

PAULO SILVA PEDRAZZANI

Efeitos do exercício excêntrico na reabilitação do músculo esquelético de camundongos *mdx* após 3 e 21 dias de treinamento. Avaliações morfológica, funcional e molecular

São Carlos - SP

2019

PAULO SILVA PEDRAZZANI

Efeitos do exercício excêntrico na reabilitação do músculo esquelético de camundongos *mdx* após 3 e 21 dias de treinamento. Avaliações morfológica, funcional e molecular

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como requisito de para obtenção do título de **mestre em fisioterapia**, no Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – PPGFT

Área de Concentração: Fisioterapia e Desempenho Funcional

Orientadora: Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

São Carlos - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Paulo Silva Pedrazzani, realizada em 16/05/2019:

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione
UFSCar

Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
UFSCar

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

DEDICATÓRIA

A vida nos ensina a lutar e a superar obstáculos diariamente, eu não seria capaz de estar onde estou hoje se não fosse pela persistência, educação, carinho e muitas outras qualidades que caracterizam as pessoas mais importantes que fazem parte da minha história. Sou grato a todos os momentos que por vezes me fizeram pensar, rir, chorar e me sentir vivo. Obrigado João Carlos e Elisete (pai e mãe)!

Tenho ORGULHO de ser filho de vocês,

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos ao **pai eterno**, que por muitas vezes tem me guiado nesta vida, me dando forças para seguir em frente e superar os empecilhos da vida. Obrigado Senhor, por me dar saúde e condições para que eu possa seguir firme e forte atrás dos meus sonhos.

Não posso deixar de lado minha família, que aqui se faz presente em alma e pensamento, pois tudo que sou hoje é fruto do aprendizado e da vivência que tive/tenho com todos. Em exclusividade para **meus pais**, que cada dia mais quero ser como eles. Obrigado a todos.

Mas a pessoa principal e peça chave de tudo isso que está acontecendo é a minha orientadora, agora, professora do DCF, **Dra. Anabelle Silva Cornachione**. Só tenho a te agradecer e te pedir desculpas. Agradeço pelo incentivo e apoio nas horas mais difíceis, agradeço por todo ensinamento que me foi passado, tanto de vida quanto acadêmico. Agradeço por todas as críticas que me fez, só me fizeram crescer e aprender a não errar novamente. Peço desculpas pelos erros e falhas que cometi durante este processo, espero ter conseguido arrumá-los. Deixo aqui meu último e mais sincero OBRIGADO! Esse com certeza será um capítulo marcado em minha história.

Sem sombra de dúvidas, à **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), também teve grande importância no desenvolvimento deste projeto, auxiliando financeiramente o mesmo sob o **processo FAPESP: 2017/00267-8**.

Agradeço também:

A todos os meus familiares que sempre se mostraram preocupados e curiosos por todo o período de elaboração, execução e finalização deste projeto.

A minha namorada **Rachel Casale**, que tanto me apoiou nesta fase final deste projeto e vem me apoiando diariamente na vida.

Aos colegas de laboratório que auxiliaram em todo esse processo, **Tatiana, Emilly, Isabela e Lucas**

As técnicas dos laboratórios que me ensinaram diversos procedimentos e técnicas: **Tatiana, Deise e Tereza**

Ao **Prof. Dr. Dilson E. Rassier**, por ser um grande incentivador de todo este projeto.

Muito obrigado a todos!

Resumo

Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética degenerativa de caráter recessivo ligada a mutação da região Xp21 do cromossomo X. A DMD se caracteriza pela ausência da proteína distrofina, que determina degeneração e fraqueza muscular progressivas, ocasionando óbito do paciente por falência respiratória e/ou cardíaca. Alterações no conteúdo da cadeia pesada da miosina (MHC) são comumente observadas em músculos distróficos e, podem estar relacionadas a maior fragilidade deste tecido. Por ser uma doença progressiva e incapacitante, recursos fisioterapêuticos como o exercício físico são comumente utilizados para proporcionar maior conforto para os pacientes durante a progressão da doença. Contudo, a grande limitação é determinar o tipo e a intensidade do exercício a ser aplicado. Há algum tempo o exercício excêntrico (EE) vem sendo utilizado na reabilitação do músculo esquelético após situações de desuso, da mesma forma, estudos mostram sua efetividade na reabilitação de músculos distróficos, porém, são poucos os relatos na literatura científica sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de regeneração. Sendo assim, o objetivo deste estudo é analisar os processos moleculares envolvidos na destruição das miofibras dos animais *mdx* e, avaliar as consequências da aplicação do treinamento excêntrico de baixa intensidade, por 21 dias, na citoarquitetura e na função contrátil das miofibras. **Métodos:** Neste estudo foram utilizados camundongos machos com idade de 6 semanas, divididos em 8 grupos: *mdx* sedentários 3 dias (*mdx*SED₃) e *mdx* sedentários 21 dias (*mdx*SED₂₁); *mdx* treinados 3 e 21 dias, *mdx*TR₃ e *mdx*TR₂₁, respectivamente; *wild type* sedentários 3 e 21 dias (*wt*SED₃ e *wt*SED₂₁) e, *wild type* treinados 3 (*wt*TR₃) e 21 dias (*wt*TR₂₁). Após os períodos de treinamentos os animais foram eutanasiados e amostras sanguíneas foram obtidas para análise da enzima creatina quinase (CK). Em seguida ambos os músculos sóleos foram excisados e submetidos à análises de função, para força de contração de fibra única; morfologia, para aspectos gerais do tecidos; e morfometria, para proporção dos diferentes tipos de fibras e trofismo. **Resultados:** A análise de força de fibras únicas dos camundongos *mdx* mostraram redução significativa quando comparadas ao grupo controle. Na análise morfológica foi possível observar alterações importantes determinadas pela doença, tais como: necrose, aumento tecido conjuntivo, centralização nuclear, entre outras. Na proporção de fibras os músculos distróficos apresentaram redução do número de fibras tipo IIA (FTIIA) concomitante ao aumento de fibras do tipo I (FTI), quando comparados aos respectivos controles. Para análise do trofismo foi observado aumento de todas os tipos de fibras no grupo distrófico mais jovem (3 dias) enquanto o mais velho (21 dias) apresentou redução do mesmo nas fibras FTI e FTIIA. Após a aplicação do treinamento excêntrico de baixa intensidade foi possível observar, nos músculos distróficos, que a aplicação do exercício durante 21 dias foi mais efetiva em quase todos os aspectos analisados quando comparado ao tempo mais agudo (3 dias). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que o exercício do tipo excêntrico quando aplicado em uma intensidade baixa e por um período mais longo, pode ser uma estratégia terapêutica efetiva para melhorar as alterações funcional, morfológica e bioquímica determinada pela ausência da proteína distrofina. **Palavras chaves:** Distrofia muscular de Duchenne, Camundongos *mdx*, exercício excêntrico, fibra única, proporção dos diferentes tipos de fibras, trofismo, enzima creatina quinase.

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a degenerative genetic disease of a recessive nature linked to the mutation of the Xp21 region of the X chromosome. DMD is characterized by the absence of the protein dystrophin, which causes progressive muscle degeneration and weakness, resulting in death of the patient due to respiratory failure and or cardiac. Changes in the content of the myosin heavy chain (MHC) are commonly observed in dystrophic muscles and may be related to the greater fragility of this tissue. Because it is a progressive and disabling disease, physiotherapeutic resources such as physical exercise are commonly used to provide greater comfort for patients during disease progression. However, the major limitation is to determine the type and intensity of the exercise to be applied. For some time, eccentric exercise has been used in the rehabilitation of skeletal muscle after disuse, in the same way, studies show its effectiveness in the rehabilitation of dystrophic muscles, however, there are few reports in the scientific literature on the cellular and involved in the regeneration process. Therefore, the objective of this study is to analyze the molecular processes involved in the destruction of myofibers of *mdx* animals and to evaluate the consequences of the application of low intensity eccentric training for 21 days in the cytoarchitecture and in the contractile function of myofibers. **Methods:** Male mice aged 6 weeks, divided into 8 groups: sedentary *mdx* 3 days (*mdx*SED₃) and sedentary *mdx* 21 days (*mdx*SED₂₁) were used in this study; *mdx* trained 3 and 21 days, *mdx*TR₃ and *mdx*TR₂₁, respectively; *wild type* sedentary 3 and 21 days (*wt*SED₃ and *wt*SED₂₁) and finally, *wild type* trained 3 (*wt*TR₃) and 21 days (*wt*TR₂₁). After the training periods the animals were euthanized and blood samples were obtained for analysis of the enzyme creatine kinase (CK). Afterwards, both of the muscles were excised and subjected to functional analysis, for single fiber contraction force; morphology, for general aspects of the tissues; and morphometry, for the proportion of different types of fibers and tropism. **Results:** The single fiber strength analysis of the *mdx* mice showed a significant reduction when compared to the control group. In the morphological analysis it was possible to observe important alterations determined by the disease, such as: necrosis, increased connective tissue, nuclear centralization, among others. In the proportion of fibers, the dystrophic muscles presented a reduction in the number of types IIA fibers (FTIIA) concomitant to the increase of type I fibers (FTI), when compared to the respective controls. For trophic analysis, all types of fibers were observed in the youngest dystrophic group (3 days) while the oldest group (21 days) had a reduction in FTI and FTIIA fibers. After application of the low intensity eccentric training, it was possible to observe in the dystrophic muscles that the application of the exercise for 21 days was more effective in almost all aspects analyzed when compared to the more acute time (3 days). **Conclusion:** Our results suggest that eccentric exercise when applied at a low intensity for a longer period may be an effective therapeutic strategy to improve the functional, morphological and biochemical changes determined by the absence of the protein dystrophin.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, *mdx* mice, eccentric exercise, single fiber, proportion of different fiber types, tropism, creatine kinase enzyme.

Lista de Figuras

Figura 1 - Músculo esquelético e suas partes que o compõem. Fonte: <http://www.iespe.com.br/wp-content/uploads/2016/03/fascia.png> modificada _____ 7

Figura 2 - Complexo proteico associado a Distrofina (CPAD) Fonte: <https://lab.research.sickkids.ca/cohn/projects/> modificada _____ 11

Figura 3 A e B – Mostram o procedimento de coleta do músculo sóleo. A - Exposição do músculo sóleo. B – Músculo sóleo amarrado em um palito de madeira para posteriormente ser armazenado em solução Rigor. _____ 22

Figura 4 - Imagem de uma fibra muscular isolada e os clips feitos em papel alumínio no formato "T". _____ 23

Figura 5 - fibra muscular isolada e permeabilizada entre dois clips de papel alumínio. 23

Figura 6 - Foto de uma única célula muscular fixada no sistema Aurora 600A e seu aumento 20x ilustrando o padrão estriado da musculatura esquelética. _____ 24

Figura 7 - Sistema de banheiras. _____ 25

Figura 8 - Ilustração de como se obtém o diâmetro menor de uma célula. Fonte: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11028> modificada. _____ 28

Figura 9 - média dos níveis séricos de CK nos diferentes grupos. ◆ comparado ao mdxTR₃ (p<0,05); * comparado ao mdxSED₃(p<0,05); ▲ comparado ao mdxTR₂₁(p<0,05); † comparado ao mdxSED₂₁(p<0,05). _____ 29

Figura 10 - Foto micrografia de lâminas coradas em HE do músculo sóleo de camundongos. Barra: 50µm para todas as imagens A - wtSED₃; B - mdxSED₃; C -

wtTR₃; D - mdxTR₃; E – wtSED₂₁; F – mdxSED₂₁; G – wtTR₂₁; H – mdxTR₂₁. * Tecido conjuntivo; Centralização nuclear; Splitting; ► Necrose; > Célula Basofílica. ____ 31

Figura 11 - Foto micrografia de cortes histológicos do músculo sóleo processados pela técnica de imunofluorescência com anticorpo para distrofina. A – Wild Type: presença da proteína distrofina marcada em verde e núcleos em azul (DAPI). B – mdx: ausência da proteína distrofina com núcleos em azul (DAPI). _____ 32

Figura 12 - Porcentagem das médias de FTI, FTIIC, FTIIA e FTIIAD do músculo sóleo em diferentes grupos analisados. *p<0,05 comparado com mdxSED₃, ◆ p<0,05 comparado com mdxTR₃, ⊗ p>0,05 comparado ao mdxSED₂₁. _____ 35

Figura 13 - Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo de camundongos. A - wtSED₃; B - mdxSED₃; C - mdxTR₃; D – mdxSED₂₁. _____ 36

Figura 14 - Contrações produzidas por uma única fibra do músculo sóleo. Linha preta: wtSED₃, linha vermelha: mdxSED₃, linha azul: mdxTR₂₁. Uma única fibra mdxSED₃ produziu forças menores que wtSED₃ (média: 67,2 ± 17,24). Após 21 dias de treinamento a força total dos mdxTR₂₁ aumentou de forma significativa (média: 106,5 ± 8,82), porém continuou menor que a força gerada pela fibra wtSED₃. _____ 37

Figura 15 - Gráfico relação força/pCa. Não houve diferença entre o grupo controle (média 5.35 ± 0.08) e mdx (média 5.41; ± 0.13). _____ 38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Separação dos diferentes grupos do estudo _____ 20

*Tabela 2 - Médias do diâmetro menor medidas em μm das FTI, FTIIC, FTIIA e FTIIAD com os respectivos valores das médias do diâmetro menor e o intervalo de confiança de 95%. * $p < 0,05$ comparado ao mdxSED_3 . • $p < 0,05$ comparado ao mdxSED_{21} . † $p < 0,05$ comparado ao wtSED_3 ; ‡ $p < 0,05$ comparado ao mdxTR_3 .* _____ 33

Anexos

Anexo A – Aprovação Comitê Ética

Anexo B – Menção Honrosa

Anexo C – Certificado de participação *European Muscle Conference*

Anexo D – Cópia de submissão de artigo científico à revista *Muscle & Nerve*

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS.....	4
2.1.	GERAL	4
2.2.	ESPECÍFICOS.....	4
3.	REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1.	MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	5
3.1.1.	<i>Características Gerais</i>	<i>5</i>
3.1.2.	<i>Bases físicas e químicas da contração muscular esquelética.....</i>	<i>7</i>
3.1.3.	<i>Diferentes tipos de fibras musculares.....</i>	<i>9</i>
3.1.4.	<i>Proteína Distrofina.....</i>	<i>10</i>
3.2.	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	12
3.2.1.	<i>Modelo experimental da DMD.....</i>	<i>15</i>
3.3.	O EXERCÍCIO FÍSICO E O MÚSCULO DISTRÓFICO.....	16
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1.	ANIMAIS	19
4.2.	TREINAMENTO.....	20
4.3.	CREATINA QUINASE	20
4.4.	AMOSTRAS DO MÚSCULO SÓLEO.....	21
4.5.	TÉCNICA DE SINGLE CELL	21
4.5.1.	<i>Soluções</i>	<i>24</i>
4.5.2.	<i>Sistema para coleta de dados</i>	<i>25</i>
4.5.3.	<i>Sistemas integrados.....</i>	<i>25</i>
4.5.4.	<i>Protocolos Experimentais.....</i>	<i>26</i>
4.6.	HISTOLOGIA.....	26
4.7.	IMUNOFLUORESCÊNCIA	27
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6.	RESULTADOS	28
6.1.	CREATINA QUINASE	28
6.2.	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	30

6.2.1.	<i>Aspectos morfológicos gerais</i>	30
6.2.2.	<i>Distrofina</i>	32
6.3.	ALTERAÇÕES DO TROFISMO DAS CÉLULAS MUSCULARES	32
6.4.	DISTRIBUIÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS	34
6.5.	ALTERAÇÕES NA FORÇA MUSCULAR – TÉCNICA <i>SINGLE CELL</i>	37
7.	DISCUSSÃO	38
7.1.	CREATINA QUINASE	39
7.2.	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	41
7.3.	ALTERAÇÕES NO DIÂMETRO MENOR.....	43
7.4.	MUDANÇAS NA PROPORÇÃO DE FIBRAS.....	46
7.5.	ALTERAÇÕES DA FORÇA MUSCULAR	47
8.	CONCLUSÃO	50
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
10.	REFERÊNCIAS	51

1. Introdução

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular hereditária causada por uma mutação da região Xp21 do cromossomo X que determina ausência da proteína distrofina na fibra muscular. A distrofina é uma proteína localizada abaixo do sarcolema, que faz parte do complexo distrofina-glicoproteína, responsável por ligar filamentos de actina à matriz extracelular (MEC), proporcionando força física para as fibras musculares (GOYENVALLE et al., 2011). Devido a ausência desta proteína a DMD é caracterizada por degeneração progressiva das fibras e, conseqüentemente fraqueza muscular. Considerada a distrofia mais comum, a DMD afeta um em 5.000 recém-nascidos do sexo masculino e sua evolução é a morte prematura desses pacientes por volta de 15 anos de idade (EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015; RUITEN et al., 2016).

Dentro da literatura científica, há uma diversidade de programas de exercícios físicos que são aplicados na reabilitação do músculo esquelético, não distróficos, que mostram ser eficazes no reestabelecimento da citoarquitetura e função muscular (BENEDINI-ELIAS et al., 2014; CORNACHIONE et al., 2008, 2011a, 2011b). Frente ao músculo distrófico, estratégias clínicas, como a implantação de mioblastos, e terapêuticas, como o exercício físico, veem sendo empregadas com objetivo de minimizar e, até mesmo retardar a evolução da doença, propiciando aos portadores destas patologias, melhor qualidade de vida (GUSSONI et al., 1999; GUSSONI; BLAU; KUNKEL, 1997; KARPATI et al., 1989; MENDELL et al., 1995; SKUK et al., 2006). Estudos científicos têm mostrado que o exercício físico do tipo aeróbio pode ser uma ferramenta promissora e eficaz no tratamento de pacientes com DMD, mesmo que este procedimento não seja capaz de reverter a evolução degenerativa e letal desta doença (HAYES; WILLIAMS, 1998, 1996; HAYES; LYNCH; WILLIAMS, 1993; WINEINGER et al., 1998). Contudo, dentro da prática clínica, os profissionais da área da saúde apresentam

certo receio em utilizar o exercício físico pois, há dúvidas em qual tipo e qual intensidade aplicar.

Estudos conduzidos com camundongos *mdx*, modelo animal da DMD, mostraram que o treinamento físico pode melhorar a função muscular sem agravar as alterações determinadas pela doença. Após treinamento de corrida, em roda giratória, o músculo sóleo de camundongos *mdx* apresentou melhora na geração de força (CALL et al., 2010; FERRY et al., 2015; GUMERSON et al., 2010; HAYES; WILLIAMS, 1996; HOURDÉ et al., 2013; WINEINGER et al., 1998) enquanto o músculo extensor longo dos dedos (EDL) mostrou aumento da resistência a fadiga (HAYES; WILLIAMS, 1996; WINEINGER et al., 1998). Hayes, Lynch e Williams em 1993, observaram aumento da capacidade oxidativa e aumento do número de fibras do tipo I no músculo sóleo, de animais *mdx*, após treinamento aquático de cinco semanas. Esses autores enfatizam que o aumento do conteúdo das fibras do tipo I contribui no retardo da progressão da doença. Uma hipótese sugestiva é que fibras oxidativas são mais resistentes que fibras glicolíticas, sendo esse último tipo, o mais acometido pela DMD (HERMES et al., 2018a; MARINI et al., 1991; PEDEMONTE et al., 1999; TALBOT; MAVES, 2016; WEBSTER et al., 1988).

Já é sabido e bem documentado na literatura, básica e científica, que além dos tipos puros de fibras musculares esqueléticas, tipos I, IIA, IID/X e IIB, determinados pelas cadeias pesadas da miosina - MHC (*Myosin Heavy Chain*) tipos I, Ila, Ild/x e Ilb, respectivamente, há combinações entre elas que determinam os tipos híbridos (CORNACHIONE et al., 2011b; PETTE; STARON, 2000). Essas fibras híbridas são passíveis de transição sob efeito do exercício físico, independente se o músculo é normal ou acometido por alguma disfunção (CORNACHIONE et al., 2008, 2011a, 2014; MORICI et al., 2017). O aumento da capacidade oxidativa do músculo esquelético distrófico pode possibilitar que o indivíduo portador da DMD realize atividades de vida diária por um maior período de tempo. Contudo, o protocolo de reabilitação a ser aplicado deve ser muito bem

planejado levando em conta evitando assim, acelerar o processo degenerativo da doença.

O exercício excêntrico (EE) é um tipo de exercício que já vem sendo estudado há anos como um forte indutor de aumento de força muscular (KRAEMER; FLECK; DESCHENES, 2016) porém, com alta capacidade lesiva (EVANS et al., 1986; LIAO et al., 2010). Por outro lado, estudos mostraram resultados positivos no restabelecimento das características citoarquiteturais de músculos previamente submetidos ao desuso (CORNACHIONE et al., 2008, 2011b; CORNACHIONE; RASSIER, 2012). Assim como, para os músculos não distróficos, o EE vem sendo explorado na reabilitação de músculos com distrofia (FÉASSON et al., 2002; LOVERING; BROOKS, 2014; MARKERT et al., 2012). Brussee, Tardif e Tremblay em 1997, mostraram que no exercício excêntrico de baixa intensidade (EEBI), realizado em esteira durante 3 dias, facilitou a infiltração de mioblastos não distróficos implantados em músculos de animais *mdx*.

O músculo esquelético apresenta alta capacidade de adaptação frente a diferentes estímulos fisiológicos, como o exercício físico e, patológicos, como uma doença ou disfunção. Essa capacidade que o tecido muscular tem de se adaptar é conhecida como plasticidade. Lovering e Brooks em 2014 observaram que após longos períodos de estímulos mecânicos, tais como, contrações excêntricas máximas, o tecido muscular mostrou-se mais resistente devido a redução de focos de lesão. Contudo, como já mencionado, estudos têm mostrado que o EE pode determinar lesões importantes no tecido muscular não distrófico em períodos curtos de treinamento (LIAO et al., 2010; SONOBE et al., 2010), mas por outro lado, quando o músculo é submetido à períodos mais longos têm-se observado resultados positivos frente a adaptação a este estímulo (CORNACHIONE et al., 2008, 2011a; MCBRIDE; GORIN; CARLSEN, 1995). Esse mesmo conceito pode ser aplicado na reabilitação de músculos com distrofia já que, Brussee, Tardif e Tremblay em 1997, observaram aumento de lesões morfológicas no músculo de animais *mdx* exercitados em um curto período de treinamento (3 dias), mas por outro lado, estudos que conduziram o treinamento físico entre 10 e 16 semanas

observaram melhora significativa da força, fadiga e morfologia (CARTER; ABRESCH; FOWLER, 2002; HAYES; LYNCH; WILLIAMS, 1993; HAYES; WILLIAMS, 1996; ISNER-HOROBETI et al., 2013; WINEINGER et al., 1998).

Sendo assim, baseada em estudos científicos prévios nossa hipótese é que o exercício do tipo excêntrico quando aplicado em baixa intensidade é capaz de melhorar as características citoarquiteturais e funcionais de músculo esquelético distrófico, principalmente em longos períodos de treinamento.

2. Objetivos

2.1. Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar as alterações determinadas pela ausência da proteína distrofina e os efeitos do treinamento do tipo excêntrico de baixa intensidade sobre o músculo sóleo de camundongos *mdx*.

2.2. Específicos

Os objetivos específicos deste estudo contaram com análise do impacto da reabilitação muscular pelo EEBI em animais distróficos, e observar os aspectos funcional, morfológico e molecular, do músculo sóleo, em diferentes períodos de treinamento, 3 e 21 dias.

- Através da análise de fibra única foi possível avaliar a mecano-cinética das pontes cruzadas e com isso observar: (I) se houve aumento da força isométrica máxima nos músculos de animais *mdx* exercitados após 3 e 21 dias quando comparados aos *mdx* sedentários; (II) se houve diferença entre as forças isométricas entre músculos de animais *mdx* sedentários e *mdx* exercitados;
- Através da técnica de histologia foi observado se houve alterações na citoarquitetura das fibras de animais distróficos sedentários e treinados;
- Através da técnica de imunofluorescências foi observado: (I) se houve transição nos diferentes tipos de fibras nos animais *mdx* sedentários e

treinados quando comparados aos grupos controles; (II) se houve alteração do trofismo dos diferentes tipos de fibras nos grupos *mdx* sedentários e treinados quando comparados aos grupos controles;

- Através da técnica bioquímica para quantificação da enzima creatina quinase foi observado se houve alteração nos níveis plasmáticos de CK entre os grupos e entre os diferentes períodos de treinamento.

3. Revisão da Literatura

3.1. Músculo Esquelético

3.1.1. Características Gerais

O músculo esquelético compõem cerca de 40% do peso corporal do humano (SILVERTHORN, 2010), tendo como fator mais importante a capacidade de gerar movimento, neste caso, mais específico a locomoção. Sua origem é a partir de células mesodermais, oriundas de células-tronco somáticas, essas células mesodermais possuem capacidade de diferenciação, maturação e desenvolvimento do tecido muscular (MUSUMECI et al., 2015). Durante o desenvolvimento a célula mesodermal sofrerá ação de fatores de transcrição miogênicos, tais como: Fator de Diferenciação Miogênica (MyoD), Fator Miogênico 5 (Myf-5), MNF (Foxk1), Pax7, Miogenina, CD34, entre outros (BICAS, 2004). Esta ação culminará na diferenciação da célula muscular, dando a ela suas características morfológica e bioquímica. Uma vez ativados, estes fatores de transcrição ligam-se a regiões específicas do DNA celular, que em seguida interagem com a região promotora, estimulando a transcrição de genes sob o controle desses fatores de transcrição miogênico, esse mecanismo é importante para expressar o fenótipo da fibra muscular, pois assim, controlam a expressão das proteínas miofibrilares, entre elas a MHC, regulando a plasticidade, especificidade e diversidade do músculo esquelético (CALVO et al., 1999; HAWKE; GARRY, 2001; RAUE et al., 2006).

Os fatores de transcrição MyoD e Myf5, transformam as células mesodermis em mioblastos. As células satélites são formadas a partir desta população não diferenciada de mioblastos, as quais permanecem na periferia da célula de forma quiescente, sendo importantes para crescimento e regeneração muscular. Quando necessário essas células são ativadas, fixando-se às fibras musculares já existentes (HAWKE; GARRY, 2001). A ativação dessas células satélites é determinada por estímulos constantes, entre os quais, a regeneração e o exercício físico, diferenciando-se e participando na formação de novas miofibrilas e fibras maduras (BICAS, 2004; BOLDRIN; ZAMMIT; MORGAN, 2015; HAWKE; GARRY, 2001)

O músculo esquelético é formado por dois grandes conglomerados de células, sendo um especializado em realizar contração, composto pelas miofibrilas e outro responsável em promover sustentação ao aparato contrátil, composto pelo tecido conjuntivo, que possui dentre os seus constituintes os fibroblastos (BOFF, 2008; KJAER et al., 2003; SILVERTHORN, 2010)

Para que as células satélites desempenhem sua função, a membrana da célula muscular deve estar íntegra. A membrana também conhecida como sarcolema que nada mais é que o endomísio, tecido conjuntivo que envolve cada fibra muscular, composta por centenas a milhares de miofibrilas. As miofibrilas são compostas por proteínas contráteis, como actina e miosina que representam os filamentos finos e grossos, respectivamente. A disposição em paralelo dessas proteínas, formam bandas e linhas escuras e claras dispostas em série, que dão o caráter de estrias as fibras e origem aos sarcômeros. O sarcômero é a menor unidade contrátil do músculo delimitado por duas linhas Z, a qual constitui o ponto onde se ancoram os filamentos de actina. Na sua região central encontra-se uma linha escura, chamada de linha M, composta apenas por filamentos de miosina. Os limites laterais da unidade contrátil chamada de sarcômero são dados pelos discos Z, constituídos por alfa-actina, onde se ancoram os filamentos finos, a titina e a nebulina (AIRES, 2012; GUYTON; HALL, 2011).

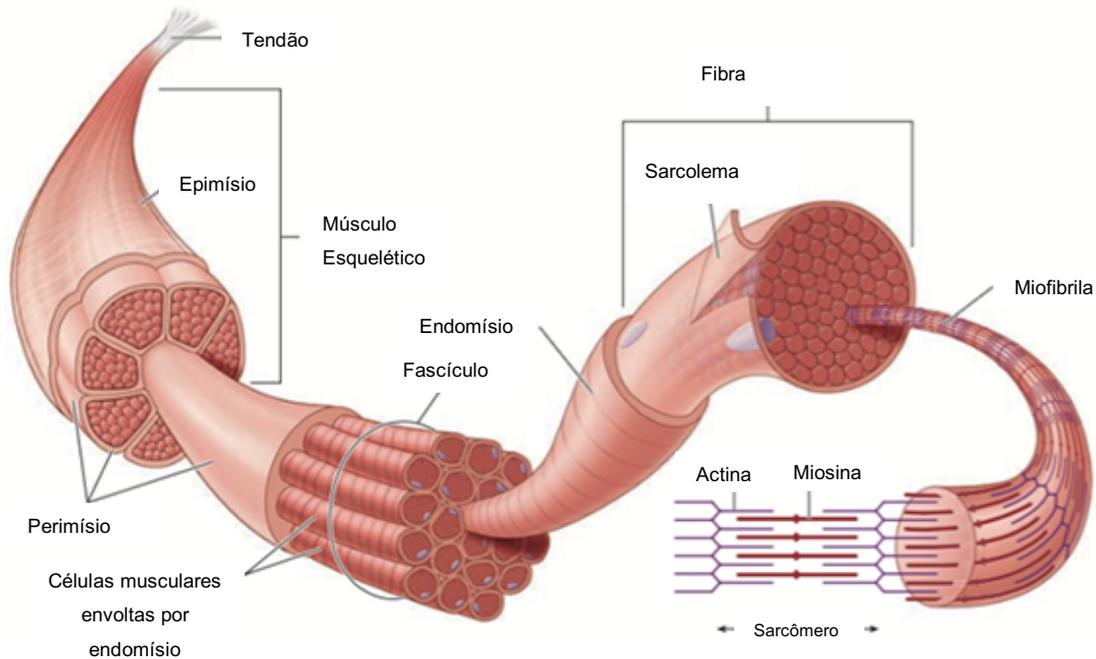


Figura 1 - Músculo esquelético e suas partes que o compõem. Fonte: <http://www.iespe.com.br/wp-content/uploads/2016/03/fascia.png> modificada

As miofibras também conhecidas como fibra muscular, são organelas tubulares dispostas em feixes longitudinais que preenchem quase totalmente o citoplasma das células musculares, em contato com as extremidades do sarcolema. Por sua vez, cada miofibrila está envolvida por um tecido conjuntivo chamado de endomísio, quando agrupadas em feixes, são envolvidas pelo perimísio, composto também por tecido conjuntivo, caracterizando assim a formação do fascículo muscular. A união de vários fascículos forma o músculo, esse por sua vez é envolvido pelo epimísio. Tendo a estrutura formada, para que haja a contração muscular, diversos nervos que por meio de axônios terminais, inervam cada fibra através das unidades motoras transmitindo assim o impulso nervoso com conseqüente contração muscular (KJAER et al., 2003).

3.1.2. Bases físicas e químicas da contração muscular esquelética

A contração muscular acontece através de várias etapas, uma subsequente a outra e, de forma dependente. As fibras musculares são inervadas por um motoneurônio alfa formando as unidades motoras. Para que ocorra a contração

muscular um potencial de ação deve ser gerado e propagado pelo moto-neurônio e atingir o terminal axonal, do mesmo, para que ocorra a liberação do neurotransmissor acetilcolina (Ach) na fenda sináptica. Na membrana pós-sináptica (fibra muscular) existem receptores nicotínicos, para a acetilcolina. Receptores ionotrópicos são canais iônicos que se abrem quando há ligação de um ligante, como Ach. Quando a Ach se liga ao receptor nicotínico, ocorre uma mudança conformacional e abertura do mesmo para passagem de íons sódio (Na^+). Com esses canais iônicos abertos ocorrerá influxo de Na^+ culminando na despolarização da membrana da fibra muscular.

A despolarização trafega ao longo da membrana da fibra muscular de mesma maneira que esta se propaga atingindo suas longas invaginações, conhecidas como túbulos T. Os túbulos T estão ligados diretamente com o retículo sarcoplasmático (RS), cisterna de Ca^{2+} , por molécula de Di-hidropiridina (DIHP). O RS mante-se fechado por uma molécula de Rianodina, a qual será aberta quando ocorrer a despolarização do túbulo T e uma mudança conformacional da DIHP. Com abertura da cisterna, íons de Ca^{2+} irão extravasar para o sarcoplasma atingindo o sarcômero, onde estão as proteínas contráteis do músculo. Os íons Ca^{2+} se ligam na proteína troponina C determinando uma mudança da sua conformação e com isso tracionando a tropomiosina, que por consequência irá liberar o sítio de ligação da actina (AIRES, 2012; GUYTON; HALL, 2011).

Com o sítio de ligação da actina livre e a hidrólise do ATP ($\text{ADP} + \text{P}_i$) a cabeça da miosina se acopla à actina, formando as pontes cruzadas e, a geração de força, ou seja, a contração muscular ocorre quando a molécula de ADP é liberada. Para o músculo relaxar após uma contração, uma molécula de ATP se liga à cabeça da miosina determinando o desacoplamento das pontes cruzadas. Além disso, ocorre o bombeamento de Ca^{2+} para dentro do RS através dos canais SERCA. O cálcio permanecerá armazenado no RS até que um novo estímulo elétrico chegue a fibra muscular (AIRES, 2012; GUYTON; HALL, 2011).

3.1.3. Diferentes tipos de fibras musculares

Os músculos esqueléticos adultos são compostos de vários tipos de fibras, sendo caracterizados por diferenças quanto ao tipo de contração e classificados em dois grandes grupos, lento ou de contração lenta (tipo I - FTI) e rápido ou de contração rápida (tipo II - FTII). Porém, existem ainda subtipos de fibras rápidas classificadas em FTIIA, FTIIB e FTIID(X) sendo a FTIIB a mais rápida, essas são as fibras puras, onde a fibra IIA é uma fibra rápida intermediária, possuindo potencial moderadamente desenvolvido para geração de força, utilizando tanto o metabolismo oxidativo como o glicolítico para a produção de energia durante a contração muscular, sendo rápida, porém com certa resistência à fadiga. A fibra IIB utiliza predominantemente o metabolismo glicolítico para a produção de energia, sendo mais rápida, porém mais fatigável que a IIA. Contudo, ainda existem as fibras híbridas (MHCIIb + MHCIIId/x; MHCIIId/x + MHCIIa ou MHCIIa + MHCII) que são caracterizadas por uma combinação de diferentes tipos de cadeia pesada da miosina.

Estímulos neuromusculares reduzidos ou aumentados além de, alterações hormonais, idade e outros fatores são capazes de alterar o fenótipo das fibras musculares, devido ao fato de serem estruturas dinâmicas (PETTE; STARON, 2000; TALMADGE, 2000). O que também difere as fibras musculares é a vascularização e, conseqüentemente o suporte sanguíneo, onde há uma relação inversa entre a quantidade de vasos sanguíneos e a velocidade de contração, ou seja, as fibras de contração rápida possuem menor número de capilares sanguíneos do que as fibras de contração mais lenta, isso se explica pelo fato de que as FTI necessitam de mais oxigênio do que as FTII (CORNACHIONE et al., 2011a).

Tendo em vista o aspecto histológico do músculo sóleo e plantar, onde os mesmos estão localizados anatomicamente próximos e com funções similares, porém, com características citoarquiteturais e bioquímicas distintas, o músculo sóleo é composto praticamente por FTI e FTIIA, sendo considerado um músculo postural. Em alguns estudos, como os de Chopard e colaboradores (2001) e

Schuenke e colaboradores (2008) mostraram que há um predomínio de FTI no músculo sóleo de camundongos adultos. Esse predomínio foi justificado pelos autores devido a constante atividade eletromiográfica do músculo sóleo durante a manutenção da postura e atividade locomotora espontânea (CARTER; ABRESCH; FOWLER, 2002; CORNACHIONE et al., 2008; TALMADGE; ROY, 1993). Já o músculo plantar por sua vez é atribuído a atividades ininterruptas da marcha e, conseqüente ativação de fibras mais glicolíticas determinando assim, o predomínio de FTIID em sua porção mais profunda (CORNACHIONE et al., 2011b; ROY et al. 1997; FULLER et al. 2006).

Sendo assim, é possível observar que existe uma ampla variedade de fibras musculares nos diferentes músculos dentro de uma mesma espécie e em espécies diferentes, onde essas fibras podem sofrer alterações da sua tipagem dependendo do estímulo em que são submetidas.

3.1.4. Proteína Distrofina

A distrofina tem 3685 aminoácidos e um peso molecular de 427 kDa, sendo um componente subsarcolemal do citoesqueleto (DURBEEJ; CAMPBELL, 2002; RODINO-KLAPAC; MENDELL; SAHENK, 2013). É composta por um domínio N-terminal, 24 unidades de repetição semelhantes à espectrina intercaladas por 4 regiões de junção, seguidas por um domínio rico em cisteína e um domínio C-terminal (YIU; KORNBERG, 2015). As proteínas contráteis (actina e miosina) estão conectadas à parte externa da célula por um complexo molecular que por sua vez conecta-se à lâmina basal. Quem gera esta ligação é a distrofina, que se encontra na parte citoplasmática da membrana muscular (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987). Ela une o citoesqueleto interno à MEC, dando assim estabilidade a célula muscular (YIU; KORNBERG, 2015).

A parte N-terminal da distrofina ligam-se a filamentos de F-actina, e a região C-terminal interage com vários elementos integrais da membrana como distroglicanos, sintrofina e distrobrevina, em conjunto formando o complexo proteico associado à distrofina (CPAD), conforme Figura 2. A função desse

complexo é providenciar uma via de sinalização entre a MEC e o citoesqueleto interno de actina (BAUMGARTNER; ARGÜELLO RUIZ, 2008; BLAKE et al., 2002a).

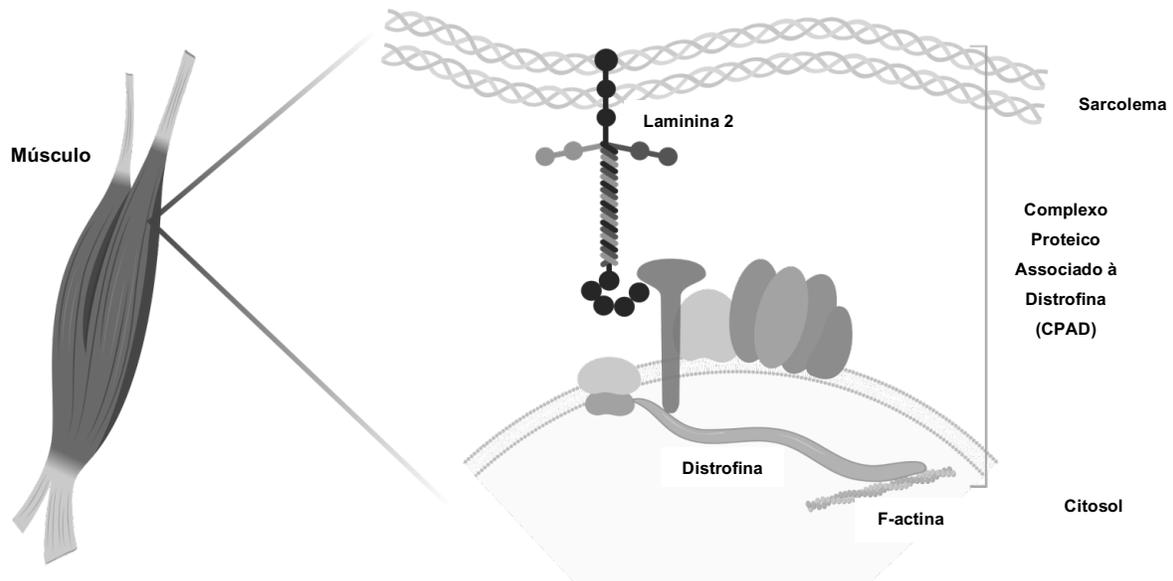


Figura 2 - Complexo proteico associado a Distrofina (CPAD) Fonte: <https://lab.research.sickkids.ca/cohn/projects/> modificada

Com a ausência da distrofina a comunicação entre a MEC e o citoesqueleto contrátil é prejudicada. Sendo assim, algumas alterações a nível estrutural e molecular são determinadas, tais como: membrana celular mais susceptível a danos mecânicos durante a contração muscular; desestruturação das proteínas de membrana, o que pode elevar os níveis de Ca^{2+} intracelular (BAUMGARTNER; ARGÜELLO RUIZ, 2008). Aumento dos níveis de cálcio no sarcoplasma da célula muscular pode determinar ativação de proteases, como calpaínas, responsáveis por vias de degradação celular (YIU; KORNBERG, 2015).

Em uma análise morfológica do músculo esquelético de camundongos distróficos é possível observar alterações histopatológicas importantes, tais como: necrose; aumento de tecido conjuntivo, em decorrência do aumento de fibroblastos; alterações significativas no trofismo celular; entre outras que

culminarão em uma ampla e significativa degeneração do tecido muscular assim como observado nos modelos experimentais da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e nos próprios pacientes acometidos (BAUMGARTNER; ARGÜELLO RUIZ, 2008; BLAKE et al., 2002a).

3.2. Distrofia Muscular de Duchenne

A primeira descrição clínica de distrofia propriamente dita, pode ser atribuída a Chales Bell em 1830, seguido por outros relatos, tais como de Conte e Gioja em 1836, de Partridge e Little em 1847, contudo a primeira descrição completa da doença foi encontrada nos relatos do Dr. Edward Meryon em 1852, onde concluiu ser uma doença de caráter hereditário que afeta primeiramente o tecido muscular, não afetando o sistema nervoso, entretanto, em 1868, um médico neurologista francês, Dr. Guillaume Benjamin Amand Duchenne, onde descreveu 12 casos mais detalhadamente (CAROMANO, 1999), definindo assim a doença como sendo a perda progressiva dos movimentos, afetando inicialmente os membros inferiores e posteriormente os superiores, com hipertrofia progressiva dos músculos afetados, aumento intersticial do tecido conjuntivo nos mesmos e aumento significativo de tecido adiposo nos músculos em estágios mais avançados.

Duchenne evidenciou também que a prevalência era maior em meninos do que em meninas, podendo afetar várias crianças da mesma família. Ele foi o primeiro a analisar biópsias de seus pacientes enquanto vivos, podendo assim comparar com diferentes períodos da doença o que permitiu encontrar que a principal lesão anatômica era a hiperplasia do tecido conectivo intersticial, surgindo assim o termo de paralisia muscular pseudo-hipertrófica. Outro pesquisador que teve grande influência sobre alguns achados nesta patologia foi William R. Gowers, que foi capaz de descrever a manobra de passagem da posição deitada para bipedestação, a qual leva seu nome: sinal de Gowers. Além disso, Gowers também concluiu que a limitação ao sexo masculino era herdada somente através da mãe.

Já é sabido que a DMD constitui um distúrbio genético, de caráter recessivo, ligado ao cromossomo X, com alta taxa de mutação em um gene localizado no braço curto deste cromossomo, mais específico na região Xp21, ocorrendo principalmente em pessoas do sexo masculino, sendo as mulheres apenas portadoras. Esta região do cromossomo é correspondente ao gene que codifica a proteína distrofina, esta proteína está ausente em quase todos os pacientes com a doença (CAROMANO, 1999). A sua presença é importante pois ela desempenha uma função estrutural no músculo ao ligar o citoesqueleto interno com a MEC. A distrofina está ligada ao CPAD (complexo de proteínas associado à distrofina), o qual, ao desestabilizar-se, levará a degeneração progressiva das fibras musculares. Devido ao seu caráter recessivo a DMD tem uma taxa de prevalência estimada de 1 em cada 5.000 meninos recém-nascidos vivos (BUSHBY et al., 2010; EMERY, 2002; RODINO-KLAPAC; MENDELL; SAHENK, 2013; YIU; KORNBERG, 2015) sendo esta, a forma mais comum de distrofia muscular em crianças, fazendo parte do grupo de doenças não inflamatórias de caráter progressivo, resultando em degeneração definitiva das fibras musculares. (GOYENVALLE et al., 2011).

Clinicamente os pacientes acometidos desenvolvem uma fraqueza muscular proximal, primeiro nos membros inferiores e, em seguida nos superiores. A progressão leva a anormalidades da marcha, por volta dos 3 a 5 anos, com quedas frequentes e dificuldade de subir e descer escadas. Posteriormente com a evolução degenerativa da doença, o indivíduo acometido necessita de cadeiras de rodas para sua locomoção, devido os músculos dos membros inferiores terem degenerado e perdido suas funções. O óbito desses pacientes é precoce devido à complicações cardiorrespiratórias na adolescência tardia ou no início da terceira década de vida, sendo que não mais do que 20 a 25 % sobrevive além dos 25 anos de idade (CAROMANO, 1999).

Na ausência da distrofina no complexo glicoproteína, há instabilidade mecânica na membrana celular dos portadores. Nesse caso, as glicoproteínas das miofibrilas não estão fixas a nenhum suporte na parte citoplasmática do

sarcolema, sendo assim, durante o ciclo de encurtamento e estiramento do sarcômero, o efeito de transdução mecânica desarranja as ligações entre as glicoproteínas, pois sem a distrofina a distribuição das forças em sentido horizontal no sarcolema é perturbada, tornando esta membrana suscetível à lesões pontuais (LOU et al., 2012).

Essa instabilidade da membrana do indivíduos portadores de DMD causa uma maior permeabilidade de íons entre o meio intra e extracelular, assim como acarreta em um aumento da sinalização inflamatória, com conseqüente aumento de infiltrado inflamatório no tecido e também aumento da secreção da enzima creatina quinase (CK), devido a essa lesão na membrana é possível observar valores elevados de CK no plasma sanguíneo (GLESBY et al., 1988; THOMASSIAN et al., 2007).

Ao contrário do que ocorre com a CK, que extravasa para o meio extracelular, alguns íons tais como o de Ca^{2+} , entram na célula de forma exacerbada, culminando assim em uma sobrecarga mitocondrial, o que acarreta em vários processos químicos que por fim aumentam ainda mais a lesão do sarcolema, desencadeando um aumento na resposta inflamatória aumentando a degeneração muscular e conseqüentemente uma substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo (MCARDLE; EDWARDS; JACKSON, 1991; SENZI et al., 2010).

Sendo assim, os elevados níveis séricos de CK funcionam como sinalizadores da ação de diversas cascatas inflamatórias que culminam em necrose sendo, portanto, um método de análise indireta do dano muscular e também amplamente utilizado como complemento no exame diagnóstico de DMD. (KLEIN et al., 2017).

Os níveis plasmáticos de CK encontram-se elevados nos indivíduos com DMD, onde os valores mais elevados são observados em meninos entre 2 e 5 anos, estando diretamente ligado aos sinais clínicos que começam a serem observados nessas crianças. Os níveis séricos de CK também são elevados nos animais distróficos assim como, nos humanos (MCGREEVY et al., 2015).

A DMD vem sendo alvo de várias investigações científicas desde a sua descoberta por Guillaume Duchenne. No entanto, até hoje ainda não existe um tratamento verdadeiramente eficaz que cure a doença, embora existam já alguns trabalhos promissores no campo da genética. Em contrapartida, inúmeros recursos terapêuticos veem sendo desenvolvidos como estratégias de suporte e tratamentos sintomáticos com o objetivo de retardar a progressão da doença e determinando melhor qualidade de vida ao portador. Contudo, muitas dessas investigações ainda, não nos permite usar o próprio portador como modelo pois, qualquer erro ou dano causado ao mesmo pode ser irreversível e acelerar a progressão da doença. Sendo assim, animais distróficos são comumente utilizados como modelos experimentais para a DMD.

3.2.1. Modelo experimental da DMD

O animal mais comumente utilizado em estudos experimentais sobre DMD é o camundongo *mdx* (*x chromosome-linked muscular dystrophy*), o qual foi descoberto em uma colônia de C57BL/10ScSn, em meados de 1980, devido ao fato de apresentarem níveis séricos mais elevados de creatina quinase e piruvatoquinase. Diferente dos humanos, a mutação nos camundongos ocorre no gene 23, o qual codifica a proteína distrofina (BULFIELD et al., 1984; MCGREEVY et al., 2015).

Esses animais apresentam sinais e sintomas similares aos seres humanos, tais como a fraqueza muscular acometendo primeiramente a musculatura de contração mais rápida, tendo o diafragma como músculo mais afetado ao longo da doença. A sua expectativa média de vida é reduzida em ~25%, onde em seres humanos a expectativa média de vida é reduzida para ~75% (MCGREEVY et al., 2015).

As características histopatológicas determinadas pela doença no músculo esquelético dos camundongos *mdx* possuem fases muito distintas. Nas duas primeiras semanas de vida a musculatura desses animais são muito semelhantes aos camundongos normais (chamados de selvagens - *wild type*). Entre 3 e 6

semanas é possível observar um início da fase de degeneração caracterizada por fibras em necrose entrando, subsequentemente a esta fase, ocorre uma estabilidade do processo degenerativo concomitante à processos regenerativos, caracterizado pelo grande número de células com centralização nuclear. Nesta fase é comum haver hipertrofia da musculatura nos *mdx*, com exceção, o diafragma que realmente demonstra uma deterioração muscular contínua e progressiva mais severa, assim como ocorre nos humanos (STEDMAN et al., 1991). Outras complicações estruturais e funcionais, como: perda muscular, escoliose e falência cardíaca, ocorrem mais tardiamente, por volta dos 15 meses de vida desses animais (HAKIM; GRANGE; DUAN, 2011).

Contudo, os brandos sinais clínicos presentes nesses camundongos *mdx*, o que se difere dos seres humanos, pode ser devido à regulação positiva de mecanismos compensatórios ou a uma propriedade específica da espécie do músculo. Apesar das diferenças evolutivas da doença encontradas entre seres humanos e esses animais, os camundongos *mdx* é o modelo mais utilizado para estudos investigatórios das alterações estruturais e funcionais determinadas pela distrofia. Além disso, quando comparado a outros modelos, como cães, sua criação e manutenção apresentam baixo custo. Outra vantagem do uso de animais para estudos clínicos ao invés de humanos é que muitas vezes a terapêutica utilizada pode determinar consequências indesejáveis, já que se trata de um músculo mais susceptível a lesão. O efeito do exercício físico vem sendo cada vez mais investigados nos músculos distróficos dos camundongos *mdx*, como uma ferramenta importante na reabilitação, porém ainda, existem dúvidas de quais os melhores parâmetros prescrever.

3.3. O exercício físico e o músculo distrófico

Já é sabido que o exercício físico pode ocasionar diversos acometimentos no músculo distrófico tais como: lesões com futura formação de tecido fibrótico, aumento do stress oxidativo e altera o consumo de oxigênio pela célula (SCHILL et al., 2016). Assim como, sabe-se também que este tipo de musculatura é mais

susceptível ao dano quando submetida ao exercício físico, como já mencionado acima.

Diversos estudos avaliam o efeito do treinamento físico sobre a musculatura de camundongos *mdx*, das mais diversas modalidades, como por exemplo a natação e a caminhada e corrida em esteira rolante elétrica, como modalidades de exercício forçado e caminhada ou corrida em roda giratória, como forma de um exercício voluntário. Contudo, algumas variáveis tais como tempo e intensidade do treino devem ser consideráveis, já que essas podem impactar em efeitos negativos e irreversíveis nesses músculos.

Em uma revisão publicada, recentemente, por Hyzewicz; Rueg e Takeda em 2015 foi comparado diversos protocolos de exercício em camundongos e em pacientes com DMD. Um dos estudos relatados na revisão demonstrou os efeitos do exercício em esteira em declive (EE) em camundongos *mdx* com 10 semanas de vida, o qual simula o teste de caminhada de 6 minutos prescrito aos pacientes com DMD (KOBAYASHI et al., 2012). Os resultados mostraram que os camundongos selvagens (controles) correm uma média de 500 metros em 6 minutos ao contrário dos distróficos que correram apenas 300 metros (KOBAYASHI et al., 2012). Alguns estudos evidenciaram que o fenótipo do membro posterior e do diafragma dos camundongos *mdx* melhorou quando o treinamento começou antes de 7 semanas de idade por outro lado, piorou quando esses animais eram submetidos ao exercício em período posterior (SCHILL et al., 2016).

Segundo Bouchentouf e colaboradores, em 2006, foi publicado que o exercício agudo leva à perda de membrana, mesmo em exercícios mais suaves como a natação, em camundongos com 4 semanas de idade, assim como também evidenciaram que a corrida voluntária em camundongos *mdx* com 10 semanas de idade, também causa eventos degenerativos no músculo tibial anterior.

De acordo com os achados desta revisão o EE (corrida em declive) em camundongos *mdx*, resultou em um aumento no dano muscular e uma diminuição

da força de preensão (BIZARIO et al., 2009), corroborando com os achados de Kobayashi e colegas (2012) e Nakamura e colaboradores (2002) que relataram evidência de fibrose, tecido adiposo e infiltração de células imunológicas concomitante a diminuição da força muscular, no músculo cardíaco de camundongos de 18 semanas de idade, após 10 semanas de corrida em declive a uma velocidade de 23m/min. Já em camundongos mais jovens (12 semanas) esses mesmos autores observaram resultados mais brandos quando o mesmo tipo de exercício (excêntrico) foi aplicado, porém, em baixa intensidade, contando com um tempo de treino de 2 semanas à uma velocidade de 15m/min.

Em humanos com DMD o exercício físico tem a finalidade de evitar a progressão da doença já que esta não tem cura. Na revisão da literatura escrita por (MCGREEVY et al., 2015) demonstra que diversos estudos recomendam que pacientes com DMD realizem exercício físico durante os estágios iniciais da doença (antes da dependência da cadeira de rodas) com base em observações em camundongos *mdx*. O exercício moderado de caminhada tem sido sugerido para crianças portadores levando sempre em consideração o limiar de exaustão (SCHILL et al., 2016). Quando esta atividade se torna mais difícil com a progressão da doença, atividades de ciclismo e natação são prescritas posteriormente (SCHILL et al., 2016). Já em pacientes dependentes de cadeira de rodas o maior foco fica para exercício que envolvem musculatura da mastigação e da respiração, com o objetivo de retardar a dependência do ventilador mecânico.

Alguns estudos com pacientes de DMD, tem mostrado que o treinamento respiratório não assistido melhorou a resistência máxima, a duração da ventilação, a pressão inspiratória nas vias aéreas, o volume expiratório forçado em 1 segundo e a capacidade vital. Já o treinamento assistido melhorou a respiração voluntária máxima, a respiração máxima atingida, a inspiração máxima da pressão esofágica e transdiafragmática, a pressão inspiratória/expiratória estática e a pressão inspiratória, bem como a ventilação voluntária máxima de 12 segundos, e a resistência muscular respiratória (ALDRICH; UHRLASS, 1987; DIMARCO et al.,

1985; RODRIGUES et al., 2014; TOPIN et al., 2002; VILOZNI et al., 1994; WANKE et al., 1994).

Apesar de já estar bem estabelecido, dentro da fisiologia e da biofísica, que geração de força é ocasionada em decorrência da contração muscular determinada pela interação dos filamentos finos e grossos, actina e miosina, respectivamente, com aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (OTTENHEIJM; GRANZIER; LBEIT, 2012), ainda não está bem claro na literatura o impacto do exercício físico sob o músculo distrófico frente a geração de força e seu impacto na estrutura. Sendo assim, propomos com este estudo utilizar uma técnica apurada capaz de mensurar a força de contração de uma única fibra muscular (CORNACHIONE; RASSIER, 2012; GARTON et al., 2010) além de, agregar outras que irão nos possibilitar entender os mecanismos celulares e moleculares da lesão do músculo esquelético determinados pela ausência da proteína distrofina e os efeitos do exercício físico.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 48 animais machos da linhagem C57BL/10^{mdx} e seu respectivo controle C57BL/10 (*wt*) adquiridos no CEMIB, divididos em 8 grupos, subdivididos em 3 dias e 21 dias, sendo eles: *mdx* treinado, *mdx* sedentário, *wild type (wt)* treinado e *wt* sedentário, cada grupo com 6 animais (Tabela 1). Os animais sedentários respeitaram a idade dos animais treinados nos respectivos dias de treinamento, 3 ou 21.

Camundongos (n=48)							
<i>wild type</i> (n=24)				<i>mdx</i> (n=24)			
Sedentários (n=12)		Treinados (n=12)		Sedentários (n=12)		Treinados (n=12)	
3 dias (n=6) <i>wtSED₃</i>	21 dias (n=6) <i>wtSED₂₁</i>	3 dias (n=6) <i>wtTR₃</i>	21 dias (n=6) <i>wtTR₂₁</i>	3 dias (n=6) <i>mdxSED₃</i>	21 dias (n=6) <i>mdxSED₂₁</i>	3 dias (n=6) <i>mdxTR₃</i>	21 dias (n=6) <i>mdxTR₂₁</i>

Tabela 1 - Separação dos diferentes grupos do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) da FMRP-USP sob número 173/2013 (anexo A).

4.2. Treinamento

Os animais dos grupos treinados foram submetidos ao EE de baixa intensidade em esteira motorizada com inclinação descendente de 16 graus (CORNACHIONE et al., 2008, 2011a; HAYWARD et al., 1999; TAKEKURA et al., 2001) à uma velocidade de 10m/mim durante 10 minutos diários (BRUSSEE; TARDIF; TREMBLAY, 1997). O protocolo de exercício foi realizado durante três dias da semana intervalados (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira) até completarem 3 dias (1 semana) ou 21 dias (7 semanas) de treinamento. Ao término do período experimental, os animais foram pesados e decapitados sob anestesia xilasina 100mg/kg + ketamina 100mg/kg, ambas, via intraperitoneal.

4.3. Creatina Quinase

A creatina quinase foi coletada no Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, imediatamente após a eutanásia. Coletou-se a amostra sanguínea em microtubo, tipo eppendorf de 1,5mL, e retirou-se 30 µL, para ser adicionado a outro eppendorf com diluição em 60 µL de anticoagulante Heparina, formando-se, portanto, uma solução com proporção de 3:1.

A diluição sanguínea dos animais foi pipetada em fitas específicas para medir creatina-quinase e analisada, seguindo o protocolo do Sistema Reflotron®, com o aguardo de 120 segundos para visualização do resultado e multiplicação deste em três vezes para obtenção do valor real, visto que o sangue foi lido nesta proporção de diluição em anticoagulante.

4.4. Amostras do músculo sóleo

Os animais, dos grupos sedentários e treinados 3 e 21 dias, foram eutanasiados por decapitação logo após o último dia de treinamento. O músculo sóleo foi excisado. Foram utilizados os músculos de ambas as patas, onde um foi congelado em nitrogênio líquido para análises morfológica e bioquímica e, o outro para análise das propriedades contráteis do tecido através da técnica de single cell.

4.5. Técnica de single cell

A preparação das fibras musculares para realização de testes mecânicos com single cell contou com a fixação do músculo sóleo em um palito de madeira (Figura 1B), para manter o comprimento fisiológico do músculo e, posteriormente passou por uma bateria de soluções Rigor e Rigor + Glicerol, para permeabilização da fibra muscular (CAMPBELL; MOSS, 2002; CORNACHIONE; RASSIER, 2012; MINOZZO; RASSIER, 2010).

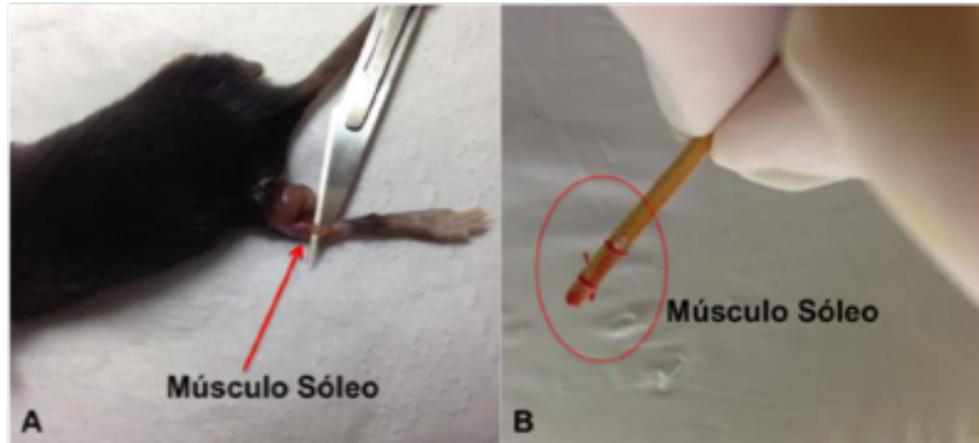


Figura 3 A e B – Mostram o procedimento de coleta do músculo sóleo. A - Exposição do músculo sóleo. B – Músculo sóleo amarrado em um palito de madeira para posteriormente ser armazenado em solução Rigor.

Os músculos foram incubados em solução rigor (pH 7.0) por 4 horas. Em seguida, transferidos para solução rigor-glicerol (50:50) permanecendo na mesma por 15 horas, em geladeira. Após o período de 15 horas, as amostras foram colocadas em nova solução rigor-glicerol (50:50) com coquetel de inibidores de protease e estocadas em freezer -20°C , para serem utilizadas, após sete dias consecutivos.

No dia do experimento a amostra foi retirada do freezer e colocada em solução rigor por 1 hora na geladeira. Um pequeno fragmento ($\sim 4\text{mm}$) foi extraído da amostra e colocado em solução de relaxamento (ver soluções) para dissecação e obtenção de uma única fibra muscular. A mesma teve suas extremidades fixadas em cliques de alumínio em forma de “T” e transferidas para uma câmara com temperatura controlada; dentro da mesma, a fibra foi fixada entre dois ganchos, um ligado a um transdutor de força (Modelo 400A, Aurora Scientific, Toronto, Canadá) e o outro a um controlador de comprimento (Modelo 312B, Aurora Scientific, Toronto, Canadá).



Figura 4 - Imagem de uma fibra muscular isolada e os clips feitos em papel alumínio no formato "T".

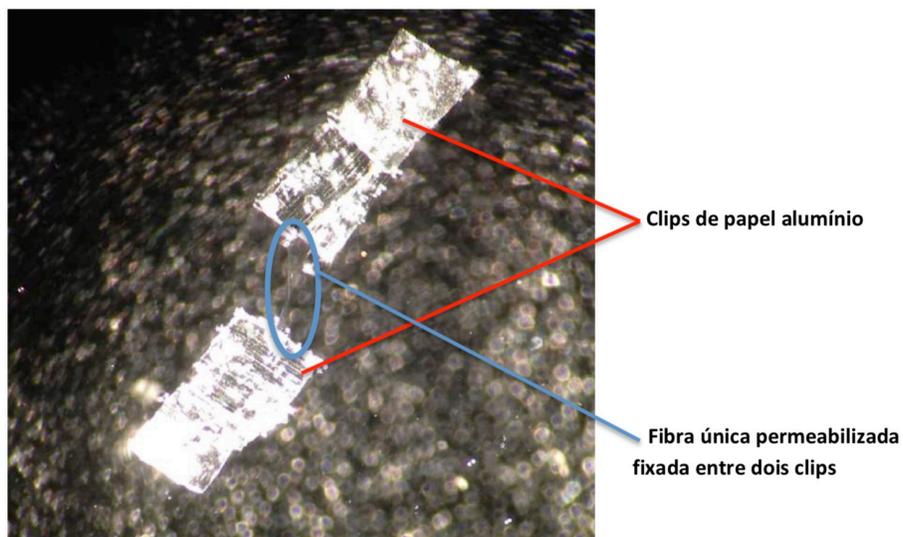


Figura 5 - fibra muscular isolada e permeabilizada entre dois clips de papel alumínio.

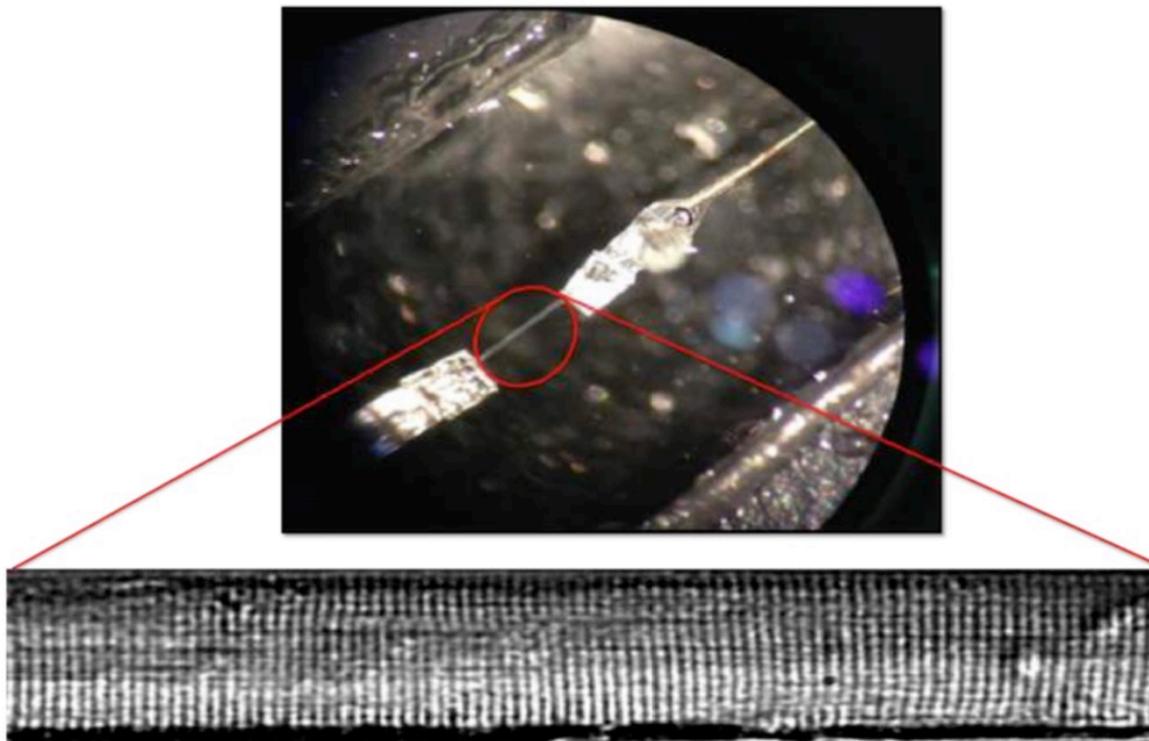


Figura 6 - Foto de uma única célula muscular fixada no sistema Aurora 600A e seu aumento 20x ilustrando o padrão estriado da musculatura esquelética.

4.5.1. Soluções

- a) **Solução Rigor (pH 7,0) (em mM):** 50 Tris, 100 NaCl, 2 KCl, 2 MgCl₂ e 10 EGTA;
- b) **Solução de Relaxamento (pH 7,0) (em mM):** 100 KCl, 2 EGTA, 20 Imidazole, 4 ATP e 7 MgCl₂;
- c) **Solução de Ativação (pH 7,0, diferentes pCa²⁺ (s) - 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0) (em mM):** 20 Imidazole, 14,5 fosfato de creatina, 7 EGTA, 4 MgATP, 1 Mg²⁺(livre) e Ca²⁺(livre) variando desde 1nM (pCa²⁺ 9,0) até 32 μM (pCa²⁺ 4,5), mais KCl (180 mM);
- d) **Solução de Pré-ativação (pH 7,0, pCa²⁺ 9,0) (em mM):** 68 KCl, 0,5 EGTA, 20 Imidazole, 14,5 fosfato de creatina, 4,83 ATP, 0.00137 CaCl₂, 5,41 MgCl₂ e 6,5 HDTA.

4.5.2. Sistema para coleta de dados

Para realização da coleta de dados do estudo proposto foi utilizado um microscópio invertido (TE 2000E – Nikon, Japão) e quatro sistemas integrados por software de controle (600A, Aurora Scientific, Canadá) (CORNACHIONE; RASSIER, 2012).

4.5.3. Sistemas integrados

- Sistema de banheiras para células permeabilizadas (802 D, Aurora Scientific, Canadá): composto por oito banheiras, com capacidade para 160 μ L, que possibilita realização de experimentos com diferentes soluções de ativação ou inibição. Possui ainda um controlador de temperatura e um microprocessador para controle do movimento. Neste sistema as células podem ser imersas e emersas das banheiras repetidamente;



Figura 7 - Sistema de banheiras.

- Controlador de comprimento celular de alta velocidade (322C, Aurora Scientific, Canadá): capaz de controlar o comprimento da célula, realizar protocolos de alongamento, encurtamento e controle de sarcômero, fornecendo feedback simultâneo;
- Transdutor de força de alta precisão (403A, Aurora Scientific, Canadá): instrumento com capacidade de medir respostas rápidas de mínimos distúrbios de tensão (escala entre 0.5 mN a 1000.0 mN), sem interferência de vibrações externas, fornecendo feedback simultâneo;
- Sistema de aquisição de imagens e cálculo de sarcômero médio de alta frequência (2.250 quadros por segundo) (901B, Aurora Scientific, Canadá): sistema capaz de capturar imagens ao vivo de células musculares (Figura 1) e calcular o sarcômero médio em tempo real.

4.5.4. Protocolos Experimentais

Foram realizados protocolos experimentais para:

- a) Medidas de força ativa, isométrica no comprimento de sarcômero de 2.5µm;
- b) Medidas de forças em diferentes concentrações de Ca²⁺.

4.6. Histologia

Fragmentos musculares dos diferentes grupos foram passados em talco e congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C até o processamento do material. O processamento histológico, contou com o seccionamento dos fragmentos em cortes transversos, espessura 6µm, com auxílio do Criótomo Leica CM 1850 UV a uma temperatura de -25°C. Os cortes para histologia básica foram colhidos em lâminas de 24x32mm e corados em Hematoxilina-Eosina (HE) para análise dos aspectos genéricos das fibras musculares em cortes histológicos tais como: centralização nuclear, necrose celular, basofilia, infiltrado inflamatório, fibras lobuladas entre outras (CORNACHIONE et al., 2008, 2011a). A análise morfológica contou com a utilização de um microscópio de Luz (Zeiss) conectado a um computador. Através do software MetaXpress (versão 5.3.0.5, 2013, Sunnyvale, CA, EUA) foram capturadas fotomicrografias do tecido.

4.7. Imunofluorescência

A técnica de IF contou com incubação dos cortes com Mouse-On-Mouse (MOM) da Vector Laboratories (Cat. No. MKB-2213) e posteriormente a aplicação de 3 tipos diferentes de anticorpos primários (tripla marcação) da Developmental Studies Hybridoma Bank, BA-D5 (1:50) para marcação das fibras do tipo I (FTI), SC-F1 (1:100) para marcação das fibras tipo IIA (FTIIA) e BF-F3 (1:50) para marcação das fibras tipo IIB (FTIIB). Após incubação à 37°C com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas e em seguida incubadas com os anticorpos secundários: Dylight (1:200), Alexa Fluor 488 (1:200) e Alexa Fluor 594 (1:200), marcando respectivamente as FTI em azul, FTIIA em verde e FTIIB em vermelho. As fibras do tipo IID (FTIID) não foram submetidas à aplicação de anticorpos primários primário e secundário, apresentando-se assim, pretas, ou seja, sem marcação. As fibras híbridas dos tipos IIC apresentaram marcação tanto azul quanto verde. Já fibras do tipo IIAD apresentaram coloração verde, porém, a intensidades da fluorescência foi menor quando comparado as FTIIA. Sendo assim, para análise de proporção foram contadas fibras FTI (azuis), FIIC (azul e verde), FTIIA (verde fluorescente mais intensa), FTIIAD (verde menos intensa), FTIID (preta) e FTIIB (vermelha). Para marcação da distrofina, outras lâminas foram submetidas à aplicação do anticorpo primário Dys-ab15277 (1:400) e do secundário o Anti-Rabbit 488 (1:1000). As lâminas foram fotografadas no ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) e a partir delas todos os diferentes tipos de fibras foram contados e mensuradas para realização das análises de proporção e diâmetro menor, respectivamente. Essas análises foram realizadas através do *software* Image J (versão 1.50e, NIH, USA). O trofismo foi analisado através da distância média entre pares de retas paralelas tangentes ao contorno projetado da célula, conforme figura a baixo.

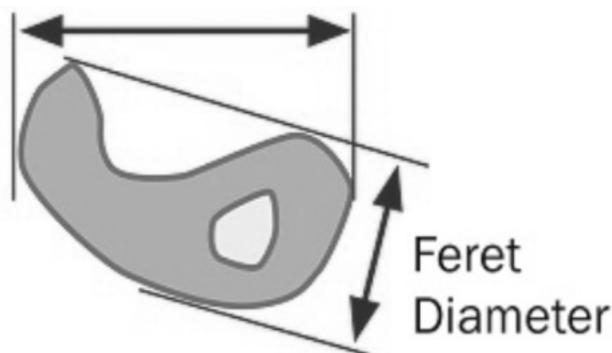


Figura 8 - Ilustração de como se obtém o diâmetro menor de uma célula.
Fonte: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11028> modificada.

5. Análise estatística

Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise de dados onde as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). No modelo de efeitos mistos utilizado, foram considerados como efeito aleatório os animais e, como efeitos fixos, os grupos, os tipos de fibras e a interação entre os mesmos. Tal modelo, tem como pressuposto, que o resíduo obtido através da diferença entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados tenha distribuição normal com média 0 e variância constante. O ajuste do modelo foi feito através do procedimento PROC MIXED do software estatístico SAS® 9.4.

Para avaliação da correlação entre dos níveis séricos de CK e força isométrica de fibras únicas, foi aplicado o teste estatístico *Two Way Analysis of Variance*, com *Normality Test (Shapiro-Wilk)* ($p \leq 0.05$). Os valores de teste de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6. Resultados

6.1. Creatina Quinase

Na análise da concentração sérica da enzima creatina quinase o genótipo distrófico sedentário expressa um basal sérico maior da CK, em todas as idades

avaliadas. Contudo, comparando estes grupos, os animais *mdx*SED₃ aos *mdx*SED₂₁ observou-se redução das atividades da CK nos animais mais velhos (Figura 9).

Após o treinamento excêntrico de baixa intensidade foi observado aumento significativo, tanto nos animais *mdx*TR₃ e *mdx*TR₂₁, quando comparados aos respectivos controles sedentários (*mdx*SED₃ < *mdx*TR₃ p<0,05) e (*mdx*Sed₂₁ < *mdx*TR₂₁ p<0,05) (Figura 9).

Nos animais controle, houve elevação nos valores da dosagem de CK dos camundongos que treinaram em relação aos que não treinaram, tanto por 3 quando por 21 dias, de 860,5 a 957,3 UI/L e 222,2 a 288,5 UI/L, respectivamente, no entanto sem diferença estatística.

Os grupos *wt* e *mdx* obtiveram maior expressão da enzima CK com o treinamento de três dias quando comparado aos praticados por 21 dias, entretanto a diferença estatística não foi significativa (Figura 9).

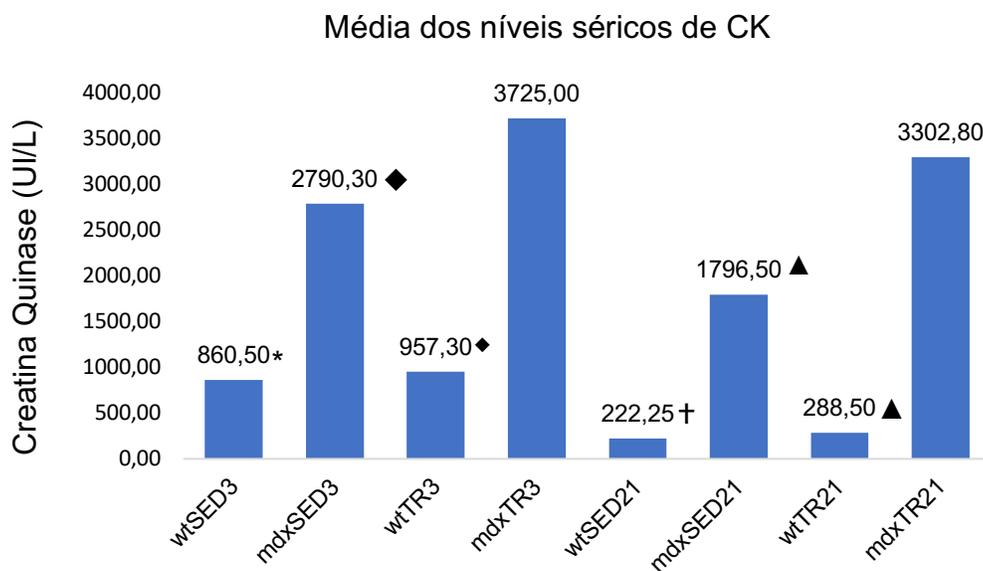


Figura 9 - média dos níveis séricos de CK nos diferentes grupos. ♦ comparado ao *mdx*TR₃ (p<0,05); * comparado ao *mdx*SED₃ (p<0,05); ▲ comparado ao *mdx*TR₂₁ (p<0,05); † comparado ao *mdx*SED₂₁ (p<0,05).

6.2. Análise morfológica

6.2.1. Aspectos morfológicos gerais

Através da análise morfológica das lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foi possível observar fibras poliédricas e núcleos na periferia nos animais *wild type* sedentários em ambos os grupos. Já nos animais distróficos sedentários as células apresentaram tamanhos variados, centralização nuclear, aumento de tecido conjuntivo, necrose, fibras basofílicas e *splitting* (Figura 10).

Após o treinamento de 3 dias os animais distróficos mostraram uma exacerbação das alterações observadas nos animais sedentários (*mdxSED₃* e *mdxTR₃*). Já com a manutenção do estímulo por 21 dias é possível observar que houve uma melhora estrutural do tecido muscular destes animais quando comparados aos treinados 3 dias (*mdxTR₃* e *mdxTR₂₁*). A Figura 10H mostra uma diminuição do tecido conjuntivo nos animais adultos, assim como há uma melhor organização celular nos fascículos, diminuição de fibras com basofilia, ausência de halo basófilo, diminuição de necrose celular.

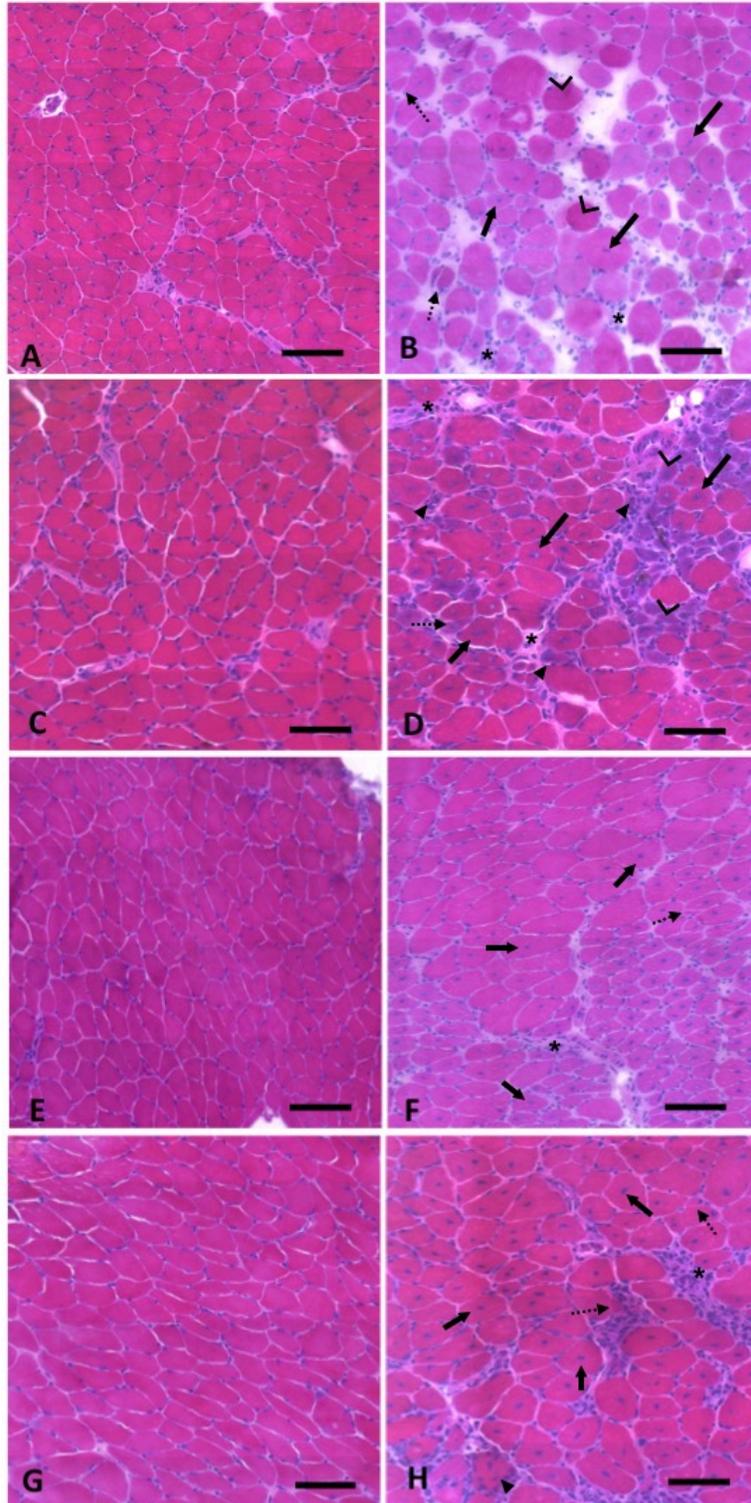


Figura 10 - Foto micrografia de lâminas coradas em HE do músculo sóleo de camundongos. Barra: 50µm para todas as imagens A - wtSED₃; B - mdxSED₃; C - wtTR₃; D - mdxTR₃; E - wtSED₂₁; F - mdxSED₂₁; G - wtTR₂₁; H - mdxTR₂₁. * Tecido conjuntivo; → Centralização nuclear; - - -> Splitting; ▴ Necrose; > Célula Basofílica.

6.2.2. Distrofina

A Figura 11 ilustra a ausência de distrofina nos animais *mdx*. Como comprovação de que os animais *mdx* utilizados neste estudo possuem características estruturais e funcionais semelhantes aos indivíduos portadores de DMD as imagens a seguir foram feitas a partir de um fragmento do músculo sóleo de um animal *wtSED*₃ (Figura 11A) e de um *mdxSED*₃ (Figura 11B).

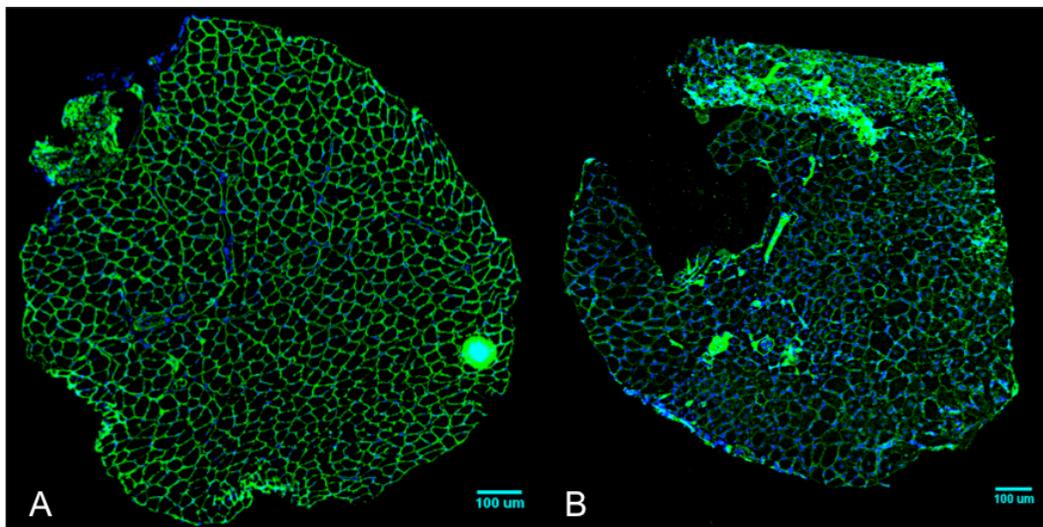


Figura 11 - Foto micrografia de cortes histológicos do músculo sóleo processados pela técnica de imunofluorescência com anticorpo para distrofina. A – Wild Type: presença da proteína distrofina marcada em verde e núcleos em azul (DAPI). B – *mdx*: ausência da proteína distrofina com núcleos em azul (DAPI).

6.3. Alterações do trofismo das células musculares

A tabela 2 apresenta as médias do diâmetro menor dos diferentes grupos estudados. Nossas análises para o trofismo mostraram que a doença determinou aumento significativo no diâmetro das FTI, FTIIC, FTIIA, FTIIAD e FTIID no grupo mais jovem quando comparado ao controle (*mdxSED*₃ > *wtSED*₃; $p < 0,05$). Por outro lado, animais do grupo 21 dias sedentário mostraram redução do diâmetro para as fibras I e IIA (*mdxSED*₂₁ < *wtSED*₂₁; $p < 0,05$) apresentando aumento apenas para as FTIID (Tabela 2). Outro achado significativo para as fibras I, IIC, IIA e IIAD foi a diferença do trofismo quando comparados os grupos distróficos sedentários de diferentes idades. Os animais mais jovens mantiveram os diâmetros dessas fibras maiores quando comparados aos mais velhos (*mdxSED*₃

> $mdxSED_{21}$; $p < 0,05$). Este achado se contrapõe aos animais controles *wild type* de idades diferentes, inclusive para FTIID, já que os mais velhos apresentaram maior diâmetro quando comparados aos mais jovens ($wtSED_{21} > wtSED_3$; $p < 0,05$).

O principal achado para os animais distróficos treinados durante três dias foi a redução do diâmetro de todas as fibras quando comparados aos animais sedentários de mesma idade ($mdxSED_3 > mdxTR_3$; $p < 0,05$). Com a manutenção do estímulo por 21 dias as principais fibras que compõe o músculo sóleo, FTI e FTIIA, mostraram redução e aumento do diâmetro, respectivamente, quando comparado ao grupo distrófico da mesma idade ($mdxSED_{21} \times mdxTR_{21}$; $p < 0,05$). O diâmetro dessas mesmas fibras, que predominam no sóleo (FTI e FTIIA), mostraram aumentar com o treinamento a longo prazo (21 dias) quando comparado ao treinamento a curto prazo (3 dias) ($mdxTR_{21} > mdxTR_3$; $p < 0,05$).

Já nos animais *wild type* o EEBI determinou no grupo sedentário mais velho (21 dias) aumento significativo das fibras FTI, FTIIA, FTIIAD e FTIID quando comparados aos mais jovens ($wtSED_{21} > wtSED_3$; $p < 0,05$). Da mesma maneira, os animais distróficos mais velhos também apresentaram aumento significativo do diâmetro nas fibras FTI, FTIIC, FTIIA e FTIIAD ($mdxSED_{21} > mdxSED_3$; $p < 0,05$).

	$wtSED_3$	$mdxSED_3$	$wtTR_3$	$mdxTR_3$	$wtSED_{21}$	$mdxSED_{21}$	$wtTR_{21}$	$mdxTR_{21}$
FTI	32,10 * 31,7 - 32,4	39,92 39,01 - 40,83	30,72 30,34 - 31,1	27,67 * 27,16 - 28,18	35,18 • † 34,74 - 35,63	33,09 * 32,67 - 33,51	32,61 32,13 - 33,10	31,68 • □ 31,17 - 32,20
FTIIC	23,65 * 23,1 - 24,20	33,36 32,19 - 34,54	23,09 22,39 - 23,80	24,08 * 23,61 - 24,54	27,82 † 26,38 - 29,26	27,52 * 26,73 - 28,30	25,28 24,14 - 26,42	27,35 26,67 - 28,03
FTIIA	25,87 * 25,65 - 26,1	36,86 36,03 - 37,63	25,02 24,78 - 25,26	27,81 * 27,48 - 28,14	31,76 • † 31,46 - 32,06	32,79 * 32,37 - 33,20	29,76 29,39 - 30,13	34,16 • □ 33,64 - 34,68
FTIIAD	27,52 * 26,87 - 28,16	39,99 37,83 - 42,16	27,25 26,57 - 27,94	27,94 * 26,92 - 28,96	34,16 † 33,16 - 35,15	34,50 * 32,71 - 36,29	31,75 30,73 - 32,76	33,37 31,73 - 35,01
FTIID	30,65 * 29,89 - 31,41	40,76 38,74 - 42,77	29,46 28,65 - 30,28	38,29 * 36,62 - 39,97	36,79 † 35,61 - 37,97	42,34 40,18 - 44,49	33,88 32,94 - 34,82	39,72 37,62 - 41,83

Tabela 2 - Médias do diâmetro menor medidas em μm das FTI, FTIIC, FTIIA e FTIIAD com os respectivos valores das médias do diâmetro menor e o intervalo de confiança de 95%. * $p < 0,05$ comparado ao $mdxSED_3$.

• $p < 0,05$ comparado ao $mdxSED_{21}$. † $p < 0,05$ comparado ao $wtSED_3$; □ $p < 0,05$ comparado ao $mdxTR_3$.

6.4. Distribuição dos diferentes tipos de fibras

A doença mostrou afetar diretamente a proporção das fibras que predominam no músculo sóleo, FTI e FTIIA. No estado mais exacerbado (6 semanas de vida) determinou uma redução significativa do número de FTIIA em relação aos animais sadios de mesma idade ($mdxSED_3 < wtSED_3$; $p < 0,05$) (Figura 12). No grupo mais velho ($mdxSED_{21}$) também foi possível observar redução das FTIIA quando comparado com seu respectivo controle ($mdxSED_{21} \times wtSED_{21}$; $p = 0,10$) porém, sem significância estatística. Outro achado importante observado em ambos os grupos distróficos sedentários, mesmo que sem significância estatística, foi o concomitante aumento proporcional das fibras híbridas FTIIC e das puras FTI (Figura 12). A imagem da figura 13B ilustra este achado para proporção, onde é possível observar uma redução da distribuição de fibras verdes (FTIIA) concomitante a um aumento de fibras azuis (FTI) e verde/azul (FTIIC).

A aplicação do EEBI não mostrou afetar diretamente a distribuição dos diferentes tipos de fibras nos músculos dos animais sadios, independente da idade ($wtSED_3 \times wtTR_3$; $wtSED_{21} \times wtTR_{21}$; $p > 0,05$) (Figura 12). Já para os animais *mdx* foi possível observar que o treinamento à curto prazo aumentou significativamente o número de FTIIA e reduziu FTI, quando comparado ao grupo *mdx* sedentário (Figuras 12 e 13C). A manutenção do estímulo por 21 dias determinou efeito oposto, onde houve redução do número de FTIIA e aumento FTI, quando comparado ao grupo *mdx* treinado durante 3 dias, porém, a distribuição das fibras predominantes mostrou-se mais homogenia (Figura 13D). Para análise da proporção foi observado que a doença afetou mais as fibras de predomínio do músculo sóleo (FTI e FTIIA).

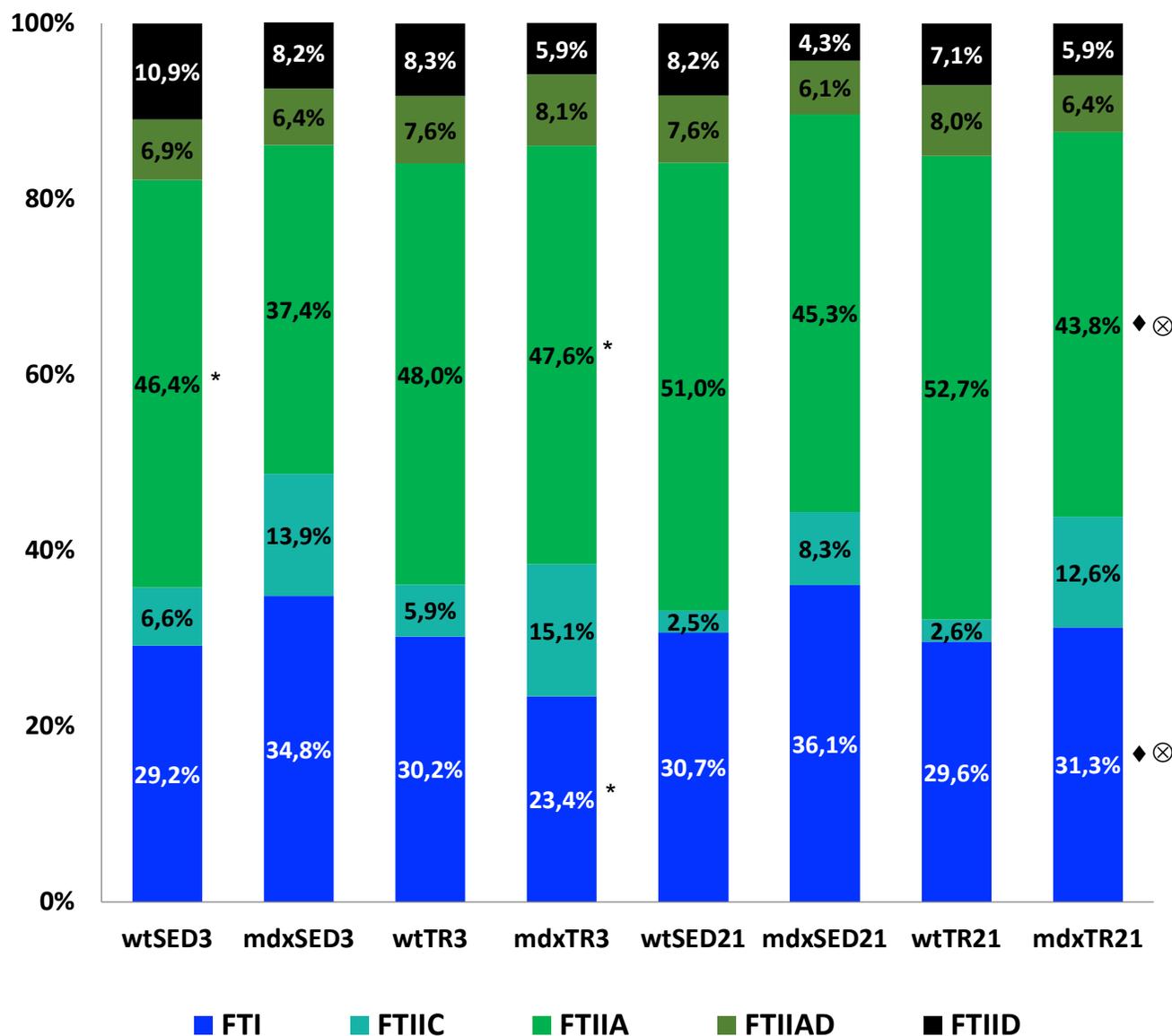


Figura 12 - Porcentagem das médias de FTI, FTIIC, FTIIA e FTIIAD do músculo sóleo em diferentes grupos analisados.

* $p < 0,05$ comparado com mdxSED₃, ♦ $p < 0,05$ comparado com mdxTR₃, ⊗ $p > 0,05$ comparado ao mdxSED₂₁.

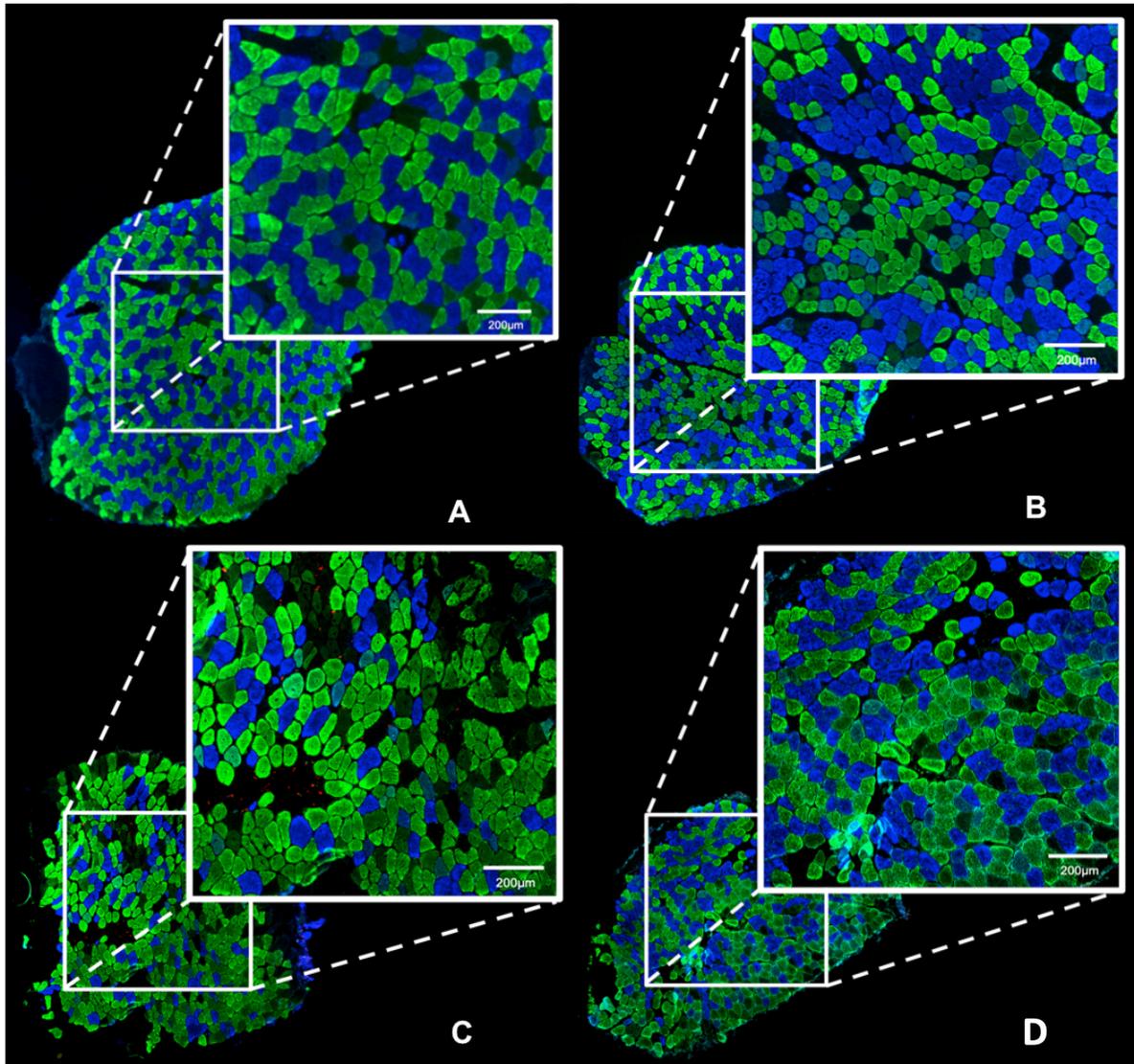


Figura 13 - Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo de camundongos. A - wtSED₃; B - mdxSED₃; C - mdxTR₃; D - mdxSED₂₁.

6.5. Alterações na força muscular – Técnica *Single Cell*

A figura 11 mostra um traço de contração realizada por células individuais dos grupos *wtSED₃*, *mdxSED₃* e *mdxTR₂₁*. As contrações isométricas foram registradas durante um experimento típico de fibra única com comprimento de sarcômero em 2,5 μ m do músculo sóleo. As forças produzidas na solução de contração (pCa²⁺ 4.5) apresentaram menores forças no músculo dos animais *mdx* (traço vermelho) (média: 67,20 \pm 17,24 mN/mm²) do que nas fibras de camundongos sadios (traço preto) (média: 241,5 \pm 33,8 mN/mm²). Após 21 dias de treinamento excêntrico de baixa intensidade, a força total aumentou (média: 106,5 \pm 8,82 mN/mm²) significativamente nas fibras *mdx* (traço de azul), mas ainda foi menor do que as fibras dos *wt* (Figura 14). A sensibilidade ao cálcio (pCa50) mostrou que não houve alteração na relação força-pCa²⁺ de fibras isoladas do músculo sóleo, sugerindo que a sensibilidade do Ca²⁺ não é prejudicada nas fibras dos camundongos *mdx* (Figura 15).

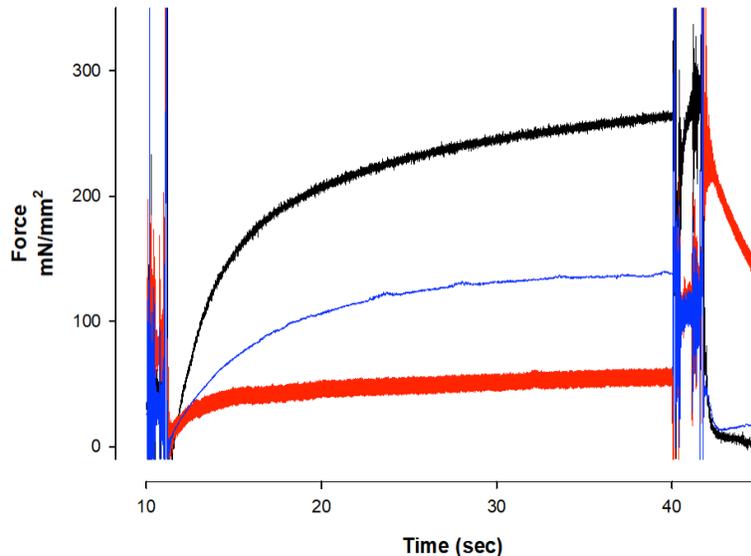


Figura 14 - Contrações produzidas por uma única fibra do músculo sóleo. Linha preta: *wtSED₃*, linha vermelha: *mdxSED₃*, linha azul: *mdxTR₂₁*. Uma única fibra *mdxSED₃* produziu forças menores que *wtSED₃* (média: 67,2 \pm 17,24). Após 21 dias de treinamento a força total dos *mdxTR₂₁* aumentou de forma significativa (média: 106,5 \pm 8,82), porém continuou menor que a força gerada pela fibra *wtSED₃*.

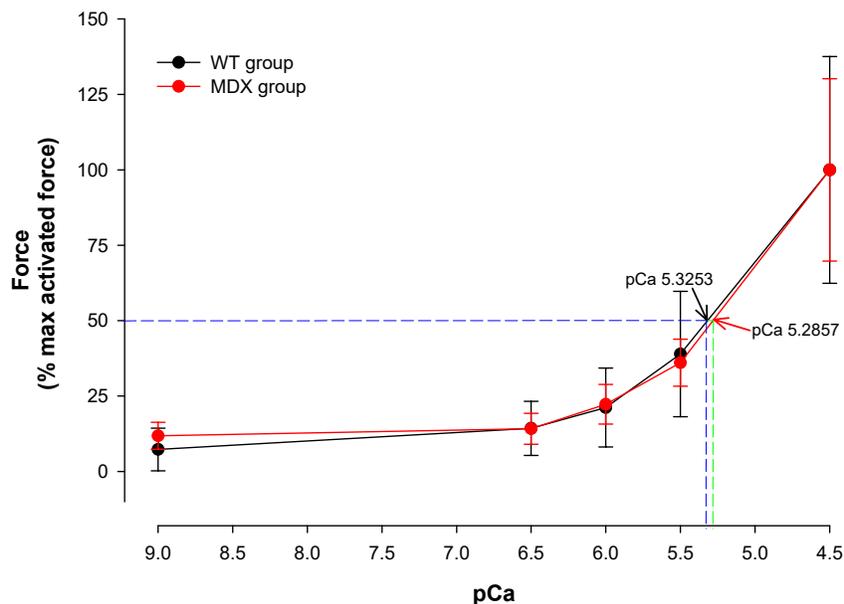


Figura 15 - Gráfico relação força/pCa. Não houve diferença entre o grupo controle (média 5.35 ± 0.08) e *mdx* (média $5.41; \pm 0.13$).

7. Discussão

A DMD é uma patologia degenerativa de caráter recessivo que atinge a musculatura esquelética de indivíduos do sexo masculino caracterizada por severa degeneração das fibras musculares determinando uma fraqueza expressiva que impacta diretamente na qualidade de vida desses indivíduos. Dentro da literatura científica é observado que a aplicação de protocolos terapêuticos de exercício físico auxiliam no retardo da progressão da doença (HYZEWICZ; RUEGG; TAKEDA, 2015), por reverter e até mesmo retardar a progressão dela. Ciente da aplicabilidade de exercício físico nesta população, o presente estudo submeteu animais distróficos (*mdx*) ao treinamento de baixa intensidade em esteira com os e obteve resultados significativos e expressivos no quesito função muscular, observando aumento de força ao longo do treinamento, assim como transição de tipos diferentes de fibra encontradas no músculo sóleo, entre outros achados que serão discutidos a seguir.

7.1. Creatina Quinase

Os resultados demonstrados neste estudo referente aos níveis plasmáticos de CK, corroboram com os achados das alterações patológicas musculares encontradas na DMD, observado que o acréscimo do efluxo de CK está associado a lesões na membrana muscular, à cascata inflamatória, necrose e ao *splitting* dessas fibras (MATHUR et al., 2010). Alterações semelhantes também foram observada neste estudo e serão discutidas brevemente abaixo.

Cullen e Jaros (1988) relataram a histopatologia do músculo sóleo dos camundongos C57BL/10mdx de 4 a 5 semanas de vida, os quais apresentavam o retículo sarcoplasmático sobrecarregado, com um maior volume, o qual tem sido justificado pela sobrecarga de cálcio nas células musculares; desorganização dos miofilamentos; fibras em estado de necrose com elevada quantidade de células inflamatórias (DECONINCK; DAN, 2007). Os resultados obtidos por Pastoret e Sebille (1995) são semelhante aos do grupo mencionado, assim como o pico da necrose com o aumento da atividade do camundongo na gaiola sugerindo, portanto, uma relação entre o estresse mecânico e os danos das fibras durante as exigências dinâmicas impostas pelo ambiente (CULLEN; JAROS, 1988).

Contrastando o curso de vida dos camundongos selvagens sedentários, os *mdx* apresentam uma redução sérica da enzima CK conforme se desenvolvem. Pastoret e Sebille (1995) também observaram esses sinais clínicos, embora o perfil necrótico das fibras ocorra em todas as idades. A necrose celular evidenciada na musculatura esquelética desses camundongos é explicado pelo efluxo contínuo de proteínas citoplasmáticas, como a CK. Existe uma incidência de 80 a 90% de fibras com núcleos centralizados nesses animais distróficos, desde as 3 semanas até 104 semanas de vida e de até 68% de necrose de fibras musculares, assim como células basofílicas em animais entre 3 a 43 semanas de idade (PASTORET; SEBILLE, 1995), o que nos dá indícios da existência contínua do ciclo regeneração-degeneração.

O que diz respeito ao aspecto funcional do músculos sóleo de animais *mdx* jovens, através da avaliação da fibra única, é que a força isométrica é menor

nesses animais mais jovens, quando comparados aos adultos (COULTON et al., 1988). Estes dados, associados aos resultados obtidos com os elevados níveis de CK elucidam de que, por volta de 7 semanas de idade (3 dias de treinamento) as lesões na membrana celular podem estar associadas a alterações de caráter funcional do tecido muscular, evidenciado pela redução de força isométrica. Hermes e colegas (2018) também observaram aumento dos níveis de CK em animais *mdx* treinados em baixa intensidade, durante 4 semanas, quando comparados aos *mdx* sedentários. Assim como, também relataram que os valores de CK dos animais *mdx* eram maiores do que os animais controle e indiferente do sexo para os animais distróficos. Esses achados corroboram com os resultados aqui apresentados.

O exercício excêntrico, quando realizado a curto prazo é capaz de gerar lesões extensas às membranas celulares, haja visto o aumento dos níveis plasmáticos de CK nos animais treinados jovens em relação aos animais sedentários de mesma idade. Segundo Hyzewicz e colaboradores (2015) após exercícios de baixa intensidade, pelo período de 4 semanas, o músculo gastrocnêmico de camundongos *mdx* apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de CK, quando comparados aos animais não-exercitados. Outra diferença observada foi redução do estresse oxidativo deste músculo. Este estudo pode justificar nosso achado para a melhora nos níveis de CK e da morfologia tecidual nos animais *mdx* mais velhos. , podendo estar relacionado aos achados deste estudo, onde os animais mais *mdx* velhos. Coulton, Curtin e Morgans (1988) relataram aumento de 2,7 vezes nos níveis plasmáticos de CK em animais *mdx*, após serem submetidos a 5 minutos de esteira em declive.

Brussee e colaboradores (1997) avaliaram a musculatura de camundongos *mdx* e *wt* com 3 sessões de treinamento com a esteira elétrica motorizada em declive (15°) na mesma velocidade do presente estudo (10m/min), durante o mesmo tempo (10 minutos), eles evidenciaram danos musculares e identificaram danos musculares mais extensos no sóleo dos animais distróficos, os quais não foram observados de forma extensa nos camundongos *wt*. Brussee, Tardif e

Tremblay (1997) obtiveram resultados por meio de análises de ressonância magnética dos músculos de camundongos distróficos e selvagens, elucidando os efeitos agudos do EE. Foi possível observar através da ressonância magnética que os animais distróficos apresentaram aumento no percentual da área de secção transversa do músculo sóleo, permanecendo por até 48 horas após o exercício, associado a lesões histopatológicas positivas. Resultados similares foram observados no estudo de Hermes (2018).

Hyzewicz (2015) em sua revisão a qual relata diversos protocolos de treinamento realizados com animais com DMD, foi feita a correlação entre a intensidade e volume do treinamento que culminariam em estresse mecânico às fibras musculares com conseqüente piora do fenótipo distrófico. No entanto, é possível observar em nosso estudo, que ao serem submetidos a um protocolo de treinamento de 21 dias há uma redução dos níveis plasmáticos de CK nos camundongos *mdx*, sugerindo a possibilidade de redução das lesões histológicas, as quais são discutidas a seguir.

7.2. Alterações morfológicas

Os músculos esqueléticos dos diversos tipos de animais *mdx* remetem as características estruturais e funcionais encontradas nos pacientes com DMD. Como já mencionado na revisão da literatura deste estudo, os camundongos *mdx* apresentam uma mutação genética a qual determina ausência da proteína distrofina e são mais comumente utilizado em estudos científicos (BLAKE et al., 2002b; CARTER; ABRESCH; FOWLER, 2002; MCGREEVY et al., 2015; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Nossos achados de análise qualitativa para as lâminas submetidas a técnica de imunofluorescência confirmou que os animais *mdx* utilizados neste estudo não apresentavam a proteína distrofina no músculo sóleo. Este achado corrobora com estudos que utilizaram tanto o mesmo modelo animal (GUIRAUD et al., 2019; KARPATI et al., 1989) como pacientes portadores de DMD (SARDONE et al., 2018).

Na análise qualitativa dos aspectos gerais do tecido muscular corados em HE, foram observadas neste estudo, alterações de caráter regenerativo/degenerativo, tais como: centralização nuclear, *splitting*, necrose, aumento de tecido conjuntivo e células basofílicas no músculo sóleo de camundongos *mdx* tanto sedentários quanto treinados. A centralização observada no tecido é justificada por fases de degeneração e regeneração muscular (BURNS et al., 2017). Durante a reparação do tecido muscular esquelético, células satélites, que são precursoras da miogênese, são ativadas e proliferam até o local da lesão onde, irão se fundir no foco da lesão e posteriormente, se diferenciar em mioblastos. Essas células recém reparadas apresentam o núcleo centralizado até que, ocorra a maturação desta célula e a migração do núcleo para periferia (ITALI; KARIYA; HOSHINO, 2004). Outras alterações citoarquiteturais como basofilia e *splitting* são características de lesão da membrana celular e influxo de cálcio no citoplasma da célula (BRUSSEE; TARDIF; TREMBLAY, 1997). A basofilia é característica de acidose citosólica determinada por alterações subcelulares, como nas proteínas nucleares, glicoproteínas e influxo de cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017), observadas no músculo distrófico (YIU; KORNBERG, 2015). O influxo de cálcio dispara reações de caráter degenerativo ocasionando inflamação e necrose. O aumento do conteúdo citosólico pode ultrapassar o volume trófico da célula determinando rompimento da membrana e divisão da mesma, conhecida como *splitting*. Brussee, Tardif e Tremblay, (1997) observaram aumento na área de secção transversa das fibras do músculo sóleo de camundongos *mdx*. Mathur e colaboradores (2010), assim como o presente estudo, também observaram *splitting* nas células de camundongos *mdx*. Estudos realizados por Abdel-salam, Abdel-meguid e Korraa, (2009), Gillis (1999) e Muntoni et al., (1993) corroboram com nossos achados.

Pastoret e Sebillé (1995) afirmaram que essas alterações citoarquiteturais podem se alterar com a progressão da doença e envelhecimento do animal. Do mesmo modo, o exercício físico pode acelerar o processo degenerativo, dependendo dos parâmetros aplicados. Nossos achados mostraram uma piora do

fenótipo dos animais *mdx* treinados durante 3 dias. Gaiad e colaboradores (2017) afirmam que o exercício excêntrico quando aplicado em curto período de tempo pode prejudicar o músculo do portador de DMD mas, quando o estímulo é mantido por tempo prolongado, pode sofrer efeitos benéficos da intervenção. Devido o exercício excêntrico desencadear forças mecânicas de cisalhamento a membrana das células já fragilizadas pela ausência da distrofina apresentam maior susceptibilidade à lesão. Já com a manutenção do estímulo essas alterações mostraram-se mais brandas. Estudo realizado por Proske e Morgan (2001) mostrou que as alterações de caráter degenerativo observado na fase aguda de contrações excêntricas minimizam ao passar do tempo.

Grounds (2014) também observou elevado número de núcleos centralizados, o que pode indicar que há maior regeneração muscular. Conforme cita Cater e colegas (1995) após exercício voluntário em roda giratória por 4 semanas, os animais *mdx* mais velhos (iniciaram o programa de treinamento com 6 semanas de vida) demonstraram várias fibras em regeneração e apenas algumas em processo de degeneração/regeneração, diferentemente dos animais mais jovens (iniciaram o programa de treinamento com 4 semanas de vida), nos quais foram identificadas áreas extensas de necrose e consequente degeneração.

7.3. Alterações no Diâmetro menor

Por meio da análise do trofismo celular, foi observado que todos os tipos de fibras (FTI, IIC, FTIIA, FTIIAD e FTIID) do músculo sóleo dos animais sedentários *mdx* jovens, aumentaram o diâmetro menor, quando comparados aos controles *wild type* de mesma idade. Este resultado corrobora com os achados de Bloemberg e Quadrilatero (2012) quando mostraram que os animais *mdx* jovens apresentaram aumento no trofismo muscular, em relação ao animais *wild type*. Zweyer et al. (2005) e Gaiad e colegas (2017) observaram resultados similares aos aqui apresentados após análise da área de secção transversa (AST) do músculo sóleo de animais *mdx* sedentários. Anderson, Bressler e Ovalle (1988) também obtiveram achados semelhantes ao analisar a AST de camundongos *mdx*

sedentários. Esses autores observaram aumento da AST nas fibras glicolíticas, quando comparados aos animais sedentários controle de mesma idade. Briguet e colegas (2004) mostraram que camundongos *mdx*, com 7 semanas de vida, apresentavam a AST dos músculos: sóleo, tibial anterior e diafragma maior quando comparado aos animais sedentários *wild type* da mesma idade.

O aumento do diâmetro das fibras observado nos animais distróficos jovens pode ser devido ao período em que a doença se encontra, na fase de maiores manifestações degenerativas determinando assim, aumento do conteúdo citoplasmático. Como já descrito previamente, Mathur e colaboradores (2010) observaram lesões significativas da membrana celular associada à processo inflamatório, no músculo tríceps sural de crianças portadoras de DMD, entre 5 e 14 anos quando comparado as crianças controle (sem DMD). O aumento das células musculares pode ser justificado por esses processos degenerativos exacerbados, os quais, determinam um acúmulo de líquido intracelular ocasionando tumefação da mesma. Esta hipótese pode ser confirmada pelos estudos de Cullen e Jaros, (1988), Deconinck e Dan (2007) e Kargacin e Kargacin (1996) que observaram no músculo sóleo de camundongos *mdx*, com 5 semanas de idade, aumento do retículo sarcoplasmático das fibras concomitante ao elevado número de células fagocitárias no citoplasma. Com o decorrer do tempo, nossos achados, mostraram que os animais mais velhos apresentavam um diâmetro reduzido, o que pode sugerir uma atrofia da musculatura e uma redução do processo inflamatório. Choi (2016) observou que animais mais velhos apresentam atrofia do músculo esquelético quando comparado aos mais jovens.

Por outro lado, após a aplicação do exercício excêntrico de baixa intensidade durante 3 dias, todos os tipos de fibras musculares mostraram redução do diâmetro. Já com a manutenção do treinamento durante 21 dias as fibras que mais mostraram alterações do diâmetro em relação ao controle foram as que predominam o músculo sóleo, ou seja, FTI e FTIIA. Sendo que, as FTI reduziram o diâmetro enquanto as FTIIA aumentaram. Nossa hipótese é que o exercício excêntrico de baixa intensidade possa estar estimulando a

reorganização tecidual, reduzindo o processo inflamatório exacerbado na fase de pico da doença (fase dos animais mais jovens) e, com isso reduzindo o volume das células. Frinchi et al. (2014) citaram os efeitos benéficos do exercício de baixa intensidade em esteira rolante com animais *mdx*, além de, evidenciar o benefício que este tipo de exercício trás, ao decorrer do tempo, principalmente quando comparado animais distróficos com treinamento de 30 a 45 dias. Este achado corrobora com os nossos resultados que observaram melhora do trofismo de FTI e FTIIA após 21 dias. Baltgalvis e colaboradores (2012) observaram melhora nas características funcionais nos flexores plantares (gastrocnêmio, sóleo e plantar) de camundongos *mdx* após 12 semanas de treinamento de baixa intensidade. Esses autores, observaram melhora na resistência a fadiga, capacidade oxidativa e melhora da força muscular.

Kaczor e colaboradores (2007) observaram significativa redução do estresse oxidativo do músculo esquelético de camundongos *mdx* após treinamento de baixa intensidade em esteira. Do mesmo modo Morici e colegas (2017) observaram que o treinamento de baixa intensidade determinou adaptações importantes no remodelamento da matriz extracelular do músculo de camundongos *mdx*. Hayes, Lynch e Williams (1993) evidenciaram redução do tamanho das fibras, principalmente das oxidativas, no músculo sóleo de camundongos *mdx*, após serem submetidos a treinamento de *endurance*. Landisch e colegas (2008) observaram redução da AST do músculo sóleo após 8 semanas de corrida de baixa intensidade. Esses autores atribuem que a redução do trofismo pode ser recorrente da reorganização celular e mudança no tipo de cadeia pesada da miosina (rápida para lenta). Dentro da literatura científica é possível observar que existem estudos que corroboram com nossos achados e outros que apresentam resultados controversos. Isso pode ser explicado pelo fato do tipo de exercício, tempo, intensidade serem diferentes.

7.4. Mudanças na Proporção de fibras

Hayes, Lynch e Williams (1993) e Lindsay e colaboradores (2019) descreveram em seus estudos que o músculo sóleo de camundongos apresenta uma distribuição quantitativa homogênea entre fibras do tipo I e IIA, com uma tendência maior de FTIIA. Em nossos resultados foi possível observar, Figura 12, que os animais *wt*SED₃ e *wt*SED₂₁ apresentaram distribuição similar aos estudos aqui apresentados. Já nos animais acometidos pela distrofia observamos um desequilíbrio dessa distribuição homogênea, onde as FTIIA reduzem quantitativamente, enquanto as FTI aumentam, em ambos os animais sedentários distróficos 3 e 21 dias *mdx*SED₃ e *mdx*SED₂₁. Deconinck e colegas (1998) também observaram resultados similares na distribuição das fibras FTI e FTIIA no músculo sóleo de camundongos *mdx*, com 6 semanas de idade. Essa mudança proporcional da tipagem de fibras pode ser explicada devido a capacidade glicolítica FTIIA as quais, são evidenciadas pela literatura científica sofrer mais com o processo de degeneração quando comparadas as FTI. Lindsay e colaboradores (2019) acreditam que essa “proteção” que ocorre nas fibras mais oxidativas é devido ao aumento da expressão da utrofina, uma proteína homóloga a distrofina. Além disso, esses mesmos autores atribuem que as fibras glicolíticas do músculo de camundongos *mdx* apresentam aumento da expressão de *peroxisome proliferator – activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC – 1α)*, o que determina uma transição para fibras mais oxidativas (FTI).

Já está documentado na literatura científica que uma das formas de prevenir a progressão da doença e propiciar melhor qualidade de vida à portadores da DMD é através de exercícios físicos de baixa intensidade. No que diz respeito ao treinamento, o presente estudo evidenciou que o exercício excêntrico reduziu as FTI, proporcionalmente aumentadas pela doença. Contudo, com a manutenção do treino durante 21 dias foi possível observar que o número dessas fibras oxidativas aumentaram, quando comparado ao grupo treinado 3 dias (*mdx*TR₂₁ > *mdx*TR₃) concomitante à redução das FTIIA. Carter e colaboradores (2002) afirmaram que o exercício de baixa intensidade em indivíduos/animais com

mais tempo de treinamento, está diretamente relacionado ao aumento das fibras oxidativas. Lynch, Hayes e Lam (1993) também observaram resultados similares para os camundongos *mdx* submetidos ao treino de natação por 15 semanas. Baltgalvis e colaboradores (2012) observaram uma transição de fibras mais glicolíticas para mais oxidativas em flexores plantares de camundongos *mdx* após longo período (12 semanas) de exercício de baixa intensidade. Esses autores acreditam que o longo período de treinamento determinou adaptações significativas nas mitocôndrias aumentando assim, a capacidade oxidativa das fibras e a resistência a fadiga. Resultados similares foram observados por Landisch e colegas (2008) ao analisar os diferentes tipos de fibras do músculo sóleo de camundongos *mdx* exercitados (baixa intensidade) durante 8 semanas. A transição de fibras mais glicolíticas para mais oxidativas podem ser importantes no aumento da resistência à fadiga e no retardo da progressão da degeneração, já que as fibras glicolíticas são primeiramente acometidas pela doença.

7.5. Alterações da força muscular

A característica mais marcante da DMD é a perda da força muscular devido a degeneração progressiva das fibras musculares. Já está bem documentado na literatura científica que essa perda de tecido muscular contrátil é substituída por tecidos não contráteis, como adiposo e conjuntivo. Estudos que analisaram a força de prensão muscular de camundongos *mdx* observaram uma redução significativa da mesma, quando comparadas aos animais controles (*wild type*) (BOSTICK et al., 2008; LUCA, 2014). Alguns estudos atribuem que a redução da força muscular não está diretamente relacionada a ausência da distrofina e sim, à alterações secundárias que deterioraram o tecido (CANEPARI et al., 2009; COIRAULT et al., 2002) Esses autores indicam que a função da miosina pode estar alterada em músculos distróficos.

Nossos resultados (Figura 14) mostraram redução significativa da força total de uma única fibra muscular dos animais distróficos, quando comparados aos controle. A técnica de *single cell* nos permitiu analisar de maneira isolada o

aparato contrátil das outras composições estruturais do tecido muscular, como tecidos não contráteis gerais. Segundo Canepari e colaboradores (2009) técnicas de análise da biofísica celular que isolam a fibra são mais acuradas e podem trazer mais embasamento sobre as alterações encontradas em músculos doentes. Esses mesmos autores afirmam que o comprometimento da função da miosina dos músculos distróficos é atribuído à modificação pós-translacional da molécula de miosina, o que determinaria uma mudança em suas propriedades enzimáticas ou mecânicas. Essas alterações mecânicas podem estar comprometendo a velocidade do braço de alavanca entre a miosina e actina (*cross-bridges*) reduzindo a motilidade entre essas proteínas contráteis, conseqüentemente, há redução de força e mobilidade de camundongos *mdx*, *in vivo* (CANEPARI et al., 2009) Por outro lado, existe o estudo desenvolvido por Bates e colaboradores (2013) que não observaram redução significativa da força de células únicas do músculo diafragma de camundongos *mdx*. Vale ressaltar que essa controvérsia pode ser explicada pelo fato que os animais analisados neste estudo estavam na fase de pico da lesão, apresentando muitas células em degeneração, como já mostrado e discutido previamente.

Na literatura científica são escassos os estudos que analisam o músculo sóleo de animais distróficos sobre condições de tratamentos com exercício físico. Na grande maioria, o músculo extensor longo dos dedos (EDL) e o diafragma são os mais investigados pois, acreditam que esses sofram mais com a progressão da doença. Contudo, objetivamos analisar o músculo sóleo por se tratar de um músculo postural que, diferente do EDL, permanece em constante atividade eletromiográfica, ou seja, o mesmo está em contração tanto na deambulação como na postura estática (ROY et al., 1991). Além disso, registros eletromiográficos mostraram maior ativação do músculo sóleo (flexor plantar) quando comparado ao tibial anterior, um flexor dorsal assim como o EDL, na caminhada em esteira (GREGOR et al., 2006; ROY et al., 1991). Sendo assim, por se tratar de um músculo ativado constantemente, ele também sofre alterações

significativas com a doença, já que permanece em constantes contrações, mas também, adapta-se a estímulos crônicos como o exercício físico.

Do mesmo modo que o grupo *mdx* sedentário, as fibras do grupo distrófico treinados também foram permeabilizadas eliminando qualquer barreira de permeabilidade e integridade da lâmina basal e sarcolema. Este processo coloca os animais controles em situação similar à dos animais *mdx* já que, com a permeabilização da membrana não há mais a proteção gerada pela distrofina e pelo complexo distrofina-glicoproteínas (DAG) (LYNCH et al., 2000). Nessas mesmas condições as fibras foram testadas após treinamento excêntrico em diferentes períodos, agudo (3 dias) e crônico (21 dias). Apesar do exercício excêntrico ser tachado como um exercício lesivo, aqui sua aplicação foi extremamente cautelosa (baixa intensidade), buscando seus efeitos benéficos e não lesivos pois, os músculos aqui analisados são mais susceptíveis a lesão. De maneira geral, focando na morfologia das células observamos que o exercício excêntrico de baixa intensidade pode melhorar a citoarquitetura das fibras dos animais distróficos treinados quando comparados aos sedentários. No quesito força, também observamos uma melhora nos animais *mdx* treinados em relação aos sedentários, mesmo mantendo seus valores abaixo do controle *wild type*.

Capogrosso e colegas (2017) observaram que o músculo distrófico de animais treinados em esteira por um período crônico, se adapta mais aqueles que treinaram em um período curto (agudo), melhorando a capacidade funcional desses animais (força). Técnicas de análises da força de uma única fibra muscular (*single cell*) não são facilmente encontradas em estudos científicos que, investigam os efeitos do exercício excêntrico no músculo esquelético de animais distróficos. Na sua maioria os testes são feitos por *grip strength*, um teste de força da preensão palmar dos animais. Apesar dessa análise ser mais macro essa quando comparada a aqui abordada, estudos mostram uma melhora da força desses animais após períodos longos de treinamento em esteira de baixa intensidade (FRINCHI et al., 2014; HYZEWICZ et al., 2015). Considerando que o desafio mecânico é um dos principais indutores de plasticidade muscular e ganho

de força acreditamos que o treinamento a longo prazo induziu à essas adaptações benéficas no músculo de animais distróficos.

8. Conclusão

Nossos resultados nos possibilitaram alcançar os objetivos propostos neste estudo. O treinamento excêntrico de baixa intensidade (EEBI) mostrou ser mais eficaz quando aplicado em períodos mais longos de treinamento pois, os animais *mdx* treinados apresentaram melhora na morfologia muscular, força, nos parâmetros bioquímicos para a CK, distribuição e trofismo das fibras, sugerindo um possível retardo da progressão da doença. Sendo assim, o EEBI pode ser um tratamento efetivo a ser aplicado na prática clínica da fisioterapia em portadores da DMD.

9. Considerações Finais

Embora existam estudos científicos que comprovem a eficácia do exercício excêntrico sobre as características morfológicas e funcionais de músculos distróficos, vale ressaltar que estudos experimentais devem ser projetados de maneira cautelosa no âmbito humano. Esclarecimentos adicionais sobre os mecanismos envolvidos na adaptação do músculo distróficos sob ação de protocolos de exercícios físicos, ainda requerem mais investigações.

10. Referências

- ABDEL-SALAM, E.; ABDEL-MEGUID, I.; KORRAA, S. S. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. XXVIII, n. 13, p. 94–100, 2009.
- AIRES, M. DE M. **Fisiologia**. 4ª ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALDRICH, T. K.; UHRLASS, R. M. Weaning from mechanical ventilation: Successful use of modified inspiratory resistive training in muscular dystrophy. **Critical Care Medicine**, 1987.
- ANDERSON, J. E.; BRESSLER, B. H.; OVALLE, W. K. Functional regeneration in the hindlimb skeletal muscle of the mdx mouse. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 515, n. 9, p. 499–515, 1988.
- BALTGALVIS, K. A. et al. Exercise Training Improves Plantarflexor Muscle Function in mdx Mice. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 44, n. 9, p. 612–626, 2012.
- BATES, G. et al. Molecular , cellular , and muscle strip mechanics of the mdx mouse diaphragm. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 2, p. 873–880, 2013.
- BAUMGARTNER, M.; ARGÜELLO RUIZ, D. **Distrofia Muscular De Duchenne**. [s.l: s.n.].
- BENEDINI-ELIAS, P. C. O. et al. Post-immobilization eccentric training promotes greater hypertrophic and angiogenic responses than passive stretching in muscles of weanling rats. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 3, p. 503–513, 2014.
- BICAS, H. E. A. Células satélites musculares. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 67, n. 4, p. 681–687, 2004.
- BIZARIO, J. C. DA S. et al. Imatinib mesylate ameliorates the dystrophic phenotype in exercised mdx mice. **Journal of Neuroimmunology**, 2009.
- BLAKE, D. J. et al. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 291–329, 2002a.
- BLAKE, D. J. et al. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. **Physiol. Rev**, p. 291–329, 2002b.
- BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J. Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat , Mouse , and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
- BOFF, S. R. Artigo de Revisão: The muscle fiber and the factors that interfere with its phenotype. **Acta Fisiatrica**, v. 15, n. 2, p. 111–116, 2008.
- BOLDRIN, L.; ZAMMIT, P. S.; MORGAN, J. E. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. **Stem Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 20–29, 2015.
- BOSTICK, B. et al. Cardiac Expression of a Mini-dystrophin That Normalizes Skeletal Muscle Force Only Partially Restores Heart Function in Aged Mdx Mice. **The American Society of Gene Therapy**, v. 17, n. 2, p. 253–261, 2008.
- BOUCHENTOUF, M. et al. Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, 2006.
- BRIGUET, A. et al. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 10, p. 675–682, 2004.
- BRUSSEE, V.; TARDIF, F.; TREMBLAY, J. P. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. **Neuromuscular disorders : NMD**, v. 7, n. 8, p. 487–92, dez. 1997.
- BULFIELD, G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 4, p. 1189–1192, 1984.
- BURNS, D. P. et al. Restoration of pharyngeal dilator muscle force in dystrophin-deficient (mdx) mice following co-treatment with neutralizing interleukin-6 receptor antibodies and urocortin 2. **Exp Physiol**, v. 102, n. 9, p. 1177–1193, 2017.
- BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy , part 1 : diagnosis , and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77–93, 2010.
- CALL, J. A. et al. Progressive resistance voluntary wheel running in the mdx mouse. **Muscle & nerve**, v. 42, n. 6, p. 871–80, dez. 2010.
- CALVO, S. et al. Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. **Molecular and cellular biology**, 1999.

CAMPBELL, K. S.; MOSS, R. L. History-dependent mechanical properties of permeabilized rat soleus muscle fibers. **Biophys J**, v. 82, n. 2, p. 929–943, 2002.

CANEPARI, M. et al. ACTIN SLIDING VELOCITY ON PURE MYOSIN ISOFORMS FROM DYSTROPHIC MOUSE MUSCLES. **Muscle Nerve**, n. August, p. 249–256, 2009.

CAPOGROSSO, R. F. et al. Contractile efficiency of dystrophic mdx mouse muscle : in vivo and ex vivo assessment of adaptation to exercise of functional end points. **J Appl Physiol**, v. 30, p. 828–843, 2017.

CAROMANO, F. A. Características do portador de distrofia muscular de Duchenne (DMD)-revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 3, 1999.

CARTER, G. T. et al. EFFECT OF VOLUNTARY WHEEL-RUNNING EXERCISE ON MUSCLES OF THE mdx MOUSE. **Neurobiology of Disease**, v. 5, n. 4, p. 323–332, 1995.

CARTER, G. T.; ABRESCH, R. T.; FOWLER, W. M. Adaptations to exercise training and contraction-induced muscle injury in animal models of muscular dystrophy. **American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists**, v. 81, n. 11 Suppl, p. S151-61, 2002.

CHOI, S. Age-related functional changes and susceptibility to eccentric contraction-induced damage in skeletal muscle cell. **Integrative Medicine Research**, v. 5, n. 3, p. 171–175, 2016.

COIRAULT, C. et al. Velocity of Actomyosin Sliding in Vitro Is Reduced in Dystrophic Mouse Diaphragm. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. 250–253, 2002.

CORNACHIONE, A. et al. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 18, n. 4, p. 453–461, 2008.

CORNACHIONE, A. et al. Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 277–282, 2011a.

CORNACHIONE, A. S. et al. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. **Acta Histochem Cytochem**, v. 44, n. 2, p. 43–50, 2011b.

CORNACHIONE, A. S. et al. Effects of eccentric exercise in rehabilitation of phasic and tonic muscles after leg immobilization in rats. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 8, p. 1216–1224, 2014.

CORNACHIONE, A. S.; RASSIER, D. E. A non-cross-bridge, static tension is present in permeabilized skeletal muscle fibers after active force inhibition or actin extraction. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 302, n. 3, p. C566 LP-C574, 2012.

COULTON, G. R. et al. The mdx mouse skeletal muscle myopathy. I. A histological, morphometric and biochemical investigation. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 14, p. 53–70, 1988.

CULLEN, M.; JAROS, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathologica**, v. 77, n. 1, p. 69–81, 1988.

DECONINCK, N. et al. Consequences of the combined deficiency in dystrophin and utrophin on the mechanical properties and myosin composition of some limb and respiratory muscles of the mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 8, p. 362–370, 1998.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatr Neurol**, v. 36, n. 1, p. 1–7, 2007.

DIMARCO, A. F. et al. The effects of inspiratory resistive training on respiratory muscle function in patients with muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, 1985.

DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. P. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: An overview of current mouse models. **Current Opinion in Genetics and Development**, 2002.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, p. 687–695, 2002.

EMERY, A. E.; MUNTONI, F.; QUINLIVAN, R. C. **Duchenne muscular dystrophy**. Oxford: OUP Oxford, 2015.

EVANS, W. J. et al. Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 61, n. 5, p. 1864–8, nov. 1986.

FÉASSON, L. et al. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in

response to eccentric exercise in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 543, n. 1, p. 297–306, ago. 2002.

FERRY, A. et al. EFFECT OF VOLUNTARY PHYSICAL ACTIVITY INITIATED AT AGE 7 MONTHS ON SKELETAL HINDLIMB AND CARDIAC MUSCLE FUNCTION IN mdx MICE OF BOTH GENDERS. **Muscle & nerve**, v. 52, n. 5, p. 788–794, 2015.

FRINCHI, M. et al. Recovery of Damaged Skeletal Muscle in mdx Mice through Low-intensity Endurance Exercise. **International Journal of Sports Medicine**, p. 19–27, 2014.

GAIAD, T. P. et al. Low-intensity training provokes adaptive extracellular matrix turnover of a muscular dystrophy model. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 13, n. 6, p. 693–703, 2017.

GARTON, F. et al. Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibre morphometry analysis. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, n. 8, p. 540–547, 2010.

GILLIS, J. M. Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 20, p. 605–625, 1999.

GLESBY, M. J. et al. SERUM CK, CALCIUM, MAGNESIUM, AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MDX MOUSE MUSCULAR DYSTROPHY MARSHALL. **Muscle & Nerve**, v. 11, n. August, p. 852–856, 1988.

GOYENVALLE, A. et al. Therapeutic approaches to muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. R1, p. R69–R78, 15 abr. 2011.

GREGOR, R. J. et al. Mechanics of Slope Walking in the Cat: Quantification of Muscle Load, Length Change, and Ankle Extensor EMG Patterns. **J Neurophysiol**, p. 1397–1409, 2006.

GROUNDS, M.; GROUNDS, M. Quantification of histopathology in Haematoxylin and Eosin stained muscle sections Official reviewer. **Treat-NMD Neuromuscular Network**, n. May 18th, 2010, p. 1–13, 2014.

GUIRAUD, S. et al. Embryonic myosin is a regeneration marker to monitor utrophin-based therapies for DMD. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 2, p. 307–319, 2019.

GUMERSON, J. D. et al. Soleus muscle in glycosylation-deficient muscular dystrophy is protected from contraction-induced injury. **Am J Physiol Cell Physiol.**, p. 1430–1441, 2010.

GUSSONI, E. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, v. 401, n. 6751, p. 390–394, 1999.

GUSSONI, E.; BLAU, H. M.; KUNKEL, L. M. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. **Nature Medicine**, v. 3, n. 9, p. 970–977, 1 set. 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAKIM, C. H.; GRANGE, R. W.; DUAN, D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. **Journal of Applied Physiology**, 2011.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, 2001.

HAYES, A; WILLIAMS, D. A. Contractile function and low-intensity exercise effects of old dystrophic (mdx) mice. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 4 Pt 1, p. C1138-44, 1998.

HAYES, A.; LYNCH, G.; WILLIAMS, D. The effects of endurance exercise on dystrophic mdx mice. I. Contractile and histochemical properties of intact muscles. **Proc Biol Sci**, v. 253, p. 19–25, 1993.

HAYES, A.; WILLIAMS, D. A. Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 80, n. 2, p. 670–9, fev. 1996.

HAYWARD, R. et al. Effects of dietary protein on enzyme activity following exercise-induced muscle injury. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 3, p. 414–20, mar. 1999.

HERMES, D. A. et al. Sex influences diaphragm muscle response in exercised mdx mice. v. 42, p. 1611–1621, 2018a.

HERMES, T. DE A. et al. Sex influences diaphragm muscle response in exercised mdx mice. **Cell Biology International**, n. September 2018, p. 1–32, 2018b.

HOFFMAN, E. P.; BROWN, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, 1987.

HOURDÉ, C. et al. Voluntary Physical Activity Protects from Susceptibility to Skeletal Muscle Contraction e Induced Injury But Worsens Heart Function in mdx Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 5, p. 1509–1518, 2013.

HYZEWICZ, J. et al. Low intensity training of mdx mice reduces carbonylation and increases expression levels of proteins involved in energy metabolism and muscle contraction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 82, p. 122–136, 2015.

HYZEWICZ, J.; RUEGG, U. T.; TAKEDA, S. Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. **Journal of neuromuscular diseases**, v. 2, n. 4, p. 325–342, 2015.

ISNER-HOROBETI, M.-E. et al. Eccentric Exercise Training: Modalities, Applications and Perspectives. **Sports Medicine**, v. 43, n. 6, p. 483–512, 2013.

ITAI, Y.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Morphological changes in rat hindlimb muscle fibres during recovery from disuse atrophy. p. 217–224, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2017.

KACZOR, J. J. et al. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 145–154, 2007.

KARGACIN, M. E.; KARGACIN, G. J. The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1290, p. 4–8, 1996.

KARPATI, G. et al. Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. **The American journal of pathology**, v. 135, n. 1, p. 27–32, jul. 1989.

KJAER, M. et al. **Textbook of Sports Medicine: Basic Science and Clinical Aspects of Sports Injury and Physical Activity**. Oxford: BMJ, 2003.

KLEIN, S. M. et al. Circulating serum CK level vs. muscle impairment for in situ monitoring burden of disease in Mdx-mice. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 65, n. 4, p. 327–334, 2017.

KOBAYASHI, Y. M. et al. Endpoint measures in the mdx mouse relevant for muscular dystrophy pre-clinical studies. **Neuromuscular Disorders**, 2012.

KRAEMER, W. J.; FLECK, S. J.; DESCHENES, M. R. **Fisiologia do exercício: teoria e prática**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2016.

LIAO, P. et al. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- α . **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 32, p. 599–607, 2010.

LINDSAY, A. et al. Variable cytoplasmic actin expression impacts the sensitivity of different dystrophin-deficient mdx skeletal muscles to eccentric contraction. **The FEBS Journal**, p. 1–15, 2019.

LOU, J. et al. Muscle injury induced by different types of contractions in dystrophic mdx mice. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 32, n. 6, p. 411–419, 2012.

LOVERING, R. M.; BROOKS, S. V. Eccentric exercise in aging and diseased skeletal muscle : good or bad ? **J Appl Physiol**, v. 116, p. 1439–1445, 2014.

LUCA, A. DE. Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice. **Treat-NMD Neuromuscular Network**, n. 1d, p. 1–11, 2014.

LYNCH, G.; HAYES, A.; LAM, M. The effects of endurance exercise on dystrophic mdx mice . II . Contractile properties of skinned muscle fibres. **Proc. R. Soc. Lond.**, n. 253, p. 27–33, 1993.

LYNCH, G. S. et al. Contraction-induced injury to single permeabilized muscle fibers from mdx, transgenic mdx, and control mice. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 2007, p. 1290–1294, 2000.

MARINI, J. F. et al. Expression of myosin heavy chain isoforms in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers. **Neuromuscular disorders : NMD**, v. 1, p. 397–409, 1991.

MARKERT, C. D. et al. Exercise and duchenne muscular dystrophy: Where we have been and where we need to go. **Muscle & Nerve**, v. 45, n. 5, p. 746–751, maio 2012.

MATHUR, S. et al. Age-Related Differences in Lower-Limb Muscle Cross-Sectional Area and Torque Production in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 91, n. 7, p. 1051–1058, 2010.

MCARDLE, A.; EDWARDS, R. H. T.; JACKSON, M. J. Effects of contractile activity on muscle damage in the dystrophin-deficient. p. 367–371, 1991.

MCBRIDE, T. A.; GORIN, F. A.; CARLSEN, R. C. Prolonged recovery and reduced adaptation in aged rat muscle following eccentric exercise. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 6374, n. 95, 1995.

MCGREEVY, J. W. et al. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 195–213, 1 mar. 2015.

MENDELL, J. R. et al. Myoblast Transfer in the Treatment of Duchenne's Muscular Dystrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 13, p. 832–838, 28 set. 1995.

MINOZZO, F. C.; RASSIER, D. E. Effects of blebbistatin and Ca²⁺ concentration on force produced during stretch of skeletal muscle fibers. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 299, n. 5, p. C1127-35, 2010.

MORICI, G. et al. Mild Aerobic Exercise Training Hardly Affects the Diaphragm of mdx Mice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 8, p. 2044–2052, 2017.

MUNTONI, F. et al. Muscular weakness in the mdx mouse. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 120, p. 71–77, 1993.

MUSUMECI, G. et al. Somitogenesis : From somite to skeletal muscle. **Acta Histochemica**, 2015.

NAKAMURA, A. et al. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. **FEBS Letters**, 2002.

OTTENHEIJM, C. A. C.; GRANZIER, H.; LABEIT, S. The sarcomeric protein nebulin: Another multifunctional giant in charge of muscle strength optimization. **Frontiers in Physiology**, v. 3 FEB, n. February, p. 1–9, 2012.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J Neurol Sci**, v. 129, p. 97–105, 1995.

PEDEMONTE, M. et al. Early decrease of IIX myosin heavy chain transcripts in Duchenne muscular dystrophy. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 255, n. 2, p. 466–9, 1999.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy research and technique**, v. 50, n. 6, p. 500–9, 15 set. 2000.

PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise : mechanism , mechanical signs , adaptation and clinical applications. **Journal of Physiology**, v. 537, n. 2, p. 333–345, 2001.

RACHEL M. LANDISCH, B. et al. ADAPTIVE AND NONADAPTIVE RESPONSES TO VOLUNTARY WHEEL RUNNING BY mdx MICE. **Muscle Nerve**, v. 38, n. 4, p. 1290–1303, 2008.

RAUE, U. et al. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18 –30 yr) and old (80 – 89 yr) women. **J Appl Physiol**, 2006.

RODINO-KLAPAC, L. R.; MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Update on the treatment of duchenne muscular dystrophy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, 2013.

RODRIGUES, M. F. et al. Effects of yoga breathing exercises on pulmonary function in patients with Duchenne muscular dystrophy: an exploratory analysis. **J Bras Pneumol**, 2014.

ROY, R. et al. EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. **American Physiological Society**, 1991.

RUITEN, H. J. A. VAN et al. Why are some patients with Duchenne muscular dystrophy dying young : An analysis of causes of death in North East England. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 20, n. 6, p. 904–909, 2016.

SARDONE, V. et al. A novel high-throughput immunofluorescence analysis method for quantifying dystrophin intensity in entire transverse sections of Duchenne muscular dystrophy muscle biopsy samples. **PLOS ONE**, p. 1–21, 2018.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. In: **Biometrika**. [s.l.: s.n.]. v. 78p. 719–727.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–531, 2011.

SCHILL, K. E. et al. Muscle damage, metabolism, and oxidative stress in mdx mice: Impact of aerobic running. **Muscle and Nerve**, v. 54, n. 1, p. 110–117, 2016.

SENZI, R. D. E. et al. **Influência do n-acetilcisteína (nac) no processo de degeneração muscular em camundongos distróficos**. [s.l.] UNICAMP, 2010.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana - uma abordagem integrada**. 5ª ed ed. Porto Alegre:

Artmed, 2010.

SKUK, D. et al. Dystrophin Expression in Muscles of Duchenne Muscular Dystrophy Patients After High-Density Injections of Normal Myogenic Cells. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 65, n. 4, p. 371–386, 2006.

SONOBE, T. et al. Sex differences in intracellular Ca²⁺ accumulation following eccentric contractions of rat skeletal muscle in vivo. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, p. 1006–1012, 2010.

STEDMAN, H. H. et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, 1991.

TAKEKURA, H. et al. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. **J. Physiol**, v. 533, n. Pt 2, p. 571–583, 2001.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. 4, p. 518–534, 2016.

TALMADGE, R. J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. **Muscle & nerve**, v. 23, n. 5, p. 661–79, maio 2000.

TALMADGE, R. J.; ROY, R. R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. **J Appl Physiol**, v. 75, n. 5, p. 2337–2340, 1993.

THOMASSIAN, A. et al. Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de eqüinos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 44, n. 3, p. 183–190, 2007.

TOPIN, N. et al. Dose-dependent effect of individualized respiratory muscle training in children with Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular disorders : NMD**, 2002.

VILOZNI, D. et al. Computerized respiratory muscle training in children with Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular disorders : NMD**, 1994.

WANKE, T. et al. Inspiratory muscle training in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Chest**, 1994.

WEBSTER, C. et al. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 52, n. 4, p. 503–513, 1988.

WINEINGER, M. A. et al. Effects of aging and voluntary exercise on the function of dystrophic muscle from mdx mice. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v. 77, n. 1, p. 20–7, 1998.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 51, p. 759–764, 2015.

ZWEYER, M. et al. The ontogeny of soleus muscles in mdx and wild type mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 57–64, 2005.

Anexo A – Aprovação Comitê Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP
3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 173/2013, sobre o projeto intitulado “*Efeitos do exercício excêntrico na reabilitação do músculo esquelético de camundongos mdx após longo período de treinamento. Avaliações morfológica, funcional e molecular*”, sob a responsabilidade da **Doutora Anabelle Silva Cornachione** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de fevereiro de 2014.

We certify that the protocol n° 173/2013, entitled “*Effects of eccentric exercise in skeletal muscle rehabilitation of mdx mice after long period of training. Morphological, functional and molecular evaluations*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 02/26/2014.

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício



Anexo C – Certificado de participação *European Muscle Conference*



K&M Congress PCO and Travel Agency
BUDAPEST Podmaniczky utca 75. H-1064 HUNGARY
Phone: +36-(1)301-2000, Fax: +36-(1)301-2001
E-mail: info@kmcgress.com Homepage: www.kmcgress.com

Phone: +55/16991117218

Name: **Dr. Paulo Silva Pedrazzani**

Fax: +55/16991117218

Address: UFSCar - Universidade Federal de Sao Carlos



Sao Carlos

Rua Adolfo Catani 822, ap 21

Reg.ID: * 0 1 5 9 *

13560470 Brazil



**EUROPEAN MUSCLE CONFERENCE
2018 BUDAPEST, HUNGARY**

On behalf of the organizers hereby we confirm that

Paulo Silva Pedrazzani

(Brazil)

participated in the 47th European Muscle Conference

in Budapest from August 30 - September 3, 2018.

3 September 2018

**Dr. Miklós Kellermayer
EMC2018 Chairman**

Anexo D – Cópia de submissão de artigo científico à revista *Muscle & Nerve*

Muscle & Nerve



Muscle and Nerve

Low-intensity eccentric training improves characteristics of soleus muscle of mdx mouse

Journal:	<i>Muscle and Nerve</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Basic Science Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pedrazzani, Paulo Araújo, Tatiana Sigoli, Emilly Ramilly, Isabella Cornachione, Anabelle
Keywords:	Duchenne Muscular Dystrophy, mdx mice, low-intensity training, eccentric exercise, rehabilitation, fiber types

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.