
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UFSCar/UNESP**

TATIANA OLIVEIRA PASSOS DE ARAÚJO

“Efeitos do treinamento aeróbio no conteúdo da proteína utrofina e nas propriedades contráteis do músculo tibial anterior de camundongos mdx: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne”.

SÃO CARLOS – SP
JULHO DE 2020

TATIANA OLIVEIRA PASSOS DE ARAÚJO

“Efeitos do treinamento aeróbio no conteúdo da proteína utrofina e nas propriedades contráteis do músculo tibial anterior de camundongos mdx: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne”.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, no Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia do Exercício

Orientadora: Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

SÃO CARLOS – SP

JULHO DE 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tatiana Oliveira Passos de Araújo, realizada em 31/07/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione (UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)

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

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

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

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPQ/UNIVERSAL

Processo: 408795/2018-2.

Dedicatória

*Queridos pais **Honório e Eva**, a emoção me cala, ficando a certeza de que hoje lhes ofereço mais essa conquista, pois tudo o que tenho feito foi receber...*

Em todas as etapas vencidas da minha vida, envolto em clima de encantamento e alegria, procuro seus olhos na plateia. Os mesmos olhos que, ansiosos, acompanharam meus primeiros passos, passaram noites velando o meu sono agitado e me viram crescer. E de vocês, ainda recebi valores que me transformaram em uma mulher responsável e consciente. Quantas vezes sacrificaram os seus sonhos em favor dos meus. Meu cansaço foi sentido e compartilhado por vocês, numa palavra de incentivo ou mesmo num silêncio.

Dedico este trabalho a vocês, pessoas tão presentes e significantes em minha vida.

Muito obrigada pelo apoio, carinho, companheirismo, amor, dedicação e principalmente pelo incentivo em me encorajar nos momentos mais difíceis durante essa pós-graduação, momentos estes que vocês conhecem como ninguém.

Vocês me conduziram por sábios caminhos, me deram a vida e se deram inteiros, renunciando aos seus sonhos para que, muitas vezes pudesse realizar os meus. Sei que cada vitória que esta carreira me proporcionar, vocês certamente estarão por trás dela, como estiveram em cada momento de minha vida.

Dedico a vocês esta, bem como todas as minhas demais conquistas, e sendo esta uma conquista e vitória não apenas minha, mas nossa.

Com o mais profundo orgulho, admiração e gratidão de serem meus pais.

Serei eternamente grata,

Amo muito vocês!

Agradecimentos

Sou grata pela vida e pelas pessoas que fazem parte dela, mas acima de tudo grato à **Deus** por me conceder tudo isso. Se finda mais uma etapa da minha vida, e nesse caminho ELE se fez presente a cada instante. Agradeço ao senhor Deus por me possibilitar a realização de mais uma conquista. Obrigada por ser meu Pai nos momentos de alegria, por ser meu caminho nos momentos de incertezas e por ser meu refúgio nos momentos difíceis. A Ti, senhor, agradeço mais essa conquista, confiando que continuarás a conduzir meus passos em direção a tua vontade, perfeita e soberana.

Agradeço de forma especial minha orientadora **Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione**, uma pessoa amiga, companheira, prestativa, que esteve presente em todo momento durante a realização desse trabalho, por todo seu empenho em me conduzir firme no meu objetivo e principalmente por acreditar em minha capacidade. Minha gratidão, pela amizade, pela paciência e carinho, pelos ensinamentos e pela contribuição de minha formação profissional, pois sem a mesma, não conseguiria completar minha caminhada. Se cheguei ao fim, foi porque a cada passo dado, ela esteve ao meu lado no decorrer desta conquista.

Agradeço aos meus filhos **Sophia e Théo** por compreenderem as várias horas em que estive ausente por causa do desenvolvimento deste trabalho e me perdoem os momentos de tensão e impaciência com vocês. Tudo o que me comprometo a fazer, é sempre pensando no bem estar de vocês, mesmo que para isso haja sacrifícios. É através de vocês que eu consigo enxergar o meu melhor, e também as minhas maiores fraquezas, mas com o sorriso de vocês, a minha energia é renovada, minha dor amenizada e o meu coração acalentado. Vocês são a energia e a força que me movem para frente, obrigada pelo amor incondicional que vocês me proporcionam. Amo vocês infinitamente.

Agradeço meu esposo **Wanderson Marcasso**, pelas inúmeras vezes que ele me enxergou melhor do que eu sou. Agradeço pelo seu amor, por todo seu carinho e dedicação comigo, pelos incentivos que me deu para continuar quando meu maior desejo era parar. Obrigada por todo o tempo que destina a mim e por querer sempre o meu melhor. Ninguém melhor do que você para compartilhar minha vida e todas as minhas conquistas. Amo você!

Agradeço as alunas **Patty Santos** (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar), **Andressa Duarte** e **Bruna Pato** (Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da USP de Ribeirão Preto) pela ajuda e todo conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a **Daiane Leite da Roza**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pelo seu auxílio estatístico.

Agradeço ao Professor **Dr. Wladimir Rafael Beck** do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico do Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar, por conceder o espaço físico durante os experimentos.

Agradeço à Professora **Dra. Heloísa S. S. de Araújo** por permitir acesso ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e o uso de equipamentos que foram essenciais para o desenvolvimento de algumas técnicas no decorrer deste estudo.

Agradeço ao Professor **Dr. Thiago Russo** do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisioterapia – UFSCar, por compartilhar seu laboratório e equipamento durante os experimentos.

Agradeço ao **CNPQ/UNIVERSAL-** Processo: 408795/2018-2 pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos colegas de laboratório **Paulo Pedrazzani, Emilly Sigoli e Lucas Toniolo** pela colaboração e amizade.

Enfim, agradeço à todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

Introdução: A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum e severa distrofia muscular causada pela ausência da proteína distrofina que determina, perda progressiva das fibras musculares e fraqueza muscular. Por se tratar de uma doença que não tem cura, inúmeros estudos buscam tratamentos paliativos que possam amenizar os efeitos da doença e proporcionar melhor qualidade de vida ao portador. O exercício aeróbio de baixa intensidade vem mostrando resultados promissores na reabilitação do músculo esquelético distróficos frente ao conteúdo da proteína utrofina, proteína homóloga à distrofina. Contudo, poucos são os relatos científicos que envolvem análises do conteúdo da utrofina após longo período de treinamento aeróbio de baixa intensidade, em músculos distróficos. Sendo assim, nosso objetivo foi avaliar o impacto do treinamento aeróbio de baixa intensidade sobre o conteúdo da proteína utrofina, no músculo tibial anterior de camundongos *mdx*. **Métodos:** Foram utilizados 36 camundongos machos, 12 animais *Wild Type* C57BL-10 (n=6/grupos sedentários 21 e 37) e 24 animais *mdx* C57BL/10-Dmd^{mdx} (n=6/grupos sedentários 21 e 37 e n=6/grupos treinados 21 e 37 sessões). Os animais treinados foram submetidos à 21 e 37 sessões de exercício concêntrico de baixa intensidade em esteira plana, e durante o período foi realizado teste de preensão palmar dos animais. Após as sessões, os animais foram eutanasiados, e amostras de sangue foram obtidas, para análise da proteína creatina quinase (CK), e o músculo tibial anterior excisado para análises morfológica e bioquímica. **Resultados:** Os animais *mdx* mostraram redução significativa da força e do conteúdo de utrofina, alterações morfológicas importantes, como: necrose, concomitante ao aumento de CK, quando comparados aos animais *Wild Type*. Após 21 e 37 sessões de treinamento foi observado melhora da força de preensão palmar e dos aspectos morfológicos, e aumento do conteúdo da utrofina, quando comparados aos animais *mdx* sedentários. Contudo, os animais submetidos às 37 sessões mostraram melhoras mais significativas quando comparados aos treinados por 21 sessões. **Conclusão:** A manutenção do treinamento por um longo período demonstrou estimular o aumento do conteúdo da proteína utrofina, melhorar a função e a morfologia do músculo tibial anterior de camundongos *mdx*.

Palavras chaves: Distrofia Muscular de Duchenne, camundongo *mdx*, exercício aeróbio de baixa intensidade, utrofina.

ABSTRACT

Introduction: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common and severe muscular dystrophy caused by the absence of the dystrophin protein that determines, progressive loss of muscle fibers and muscle weakness. It is a disease that has no cure, numerous studies seek palliative treatments that can mitigate the effects of the disease and provide a better quality of life for the patient. Low-intensity aerobic exercise has shown promising results in the rehabilitation of dystrophic skeletal muscle due to the content of utrophin protein, a protein homologous to dystrophin. However, there are few scientific reports that involve analysis of utrophin content after a long period of low-intensity aerobic training in dystrophic muscles. Therefore, our objective was to evaluate the impact of low-intensity aerobic training on the content of utrophin protein, in the anterior tibial muscle of mdx mice. **Methods:** 36 male mice were used, 12 Wild Type C57BL-10 animals (n = 6 / sedentary groups 21 and 37) and 24 mdx C57BL / 10-Dmdmdx animals (n = 6 / sedentary groups 21 and 37 and n = 6 / trained groups 21 and 37 sessions). The animals were submitted a low intensity running sessions (21 and 37) on a flat treadmill, and during the period grip strength test was performed. After the sessions, the animals were euthanized, and blood samples were obtained for analysis of the protein creatine kinase (CK), and the anterior tibial muscle excised for morphological and biochemical analysis. **Results:** The mdx animals showed a significant reduction in strength and utrophin content, important morphological changes, such as: necrosis, concomitant to the increase in CK, when compared to Wild Type animals. After 21 and 37 training sessions, there was an improvement in handgrip strength and morphological aspects, and an increase in utrophin content when compared to sedentary mdx animals. However, the animals submitted to the 37 of training showed more significant improvements when compared to those trained for 21 sessions. **Conclusion:** The maintenance of training for a long period has been shown to stimulate the increase in the content of utrophin protein, improve the function and morphology of the anterior tibial muscle of mdx mice.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy, mdx mice, low intensity aerobic exercise, utrophin.

Lista de Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina Trifosfato

BCA - Ácido Bicinconínico

CA²⁺ - Cálcio

CK - Creatina Quinase

DAGC - Complexo de glicoproteínas associadas à distrofina

DMD - Distrofia muscular de Duchenne

DSHB - Developmental Studies Hybridoma Bank

ECL - Enhanced chemiluminescence

EDL – Extensor longo dos dedos

EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético

FP – Força de Preensão

HCL - Ácido clorídrico

HE – Hematoxilina-eosina

HRP - Horseradish peroxidase

IF – Imunofluorescência

KCl – Cloreto de potássio

KDa – Kilodalton

mdx - Camundongo C57BL/10-Dmd^{mdx}

NaCl – Cloreto de sódio

QI – Quociente de inteligência

SNC – Sistema nervoso central

TA – Tibial anterior

WB – *Western Blot*

21DSEDWT – Grupo de camundongos controle, sedentários *wild type* 21 dias

37DSEDWT – Grupo de camundongos controle, sedentários *wild type* 37 dias

21DSEDMDX – Grupo de camundongos sedentários com distrofina 21 dias

21DTRMDX – Grupo de camundongos 21 sessões de treinamento com distrofia

37DSEDMDX - Grupo de camundongos sedentários com distrofia 37 dias

37DTRMDX – Grupo de camundongos 37 sessões de treinamento com distrofia

Índice de Figuras

Figura 1 - FásCIAS Musculares	13
Figura 2 - Sarcômero relaxado e contraído	14
Figura 3 - Titina e Nebulina	15
Figura 4 - Fibra Muscular.....	16
Figura 5 - Distrofina e Utrofina.....	17
Figura 6 - Distrofina	18
Figura 7 – Avaliação temporal dos sintomas entre Humanos e Camundongos	28
Figura 8 - Grupos Experimentais.....	28
Figura 9 - Camundongos C57Bl-10.....	29
Figura 10 - Linha do tempo de treinamento	30
Figura 11 - Esteira INSIGHT	30
Figura 12 - Teste de Preensão Palmar e Aparelho de Grip Strength.....	31
Figura 13 - Linha do tempo - Teste de Preensão Palmar.....	32
Figura 14 - Dosagem de CK.....	33
Figura 15 - Excisão do Músculo Tibial Anterior.....	33
Figura 16 - Criostato Leica.....	34
Figura 17 - Figura ilustrativa da padronização para quantificação da imunomarcção da proteína utrofina no TA	35
Figura 18 - Teste de Preensão Palmar em camundongos <i>mdx</i>	38
Figura 19 - Níveis séricos de CK nos diferentes grupos	40
Figura 20 - Fotomicrografia de cortes histológicos do TA pela técnica de IF	41
Figura 21 - Fotomicrografias do músculo TA de camundongos <i>mdx</i> - HE	42
Figura 22 - Análise qualitativa da imunomarcção para utrofina no TA de animais <i>mdx</i>	43
Figura 23 - Análise quantitativa da imunomarcção da utrofina no TA de camundongos <i>mdx</i>	44
Figura 24 - Membranas de <i>Western Blot</i> – Utrofina + GAPDH.	45
Figura 25 - Semi-quantificação de Utrofina/GAPDH	46

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Sinais Clínicos da DMD.....21

Tabela 2 – Média do peso dos animais de cada grupo.....39

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Objetivos.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. Revisão Bibliográfica	13
3.1 Estrutura do Músculo Esquelético	13
3.1.1 Proteínas Distrofina e Utrofina	16
3.2 Distrofia Muscular de Duchenne	18
3.2.1 Modelo experimental para DMD: camundongo <i>mdx</i>	22
3.2.2 Exercício aeróbico de baixa intensidade no músculo distrófico	24
4. Métodos	27
4.1 Animais	27
4.2 Treinamento	29
4.3 Teste de Prensão Palmar	31
4.4 Quantificação da enzima creatina quinase (CK).....	32
4.5 Análise Histológica – Técnica de Coloração HE.....	33
4.6 Imunofluorescência para Distrofina e Utrofina	34
4.7 <i>Western Blot</i> para Utrofina	35
4.8 Estatística	36
5. Resultados.....	37
5.1 Teste Funcional para prensão palmar.....	37
5.2 Níveis séricos da Creatina quinase (CK)	38
5.3 Alterações qualitativas do músculo tibial anterior.....	40
5.3.1 Imunomarcção para proteína distrofina.....	40
5.3.2 Alterações histológicas do músculo tibial anterior	41
5.4 Análises qualitativa e quantitativa da Imunomarcção para proteína utrofina	42
5.5 Conteúdo de Utrofina no músculo TA – <i>Western Blot</i>	44
6. Discussão	46
6.1 Teste Funcional para Prensão Palmar	47
6.2 Alterações nos níveis séricos da Creatina Quinase (CK).....	49
6.3 Alterações histológicas do músculo tibial anterior	51
6.4 Alterações na imunomarcção e no conteúdo da proteína utrofina	53
7. Conclusão	55
7. Referências	57
ANEXOS	69

1. Introdução

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum e severa distrofia muscular que acomete em torno de 1 a cada 5.000 meninos nascidos vivos (KENNEDY, *et al.*, 2018). A DMD é causada pela mutação da região Xp21 no cromossomo sexual X, o que determina ausência da proteína distrofina levando à perda progressiva das fibras musculares (degeneração) e conseqüentemente, fraqueza muscular. Os portadores da DMD apresentam um declínio acentuado das suas mobilidades por volta dos 7-10 anos, devido ao alto processo degenerativos das fibras musculares, o que culmina em fraqueza acentuada da musculatura de membros inferiores, podendo levar esses meninos à cadeira de rodas. A progressão da doença também afeta o músculo esquelético diafragma e o cardíaco determinando na maioria das vezes morte prematura em torno de 15 anos de idade (ANNEXSTAD, *et al.*; 2014).

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, promovendo a estabilidade da membrana sarcoplasmática, proporcionando força física para as fibras musculares (GOYENVALLE, *et al.*, 2011; FERNANDES, *et al.*, 2019). Estudos mostraram que a deficiência ou ausência da distrofina pode determinar aumento da fosforilação de proteínas, alteração na homeostase do cálcio intracelular, desencadeando proteólise e ativação do proteassoma, instabilidade e perda da integridade do sarcolema, levando assim, as fibras musculares à processos necróticos importantes, com liberação de enzimas que poderão induzir a apoptose (INFANTE, *et al.*, 1999; DECONINCK, *et al.*, 2007). Com a progressão da doença, as recorrentes lesões determinam uma resposta inflamatória crônica no tecido contrátil, acometendo sua capacidade regenerativa e o substituindo por tecidos fibroso e adiposo, reduzindo cada vez mais a força de contração gerada pelo músculo (FERNANDES, *et al.*, 2019).

A redução da força muscular culmina em quedas frequentes quando esses meninos atingem a idade pré-escolar, entre 2 a 7 anos. Nesta fase, o diagnóstico pode ser por mapeamento genético, biópsia muscular e dosagem dos níveis séricos para creatina quinase (CK) (DARRAS, *et al.*, 2000). Este último método é o mais rápido e barato para um diagnóstico inicial. A CK é encontrada no tecido muscular e se encontra aumentada na corrente sanguínea quando há dano muscular. A principal atividade dessa enzima é

fosforilar de forma reversível a creatina as custas do ATP, como forma adicional de armazenamento de energia em ligações fosfatadas (CACCHIARELLI, *et al.*; 2011; STREHLE, *et al.*; 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017). No indivíduo normal os valores para CK são em torno de 200 UI/L enquanto no portador da DMD, os valores são mais elevados, em torno de 2000 UI/L (DARRAS, *et al.*, 2000).

De acordo com a literatura científica, as fibras do tipo II (glicolíticas) são as mais acometidas pela doença, por serem mais frágeis e susceptíveis à lesões quando comparadas as fibras do tipo I (oxidativas) (WEBSTER, *et al.*, 1988; BANKS, *et al.*, 2014). Esta fragilidade pode ser justificada pelas diferenças estruturais e bioquímicas desses dois tipos de fibras. As fibras tipo I (oxidativa) expressam mais células satélites e utrofina (proteína homóloga à distrofina) quando comparado as fibras do tipo II (glicolíticas), importantes no processo de reparação tecidual principalmente, em músculos distróficos. A expressão da utrofina está relacionada diretamente com outras proteínas sinalizadoras como calcineurina e PGC-1 α , que são mais expressas nas fibras do tipo I, o que pode justificar a maior expressão desta nas fibras do tipo I, proporcionando à elas maior estabilidade sarcolemal (AL-REWASHDY, *et al.*, 2014).

Com objetivo de manter a morfologia e a funcionalidade muscular, o tecido sofre adaptações moleculares e celulares na ausência da distrofina (BANKS, *et al.*, 2008). Uma resposta adaptativa muito observada no músculo esquelético de camundongos *mdx*, modelo experimental mais utilizado da DMD, é o aumento da proteína utrofina (OHLENDIECK, *et al.*, 1991; PONS, *et al.*, 1991). A utrofina é uma proteína expressa no sarcolema e nas junções neuromuscular (JNM) e miotendinosa (JMT) do músculo esquelético durante a fase de desenvolvimento fetal. Na 12ª semana de gestação ela é substituída por sua homóloga distrofina no sarcolema (RODINO-KLAPAC, *et al.*, 2013) porém, continua sendo expressa nas junções neuromuscular e miotendinosa (ROONEY, *et al.*, 2006; PIETTE, *et al.*, 2019).

Estudos tem mostrado que a terapia com genes da utrofina pode ser um tratamento promissor para pacientes portadores de DMD pois, atua similarmente a distrofina na reparação do músculo lesado, minimizando lesões e retardando a evolução da doença (RODINO-KLAPAC, *et al.*, 2013; MCGREEVY, *et al.*; 2015). SQUIRE *et al.*, (2002) e RODINO-KLAPAC *et al.*, (2013) observaram um aumento na expressão da utrofina no músculo esquelético de camundongos *mdx*, e acreditam que este aumento pode minimizar

a degeneração muscular, como resposta protetora do tecido muscular.

Existem recursos terapêuticos, como exercício aeróbico, que podem contribuir no aumento da utrofina potencializando o efeito protetor desta proteína no músculo distrófico. O exercício físico tem mostrado ser um *stress* fisiológico importante no estímulo do remodelamento do músculo distrófico, determinando melhora da força, fadiga e da morfologia quando submetido a longos períodos de treinamento (HAYES, *et al.*, 1993; HAYES, *et al.*, 1996; HAYES, *et al.*, 1998; WINEINGER, *et al.*, 1998; FERNANDES, *et al.*, 2019). No entanto, o impacto e os mecanismos benéficos trazidos pelo exercício aeróbico no músculo distrófico são inteiramente dependentes da intensidade em que o mesmo é aplicado. Já existe um consenso na literatura que exercício de alta intensidade pode exacerbar o fenótipo distrófico, acelerando a progressão da doença. Por outro lado, quando aplicado em baixa intensidade tem mostrado efeitos benéficos e protetores pois, é capaz de aumentar expressão e conteúdo de proteínas importantes, como a utrofina. Estudos conduzidos por CALL *et al.*, (2008) e LANDISCH *et al.*, (2008) mostraram aumento da utrofina no músculo esquelético de camundongos *mdx* após treinamento aeróbio. De LUCA e colaboradores (2005) observaram aumento da proteína utrofina no músculo esquelético de camundongos *mdx* após treinamento aeróbio, em esteira motorizada.

A DMD é uma doença que não tem cura, até o presente momento. Inúmeros estudos científicos, experimentais ou com humanos, buscam tratamentos paliativos que sejam capazes de recuperar as características morfofuncionais do tecido muscular esquelético retardando assim, a progressão da doença, e proporcionando longevidade aos portadores com melhor qualidade de vida. Entender as adaptações do músculo distrófico frente ao estímulo do exercício de baixa intensidade pode nos trazer mais conhecimentos na deliberação e elucidação de recursos terapêuticos mais fidedignos e promissores na reabilitação de pacientes acometidos pela DMD.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o exercício aeróbio de baixa intensidade, aplicado a longo prazo, é uma ferramenta terapêutica eficaz na reversão das alterações negativas impostas pela ausência da distrofina no músculo tibial anterior de camundongos *mdx*: modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos contarão com:

- Análise funcional da força de preensão palmar de camundongos *mdx* e *wild type* sedentários e, *mdx* após treinamento em esteira em diferentes períodos (21 e 37 sessões), através da técnica *grip strength*;
- Análise quantitativa dos níveis séricos da enzima Creatina Quinase (CK) dos grupos estudados;
- Análise qualitativa dos aspectos gerais do músculo tibial anterior dos grupos estudados, através da técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (HE);
- Análise qualitativa das proteínas distrofina e utrofina, análise quantitativa da proteína utrofina do músculo tibial anterior de camundongos *mdx* e *wild type* sedentários e, *mdx* após treinamento em esteira em diferentes períodos (21 e 37 sessões), através da técnica de imunofluorescência;
- Análise semi-quantitativa da proteína utrofina do músculo tibial anterior de camundongos *mdx* e *wild type* sedentários e, *mdx* após treinamento em esteira em diferentes períodos (21 e 37 sessões), através da técnica de *Western Blot*.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Estrutura do Músculo Esquelético

A musculatura esquelética é composta por vários tipos de tecidos, entre eles o tecido nervoso, o tecido contrátil, o tecido vascular e o tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo desempenha importantes funções no músculo esquelético, tais como: estrutura, proteção, regeneração, entre outras. A Figura 1 ilustra de maneira clara camadas deste tecido envolvendo diferentes estruturas do tecido contrátil. A camada mais externa que envolve o músculo como um todo é denominada epimísio. À medida que o tecido conjuntivo invade camadas mais profundas há a formação do perimísio, que dá forma aos fascículos por envolver grupos de células musculares. A terceira e última camada é o endomísio responsável por revestir cada fibra, também conhecida como sarcolema (NAVARRO, 2000).

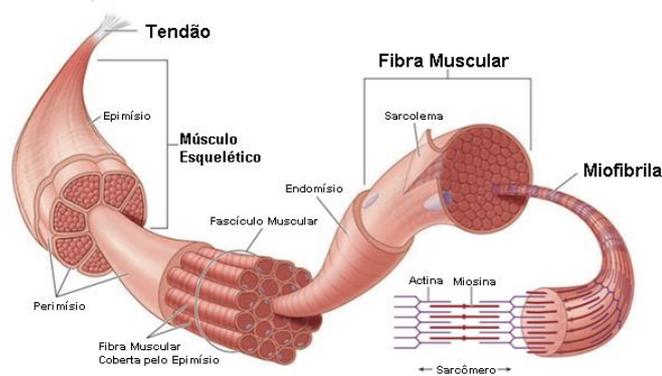


Figura 1 - FásCIAS Musculares

Fonte: Adaptado do site <https://www.iespe.com.br/blog/o-musculo-e-suas-estruturas/>

O músculo esquelético é constituído por um conjunto de células musculares conhecidas também por fibras musculares ou miofibras, de forma alongada e cilíndrica que com várias centenas de núcleos periféricos (SILVERTHORN, 2010). Essas fibras são compostas por feixes de filamentos conhecidos como miofibrilas, as quais são compostas por proteínas contráteis e não contráteis. As contráteis compreendem as proteínas miosina e actina, também conhecidas como filamentos espesso e fino, respectivamente. Esses filamentos estão organizados em paralelo o que dá a característica estriada do músculo e formam os sarcômeros (HALL, 2011; SILVERTHORN, 2017).

O sarcômero é a menor unidade contrátil do músculo esquelético e são formados tanto por proteínas contráteis como não contráteis, as quais determinam a morfologia desta unidade devido suas disposições. O sarcômero é delimitado entre duas linhas Z em ziguezague, que atuam como sítios de fixação para os filamentos delgados de actina (Figura 2). No centro do sarcômero encontra-se a linha M, composta por apenas filamentos grossos de miosina. Além dessas linhas existem bandas claras e escuras, formadas pela disposição em paralelo dos filamentos de actina e miosina. Seguindo em direção da linha Z para o centro do sarcômero (linha M) encontra-se a banda I, onde são encontrados apenas os filamentos de actina. Seguindo em direção a banda M (centro) existe uma banda escura, chamada banda A e, é nesta que há a sobreposição dos filamentos finos e grossos. Por fim, em ambos os lados da linha M existe uma banda mais clara, a banda H, formada apenas or filamentos de miosina (Figura 2) (HALL, 2011).

Durante a contração e relaxamento muscular essas bandas e linhas alteram suas disposições e espessuras. Ainda na Figura 2 é possível observar o sarcômero na posição encurtada (contração) e relaxado. É possível observar que durante a contração as linhas Z (extremidades) se aproximam da linha M (centro) reduzindo a espessura da banda I e H concomitante ao aumento da a banda A, devido ao aumento da interação das pontes cruzadas (HALL, 2011; SILVERTHORN, 2010).

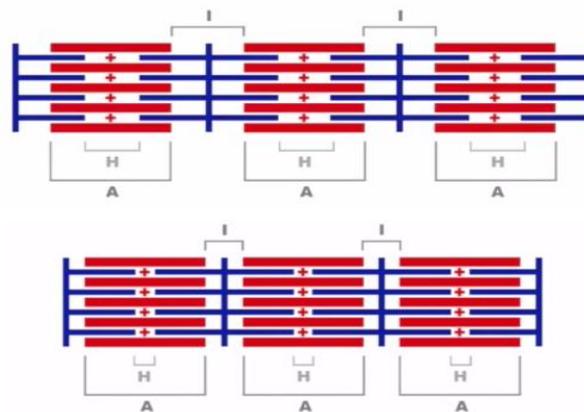


Figura 2 - Sarcômero relaxado e contraído

Fonte: <https://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic11-animal-physiology/112-movement/state-of-contraction.html>

Apesar das bandas e linhas serem caracterizadas basicamente pelas proteínas contráteis na literatura básica, existem outras proteínas importantes dentro do sarcômero porém, não contráteis. Independente de não serem proteínas contráteis, elas desempenham funções importantes tanto para manter a integridade do sarcômero durante a contração e alongamento quanto são essenciais durante os mecanismo de contração em

si. As proteínas troponina e tropomiosina representam uma pequena parte do músculo, mas possuem um importante papel na regulação do processo contrátil (NAVARRO, 2000).

As moléculas de tropomiosina estão espiraladas nos sulcos da dupla hélice da actina e durante o período de repouso, essas moléculas recobrem os locais ativos de filamento de actina, de forma a impedir que ocorra atração entre os filamentos de actina e miosina para produzir contração. Já a troponina, se encontra ligada intermitentemente ao lado das moléculas de tropomiosina e é formada por um complexo de três subunidades proteicas frouxamente ligadas, cada uma com participação específica na regulação da contração muscular. A Troponina I tem forte afinidade com a actina, a Troponina T com a tropomiosina e a Troponina C com os íons de cálcio. Acredita-se que esse complexo seja responsável pela ligação da tropomiosina com a actina. A forte afinidade da troponina pelos íons cálcio seja o evento que desencadeia o processo da contração (HALL, 2011).

O alinhamento adequado dos filamentos dentro de um sarcômero é garantido por duas proteínas bem grandes: a titina e a nebulina (Figura 3). A titina é uma molécula elástica grande, composta por mais de 25.000 aminoácidos, o que faz dela a maior molécula de proteína do corpo. Por ser muito flexível, ela atua como arcabouço que mantém os filamentos de miosina e actina em seus lugares, de modo que a maquinaria contrátil possa entrar em ação. A titina é auxiliada pela nebulina uma proteína também muito grande mas não elástica, que se dispõe lado a lado com filamentos finos e se prende ao disco Z. Ela auxilia no alinhamento dos filamentos de actina do sarcômero (SILVERTHORN, 2010).

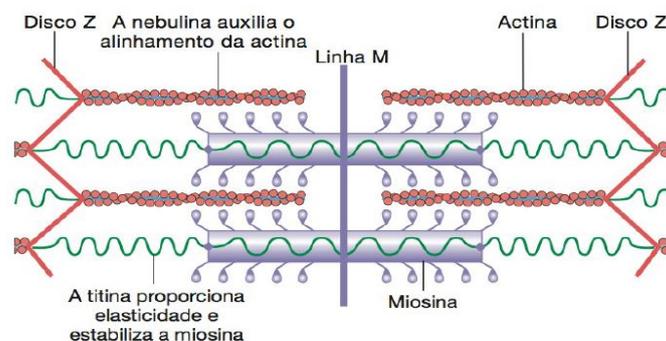


Figura 3 - Titina e Nebulina

Fonte: Silverthorn, 2010

Os músculos esqueléticos também contêm um extenso retículo sarcoplasmático que é formado por túbulos longitudinais que liberam íons Ca^{2+} , e pelas cisternas terminais que são regiões alargadas nas extremidades dos túbulos, que concentram e sequestram o Ca^{2+} o qual, é importante na contração muscular (figura 4). As cisternas terminais são adjacentes e intimamente associadas com uma rede ramificada de túbulos transversos, também conhecidos como túbulos T, onde as suas membranas são uma continuação da membrana da fibra muscular, o que torna o lúmen dos túbulos T contínuo com o líquido extracelular, conduzindo rapidamente os potenciais de ação da superfície celular para o interior da fibra (SILVERTHORN, 2017).

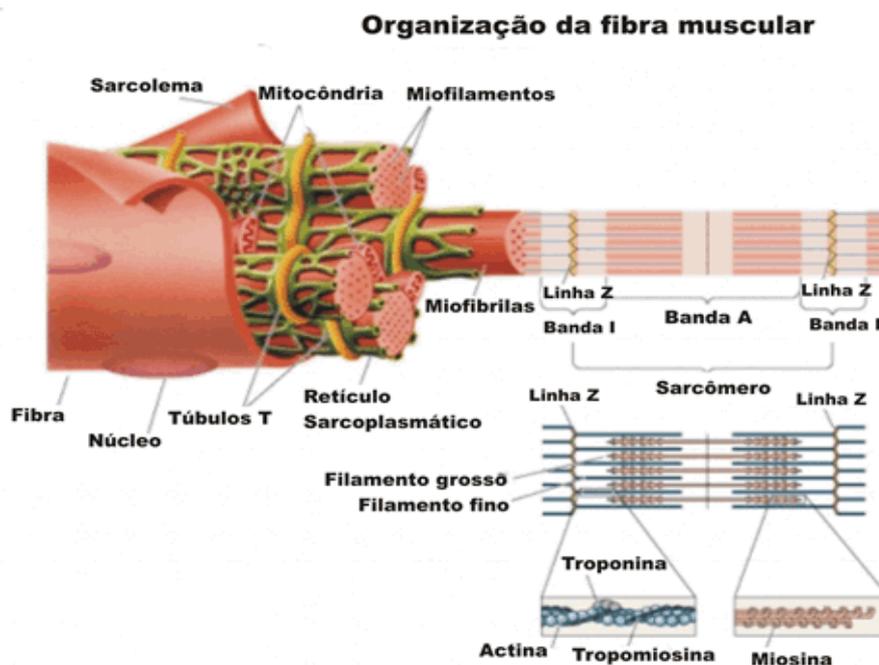


Figura 4 - Fibra Muscular

Fonte: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio22.php>

3.1.1 Proteínas Distrofina e Utrofina

No músculo esquelético existem outras proteínas que apresentam importante função de fornecer estrutura e estabilidade ao sarcômero durante a contração muscular. Geralmente essas proteínas estão interligadas com o aparato contrátil e a matriz extracelular, dando sustentação a membrana da fibra para que esta não se rompa durante as tensões mecânicas geradas. Duas importantes proteínas que desempenham essas funções tanto na fase embrionária como adulta são as utrofina e distrofina.

A utrofina é uma proteína com 395 kDa homóloga à distrofina (Figura 5) tanto estruturalmente como funcionalmente e seu gene se encontra no cromossomo 6q24 no humano (PEARCE, *et al.*; 1993). Ela está localizada no sarcolema da fibra durante o desenvolvimento fetal, mas é substituída pela distrofina quando essa começa a ser produzida por volta da 12ª semana de gestação. A utrofina então, permanece concentrada nas junções neuromusculares e miotendinosas do músculo esquelético até a fase adulta (BASU, *et al.*; 2011; AL-REWASHDY, *et al.*; 2014).

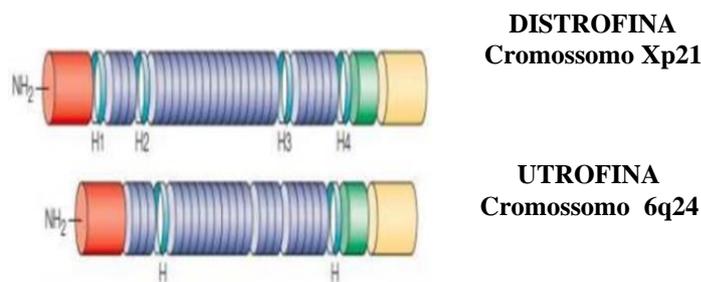


Figura 5 - Distrofina e Utofina
Fonte: Adaptado de El-Asaly, 2016

No músculo esquelético sadio a utrofina também pode ser encontrada nos nervos periféricos, nos vasos e na junção neuromuscular, mas não no sarcolema. No cérebro está presente na pia-máter, no plexo coroide e nos vasos sanguíneos. E nos rins ela é expressa nos podócitos do glomérulo e em alguns túbulos e vasos sanguíneos. Existem duas isoformas de utrofina: a utrofina A e a utrofina B. A utrofina-A é expressa na junção neuromuscular, plexo coroide, pia-mater e glomérulo renal, já a utrofina-B é expressa nas células endoteliais vasculares (WEIR, *et al.*, 2002).

A distrofina também é considerada uma proteína grande com 427 kDa correspondendo a 5% do citoesqueleto, que funciona como uma grande mola molecular que conecta o citoesqueleto do músculo esquelético ao complexo glicoproteico associado a distrofina (DAGC) Figura 6 (BANKS, *et al.*; 2014). Após a maturação do embrião, por volta da 12ª semana intraútero (KENNEDY, *et al.*; 2018), a distrofina substitui a utrofina no sarcolema, interligando filamentos de actina-F em uma rede cortical de suporte e, fixa essa rede a um complexo de glicoproteína na membrana da célula muscular que, se conectam à matriz extracelular, dando suporte e estabilidade a fibra muscular durante a contração (GUIRAUD, 2019).

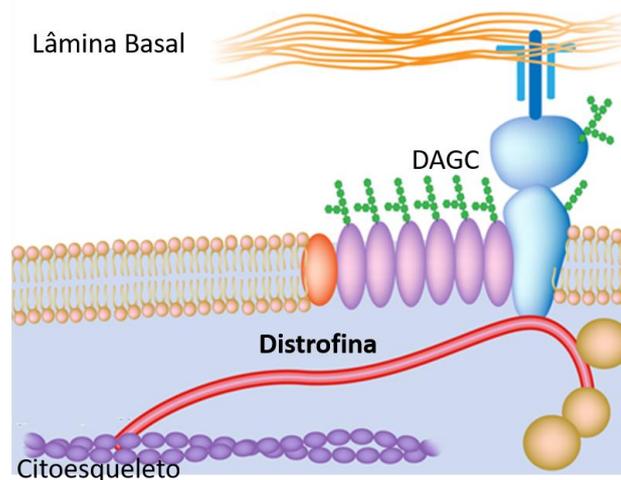


Figura 6 - Distrofina

<https://muscular dystrophy news.com>

Assim como a utrofina, a distrofina não está presente apenas no músculo estriado, mas também como isoformas distintas em áreas que incluem o sistema nervoso central (SNC). A distrofina encefálica é expressa principalmente no neocórtex cerebral, nas regiões hipocâmpais e no cerebelo, principalmente nas células de Purkinje.

A ausência ou redução da distrofina determina alterações significativas tanto no sistema nervoso central (SNC) como no músculo esquelético. Neste último tecido, a ausência da proteína altera a expressão do DAGC (complexo glicoproteico associado a distrofina), onde a membrana celular perde a sustentação do citoesqueleto cortical e com isso, torna-se mais susceptível ao rompimento pela tensão gerada pelas repetidas contrações musculares. Essa alteração estrutural determina lesões devido aos ciclos de degeneração e regeneração celular culminando na substituição do tecido contrátil por tecidos fibroso e gorduroso. Essas características são comumente encontradas em indivíduos portadores de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (LODISH, *et al.*; 2002).

3.2 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma desordem muscular grave, degenerativa e fatal que afeta 1:5000 meninos nascidos vivos (KENNEDY, *et al.*; 2018). A DMD é causada por mutações no gene da distrofina, localizada no cromossomo sexual

X (região Xp21) que por ser muito grande e complexa, se torna propenso a rearranjar e recombinar eventos que causam mutações. No caso da DMD ocorre uma parada prematura da sua transcrição gênica e codificação anormal da proteína distrofina, onde é rapidamente degradada por proteases endógenas. Essa mutação acaba levando à perda ou disfunção dessa proteína estrutural localizada no sarcolema. As mulheres portadoras dessa mutação geralmente são assintomáticas, por ser XX, o X que não possui a mutação se sobressai sobre o X mutado e, consegue produzir distrofina suficiente para proteger, parcialmente, o tecido contrátil, sendo assim algumas mulheres podem ou não apresentam sintomas leves da doença muscular (ANNEXSTAD, *et al.*; 2014).

Na ausência da distrofina, o sarcolema é altamente suscetível à lesão induzida pela contração, causando degeneração muscular e substituição de material contrátil por tecido adiposo e fibrótico, como já mencionado anteriormente. De acordo com a literatura, as fibras do tipo II (glicolíticas) são as mais acometidas pela doença, por serem mais frágeis e susceptível a lesão quando comparadas as fibras do tipo I (oxidativas). A incapacidade de reparar rapidamente uma ruptura da membrana (menor quantidade de células satélites) provoca uma elevação na concentração de cálcio intracelular, que desencadeia vias de degradação ativadas por cálcio como proteólise e ativação do proteassoma e mais danos ultraestruturais, levando a uma degeneração da fibra seguida por inflamação crônica. (MARKERT, *et al.*; 2011; PIETTE, *et al.*; 2018).

Com a evolução da doença, os meninos começam a fazer uso de cadeira de rodas para locomoção, já que, perdem progressivamente a função dos músculos dos membros inferiores. Seguindo, o fenótipo da doença tende a piorar, determinando o severo desconforto cardiorrespiratório nesses indivíduos que, geralmente vem à óbito por volta dos 15-20 anos de idade (ANNEXSTAD, *et al.*; 2014). Atualmente, devido a avanços nos tratamentos respiratórios, a expectativa de vida de um portador da DMD passou para 25 a 30 anos (MAVROGENI, *et al.*, 2017). A insuficiência dos músculos respiratórios foi responsável pela grande maioria das mortes precoces em pacientes com DMD. Na maioria dos casos, o diagnóstico pode ser feito com base na combinação dos típicos sinais clínicos (Tabela 1) com os altos níveis de creatina quinase (CK), força de prensão palmar (grip strenght) e análise genética (CACCHIARELLI, *et al.*; 2011; STREHLE, *et al.*; 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017).

Níveis sanguíneos de creatina quinase (CK) são frequentemente utilizados como marcadores para diagnóstico de DMD. A CK é uma enzima que cataliza a reação de forma reversível da creatina e ATP, formando fosfocreatina e ADP dando energia para os músculos. Essa enzima é encontrada na corrente sanguínea, e é um marcador bioquímico natural do corpo humano que é liberada pelos músculos tanto esqueléticos como cardíaco, após algum tipo de lesão. O acometimento pode ser uma microlesão determinada pelo exercício físico ou até mesmo uma lesão mais grave, advinda de doenças musculares degenerativas ou lesões isquêmicas do coração. Por isso é encontrada em quantidades elevadas em indivíduos portadores da DMD (CAROMANO, *et al.*, 1998; FREITAS, *et al.*, 2014; ORCY, *et al.*, 2018).

As concentrações séricas são elevadas nesses pacientes e geralmente excedem 1.000 UI/L e podendo chegar a 30.000 UI/L, onde um valor dentro da normalidade seria de 200 UI/L. Esse aumento da CK se deve ao fato dela difundir-se facilmente através das membranas das células musculares danificadas para o sangue. (CACCHIARELLI, *et al.*; 2011; MCDONALD, *et al.*; 2012; STREHLE, *et al.*; 2014). No entanto, os níveis de CK não servem como indicador da progressão da doença e não são medidos rotineiramente após o diagnóstico ter sido estabelecido (STREHLE, *et al.*; 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017).

Curso clínico típico da DMD não tratada.	
Existem grandes diferenças individuais na rapidez com que a doença progride	
Idade	Sinais clínicos de perda da massa muscular
Até 2 anos	Frequentemente marcado por atrasos motores, incluindo o andar (perto dos dois anos de idade).
3 a 4 anos	Dificuldades em pular, correr, mover-se sobre superfícies irregulares, subir e descer escadas; Resistência física reduzida quando comparado com outras crianças; Usa os braços para “escalar as próprias pernas” para passar da posição deitada para uma posição em pé; (Sinal de Gowers) Pseudo-hipertrofia da musculatura da panturrilha.
5 a 8 anos	Platô no desenvolvimento motor; Movimentos padrões: aumento no balanço dos braços, aumento da lordose lombar, marcha ampla bamboleante, anda nas pontas dos pés.

Antes dos 13 anos	Perda de deambulação independente
Depois da perda de deambulação	Enfraquecimento gradual da musculatura do tronco, braços e mãos; Desenvolvimento de escoliose neuromuscular; Musculatura respiratória cada vez mais fraca; Desenvolvimento de cardiomiopatia e/ou arritmia; Deterioração da fala e deglutição.

Tabela 1 – Sinais clínicos da DMD

Fonte: Adaptado de ANNEXSTAD, 2014

Como supracitado, a distrofina não está presente apenas no músculo estriado esquelético, mas também como isoformas distintas em áreas que incluem o sistema nervoso central (SNC). A ausência dessa proteína no SNC resulta em perturbação significativa da função neuronal. Diferentemente da perda de força física e função muscular, o retardo mental não é progressivo e não parece estar relacionado à gravidade da doença. Cerca de um terço dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne apresentam dificuldades cognitivas. De um modo geral, o QI médio é um desvio padrão mais baixo do que em meninos saudáveis. Esse comprometimento cognitivo não é progressivo. Além do comprometimento cognitivo, observa-se nesses indivíduos maior frequência de doenças psiquiátricas, como Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (KREIS, *et al.*, 2010; ANNEXSTAD, *et al.*; 2014).

Atualmente, não há cura nem tratamento efetivo, exceto cuidados paliativos. No entanto, sabe-se que o tratamento com glicocorticóides melhora a função motora a curto prazo e também parecem reduzir o risco de desenvolver escoliose que necessite de tratamento, prolongar a deambulação, retardar o desenvolvimento de complicações respiratórias e possivelmente cardíacas (ANNEXSTAD, *et al.*; 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017). O tratamento com prednisolona ou deflazacorte é recomendado antes que o desenvolvimento motor do paciente comece a se deteriorar, porém a terapia com glicocorticóides a longo prazo está associada a efeitos colaterais, incluindo ganho de peso, distúrbios endócrinos, osteoporose e dificuldades comportamentais, sendo assim, pode não ser a melhor intervenção terapêutica nesses pacientes (ANNEXSTAD, *et al.*; 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017).

Novos tratamentos para DMD têm se concentrado com objetivo de retardar o mecanismo distrófico da doença muscular, modulando a expressão da proteína utrofina e até mesmo, estimular a expressão da proteína distrofina. Entre as estratégias para reduzir os mecanismos distróficos estão: 1) inibição da inflamação; 2) promoção do crescimento e regeneração muscular; 3) redução da fibrose; e 4) facilitação da função mitocondrial (KENNEDY, *et al.*; 2017; SHIEH, *et al.*; 2018).

O exercício físico é uma abordagem de tratamento não farmacológica que vem sendo cada vez mais empregada para a extremidade inferior para crianças com DMD devido à importância dos efeitos benéficos sobre a deambulação (ALEMDAROĞLU, *et al.*; 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017; SPAULDING, *et al.*; 2018). Dentro da literatura científica é possível encontrar estudos que investigam efeitos de exercício físico no músculo de seres humanos com DMD, principalmente exercícios respiratórios. No entanto, para as distrofias musculares, há uma considerável hesitação em prescrever o exercício como uma intervenção terapêutica. A razão para a hesitação, particularmente para crianças com distrofia muscular de Duchenne (DMD), é a preocupação de que o exercício ou muita atividade física possa causar danos musculares e exacerbar a doença (BALTGALVIS, *et al.*; 2012; NG, *et al.*; 2018; SPAULDING, *et al.*; 2018). Sendo assim, modelos experimentais vem sendo cada vez mais utilizados como foco de pesquisas científicas, como os camundongos *mdx*, buscando entender os efeitos celulares e moleculares determinados pelo exercício físico.

3.2.1 Modelo experimental para DMD: camundongo *mdx*

A maioria dos estudos no campo da ciência (quase 59%) utilizam modelos experimentais para investigar as implicações no corpo e na saúde humana. Apesar de serem espécies diferentes, humanos e camundongos mostram padrões semelhantes na patogênese da doença, bem como órgão e sistema fisiológico (DUTTA, *et al.*; 2016). Numerosos modelos animais para DMD têm sido desenvolvidos nos últimos 30 anos, variando de invertebrados a grandes modelos de mamíferos, mas os camundongos *mdx* são os mais comumente empregados como modelos experimentais na DMD (MCGREEVY, *et al.*; 2015).

O camundongo *mdx* foi descoberto no início dos anos 80, em uma colônia de camundongos C57BL/10 que apresentou aumento da enzima creatina kinase (CK) além

de, evidências histológicas de miopatia. Esses animais apresentam uma mutação pontual no exon 23 do gene da distrofina, resultando na falta da proteína distrofina funcional, assim como nos humanos (PIETTE, *et al.*; 2018). Devido à ausência da proteína distrofina, os camundongos *mdx* apresentam os sintomas clínicos similares aos seres humanos, como aumento dos níveis séricos de CK, ciclos de degeneração e regeneração muscular, necrose, aumento de tecido conjuntivo, entre outros. Outra similaridade é o maior acometimento de músculos glicolíticos quando comparados aos oxidativos (AL-REWASHDY, *et al.*; 2014).

A evolução da doença no músculo esquelético de camundongos *mdx* apresenta diferentes fases, onde nas 2 primeiras semanas de vida, os músculos são relativamente iguais aos camundongos normais. Entre a 3^a e a 6^a semana de vida, os músculos esqueléticos dos *mdx* sofrem um pico de necrose e logo depois se estabilizam devido a uma robusta regeneração celular. A única exceção é o diafragma que mostra uma deterioração progressiva como também é visto em humanos com DMD. Fenótipos distróficos mais graves, como perda muscular agressiva, escoliose e insuficiência cardíaca só ocorrem em camundongos *mdx* após 15 semanas ou mais. Já a expectativa de vida nos *mdx* é reduzida em apenas 25%, diferente dos indivíduos com DMD, onde o tempo de vida se reduz em 75% (MCGREEVY, *et al.*; 2015).

Outro parâmetro importante avaliado nos animais *mdx*, assim como nos humanos é a força de preensão (FP). A avaliação da FP comumente utilizada na prática clínica, desempenha o um papel importante no controle de processos de reabilitação, na avaliação e tratamento de desordens músculo-esqueléticas da mão e na avaliação de pessoas com patologias neurológicas. Além disso, a FP é entendida como indicador geral de força e potência musculares. A força muscular é proporcional ao número de sarcômeros presentes no músculo, recrutados durante uma contração, e a forma como estes se dispõem. Existem diversos fatores que a influenciam, como por exemplo, o sexo e a idade, as características antropométricas e fatores relacionados com a fisiologia do tecido muscular, tais como as alterações do pH, da temperatura, do fluxo sanguíneo e a acumulação de produtos do metabolismo celular, entre outros. A FP reflete não só a força do membro superior e a amplitude articular escolhida para a articulação envolvida, mas também a força de outros músculos e depende da estrutura de outros segmentos corporais, além da mão e do braço (DIAS, *et al.*, 2010; MENDES, *et al.*, 2013).

A medida da força de preensão palmar pode ser uma opção prática para estimar rapidamente a capacidade funcional global de crianças com DMD, pois ela pode ser prejudicada desde tenra idade, mesmo antes da perda de deambulação (PIZZATO, *et al.*, 2014). É de comum conhecimento que crianças com DMD produzem menor força muscular distal quando comparadas a crianças saudáveis, mesmo no estágio inicial da doença, e a fraqueza se torna mais marcante com a idade. A deterioração das habilidades manuais, bem como o desempenho da extremidade superior são afetadas, não apenas pela fraqueza muscular proximal, mas também pela distal. (BULLUT, *et al.*, 2019).

A fraqueza da DMD geralmente afeta os músculos proximais primeiro, com perda de força e função muscular distal posteriormente. Assim, os músculos das mãos são afetados mais tarde no curso da doença, mas também se tornam progressivamente enfraquecidos e eventualmente paralisados na segunda e terceira décadas de vida (HOGREL, *et al.*, 2020). A função de mão e braço está de fato associada a muitos domínios das atividades diárias (desempenho físico, segurar um celular, escrever, girar maçaneta da porta, mas também o funcionamento psicológico e social) (LUE, *et al.*, 2017).

As principais limitações na aplicação das conclusões de estudos em animais para seres humanos são as diferenças no fenótipo entre humanos e modelos animais geneticamente homólogos, as diferenças biomecânicas significativas entre humanos e modelos animais, e as idades também (MARKERT, *et al.*; 2011). Contudo, independente dessas diferenças, estudos em animais podem orientar tratamentos fidedignos e promissores, mas não prever completamente o resultado dos estudos clínicos com humanos (MCGREEVY, *et al.*; 2015).

3.2.2 Exercício aeróbico de baixa intensidade no músculo distrófico

Os exercícios aeróbicos são aqueles exercícios contínuos, geralmente de longa duração e de intensidade baixa a moderada que, utilizam grandes grupos musculares ao mesmo tempo. Durante a execução do exercício ocorre aumento do consumo de oxigênio pelo organismo para produção de energia (ATP) que é utilizada pelo próprio músculo em atividade além de, estimular e beneficiar outros sistemas, como: cardiorrespiratório, vascular e metabólico. Caminhar, dançar, andar, pular, correr, pedalar, nadar são exemplos de exercícios aeróbicos (DOMINICANO, *et al.*, 2010).

O exercício físico aeróbio é uma intervenção não farmacológica de baixo custo e de fácil aplicabilidade. Além dos benefícios cardiorrespiratórios, como regulação da pressão arterial, este exercício também auxilia na redução do peso corporal, níveis séricos de colesterol, reabilitação muscular, cognição, qualidade de vida, entre outros (HASHIDA, *et al.*; 2017). Como já mencionado, o exercício físico vem sendo aplicado em músculos distróficos como uma ferramenta terapêutica importante para amenizar ou até mesmo retardar a evolução, e o impacto negativo da doença. Como exemplo, os exercícios para a extremidade inferior estão se tornando mais comuns em programas de fisioterapia para crianças com DMD devido à importância dessa área em atividades relacionadas à deambulação (ALEMDAROĞLU, *et al.*, 2014). No entanto, para as distrofias musculares, há uma considerável hesitação em prescrever o exercício como uma intervenção terapêutica. A razão para a hesitação, particularmente para crianças com distrofia muscular de Duchenne (DMD), é a preocupação de que o exercício ou muita atividade física possa causar danos musculares e exacerbar a doença (BALTGALVIS, *et al.*, 2012).

Não há um consenso sobre efeitos do exercício serem benéficos ou prejudiciais aos pacientes com DMD. As principais divergências envolvem os parâmetros do exercício, tais como: tipo, intensidade, frequência e duração. Sendo assim, há necessidade de mais estudos na área, seja com animais ou seres humanos, que possam relatar os efeitos potencialmente benéficos do exercício para que, parâmetros seguros possam ser deliberados e empregados (MARKERT, *et al.*, 2011).

Na literatura existem evidências que mostram que o exercício aeróbio pode ter efeitos benéficos no músculo distrófico tanto em humanos como em animais. ALEMDAROĞLU, *et al.*; 2014; ZELIKOVICH, *et al.*; 2019 mostraram melhora funcional de pacientes com DMD (escores de deambulação, resistência e funções do braço, força muscular proximal), após exercícios aeróbios. Do mesmo modo, alguns estudos realizados em camundongos *mdx* mostraram que o treinamento físico aeróbico pode resultar em melhor função muscular esquelética sem agravar a doença (GORDON, 2014; BALTGALVIS, *et al.*; 2012; ZELIKOVICH, *et al.*; 2019). No estudo de Baltgalvis e colaboradores em 2012, diferentes tipos de exercício aeróbio foram aplicado em camundongos *mdx* durante 15 semanas. Os resultados foram promissores onde a corrida voluntária sobre rodas melhorou a força do músculo sóleo e aumentou a resistência à fadiga do músculo extensor longo dos dedos (EDL). Do mesmo modo, o

exercício aeróbio do tipo natação, também determinou ganho de força do músculo sóleo e aumento da resistência à fadiga do EDL.

Um estudo realizado por BALTGALVIS, *et al.*, (2012) mostrou que doze semanas de exercícios de baixa intensidade podem melhorar a força, a resistência à fadiga e a capacidade oxidativa mitocondrial dos músculos flexores plantares do tornozelo de camundongos *mdx*. Além disso, não houve indicação de que o músculo tenha sido prejudicado pelo exercício. Esses achados em camundongos *mdx* indicam que o exercício deve ser mais estudado como uma terapia potencial para ajudar a retardar a progressão do declínio funcional na DMD.

A recomendação é que todos os meninos com DMD participem precocemente de exercícios sub-máximos regulares para evitar a atrofia muscular por desuso e outras complicações da inatividade (MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017). No entanto, é necessário ressaltar que o excesso de atividade, pode resultar em dor e mioglobinúria, aumento da proteína mioglobina na urina, encontrada normalmente em abundância nos músculos. O aumento da sua excreção pela urina está associado a um esforço físico intenso, quando um músculo é altamente danificado (BAPTISTA, *et al.*, 2011). Terapeutas e profissionais do exercício são desafiados a encontrar um delicado equilíbrio entre atividade e excesso de atividade ao projetar programas de treinamento para essa população (MOREIRA-MARCONI, *et al.*; 2017).

As adaptações do músculo doente ao exercício ocorrem em muitos níveis, começando do mais superficial, que é a matriz extracelular, até aos mais profundos do citoesqueleto, que envolve mecanismos síntese proteica, reparo e regulação gênica (MARKERT, *et al.*; 2011). O aumento da síntese da proteína utrofina após aplicação de exercício de baixa intensidade, vem sendo foco de investigações científicas como um potencial caminho para retardar a evolução da doença (BANKS, *et al.*; 2014; GORDON, *et al.*; 2014, FERNADES, *et al.*; 2019) pois, é capaz de dar estabilidade ao sarcolema durante a contração, evitando novos focos de lesões.

Tanto nos humanos como no modelo experimental da DMD (o camundongo *mdx*), a superexpressão da utrofina determina melhora na função muscular sem exacerbar o fenótipo da doença (GORDON, *et al.*; 2014; GUIRADU, *et al.*; 2019). Assim, terapias que possam determinar aumento da utrofina vem sendo cada vez mais investigadas, com

objetivo de proporcionar maior longevidade e qualidade de vidas aos portadores da DMD (GORDON, *et al.*; 2014). Embora o mecanismo exato para o aumento da utrofina não tenha sido totalmente esclarecido, uma possível via envolvida que vem sendo investigada é a regulação traducional da mesma. Estudos mostram que a tradução da proteína utrofina é regulada por vias de sinalização ativadas pelo exercício aeróbico, tais como calcineurina e da PGC-1 α (GORDON, *et al.*; 2014; AL-REWASHDY, *et al.*, 2014).

Como já relatado acima, não existe um consenso sobre o melhor tipo de exercício, e quais melhores parâmetros a serem aplicados em um músculo distrófico. Sendo assim, esperamos com nosso estudo entendermos melhor os efeitos do exercício aeróbico de baixa intensidade aplicado em diferentes períodos de treinamento.

4. Métodos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 4740230518) da Universidade Federal de São Carlos – USFCar (ANEXO I), instituição onde este estudo foi realizado.

4.1 Animais

O estudo contou com a utilização de 36 animais, onde 12 foram controles sedentários (21 e 37) *Wild Type*: C57BL-10 e 24 foram do grupo *mdx* (*Background*: C57BL-10 - *Dmd*^{*mdx*}), divididos em 12 animais sedentários (21 e 37) e 12 animais treinados (21 e 37 sessões). Os animais chegaram ao laboratório de Biofísica e Fisiologia Muscular por volta de 4 a 5 semanas de idade e foram aclimatizados ao ambiente e a esteira de treinamento. Quando completaram 6 semanas de idade, foram iniciadas as sessões de treinamento. A Faixa etária foi escolhida devido o músculo esquelético apresentar alterações morfofuncionais importantes (LOWE, *et al.*, 2006; MCGREEVY, *et al.*, 2015; DUTTA, *et al.*, 2016), equiparando-se a idade de pacientes jovens com DMD por volta de 2 a 3 anos (MATHUR, *et al.*, 2010) (Figura 7).

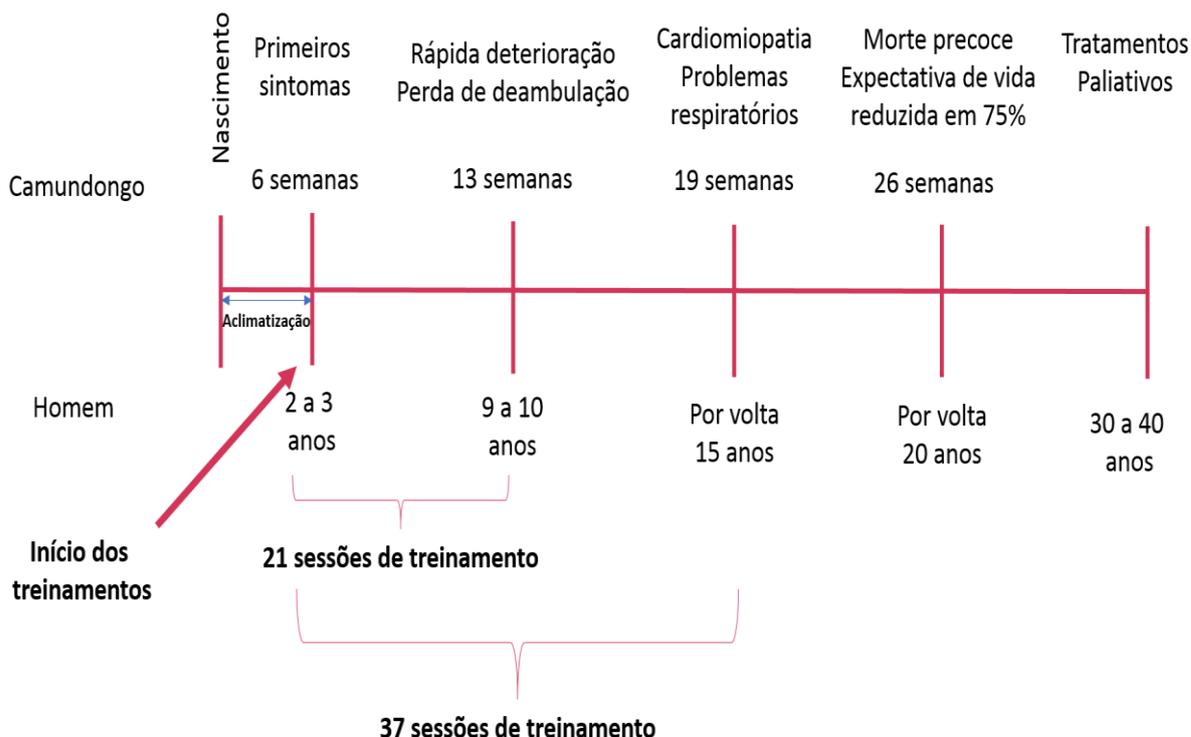


Figura 7 – Avaliação temporal dos sintomas entre Humanos e Camundongos

Os animais foram divididos em seis grupos: Grupos sedentários *wild-type* (21DSEDWT e 37DSEDWT); Grupos sedentários *mdx* (21DSEDMDX e 37DSEDMDX); Grupo *mdx* treinado 21 sessões (21DTRMDX); Grupo *mdx* treinado 37 sessões (37DTRMDX) (Figura 8). Foram delineados dois grupos sedentários dentro dos camundongos *wild-type* e dos *mdx* para assegurar que, mesmo com pouca diferença de idade, não haveria influência significativa da progressão da doença neste período.

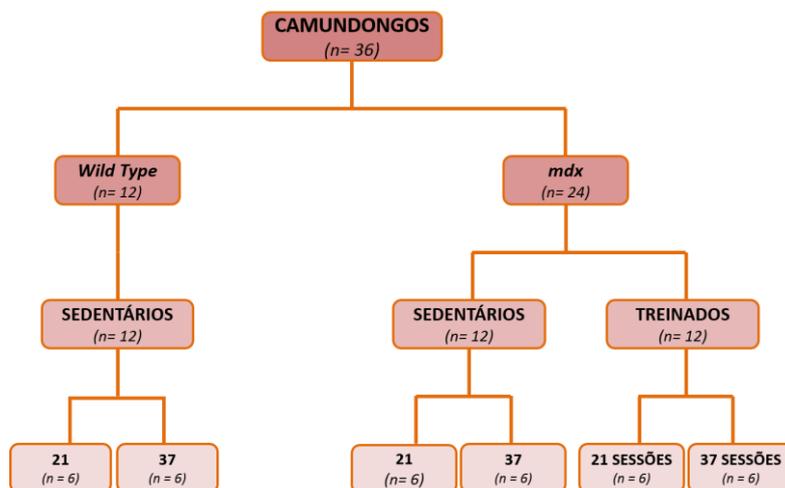


Figura 8 - Grupos Experimentais

Os animais foram adquiridos no Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) (figura 9) por volta de 4 a 5 semanas e alocados em gaiolas (n=3) no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em ciclo invertido 12/12h, com livre acesso a água e a comida “*ad libitum*”. As gaiolas foram higienizadas de acordo com os procedimentos do Biotério.



Figura 9 - Camundongos C57Bl-10

4.2 Treinamento

A Figura 10 ilustra a linha do tempo para os treinamentos dos animais. Ao atingir 6 semanas de idades, os animais dos grupos treinados foram submetidos ao treinamento aeróbio de baixa intensidade em esteira motorizada sem inclinação (figura 11), ou seja, à 0° (HAYWARD, *et al.*, 1999; TAKEKURA, *et al.*, 2001; CORNACHIONE, *et al.*, 2008) em uma velocidade entre 9-10m/min durante 30 minutos (TJONDROKOESEMO, *et al.*, 2016; FERNADES, *et al.*, 2019). Alguns dias antes de iniciar o treinamento, os animais foram familiarizados por 10 minutos com a esteira parada apenas para reconhecerem o ambiente. No dia do treinamento, os animais foram submetidos à um período de aquecimento durante 2 minutos a uma velocidade de 7m/min. Os treinamentos foram realizados 3x/semana até completarem 21 ou 37 sessões de treinamento (GAIAD, *et al.*, 2017).

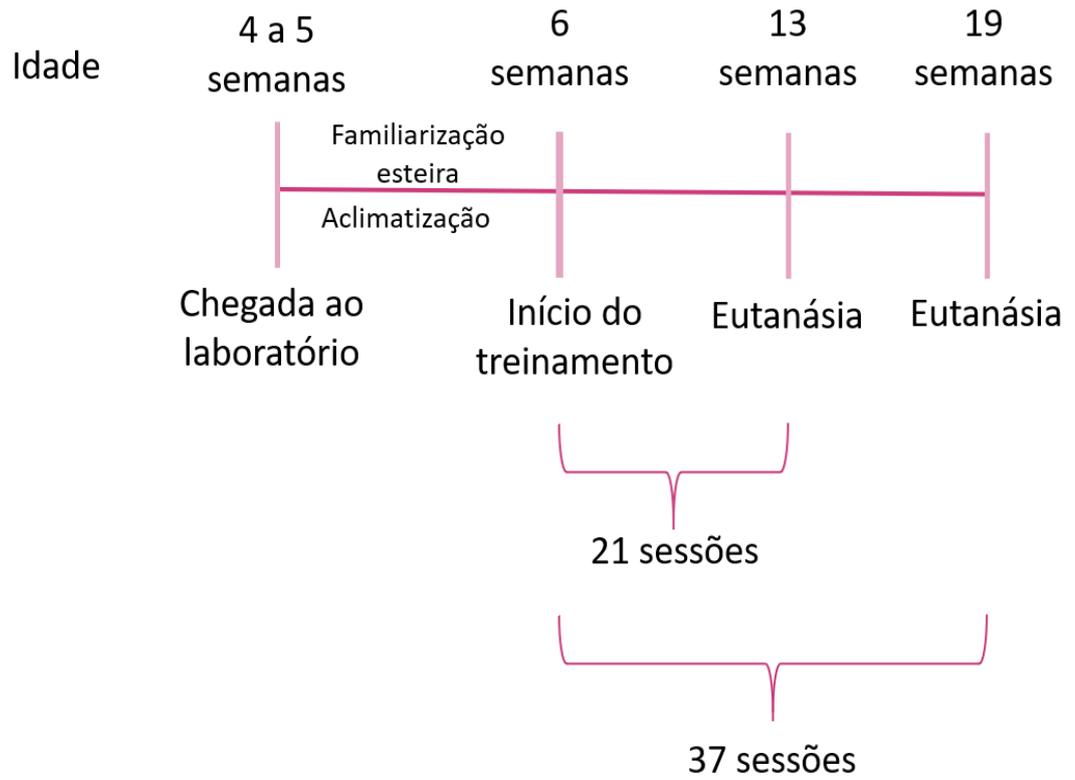


Figura 10 - Linha do tempo de treinamento



Figura 11 - Esteira INSIGHT

Após os treinamentos, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação sob anestesia.

4.3 Teste de Preensão Palmar

Para análise funcional de força muscular *in vivo* foi realizado o teste de preensão palmar dos animais dos grupos estudados. O teste foi realizado no equipamento *grip strength* (Insight[®]) (Figura 12) em três tempos, pré-treino (antes do animal começar o treino); inter-treino (11^o dia de treino para os animais treinados 21 sessões e 19^o dia para os animais treinados 37 sessões) e pós-treino (antes do último dia de treino) (Figura 13). A execução do teste contou com três séries de cinco puxadas, e entre cada série um descanso de 1 minuto (KEELING *et al.*, 2007). No final de cada série foi realizada a média das forças de preensão das cinco puxadas, de modo que tivéssemos três médias por animal ao final de cada teste, em gramas. Vale ressaltar que o teste foi realizado sempre pelo mesmo avaliador para evitar aplicação de forças diferentes.

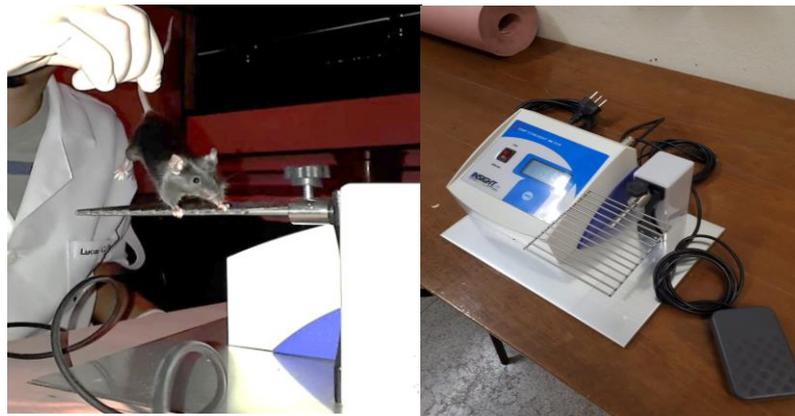


Figura 12 - Teste de Preensão Palmar e Aparelho de Grip Strength

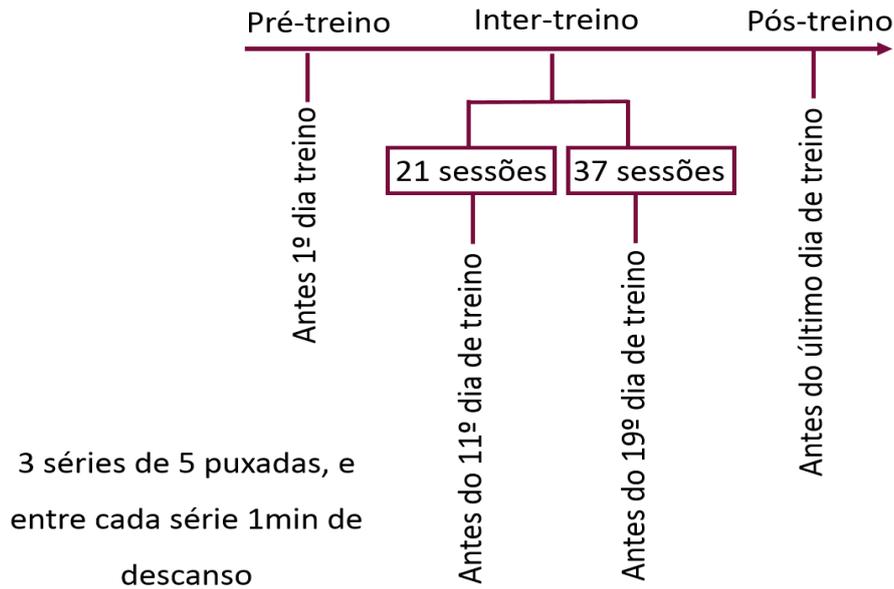


Figura 13 - Linha do tempo - Teste de Preensão Palmar

4.4 Quantificação da enzima creatina quinase (CK)

Após a coleta de dados referente a força de preensão palmar os animais dos grupos sedentários e treinados 21 e 37 sessões, foram eutanasiados por decapitação sob anestesia (Xilasina 100mg/Kg PV + Ketamina 100mg/Kg PV) logo após a última sessão de treinamento (21 ou 37). Imediatamente após a decapitação, foi coletado 30 ul de sangue total do animal em um microtubo e adicionado 60ul de Heparina. Em seguida foram coletados 30ul dessa nova solução (30ul de sangue + 60ul Heparina) e colocados a uma fita para a dosagem de CK. A fita foi inserida em um aparelho para quantificar a CK sérica (Reflotron®). Após a leitura, o valor foi multiplicado por 3, devido a diluição prévia com heparina, para obtenção do valor sérico total da CK. A Figura 14 ilustra alguns passos da técnica realizada.



Figura 14 - Dosagem de CK

4.5 Análise Histológica – Técnica de Coloração HE

Após a coleta do sangue para análise da CK, os músculos tibiais anterior das duas patas foram excisado (Figura 15). Esse músculo foi escolhido devido apresentar 60% de fibras do tipo IIB, que são mais frágeis e susceptíveis às lesões e primeiramente acometido pela doença. (WEBSTER, *et al*, 1988, BANKS, *et al*, 2014).



Figura 15 - Excisão do Músculo Tibial Anterior

Fragmentos musculares (TA) dos diferentes grupos foram 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 $6\mu\text{m}$, com auxílio do Criótomo CM 1850 UV (LEICA[®]) (Figura 16), no Laboratório da Fisioterapia da UFSCar, à uma temperatura de -25°C . Esse

procedimento também foi realizado para as lâminas de imunofluorescência, onde logo após a coleta dos fragmentos, essas lâminas foram armazenadas em freezer -20°C . Os cortes para histologia básica foram colhidos em lâminas de $24 \times 50\text{mm}$ e corados em Hematoxilina-Eosina (HE) para análises dos aspectos genéricos das fibras musculares tais como: centralização nuclear, necrose celular, basofilia, infiltrado inflamatório, fibras lobuladas entre outras (CORNACHIONE, *et al.*, 2008; CORNACHIONE, *et al.*, 2011). A análise morfológica contou com a utilização de um microscópio de luz. As imagens coletadas na objetiva de $40\times$.



Figura 16 - Criostato Leica
www.leicabiosystems.com

4.6 Imunofluorescência para Distrofina e Utofina

As lâminas com os cortes foram retiradas do freezer -20°C e em seguida foram incubados por 1h com *Mouse-On-Mouse* (MOM - *Vector Laboratories*). Logo após, foram lavadas 1x com PBS e incubadas com os anticorpos primários. Para a marcação da proteína utrofina, foi utilizado o anticorpo Mancho 7 da Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB - 1:15), para a marcação da proteína distrofina o *Anti-dystrophin* das Abcam (ab15277 - 1:400) e para marcação da laminina o *Anti-Laminin* (ab11575 - 1:200) por 45 min à 37°C . Posteriormente, as lâminas foram novamente lavada com PBS por 3x de 5 min, e em seguida incubadas com os anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 *anti-mouse* (Jackson ImunoResearch - 1:200), o Alexa Fluor 488 *anti-rabbit* (Invitrogen - 1:200) e o Alexa Fluor 647 (Invitrogen - 1:200), por 35min à 37°C . Após a incubação, as lâminas foram lavadas novamente com PBS por 3x de 5 min, e por fim, os cortes foram selados com FluorQuest com DAPI (marcador de núcleos). Em seguida, as lâminas permaneceram no freezer -20°C por pelos menos 24h para posterior leitura.

Para identificação das marcações em fluorescência da utrofina e distrofina foi utilizado o filtro FITC (comprimento de onda 1200 nm), para Laminina o Cy5 (comprimento de onda 2500 nm) e para os núcleos DAPI (comprimento de onda 800 nm). As fotomicrografias foram obtidas através das objetivas de 10x e 20x através do equipamento Image Xpress Micro XLS (Molecular Devices, EUA).

Para análise qualitativa das proteínas utrofina e distrofina foram utilizadas imagens adquiridas nas objetivas de 20x e 10x, respectivamente. Já para análise quantitativa da utrofina, foram adquiridas imagens através da objetiva de 10x. Nas imagens overlay (marcação da laminina, utrofina e núcleo) foram contadas todas as fibras com e sem marcação da utrofina em 5 campos (5x5 cm) (Figura 17) para posteriormente, ser realizada a porcentagem das fibras que apresentavam marcação para utrofina. Vale ressaltar que, quadrantes foram posicionados na mesma região, quando possível, em cada corte do músculo TA de todos os animais do estudo.

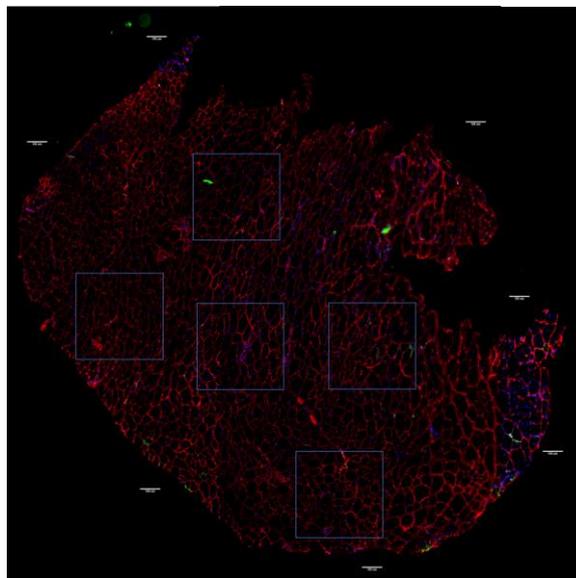


Figura 17 - Figura ilustrativa da padronização para quantificação da imunomarcção da proteína utrofina no TA

Objetiva = 10x; Barra de escala = 100µm.

4.7 Western Blot para Utofina

Para identificação da utrofina no músculo tibial anterior, a amostra foi homogeneizada em tampão de extração composto por: Tris/HCL (pH 7,4) 0,05M, NaCl 0,15 M, EDTA (pH 8,0) 0,001M, Dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,1%, inibidores de fosfatase Na_3VO_4 0,001M, NaF 0,025M, Pirofosfato de Na 0,0005M e inibidores de

proteases da marca AMRESCO overnight à 4°C, com auxílio de agitadores magnéticos em microtubo. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas à 14.000 rpm, à 4°C por 20 min e o sobrenadante coletado, para posterior quantificação das proteínas. Foram utilizadas amostras de coração dos mesmos animais para controle positivo para proteína utrofina.

As proteínas totais foram quantificadas pelo método de BCA. Posteriormente, pequenas porções do extrato (50µg) foram completadas com tampão de amostra Laemmli e fervidas por 5 min à 99°C, e logo após foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% à 100 V por 1h40. Ao término do experimento, os géis foram transferidos a uma membrana de nitrocelulose em 100 V por 2h30 (a transferência foi confirmada através do corante Ponceau S). Houve bloqueio da membrana por 2h à temperatura ambiente com leite desnatado 5% em TBS (para reduzir a ligação não específica de proteínas). A incubação com o anticorpo primário 1:50 (Mancho3 anti-utrophin, DSHB), previamente diluído em TBS-T + leite desnatado (5%), permaneceu overnight à 4°C. No dia seguinte, seguiram-se 3 lavagens de 5 min com TBS-T, e adicionado o anticorpo secundário (1:10.000) (conjugado HRP - Cell Signaling Technology) também diluído em TBS-T + leite desnatado 5%. A membrana permaneceu em incubação durante 1 hora sob agitação basculante. Seguiu-se, novamente com lavagem em TBS-T e por fim, a membrana foi revelada através do ECL – Clarity Western ECL Substrate da Bio-RAD (kit revelação).

Para a normalização dos dados obtidos, foi realizado o controle interno através da incubação da membrana com o anticorpo primário GAPDH (1:15.000) da Abcam ab181602 e anticorpo secundário conjugado HRP (1:10.000) da Abcam ab97051.

A membrana foi scaneada no equipamento ChemiDoc XRS+ (BIORAD, USA) para análise da densitometria das bandas e a semi-quantificação foi feita através do software ImageJ (versão 1.50e, NIH, USA).

4.8 Estatística

Todas as comparações das análises quantitativa e semi-quantitativa, como para CK e WB, foi aplicado o teste de variância usando ANOVA de duas vias (grupo e tempo) para medidas repetidas. Quando diferenças significativas foram encontradas, análises post-hoc foram realizadas por meio do teste de Bonferroni. Para às análises dos dados

obtidos na força de preensão palmar, foi realizado o modelo linear de efeitos mistos, através do procedimento PROC MIXED do software estatístico SAS® 9.4. Esta análise contou com ajuda da estatística Daiane Leite da Roza, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Para todas as análises foram adotados os índices de significância de 95% ($p < 0.05$).

5. Resultados

Nossos resultados mostraram uma adaptação positiva do tecido muscular distrófico frente à aplicação de exercício aeróbio, tanto após 21 quanto 37 sessões. Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre o grupo sedentário *wild type* 21 dias e o grupo sedentário *wild type* 37 dias. Do mesmo modo, os animais *mdx* sedentários 21 não são diferentes dos animais *mdx* sedentários 37, apesar de existir uma pequena diferença de idade. A seguir serão apresentados os resultados obtidos.

5.1 Teste Funcional para preensão palmar

O teste de preensão palmar mostrou que os animais *mdx* (21 e 37) apresentam uma diminuição da força antes do treinamento quando comparados ao grupo controle *wild type* ($p < 0.05$). Com o treinamento é possível observar (figura 18) que ambos os grupos distróficos (21 e 37) aumentam a força de preensão após 11 sessões (grupo *mdx21*) e 19 sessões (grupo *mdx37*) quando comparados ao pré ($mdx21_{inter} > mdx21_{pré}$; $mdx37_{inter} > mdx37_{pré}$). A manutenção dos treinamentos, 21 e 37 sessões, mostraram incrementar ainda mais a força de preensão palmar pois, houve aumento significativo quando comparado ao período final com o intermediário ($mdx21_{pós} > mdx21_{inter}$; $mdx37_{pós} > mdx37_{inter}$) ($p < 0.05$).

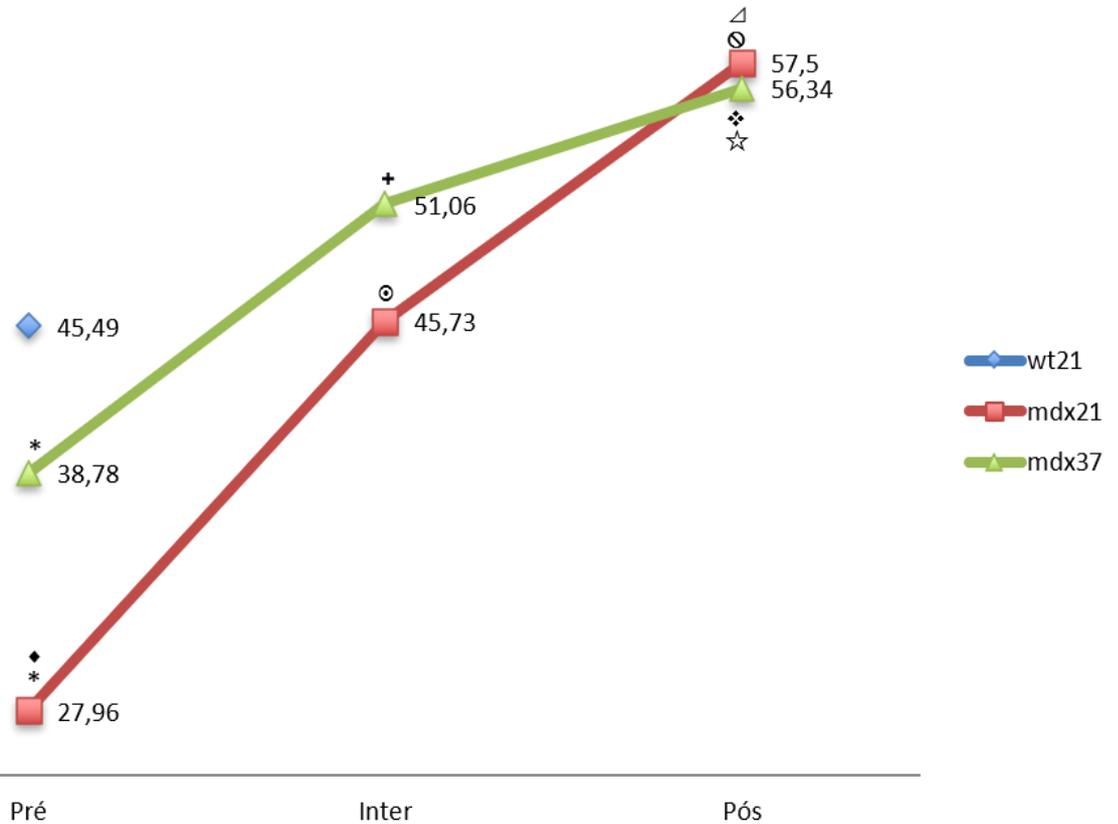


Figura 18 - Teste de Preensão Palmar em camundongos mdx

A figura ilustra as médias dos valores de força de preensão dos grupos testados nos diferentes períodos de treinamento (pré, inter e pós) *Diferente wt21; ♦Diferente mdx37pré; ⊙mdx21 inter é diferente do pré mdx21; ⊖mdx21 pós é diferente do pré mdx21; +mdx37 inter é diferente mdx37 pré; ✦mdx37 pós é diferente do pré mdx37; △mdx21 pós é diferente do inter mdx21; ☆mdx37 pós é diferente do inter mdx37 p<0.05.

5.2 Níveis séricos da Creatina quinase (CK)

Após o teste de preensão palmar, os animais foram pesados (Tabela 2) e eutanasiados para análise sérica da creatina quinase. A doença mostrou níveis séricos mais elevados de CK, tanto nos animais mdx sedentários (21) como nos animais mdx sedentários (37), quando comparados aos respectivos controles wild-type (21 e 37) (21DSEDMDX x 21SEDWT; 37DSEDMDX x 37DSEDWT; p<0.05) (Figura 19).

GRUPOS	PESO (g)
21DSEDWT	26,18
37DSEDWT	30,5
21DSEDMDX	30,79
37DSEDMDX	35,69
21DTRMDX	30,44
37DTRMDX	36,7

Tabela 2: Média do peso (g) dos animais em cada grupo

Após o treinamento aeróbio de baixa intensidade durante 21 e 37 sessões, os níveis séricos para CK mostraram-se significativamente mais elevados quando comparados aos animais *mdx* sedentários (21DMDXSED x 21DTRMDX; $p < 0.05$) (37DSEDMDX x 37DTRMDX; $p < 0.05$). Contudo, o que mais nos surpreendeu foi quando comparamos os animais *mdx* 21 sessões de treinamento (21DTRMDX) com os animais que treinaram 37 sessões (37DTRMDX). A manutenção do estímulo por 37 sessões mostrou valores significativamente menores nos níveis de CK quando comparados aos animais que treinaram durante 21 sessões (21DTRMDX x 37DTRMDX; $p < 0.05$) (Figura 19).

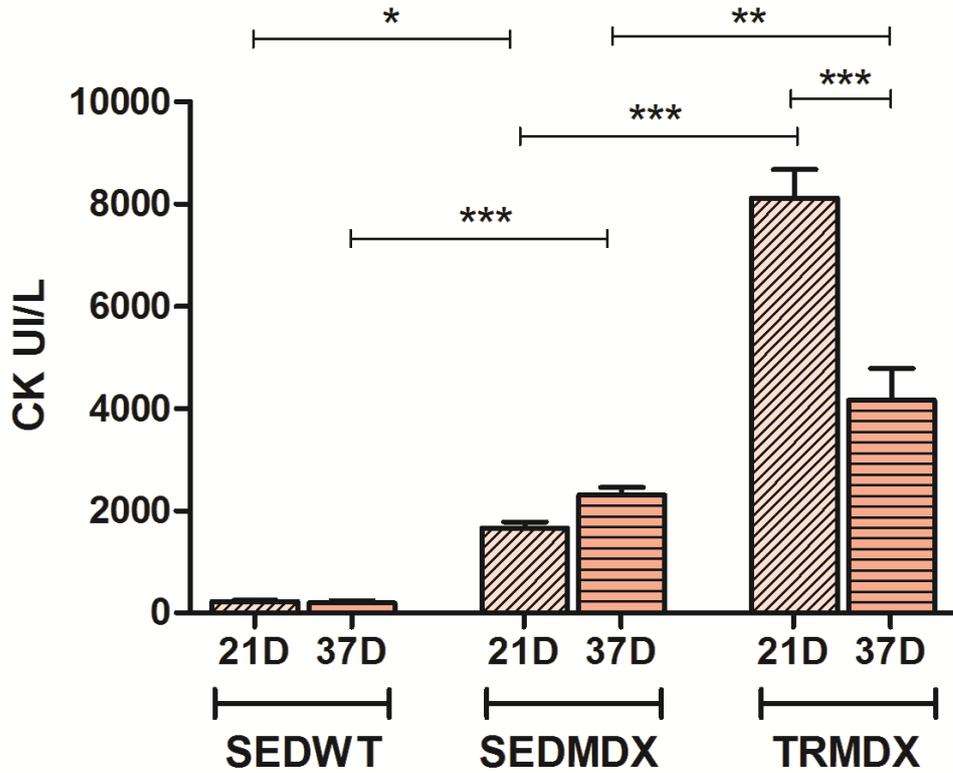


Figura 19 - Níveis séricos de CK nos diferentes grupos

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.3 Alterações qualitativas do músculo tibial anterior

5.3.1 Imunomarcção para proteína distrofina

A análise qualitativa das lâminas processadas pela técnica de imunofluorescência para a proteína distrofina confirmou que os animais *mdx* utilizados neste estudo realmente não apresentavam esta proteína (Figura 20B), como observada nos animais *wild-type* (Figura 20A).

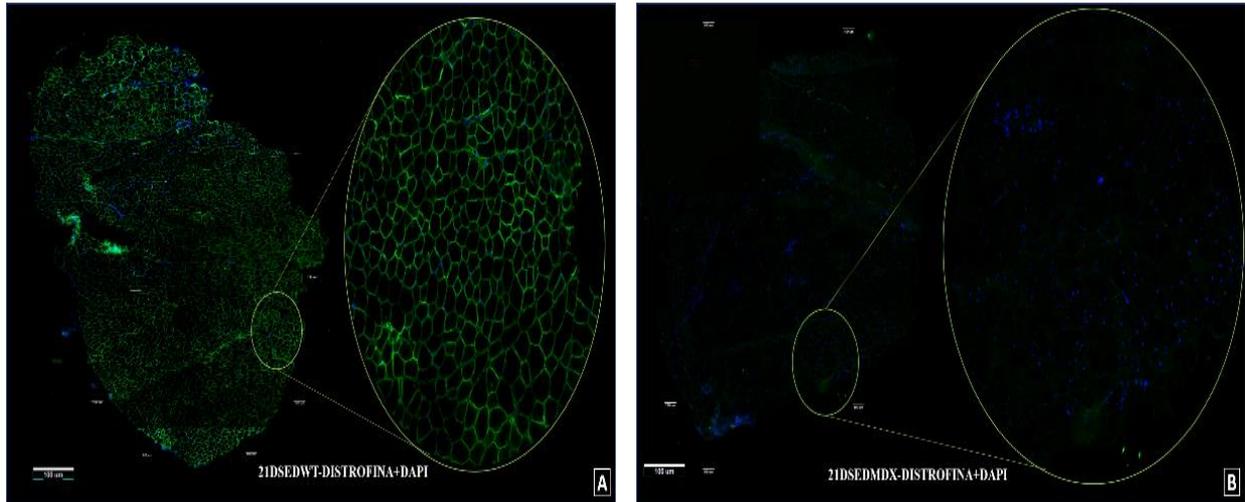


Figura 20 - Fotomicrografia de cortes histológicos do TA pela técnica de IF

Objetiva de 10x; Barra de escala = 100µm. A- 21DSEDWT: Presença da proteína distrofina marcada em verde e núcleos em azul (DAPI); B- 21DSEDMDX: ausência da proteína distrofina com núcleos em azul (DAPI).

5.3.2 Alterações histológicas do músculo tibial anterior

A Figura 21 mostra fotomicrografias, representativas, do músculo tibial anterior dos diferentes grupos estudados. Como já descrito no item 5, não houve diferença significativa entre os grupos sedentários *wild-type* (21 x 37) e *mdx* (21 x 37).

Os grupos *wild type* sedentários (21 e 37) mostraram morfologia normal do tecido, apresentando fibras poliédricas e núcleos periféricos (Figura 21A). Por outro lado, os animais *mdx* sedentários (21 e 37) mostraram alterações citoarquiteturais importantes, tais como: centralização nuclear, necrose/infiltrado inflamatório, *splitting*, variação tamanho de fibras e aumento de tecido conjuntivo (Figura 21B). Os animais distróficos submetidos ao treinamento de baixa intensidade mostraram melhora na morfologia do tecido quando comparados aos animais sedentários (Figura 21C e 21D x 21B). Contudo, mais uma vez o tempo prolongado do estímulo (37 sessões) mostrou melhorar os aspectos gerais da morfologia do músculo tibial anterior, dos animais *mdx*, quando comparado ao menor tempo de treinamento (21 sessões).

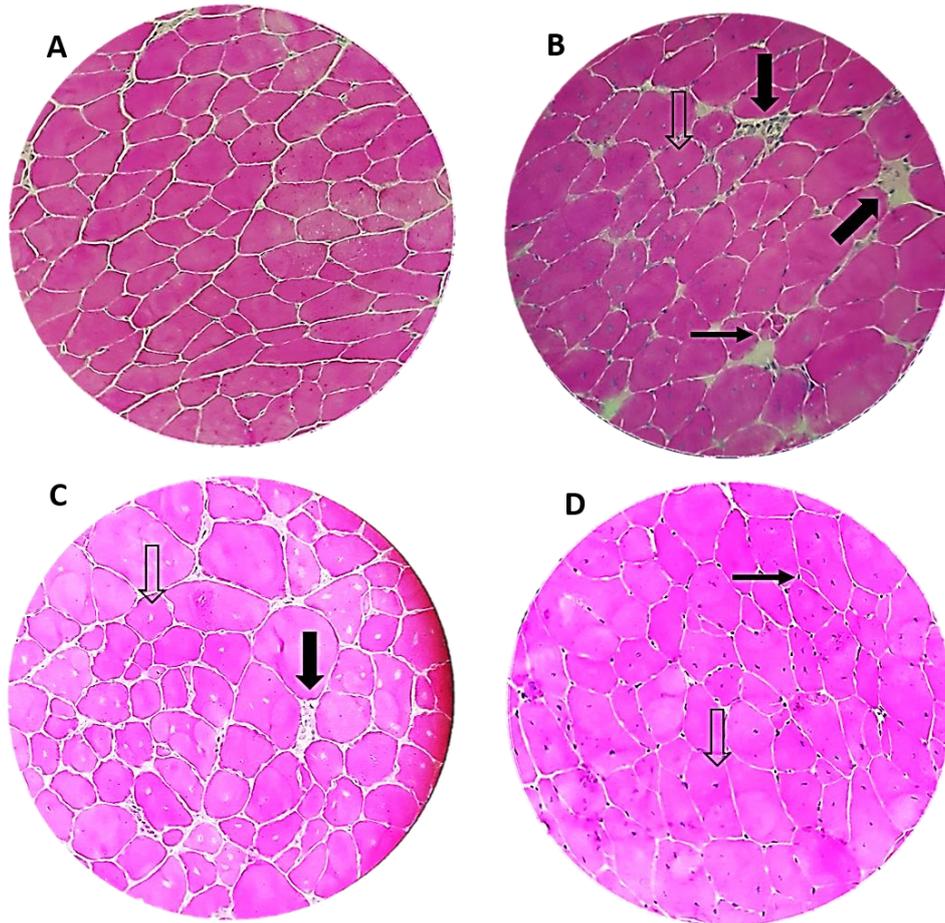


Figura 21 - Fotomicrografias do músculo TA de camundongos mdx - HE
Objetiva 40x. A – 21DSEDWT; B – 21DSEDMDX; C – 21DTRMDX; D – 37DTRMDX.
Seta vazia= Centralização nuclear; Setas grossas= Infiltrado inflamatório/necrose; Setas finas= *Splitting* celular.

5.4 Análises qualitativa e quantitativa da Imunomarcção para proteína utrofina

As análises qualitativas e quantitativas das lâminas que foram submetidas à aplicação do anticorpo para utrofina, através da técnica de imunofluorescência mostraram que, a doença pode estar acometendo outras estruturas à nível molecular, não apenas a proteína distrofina, As Figuras 22 e 23 mostram redução na imunomarcção da utrofina (verde) nos camundongos *mdx* sedentários (21DSEDMDX) quando comparados aos *wild-type* (21DSEDWT) ($p < 0.05$).

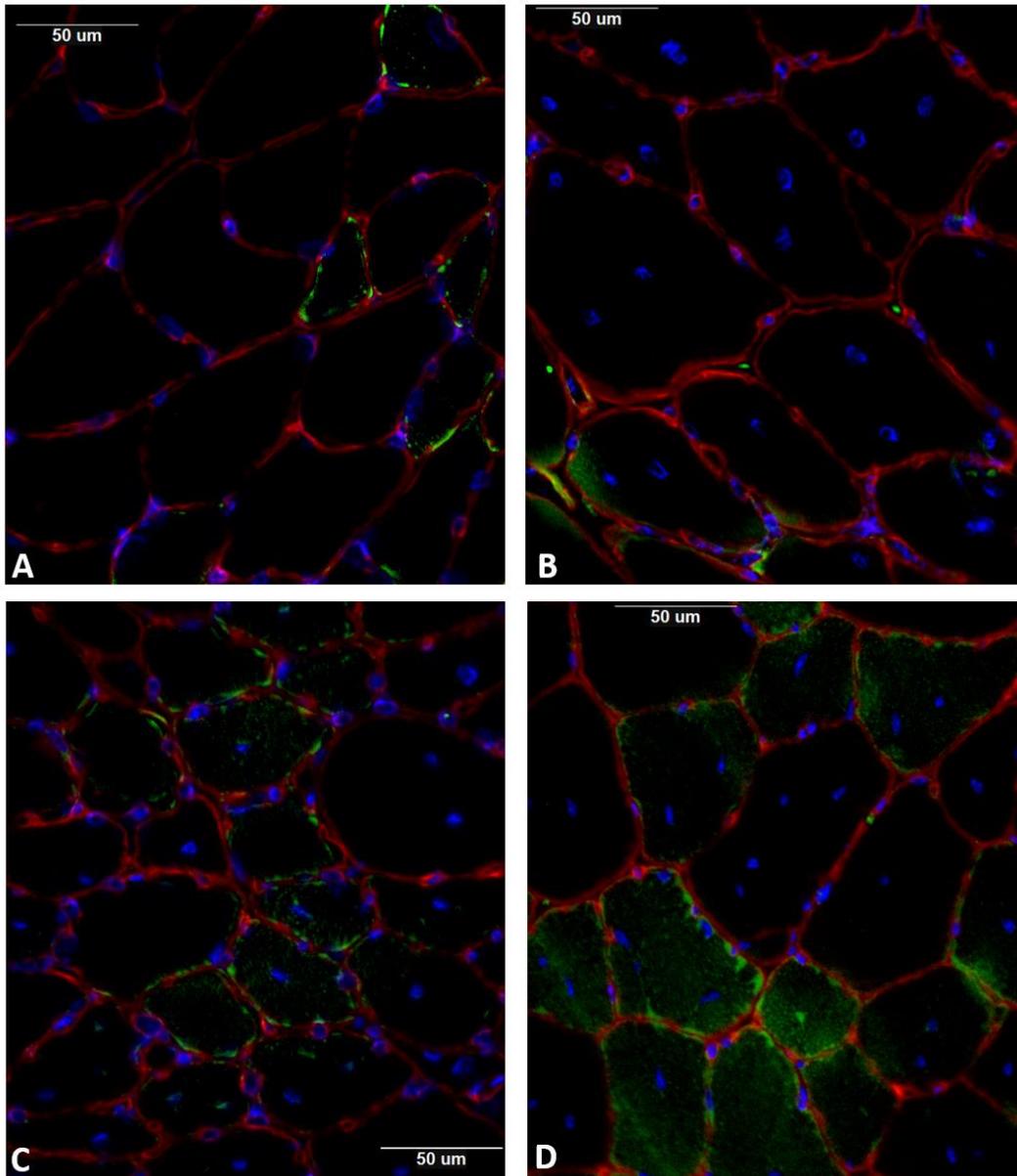


Figura 22 - Análise qualitativa da imunomarcção para utrofina no TA de animais mdx.
Objetiva de 20x; Barra de escala = 50µm. A= 21DSEDWT; B= 21DSEDMDX; C= 21DTRMDX; D= 37DTRMDX.
Imunomarcção em vermelho para laminina, verde para utrofina e azul (DAPI) núcleos. Observe que o músculo TA do grupo 37DTRMDX apresentou maior expressão da utrofina após o treino, quando comparado aos grupos 21DSEDMDX E 21DTRMDX.

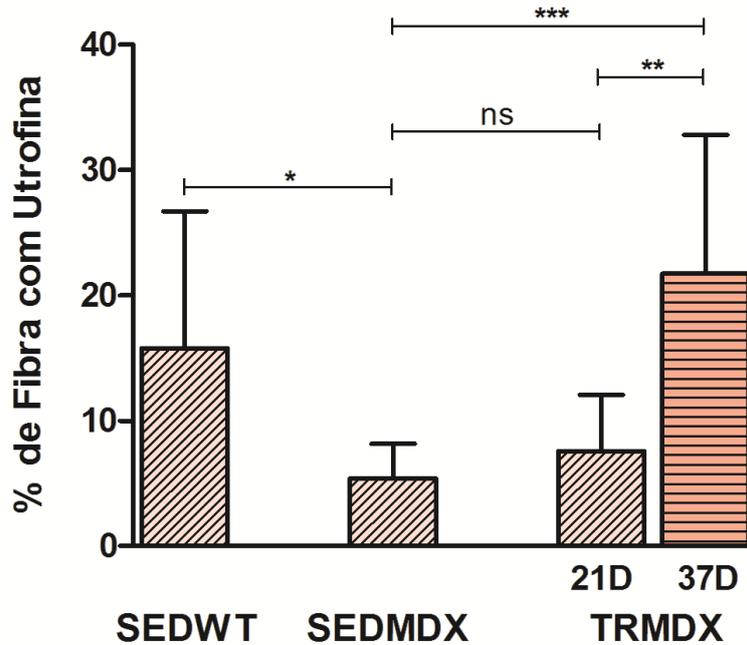


Figura 23 - Análise quantitativa da imunomarca o da utrofina no TA de camundongos mdx.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Mais uma vez o treinamento mostrou influenciar positivamente o músculo tibial anterior de animais *mdx*, tanto 21 quanto 37 sessões de treinamento, quando comparados aos animais *mdx* sedentários (21DSEDMDX x 2DTRMDX: $p > 0,05$; 21DSEDMDX x 37DTRMDX: $p < 0,05$).

Outro achado importante, observado nos animais *mdx*,   quando comparamos os tempos de treinamento, ou seja, 21DTRMDX com 37DTRMDX. Os animais *mdx* que mantiveram o treinamento aeróbico por tempo prolongado (37 sessões) mostraram um aumento da imunomarca o da utrofina ($p < 0,05$), sugerindo que o estímulo quando mantido por mais tempo pode aumentar o conteúdo desta proteína.

5.5 Conteúdo de Utofina no músculo TA – Western Blot

Os resultados desta análise semi-quantitativa para a proteína utrofina corroboram com os achados qualitativos e quantitativos observados na imunofluorescência para esta proteína, apresentados no item 5.4. Na análise de WB foi observado que esta proteína encontra-se reduzida nos animais distróficos sedentários (21 e 37) quando comparados aos *wild type* sedentários (21 e 37) (21DSEDMDX x 21DSEDWT; 37DSEDMDX x 37DSEDWT; $p < 0,05$) (Figuras 24 e 25).

Por outro lado, o exercício aeróbio de baixa intensidade mostrou ser efetivo para o aumento da utrofina no músculo tibial anterior dos camundongos distróficos, em ambos os tempos de aplicação, quando comparado com os músculos dos animais distróficos sedentários (21DSEDMDX x 21DTRMDX; $p>0.05$; 37DSEDMDX x 37DTRMDX; $p<0.05$) (Figuras 24 e 25). Outro achado importante foi a comparação entre os dois grupos de animais treinados (21DTRMDX x 37DTRMDX; $p>0.05$). O gráfico da figura 25 deixa claro que há um aumento no conteúdo da utrofina no grupo que treinou por mais tempo.

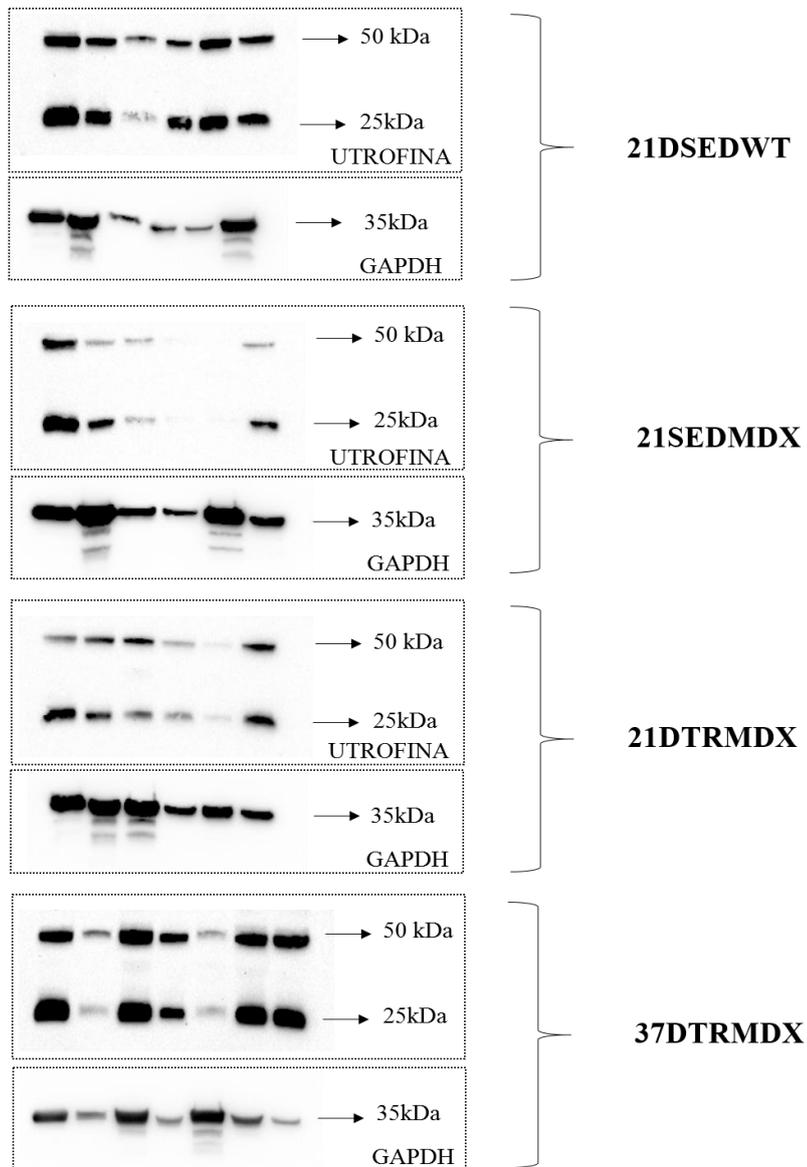


Figura 24 - Membranas de Western Blot – Utofina + GAPDH.

O primeiro poço de cada gel (da esquerda para direita) contém amostra de coração como controle positivo para proteína utrofina, os demais apresentam amostras do músculo tibial anterior.

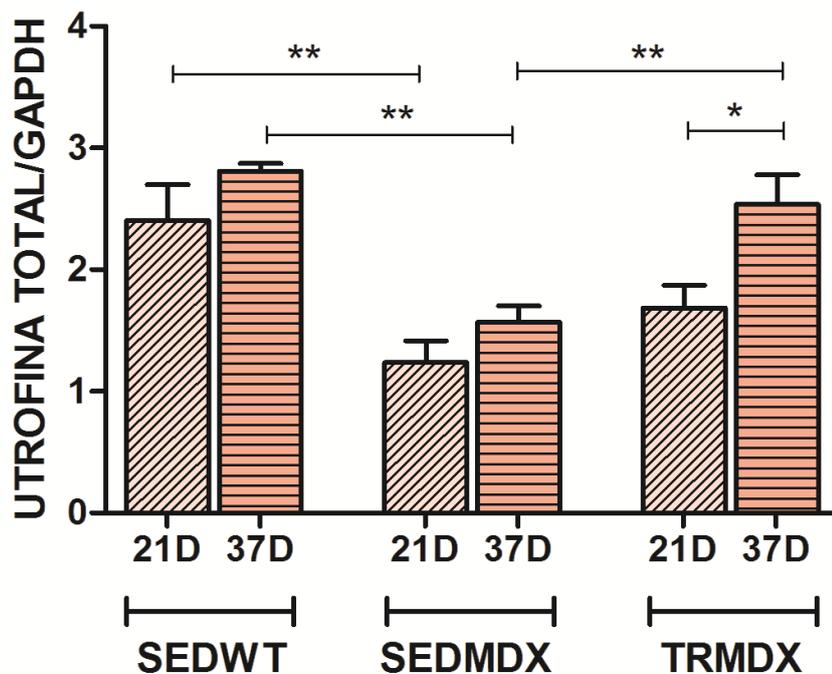


Figura 25 - Semi-quantificação de Utrofina/GAPDH

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

6. Discussão

Este projeto de pesquisa mostrou claramente algumas alterações negativas determinadas pela ausência da distrofina no músculo esquelético de camundongos *mdx*. Corroborando com a literatura científica, estudos também deixaram claro, no transcorrer do texto, que em seres humanos os efeitos negativos podem ser ainda maiores. A conhecida Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que afeta meninos pela ausência da proteína distrofina, atua de maneira devastadora na função muscular, prejudicando a qualidade de vida dessas crianças e a sobrevivência.

A cura, ainda, é algo distante para essas crianças então, cada vez mais cientistas investigam tratamentos paliativos que possam determinar melhor qualidade de vida e até mesmo postergar a evolução degenerativa da doença. O exercício físico tem mostrado ser uma ferramenta importante na reabilitação do músculo distrófico, seja no modelo experimental como no humano, quando aplicado de maneira cautelosa. Sendo assim, o presente estudo buscou entender e analisar os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade sobre o músculo esquelético de camundongos *mdx* focando, principalmente, na expressão da proteína utrofina, homóloga da distrofina

Como apresentado acima, nossos resultados mostraram resultados importantes e promissores no quadro evolutivo e degenerativo da doença, os quais, por um lado corroboram com estudos científicos e por outro contradizem. Buscando entender e justificar nossos achados, esses estudos científicos prévios nos embasam na discussão a seguir.

6.1 Teste Funcional para Preensão Palmar

O teste de Preensão Palmar é muito utilizado por ser confiável, reprodutível, não invasivo e fácil de ser realizado para avaliar a condição, função e força muscular no modelo experimental da Distrofia Muscular de Duchenne, camundongo *mdx*.

Os animais distróficos treinados (21DTRMDX e 37DTRMDX), do presente estudo, mostraram uma redução na força antes do treinamento quando comparado ao grupo controle sedentário 21DSEDWT ($p < 0,05$). PUTTEN e colaboradores (2012) também encontraram resultados semelhantes com os nossos achados, justificando que os animais *mdx* por apresentam fragilidade e disfunção muscular determinada pela ausência da proteína distrofina, apresentam como consequência, redução da força muscular. Com o treinamento (segundo teste realizado no período intermediário 11ª sessão para o grupo 21DTRMDX e na 19ª sessão para o grupo 37DTRMDX) foi possível observar que ambos os grupos treinados *mdx* mostraram uma melhora significativa da força de preensão quando comparado ao teste realizado antes do treinamento (pré treino). ZELIKOVICH, *et al.*, 2019, observaram que o treinamento de baixa intensidade (8m/min) em esteira durante 30 min, 3 vezes por semana durante 6 meses em animais *mdx* aumentou a força de preensão quando comparados ao grupo *mdx* sedentário. Eles chegaram a conclusão que esse aumento da força estava relacionado a um aumento na expressão de PGC1 α , um marcador de exercício aeróbico e também no aumento da fração oxidativa da miofibrila, confirmando a remodelação esperada do músculo para um perfil oxidativo aumentado, em resposta à adaptação determinada pelo exercício. Eles também avaliaram o efeito do exercício de baixa intensidade em um curto prazo, durante 4 dias, e concluíram que nenhuma mudança significativa foi observada. Sendo assim, melhoras na função muscular observadas em camundongos *mdx* exercitados parece ser decorrente da exposição crônica ao exercício. Esses achados corroboram com nossos estudos, pois no final do treinamento, após 21 ou 37 sessões de treinamento ambos os grupos continuaram a aumentar a força de preensão palmar quando comparado aos testes realizados no período

intermediário ($p < 0,05$), sugerindo que as miofibras distróficas têm um limiar mecânico e/ou dependente do tempo para adaptação funcional ao exercício em comparação com o músculo WT.

DE LUCA, *et al.*, 2005; HYZEWICZ, *et al.*, 2015; CAPOGROSSO, *et al.*, 2017, também realizaram um protocolo de exercício, que consistia em 30 min de corrida em esteira horizontal à 12 m/min, duas vezes por semana, durante 12 semanas, em camundongos WT e *mdx*. Com esse estudo, eles observaram uma diminuição da força nos animais distróficos submetidos ao exercício crônico concêntrico em esteira, quando comparado aos animais WT e alterações estruturais mais graves quando comparadas ao *mdx* sedentários. Esses achados contradizem os resultados do *grip strenght* no presente estudo. CAPOGROSSO e colaboradores (2017) acreditam que a fraqueza no animal *mdx* está de fato relacionada a um comprometimento da função neuromuscular induzida pelo exercício, dependente do tempo. Já HYZEWICZ e colaboradores (2015) observaram que esse protocolo de treinamento de alta intensidade (12m/min) causou uma regulação negativa de Sirt1, PGC1- α , PPAR γ e miogenina em animais *mdx*. Por outro lado, eles acreditam que o treinamento de baixa intensidade possa ser benéfico, já que a expressão dos genes mitocondrial e de diferenciação muscular foi aumentada após a roda voluntária em animais de 4-8 semanas de idade.

Nadar e correr em baixa intensidade em camundongos *mdx* também estimulou a mudança do músculo glicolítico rápido (tipo 2B) para o oxidativo (tipo 2A) e o músculo lento (tipo I). Apesar dessa mudança, a expressão de proteínas no músculo esquelético lento e rápido aumentou após nadar em baixa intensidade em camundongos com 4 semanas de idade. A comparação do grupo WT com o músculo *mdx* após natação em baixa intensidade também apontou para níveis mais altos de expressão de proteínas nas fibras *mdx*. Essa observação sugere que os músculos distróficos poderiam se beneficiar com os treinamentos de baixa intensidade.

Como já descrito anteriormente, ZELIKOVICH e colaboradores (2019) mostraram que o treinamento em esteira à 12m/min, 2 vezes por semana durante 30 min, agravaram o fenótipo dos animais *mdx*. Os protocolos de treinamento realizados entre 4 a 8 m/min em animais distróficos, mostraram que houve uma melhora na função muscular esquelética além de, atenuar a disfunção cardíaca e melhorar da capacidade respiratória. Assim, o exercício de baixa intensidade foi benéfico nesses camundongos sem aumentar

os danos à membrana muscular ou fibrose. Essa hipótese levantada de que houve uma possível proteção da membrana celular após treinamento de baixa intensidade pode vir a justificar nossos achados para creatina quinase, discutidos a seguir.

Um achado que nos surpreendeu foi a diferença entre os animais *mdx* no teste pré treino pois, os animais neste período apresentavam a mesma idade (6 semanas de vida). Contudo, em nenhuma das outras análises, realizadas no estudo, esses grupos mostraram-se diferentes. Sendo assim, uma hipótese que pode justificar é um erro na testagem realizada pelo operador ou até mesmo diferenças individuais nas ninhadas. PUTTEN, *et al.*, 2014 descreveram alguns possíveis erros que podem ser visualizados durante *grip strenght*. Os animais devem ser testados sempre pelo mesmo operador que não saiba quais eram os grupos experimentais. Os testes devem realizados na mesma hora e dia da semana, e na mesma sala para equalizar odores, ruídos, etc. É possível observar uma grande variação entre os camundongos individuais e os pontos no tempo para a realização do teste funcional, que também pode diferir bastante entre as ninhadas. Os animais devem apertar as grades sempre de forma paralela e horizontal, nunca de forma transversal e se o operador visualizar que houve uma diminuição da força quando comparada aos outros valores, ele deve desconsiderar esse resultado.

6.2 Alterações nos níveis séricos da Creatina Quinase (CK)

Os animais dos grupos *mdx* sedentários (21 e 37), do presente estudo, mostraram níveis séricos elevados para CK quando comparados aos respectivos controles dos grupos *wild type* (21 e 37). Esse resultado já era esperado pois, a ausência da proteína distrofina culmina na ruptura da membrana da fibra muscular com extravasamento da CK para corrente sanguínea (DECONINCK, *et al.*, 2007; STREHLE, *et al.*, 2014; MOREIRA-MARCONI, *et al.*, 2017). Já está bem documentado na literatura científica que tanto animais distróficos (AL-REWASHDY, *et al.*, 2014; KLEIN, *et al.*, 2017; HERMES, *et al.*, 2018) como seres humanos portadores da DMD (CACCHIARELLI, *et al.*, 2011; MCDONALD, *et al.*, 2012; STREHLE, *et al.*, 2014) apresentam aumento expressivo do conteúdo da CK sérica.

Os animais *mdx* treinados 21 e 37 sessões apresentaram níveis ainda mais elevados para CK quando comparados aos respectivos controles dos grupos sedentários de 21 e 37. Os níveis da CK no sangue são marcadores biológicos que indicam mionecrose e, por meio disso são usados como referência para medir os efeitos fisiológicos do exercício na

musculatura de camundongos *mdx* (FAIST, *et al.*, 2001). Estudo conduzido por SPAULDING, *et al.*, em 2018, mostrou aumento significativo dos níveis de CK de animais *mdx* após exercício em esteira de baixa intensidade quando comparados aos animais sedentários *mdx*. Esse aumento pode ser justificado pela força gerada na fibra muscular durante a contração, e conseqüentemente, por serem músculos desprovidos da proteína distrofina a possibilidade de lesão da membrana é maior concomitante, ao aumento do efluxo da CK.

Os resultados obtidos no presente estudo também corroboram com os achados nos estudos de SILVA, *et al.*, 2015 onde observaram aumento significativo da CK no grupo *mdx* exercitado. Esses mesmos autores também justificam que esse extravasamento está atribuído ao stress causado nas células musculares durante a contração muscular desses animais. Os valores aumentados de CK no presente estudo após o treinamento também já eram esperados pois, os animais *mdx* já apresentavam lesões prévias da membrana em decorrência do ciclo natural da doença, e com os ciclos de contração e relaxamento, durante o exercício, essa lesão pode ter sido exacerbada e com isso mais extravasamento da CK do meio intra para o extracelular (sangue).

Por outro lado, quando comparamos os grupos treinados entre si observamos um resultado surpreendente e oposto ao esperado, ou seja, redução significativa dos níveis de CK para os animais *mdx* após o treinamento mais longo (37 sessões). Esses achados corroboram com os observados na análise morfológica do tecido nas lâminas de H.E. Assim como houve redução da CK nos animais treinados por mais tempo, a histologia desse grupo também apresentou melhora na citoarquitetura das fibras musculares o que pode indicar, que a cronicidade do treino aeróbio de baixa intensidade estimulou de forma positiva a plasticidade muscular, tornando-as mais resistentes às lesões impostas pelas cargas mecânicas geradas pelo exercício e assim, reduzindo significativamente a saída da CK para o meio externo (sangue). ZELIKOVICH, *et al.*, 2019 submeteu camundongos *mdx* ao exercício aeróbio em esteira à uma intensidade de 8 m/min, 3 vezes por semana durante 6 meses. Os autores observaram que houve redução da CK sérica concomitante a melhora nos aspectos morfológicos das fibras sugerindo, adaptação positiva do músculo após longo período de treinamento.

Resultados similares foram obtidos em estudos realizados em nosso laboratório (Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular) onde em uma fase mais aguda de

treinamento excêntrico (3 sessões) a morfologia das células mostraram-se mais alteradas, com maiores sinais de rompimento de membrana (*splitting*), e conseqüentemente maiores níveis séricos de CK (PEDRAZANI, *et al.*, 2019). Por outro lado, assim como os resultados do presente estudo, PEDRAZZANI, *et al.*, (2019) observou que a submissão dos animais à 21 sessões mostraram reduzir ambas alterações, bioquímica e morfológica, observadas na fase mais aguda.

Apesar do teste bioquímico para a CK não ser o que confirma o diagnóstico da DMD, ele é atualmente o mais usual nas análises laboratoriais preliminares pois, não expõe a criança portadora da DMD à métodos tão invasivos, como a biópsia. Contudo, se houver a suspeita do indivíduo apresentar esta alteração genética, análises de histologia básica e imunomarcadores (anticorpos) poderão confirmar o diagnóstico.

6.3 Alterações histológicas do músculo tibial anterior

A DMD mostra claramente alterar a citoarquitura normal do músculo esquelético. Enquanto, a morfologia do músculo esquelético sadio é compreendida por fibras poliédricas com tamanho relativamente uniforme, núcleos periféricos e pouco tecido conjuntivo, as observadas no músculo distrófico são completamente opostas.

Na análise qualitativa dos aspectos gerais do tecido muscular, corados por H.E. no presente estudo, foi possível observar que a morfologia dos músculos tibiais anterior do grupo *wild type* sedentário (21SEDWT) apresentaram citoarquitura de um tecido saudável, como mencionadas no parágrafo anterior. Por outro lado, os animais dos grupos *mdx* sedentários (21DSEDMDX) mostraram alterações histológicas importantes, condizentes com a doença, tais como: centralização nuclear, necrose/infiltrado inflamatório, aumento de tecido conjuntivo, *splitting* e alteração do tamanho das fibras. BLAKE, *et al.*, 2002 e ALLEN, *et al.*, 2016 descrevem claramente em seus estudos que devido a ausência da proteína distrofina funcional ocorre uma desestabilização do aparato contrátil com o citoesqueleto e durante a mecanotransdução, propagação dos sinais mecânicos gerados pela contração, ocorre desorganização estrutural e rompimento do sarcolema. Esses mesmos autores, afirmam que essas alterações preliminares determinam alterações histológicas importantes, como: atrofia, pseudo-hipertrofia, mionecrose, fibrose e centralização nuclear.

A centralização nuclear é um indicativo de que houve lesão, e está ocorrendo um processo regenerativo na fibra, conduzido pelas células satélites (CS). Essas células são responsáveis por reestruturar a fibra danificada, seja em um músculo sadio ou doente, após uma lesão (RANTANEN, *et al.*, 1995; ALMEIDA, *et al.*, 2016). Nos músculos distróficos, a função das CS não é diferente contudo, com a evolução da doença essas células perdem a capacidade de proliferação, o que determina na interrupção do ciclo de degeneração/regeneração permanecendo apenas, o processo degenerativo (RENAULT, *et al.*, 2000; CHANG, *et al.*, 2016).

A interrupção do processo de regeneração, devido a exaustão das CS, determina aumento significativo do infiltrado inflamatório no tecido contrátil, e com a progressão da doença, este é substituído por tecido conjuntivo (MIZUNO, *et al.*, 2011; ZELIKOVICH, *et al.*, 2019), fato este que condiz aos nossos achados. Vale ressaltar que, a exacerbação do processo inflamatório culmina em sucessivas rupturas de membrana, facilitando a infiltração de íons cálcio do meio extracelular (WHITEHEAD, *et al.*, 2006; SILVA, *et al.*, 2015; BOZYCKI, *et al.*, 2018). Considerando que, o cálcio é um íon em potencial para ativação de vias de degeneração, como a via das caspases (BERNARDI, 1999; ABMAYR, *et al.*, 2004), as fibras musculares sofrem cada vez mais com o infiltrado inflamatório que por consequência, aumentam o exudato intracelular levando assim, essas células à tumefação. A tumefação é um aumento do volume da célula em decorrência do acúmulo de líquido no meio interno (exudato).

O aumento descontrolado desse volume (pseudo-hipertrofia) determina o rompimento da membrana e a célula se divide (*splitting*) (GROUNDS, *et al.*, 2014; JUNQUEIRA, *et al.*, 2017). Essa divisão gera duas ou até mais partes de células com tamanhos variados. Além disso, essas células sofrem processo de atrofia com a evolução da doença, pela ativação de vias como ubiquitina, variando ainda mais o tamanho entre elas. PEDRAZZANI, *et al.*, (2019) e BURNS, *et al.*, (2017) observaram alterações similares nos animais *mdx* em seus respectivos estudos.

Após as sessões de treinamento aeróbio (21 e 37) os músculos dos animais *mdx* apresentaram melhora dos aspectos gerais da citoarquitetura muscular. Na análise qualitativa dos músculos dos animais do grupo *mdx* submetidos à 21 sessões de treinamento aeróbio de baixa intensidade (21DTRMDX) foi possível observar alterações similares às observadas no grupo sedentário (21DSEDMDX) porém, menos intensas.

Com a manutenção do estímulo (treino aeróbio) durante 37 sessões, essa melhora foi ainda mais visível e significativa no músculo TA, quando comparado aos grupos 21DSEDMDX e 21DTRMDX. Na fotomicrografia do grupo 37DTRMDX é possível observar redução de fibras em degeneração, redução de tecido conjuntivo e regularização no tamanho das fibras musculares.

Estudos realizados pelos HOURDÉ, *et al.*, 2013; ZELIKOVICH, *et al.*, 2019 corroboram aos aqui apresentados. Esses autores observaram melhora na morfologia celular e redução da fibrose do músculo TA de animais *mdx* submetidos ao exercício aeróbio a longo prazo (4 a 4 meses e meio) em roda giratória, quando comparados aos músculos do grupo *mdx* sedentários. Outro achado importante reportado por HOURDÉ e colaboradores (2013) foi a melhora da força muscular. Esses autores justificam que essa melhora na força de contração pode ter reduzido a fragilidade celular acreditando que, o tempo prolongado possa ter sido benéfico para reestruturar o tecido. GORDON, *et al.* em 2013 também observaram melhora na morfologia dos músculos quadríceps e sóleo de camundongos *mdx*, submetidos ao exercício aeróbio durante 12 semanas em roda giratória. A justificativa apresentada por esses autores foi ao aumento do conteúdo da proteína utrofina (homóloga da distrofina) que possa ter contribuído na reestruturação celular reduzindo assim, as lesões no tecido.

6.4 Alterações na imunomarcção e no conteúdo da proteína utrofina

As análises, qualitativa e quantitativa, das lâminas processadas com anticorpo para utrofina, na técnica de imunofluorescência, sugerem que a doença possa estar acometendo outras proteínas situadas na membrana, não apenas a distrofina já que, houve redução significativa do conteúdo de utrofina nos animais do grupo *mdx* sedentários (21DSEDMDX) quando comparados aos *wild type* (21DSEDWT). Como já relatado na revisão da literatura, existem dois tipos de utrofina, a utrofina A expressa principalmente em fibras musculares, e a utrofina B, expressa em células endoteliais vasculares. BANKS e colaboradores (2014), utilizaram as técnicas de WB e imunofluorescência para quantificar o conteúdo da proteína utrofina A no músculo gastrocnêmio, em animais controles sadios (WT) e animais distróficos *mdx*. Através dessas análises eles observaram que a utrofina A estava quase ausente no sarcolema extra sináptico do grupo WT, mas ela estava presente no citoplasma das fibras do tipo 2B rápidas. Já no grupo *mdx*, a utrofina estava ausente no sarcolema extra sináptico na maioria das fibras do tipo 2B rápidas no

músculo gastrocnêmio e níveis baixos nas demais fibras. A redução na expressão da utrofina no sarcolema extra-sináptico dos animais *mdx* coincidiram com o aparecimento de fibras necróticas. Apesar do nosso estudo não ter realizado tipagem no tipo de fibra e nem especificado o tipo de utrofina, os achados de Banks nos ajuda a entender os nossos resultados, já que o TA (músculo avaliado em nosso trabalho) possui em sua maioria fibras do tipo 2B, justificando então, esse aumento da utrofina no animais controles WT e a redução no grupo *mdx*, já que as fibras do tipo 2B são as mais afetadas pela doença, expressando menos utrofina.

Por outro lado, os músculos dos animais *mdx* que foram submetidos aos treinamentos (21DTRMX e 37DTRMX) mostraram resultados opostos aos observados nos animais sedentários frente a imunomarcção e ao conteúdo da utrofina. Após 21 sessões de exercício aeróbio foi possível observar no TA aumento na expressão e no conteúdo da utrofina, através das técnicas de imunofluorescência e *western blot*, respectivamente. Mesmo não havendo diferença estatística em relação aos sedentários, esse resultado no âmbito clínico, infere positivamente pois, reforça que o exercício aeróbio de baixa intensidade influencia positivamente no tecido. Acrescido a esta melhora, os animais *mdx* do grupo 37DTRMDX apresentaram resposta ainda mais expressiva para no aumento da utrofina, sugerindo que o exercício mantido por período prolongado pode induzir ao aumento da síntese da utrofina. Na literatura científica não existem estudos que tenham treinado animais *mdx* por períodos longos com os mesmos parâmetros de treinamento aos aqui apresentados e, analisado a expressão da utrofina. Este fato nos impulsionou a buscar estudos equivalentes e, que nos fomentasse a redigir e discutir nossos resultados.

Como já mencionado anteriormente, GORDON, *et al.*, (2013) mostraram aumento no conteúdo da proteína utrofina em músculos distróficos (quadríceps e sóleo), através da técnica de WB, de animais *mdx* submetidos ao exercício aeróbio durante 12 semanas quando comparado aos animais *mdx* sedentários. Eles acreditam que a tradução da proteína utrofina é regulada por vias de sinalização ativadas pelo exercício aeróbio através do PGC-1 α ou também pela mudança no tipo de fibra musculares do tipo IIB para IIA. Estudo realizado por DELACROIX, e colaboradores (2018) também acreditam que o exercício aeróbio é capaz de melhorar o tecido muscular distrófico devido a ativação da via PGC-1 α além da calcineurina (uma serina que nos miócitos esqueléticos regula positivamente os promotores de genes específicos para fibras lentas). CHAKKALAKAL,

et al., 2003; DE LUCA, *et al.*, 2005 e CHALKIADAKI, *et al.*, 2014 acreditam que a atividade da calcineurina seja importante para manter o fenótipo da fibra lenta e conseqüentemente, aumentar a expressão da utrofina, o que pode exercer efeito benéfico retardando a progressão da doença no músculo do *mdx*. Esses estudos deixam claro que o (s) mecanismo (s) envolvido (s) no aumento da utrofina ainda não está bem elucidado na literatura científica.

Vale ressaltar, mais uma vez, que não realizamos a tipagem das fibras porém, o perfil do nosso treinamento infere, baseado na literatura (DE LUCA, *et al.*, 2005; HYZEWICZ, *et al.*, 2015; DELACROIX, *et al.*, 2018), que por se tratar de atividade de longo período, fibras oxidativas são mais recrutadas e possivelmente, possa estar ocorrendo uma transição de fibras mais glicolíticas para oxidativas. Se essa hipótese pode realmente estar ocorrendo, o treinamento dos animais *mdx* proposto no estudo pode ser uma medida protetora a ser imposta para retardar a evolução da doença já que, músculos oxidativos são menos acometidos em relação aos glicolíticos.

Sendo assim, novos estudos estão sendo realizados em nosso laboratório envolvendo aumento da utrofina e tipagem das fibras após longo período de treino para compreendermos melhor os efeitos do exercício aeróbio de baixa intensidade sobre músculos distróficos e com isso, ter mais embasamento científico da deliberação e aplicação de um tratamento promissor aos portadores da DMD.

7. Conclusão

Os resultados do nosso estudo deixou claro os impactos negativos que a ausência da distrofina determina no músculo TA de camundongos *mdx*. Do mesmo modo, o exercício aeróbio de baixa intensidade mostrou ser capaz de reverter, parcialmente, as alterações degenerativas impostas pela doença. Contudo, as melhoras observadas na histologia, no parâmetro bioquímico (CK), na função muscular e no conteúdo de utrofina foram mais evidenciados nos músculos dos animais *mdx* submetidos à 37 sessões.

Sendo assim, concluímos que o exercício aeróbio de baixa intensidade pode ser uma ferramenta terapêutica promissora no tratamento do músculo tibial anterior de camundongos *mdx*, quando aplicado por períodos mais prolongados.

Implicação Clínica

Apesar dos nossos resultados e estudos científicos mostrarem a eficiência do exercício aeróbio de baixa intensidade em animais distróficos, é preciso considerar que a DMD em crianças apresenta alguns sinais e evolução divergentes aos observados nos animais, como a regeneração. Sendo assim, a prescrição e aplicação de qualquer protocolo de exercício deve ser sempre baseado nas particularidades e individualidade, após uma avaliação minuciosa do paciente como um todo, não visando apenas o acometimento dos músculos esqueléticos, já que outros sistemas, como cardíaco, também são seriamente acometidos.

8. Referências

ABMAYR, S.; CRAWFORD, R. W.; CHAMBERLAIN, J. S. “Characterization of ARC, Apoptosis Repressor Interacting With CARD, in Normal and Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle.” *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/ddh018.2004.

ALEMDAROĞLU, I.; KARADUMAN, A.; YILMAZ, O. T.; TOPALOĞLU, H. “Different Types of Upper Extremity Exercise Training in Duchenne Muscular Dystrophy: Effects on Functional Performance, Strength, Endurance, and Ambulation”. *Muscle Nerve*. 51(5):697-705. doi: 10.1002/mus.24451. 2015.

ALMEIDA, C. F.; FERNANDES, S. A.; RIBEIRO JUNIOR, A. F.; OKAMOTO, O. K.; VAINZOF, M. “Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them.” *Stem Cells Int*. doi: doi.org/10.1155/2016/1078686. 2016.

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

ANNEXSTAD, E. J.; LUND-PETERSEN, I.; RASMUSSEN, M. “Duchenne Muscular Dystrophy.” *Tidsskrift for den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, ny Raekke*. 134(14):1361-4. doi: 10.4045/tidsskr.13.0836. 2014.

BALTGALVIS, K. A.; CALL, J. A.; COCHRANE, G. D.; LAKER, R. C.; YAN, Z.; DAWN A. LOWE, D. A. “Exercise Training Improves Plantarflexor Muscle Function in *mdx* Mice” *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 44(9): 1671–1679. doi: 10.1249/MSS.0b013e31825703f0. 2012.

BANKS, G. B.; COMBS, A. C.; ODOM, G. L.; BLOCH, R. J.; CHAMBERLAIN, J. S. “Muscle Structure Influences Utrophin Expression in *mdx* Mice.” *Plos Genetics*. 10(6):e1004431. doi: 10.1371/journal.pgen.1004431. 2014.

BAPTISTA, C. A. S. “Rhabdomyolysis After Non-Intense Physical Exercise.” *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2011.

BASU, U.; LOZYNSKA, O.; MOORWOOD, C.; PATEL, G.; WILTON, S. D.; TEJVIR, S. K. "Translational Regulation of Utrophin by miRNAs." *Plos One*. doi: 10.1371/journal.pone.0029376. 2011.

BERNARDI, P. "Mitochondria in Muscle Cell Death." *Italian Journal of Neurological Sciences*. doi:10.1007/s100720050057.1999.

BOULANGER, P. A.; HAMOUDI, D.; MARCADET, L.; KYOMI, L. F.; OVIDIU, D. R.; BOSSÉ, S.; ARGAW, A.; FRENETTE, J. "Utrophin Haploinsufficiency Does Not Worsen the Functional Performance, Resistance to Eccentric Contractions and Force Production of Dystrophic Mice". *Plos One*. 13(6):e0198408. doi: 10.1371. 2018.

BOZYCKI, L.; LUKASIEWICZ, K.; MATRYBA, P.; PIKULA, S. "Whole-Body Clearing, Staining and Screening of Calcium Deposits in the MDX Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Skeletal Muscle*. doi: 10.1186/s13395-018-0168-8.2018.

BULUT, N.; GURBUZ, I.; YILMAZ, O. "Associação da Força de Preensão Manual com Medidas Funcionais em Crianças Não Ambulatoriais Com Distrofia Muscular de Duchenne." *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. doi.org/10.1590/0004-282x20190161.2019.

CACCHIARELLI, D.; LEGNINI, I.; MARTONE, J.; CAZZELLA, V.; D'AMICO, AD.; BERTINI, E.; BOZZONI, I. "miRNAs as Serum Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy." *Embo Molecular Medicine*. doi: 10.1002/emmm.201100133. 2011.

CALL, J. A.; VOELKER, K. A.; WOLFF, A. V.; MCMILLAN, R. P.; EVANS, N. P.; HULVER, M. W.; TALMADGE, R. J.; GRANGE, R. W. "Endurance Capacity in Maturing *mdx* Mice is Markedly Enhanced by Combined Voluntary Wheel Running and Green Tea Extract." *Journal of Applied Physiology*. 105 (3): 923-932. 2008.

CAMPBELL, K. S.; MOSS, R. L. "History-Dependent Mechanical Properties of Permeabilized Rat Soleus Muscle Fibers." *Biophysical Journal*. 82(2): 929-943. 2002.

CHAKKALAKAL, J. V.; STOCKSLEY, M. A.; HARRISON, M. A.; ANGUS, L. M.; DESCHENES-FURRY, J.; ST-PIERRE, S.; MEGENEY, L. A.; CHIN, E. R.; MICHEL, R. N.; JASMIN, B. J. "Expression of Utrophin A mRNA Correlates With the Oxidative Capacity of Skeletal Muscle Fiber Types and is Regulated by Calcineurin/NFAT

Signaling.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100(13):7791-9. doi: 10.1073/pnas.0932671100. 2003.

CHALKIADAKI, A.; IGARASHI, M.; NASAMU, A. S.; KNEZEVIC, J.; GUARENTE, L. “Muscle-specific SIRT1 Gain-Of-Function Increases Slow-Twitch Fibers and Ameliorates Pathophysiology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy.” Plos Genetics. doi:10.1371/journal.pgen.1004490.2014.

CHANG, N.C.; FABIEN, P.; CHEVALIER, F. P.; RUDNICKI, M. P. “Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity”. Trends Molecular Medicine. 22(6): 479–496. 2016.

CORNACHIONE, A.; CACAO-BENEDINI, L. O.; SHIMANO, M. M.; J. B. VOLPON, J. B.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. "Morphological Comparison of Different Protocols of Skeletal Muscle Remobilization in Rats After Hindlimb Suspension." Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. 18(4): 453-461. 2008.

CORNACHIONE, A., CACAO-BENEDINI, L. O.; MARTINEZ, E. Z.; NEDER, L.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. "Effects of Eccentric and Concentric Training on Capillarization and Myosin Heavy Chain Contents in Rat Skeletal Muscles After Hindlimb Suspension." Acta Histochemica 113(3): 277-282. 2011.

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. 302(3): C566-574. 2012.

DARRAS, B. T.; URION, D. K.; GHOSH, P. S. “Dystrophinopathies”. Gene Reviews. PMID: 20301298. 2000.

DE LUCA, A.; NICO, B.; LIANTONIO, A.; DIDONNA, M. P.; FRAYSSE, B.; PIERNO, S.; BURDI, R.; MANGIERI, D.; ROLLAND, J. F.; CAMERINO, C.; ZALLONE, A.; CONFALONIERI, P.; ANDREETTA, F.; ARNOLDI, E.; COURDIER-FRUH, I.; MAGYAR, J. P.; FRIGERI, A.; PISONI, M.; SVELTO, M.; CONTE, C. C. “A Multidisciplinary Evaluation of the Effectiveness of Cyclosporine a in Dystrophic *mdx* Mice.” The American Journal of Pathology. 166(2):477-89. 2005.

DECONINCK, N.; DAN, B. "Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses." *Pediatric Neurology*. 36(1): 1-7. 2007.

DOMICIANO, M. D. O.; ALESSANDRO; ARAÚJO, A. S. D.; MACHADO, A. P. R.; VITOR, H. "Treinamento Aeróbio e Anaeróbio: Uma Revisão". *Revista Uningá Review*, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 2. 2010.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. "Men and Mice: Relating Their Ages." *Life Sciences*. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025. 2016.

ELASALY, M. "Molecular Diagnosis of Muscular Dystrophy. Gene therapy strategies. *Health & Medicine*. 2016.

FAIST, V.; KONIG, J.; HOGER, H.; ELMADFA, I. "Decreased Mitochondrial Oxygen Consumption and Antioxidant Enzyme Activities in Skeletal Muscle of Dystrophic Mice After Low-Intensity Exercise." *Nutrition & Metabolism*. 45:58-66. 2001.

FERNANDES, D. C.; CARDOSO-NASCIMENTO, J. J. A.; GARCIA, B. C. C.; COSTA, K. B.; ROCHA-VIEIRA, E.; OLIVEIRA, M. X.; MACHADO, A. S. D.; SANTOS, A. P.; GAIAD, T. P. "Low Intensity Training Improves Redox Status and Reduces Collagen Fibers on Dystrophic Muscle." *Journal of Exercise Rehabilitation*. doi: 10.12965/jer.1938060.030. 2019.

FERREIRA, J. C. B.; BACURAU, A. V.; BUENO, C. R.; CUNHA, T. C.; TANAKA, L. Y.; JARDIM, M. A.; RAMIRES, P. R.; BRUM, P. C. "Aerobic Exercise Training Improves Ca²⁺ Handling and Redox Status of Skeletal Muscle in Mice." *Experimental Biology and Medicine*. doi: 10.1258/ebm.2009.009165.2010.

GAIAD, T. P.; OLIVEIRA, M. X.; LOBO, A. R.; LIBORIO, L. R.; PINTO, P. A. F.; FERNANDES, D. C.; SANTOS, A. P.; AMBROSIO, C. E.; MACHADO, A. S. D. "Low-Intensity Training Provokes Adaptive Extracellular Matrix Turnover of A Muscular Dystrophy Model." *The Journal of Exercise Rehabilitation*. 13(6): 693-703. 2017.

GORDON, B. S.; LOWE, D. A.; KOSTEK, M. C. "Exercise Increases Utrrophin Protein Expression in the Mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Muscle Nerve*. 49(6):915-8.doi:10.1002/mus.24151.2014.

GOYENVALLE, A.; SETO, J. T.; DAVIES, K. E.; Chamberlain, J. "Therapeutic Approaches to Muscular Dystrophy." *Human Molecular Genetics*. 20(R1):R69-78. doi: 10.1093/hmg/ddr105. 2011.

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.; EDWARDS, B.; SQUIRE, S. E.; MOIR, L.; BERG, A.; BABBS, A.; RAMADAN, N.; WOOD, M. J.; DAVIES, K. E. "Embryonic Myosin is a Regeneration Marker to Monitor Utrrophin-Based Therapies for DMD. *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/ddy353. 2019.

HALL, J. E. "GUYTON & HALL: Tratado de Fisiologia Médica." Elsevier. 12ª Edição. 2011.

HAYES, A.; LYNCH, G. S.; WILLIAMS, D. A. "The Effects of Endurance Exercise on Dystrophic *mdx* Mice. Contractile and Histochemical Properties of Intact Muscles." *Proceedings Biological Sciences*. 253(1336):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*. 80(2): 670-679. 1996.

HAYES, A.; WILLIAMS, D. A. "Contractile Function and Low-intensity Exercise Effects of Old Dystrophic (*mdx*) Mice." *American Journal of Physiology*. 274(4 Pt 1): C1138-1144. 1998.

HAYWARD, R.; FERRINGTON, D. A.; KOCHANOWSKI, L. A.; MILLER, L. M.; JAWORSKY, G. M.; SCHNEIDER, C. M. "Effects of Dietary Protein on Enzyme Activity Following Exercise-Induced Muscle Injury." *Medicine and Science Sports Exercise*. 31(3):414-20. 1999.

HASHIDA, R.; KAWAGUCHI, T.; BEKKI, M.; OMOTO, M.; MATSUSE, H.; NAGO, T.; TAKANO, Y.; UENO, T.; KOGA, H.; GEORGE, J.; SHIBA, N.; TORIMURA, T. "Aerobic vs. Resistance Exercise in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review". *Journal of Hepatology*. 66(1):142-152. doi: 10.1016/j.jhep.2016.08.023. 2017.

HERMES, T. D. A.; KIDO, L. A.; MACEDO, A. B.; MIZOBUTI, D. S.; MORAES, L. H. R.; SOMAZZ, M. C.; CAGNON, V. H. A.; MINATEL, E. "Sex Influences Diaphragm Muscle Response in Exercised *Mdx* Mice. 42(12):1611-1621. doi: 10.1002/cbin.11057. 2018.

HOGREL, J. Y.; DECOSTRE, V.; LEDOUX, I.; ANTONIO, M. D.; NIKS, E. H.; GROOT, I. D.; STRAUB, V.; MUNTONI, F.; RICOTTI, V.; VOIT, T.; SEFERIAN, A.; GIDARO, T.; SERVAIS, L. "Normalized Grip Strength is a Sensitive Outcome Measure Through All Stages of Duchenne Muscular Dystrophy." *Journal of Neurology*. doi: 10.1007/s00415-02009800-9. 2020.

INFANTE, J. P.; HUSZAGH, V. A. "Mechanisms of Resistance to Pathogenesis in Muscular Dystrophies." *Molecular and Cellular Biochemistry*. 195(1-2): 155-167. 1999.

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

KEELING, R. M.; GOLUMBEEK, P. T. STREIF, E. M.; CONNOLLY, A. M. "Weekly Oral Prednisolone Improves Survival and Strenght in Male *mdx* Mice." *Muscle & Nerve*. doi.org/10.1002/mus.20646. 2007.

KENNEDY, T. L.; MOIR, L.; HEMMING, S.; EDWARDS, B.; SQUIRE, S.; DAVIES, K.; GUIRAUD, S. " Utrophin Influences Mitochondrial Pathology and Oxidative Stress in Dystrophic Muscle." *Skeletal Muscle*. doi 10.1186/s13395-017-0139-5. 2017.

KENNEDY, T. L.; GUIRAUD, S.; EDWARDS, B.; SQUIRE, S.; MOIR, L.; BABBS, A.; ODOM, G.; GOLEBIEWSKI, D.; SCHNEIDER, J.; CHAMBERLAIN, J. S.; DAVIES, K. E. " Micro-utrophin Improves Cardiac and Skeletal Muscle Function of Severely Affected D2/*mdx* Mice." *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*. 11:92-105. doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.005. 2018.

KLEIN, S. M.; PRANTL, L.; GEIS, S.; FELTHAUS, O.; DOLDERER, J.; ANKER, A. M.; ZEITLER, K.; ALT, E.; VYKOUKAL, J. "Circulatin Serum CK Level vs. Muscle Impairment for in Situ Monitoring Burden of Disease in *Mdx* – Mice." *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 65(4):327-334. doi: 10.3233/CH-16195. 2017.

KREIS, R.; WINGEIER, K.; VERMATHEN, P.; GIGER, E.; JONCOURT, F.; ZWYGART, K.; KAUFMANN, F.; BOESCH, C.; STEINLIN, M. "Brain Metabolite Composition in Relation to Cognitive Function and Dystrophin Mutations in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy." *NMR in Biomedicine*. doi:10.1002/nbm.1583. 2010.

LOWE, D. A.; WILLIAMS, B. O.; THOMAS, D. D.; GRANGE, R. W. "Molecular and Cellular Contractile Dysfunction of Dystrophic Muscle from Young Mice." *Muscle Nerve*. 34(1): 92-100. 2006.

LANDISCH, R. M.; KOSIR, A. M.; NELSON, S. A.; BALTGALVIS, K. A.; LOWE, D. A. "Adaptive and Nonadaptive Responses to Voluntary Wheel Running by *mdx* Mice." *Muscle & Nerve*. 38(4): 1290-1303. 2008.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. "Biologia Celular e Molecular." Editora Revinter. 4ª Edição. 2002.

LUE, Y. J.; CHEN, S. S.; LU, Y. M. "Quality of Life of Patients With Duchenne Muscular Dystrophy: From Adolescence to Young Men." *Disability and Rehabilitation*. doi.org/10.1080/09638288.2016.1196398. 2017.

MANNING, J.; O'MALLEY, D. "What Has The *mdx* Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy Contributed to our Understanding of this Disease?" *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 36(2):155-67. doi: 10.1007/s10974-015-9406-4. 2015.

MARKERT, C. D.; CASE L. E.; CARTER, G. T.; FURLONG, P. A.; GRANGE, R. W. "Exercise and Duchenne Muscular Dystrophy: Where We Have Been and Where We Need to Go". *Muscle Nerve*. 45(5):746-51. doi: 10.1002/mus.23244. 2012.

MATHUR, S.; LOTT, D. J.; SENESAC, C.; GERMAIN, S. A.; VOHRA, R. S.; SWEENEY, H. L.; WALTER, G. A.; VANDENBORNE, K. "Age-Related Differences in Lower-Limb Muscle Cross-Sectional Area and Torque Production in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy." *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 91(7): 1051-1058. 2010.

MAVROGENI, S.; GIANNAKOPOULOU, A.; PAPAVALIIOU, A.; MARKOUSIS-MAVROGENIS, G.; PONS, R.; KARANASIOS, E.; NOUTSIAS, M.; KOLOVOU, G.;

PAPADOPOULOS, G. "Cardiac Profile of Asymptomatic Children with Becker and Duchenne Muscular Dystrophy Under Treatment with Steroids and With/without Perindopril." *BMC Cardiovascular Disorders*. doi: 10.1186/s12872-017-0627-x. 2017.

MCDONALD, C. M. "Clinical Approach to the Diagnostic Evaluation of Hereditary and Acquired Neuromuscular Diseases." *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. doi: 10.1016/j.pmr.2012.06.011. 2012.

MCGREEVY, J. W. HAKIM, C. H.; MCINTOSH, M. A. DUAN, D. "Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy: From Basic Mechanisms to Gene Therapy." *Disease Models & Mechanisms*. doi:10.1242/dmm.018424. 2015.

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*. 299(5): C1127-1135. 2010.

MIZUNO, H.; NAKAMURA, A.; AOKI, Y.; ITO, N.; KISHI, S.; YAMAMOTO, K.; SEKIGUCHI, M.; TAKEDA, S.; HASHIDO, K. "Identification of Muscle-Specific microRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy." *Plos One*. doi: 10.1371/journal.pone.0018388. 2011.

MOREIRA-MARCONI, E.; SÁ-CAPUTO, D. C.; DIONELLO, C. F.; GUEDES-AGUIAR, E. O.; SOUSA-GONÇALVES, C. R.; MOREL, D. S.; PAINEIRAS-DOMINGOS, L. L.; SOUZA, P. L.; KÜTTER, C. R.; COSTA-CAVALCANTI, R. G.; COSTA, G.; PAIVA, P. C.; FIGUEIREDO, C.; BRANDÃO-SOBRINHO-NETO, S.; STARK, C.; UNGER, M.; BERNARDO-FILHO, M. "Whole-Body Vibration Exercise is Well Tolerated in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy: A Systematic Review." *African Journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*. 14(4 Suppl):2-10. doi: 10.21010/ajtcam.v14i4S.1. 2017.

NAVARRO, F.; BACURAU, R. F. P. "Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho." Editora Manole Ltda. 1ª Edição. 2000.

NG, S. Y.; MANTA, A.; LJUBICIC, V. "Exercise Biology of Neuromuscular Disorders. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. doi: 10.1139/apnm-2018-0229. 2018.

OHLENDIECK, K.; ERVASTI, J. M.; MATSUMURA, K.; KAHL, S. D.; LEVEILLE, C. J.; CAMPBELL, K. P. "Dystrophin-related Protein is Localized to Neuromuscular Junctions of Adult Skeletal Muscle." *Neuron*. 7(3): 499-508. 1991.

PEARCE, M.; BLAKE, D. J.; TINSLEY, J.M.; BYTH, B. C.; CAMPBELL, L.; MONACO, A. P.; DAVIES, K. E. "The Utrophin and Dystrophin Genes Share Similarities in Genomic Structure." *Human Molecular Genetics*. 2(11):1765-72. 1993.

PEDRAZZANI, P. S. "Efeitos do Exercício Excêntrico na Reabilitação do Músculo Esquelético de Camundongos *Mdx* Após 3 E 21 Dias De Treinamento. Avaliações Morfológica, Funcional E Molecular". 2019.

PIETTE, A. B.; HAMOUDI, D.; MARCADET, L.; LABELLE, F. K.; DAVID, R. O.; BOSSÉ, S.; ARGAW, A.; FRENETTE, J. "Utrophin Haploinsufficiency Does Not Worsen the Functional Performance, Resistance to Eccentric Contractions and Force Production of Dystrophic Mice." *Plos One*. doi.org/10.1371/journal.pone.0198408. 2018.

PIZZATO, T. M.; BAPTISTA, C. R. J. A.; SOUZA, M. A.; BENEDICTO, M. M. B.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. "Longitudinal Assessment of Grip Strength Using Bulb Dynamometer in Duchenne Muscular Dystrophy." *Brazilian Journal of Physical Therapy*. doi.org/10.1590/bjpt-rbf.2014.0031.2014.

PONS, F.; AUGIER, N.; LEGER, J. O.; ROBERT, A.; TOME, F. M.; FARDEAU, M.; VOIT, T.; NICHOLSON, L. V.; MORNET, D.; LEGER, J. J. "A Homologue of Dystrophin is Expressed at the Neuromuscular Junctions of Normal Individuals and DMD Patients, and of Normal and *mdx* Mice. Immunological Evidence." *FEBS Letters*. 282(1): 161-165. 1991.

PUTTEN, M. V.; HULSKER, M.; NADARAJAH, V. D.; HEININGEN, S. H. V.; HUIZEN, E. V.; ITERSAN, M. V.; ADMIRAAL, P.; MESSEMAKER, T.; DUNNEN, J. T. D.; HOEN, P. A. C.; AARTSMA-RUS, A. "The Effects of Low Levels of Dystrophin on Mouse Muscle Function and Pathology." *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0031937.2012.

RAJAGANAPATHY, S.; MCCOURT, J. L.; GHOSAL, S.; LINDSAY, A.; MCCOURT, P.; LOWE, D. A.; ERVASTI, J. M.; SALAPAKA, M. V. "Distinct Mechanical Properties

in Homologous Spectrin-like Repeats of Utrophin.” Scientific Reports. doi: 10.1038/s41598-019-41569-4. 2019.

RANTANEN, J.; HURME, T.; LUKKA, R.; HEINO, J.; KALIMO, H. “Satellite Cell Proliferation and the Expression of Myogenin and Desmin in Regenerating Skeletal Muscle: Evidence for Two Different Populations of Satellite Cells.” Lab Invest. 341-7. 1995.

RENAULT, V.; PIRON-HAMELIN, G.; FORESTIER, C.; DIDONNA, S.; DECARY, S.; HENTATI, F. “Skeletal Muscle Regeneration and the Mitotic Clock.” Exp. Gerontol. 711-9. 2000.

RODINO-KLAPAC, L. R.; MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. "Update on the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy." Current Neurology and Neuroscience Reports. 13(3): 332. 2013.

ROONEY, J. E.; WELSER, J. V.; DECHERT, M. A.; FLINTOFF-DYE, N. L.; KAUFMAN, S. J.; BURKIN, D. J. "Severe Muscular Dystrophy in Mice that Lack Dystrophin and Alpha7 Integrin." Journal of Cell Science. 119(Pt 11): 2185-2195. 2006.

RUI, Y.; PAN, F. “Composition of Muscle Fiber Types in Rat Rotator Cuff Muscles.” Muscle Biology. doi.org/10.1002/ar.23384. 2016.

SILVA, A. A. D. O.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; D`AVILA, K. D. A. L.; SERRA, A. J.; ALBERTINI, R.; FRANÇA, C. M.; NISHIDA, J. A.; CARVALHO, P. D. T. C. D. “Pre-Exercise Low-Level Laser Therapy Improves Performance and Levels of Oxidative Stress Markers in *Mdx* Mice Subjected to Muscle Fatigue by High-Intensity Exercise.” Lasers Medicine Science. 30:1719-1727. doi: 10.1007/s10103-015-1777-7. 2015.

SILVERTHORN, D. U. “Fisiologia Humana: Uma abordagem Integrada. Artmed. 5ª Edição. 2010.

SILVERTHORN, D. U. “Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.” Artmed. 7ª Edição. 2017.

SPAULDING, H.; SELSBY, J. “Is Exercise the Right Medicine for Dystrophic Muscle?” Medicine & Science in Sports & Exercise. Doi: 10.1240/MSS.1639. 2018.

SQUIRE, S.; RAYMACKERS, J. M.; VANDEBROUCK, C.; POTTER, A.; TINSLEY, J.; FISHER, R.; GILLIS, J. M.; DAVIES, K. E. "Prevention of Pathology in *mdx* Mice by Expression of Utrophin: Analysis Using an Inducible Transgenic Expression System." *Human Molecular Genetics*. 11(26): 3333-3344. 2002.

STREHLE, E. M.; STRAUB, V. "Recent Advances in the Management of Duchenne Muscular Dystrophy." *Archives of Disease in Childhood*. doi:10.1136/archdischild-2014-307962. 2014.

TAKEKURA, H.; FUJINAMI, N.; NISHIZAWA, T.; OGASAWARA, H.; KASUGA, N. "Eccentric Exercise-Induced Morphological Changes in the Membrane Systems Involved in Excitation-Contraction Coupling in Rat Skeletal Muscle." *The Journal of Physiology*. 533(Pt 2):571-83. 2001.

TIMMONS, J. A.; LARSSON, O.; JANSSON, E.; FISCHER, H.; GUSTAFSSON, T.; GREENHAFF, P. L.; RIDDEN, J.; RACHMAN, J.; PEYRARD-JANVID, M.; WAHLESTEDT, C.; SUNDBERG, C. J. "Human Muscle Gene Expression Responses to Endurance Training Provide a Novel Perspective on Duchenne Muscular Dystrophy." *The FASEB Journal*. 2005.

TJONDROKOESOEMO, A.; SCHIPS, T. G.; SARGENT, M. A.; VANHOUTTE, D.; KANISICAK, O.; PRASAD, V.; LIN, S.C.; MAILLET, M.; MOLKENTIN, J. D. "Cathepsin S Contributes to the Pathogenesis of Muscular Dystrophy in Mice." *The Journal of Biological Chemistry*. 291(19):9920-8. doi: 10.1074/jbc.M116.719054. 2016.

WEBSTER, C.; SILBERSTEIN, L.; HAYS, A. P.; BLAU, H. M. "Fast Muscle Fibers are Preferentially Affected in Duchenne Muscular Dystrophy." *Cell*. doi:10.1016/0092-8674(88)90463-1. 1988.

WEIR, A. P.; BURTON, E. A.; HARROD, G. "A and B-Utrophin Have Different Expression Patterns and are Differentially Up-Regulated in *mdx* Muscle." *Journal of Biological Chemistry*. doi 10.1074/jbc.M205177200. 2002.

WINDER, S. J. "The Membrane-Cytoskeleton Interface: the Role of Dystrophin and Utrophin." *Journal of muscle research and cell motility*. 18(6):617-29. doi:10.1023/A:1018627705273. 1997.

WINEINGER, M. A.; ABRESCH, R. T.; WALSH, S. A.; CARTER, G. T. "Effects of Aging and Voluntary Exercise on the Function of Dystrophic Muscle From *mdx* Mice." American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation. 77(1): 20-27. 1998.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. "Muscle Damage in MDX (Dystrophic) Mice: Role of Calcium and Reactive Oxygen Species." Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04394.x. 2006.

ZELIKOVICH, A. S.; QUATTROCELLI, M.; SALAMONE, I. M.; KUNTZ, N. L.; MCNALLY, E. M. "Moderate Exercise Improves Function and Increases Adiponectin in the *mdx* Mouse Model of Muscular Dystrophy." 9(1):5770. doi: 10.1038/s41598-019-42203-z. 2019.

ANEXOS

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

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

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

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

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

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

Área: Centro de Ciências Biológicas E da Saúde

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos transgênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [48](#)

Linhagem: [C57BL10](#)

Peso: [15 a 20 g](#)

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

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

São Carlos, 27 de junho de 2018

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

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

Anexo II – Inscrição no XXIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia – RJ e Submissão de Trabalho.



RECIBO

R\$ 538,00

Recebemos de **TATIANA OLIVEIRA PASSOS DE ARAUJO**, CPF: **324.258.348-50**, a importância de **R\$ 538,00 (quinhentos e trinta e oito reais)**, referente a(s) atividade(s) abaixo:

INSCRIÇÃO NO XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOTERAPIA

TAXA DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS CIENTÍFICOS

Forma de pagamento: CIELO

Recife, 05 de dezembro de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Denise Flávio de Carvalho Botelho Lima'.

Denise Flávio de Carvalho Botelho Lima - Presidente da AFB
AFB - Associação de Fisioterapeutas do Brasil
CNPJ: 07.818.190/0001-06