

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE SAÚDE E SOCIEDADE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**

**CARACTERIZAÇÃO DO REMODELAMENTO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS**  
**MDX SUBMETIDOS A TREINAMENTO AERÓBICO**

Luciana Alécio Cabanelas

**Orientadora:** Profa. Dra. Flavia de Oliveira

**Santos**

**2022**

**LUCIANA ALÉCIO CABANELAS**

**CARACTERIZAÇÃO DO REMODELAMENTO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS  
MDX SUBMETIDOS A TREINAMENTO AERÓBICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde da Universidade Federal de São Paulo - *Campus* Baixada Santista, como exigência para obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Orientadora:** Profa. Dra. Flavia de Oliveira

**Santos**

**2022**

A366cc Alécio Cabanelas, Luciana.  
Caracterização do remodelamento cardíaco de camundongos mdx submetidos a treinamento aeróbico. / Luciana Alécio Cabanelas; Orientadora Flavia de Oliveira; Coorientador . -- Santos, 2022.  
75 p. ; 30cm

Tese (Doutorado - Pós-graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde) -- Instituto Saúde e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2022.

1. miocárdio. 2. Distrofia Muscular do Tipo Duchenne. 3. gelatinases. 4. cicloxigenase-2. 5. estresse oxidativo. I. de Oliveira, Flavia, Orient.  
II. Título.

CDD 610

**LUCIANA ALÉCIO CABANELAS**

**CARACTERIZAÇÃO DO REMODELAMENTO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS  
MDX SUBMETIDOS A TREINAMENTO AERÓBICO**

**Presidente da Banca:** Dra. Flavia de Oliveira

**BANCA EXAMINADORA**

Profª. Dra. Renata de Britto Mari

Prof. Dr. Josemberg da Silva Baptista

Prof. Dr. William Paganini Mayer

Profª. Dra. Cristina dos Santos Cardoso de Sá

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE SAÚDE E SOCIEDADE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS**

**Chefe do Departamento de Biociências:** Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

**Coordenadora do Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde:**

Profa. Dra. Alessandra Medeiros

À todas as mulheres da minha família, que me ensinaram com suas histórias que ser forte é a nossa única opção.

***“Que nada nos defina, que nada nos sujeite.  
Que a liberdade seja a nossa própria substância  
[...]” Simone de Beauvoir***

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha professora e orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flavia de Oliveira, pela porta aberta para desenvolver este trabalho, e por guiá-lo com assertividade e ternura, por toda sua disponibilidade e paciência. Obrigada pelas suas palavras e orientações, para este trabalho e para a vida e por vezes acreditar mais em mim do que eu mesma. Obrigada pela força e incentivo em tempos tão turbulentos para a conclusão deste trabalho e pelos ensinamentos que levarei para sempre.

Agradeço a Mariana Cruz Lazzarin, por me ensinar e acompanhar nos procedimentos no laboratório, pelo seu comprometimento com a excelência na pesquisa e ensino. Este trabalho não seria possível sem você.

Agradeço ao meu companheiro da vida, meu esposo Gustavo, que fez o possível e impossível para que eu pudesse estar aqui hoje e me reerguer nos momentos difíceis em que desistir não era uma opção.

Agradeço a minha mãe Darli, sempre presente e disponível, apoiadora dos meus planos e sonhos e que mesmo frente às adversidades da vida, me trouxe até aqui.

Por fim agradeço aos professores do programa de pós-graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde e aos colegas de pós-graduação que tornaram a rotina mais leve, pelo conhecimento e conselhos compartilhados: Muito obrigada!

## RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária progressiva e com envolvimento cardíaco. Este estudo teve como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos no remodelamento cardíaco do ventrículo esquerdo de modelos experimentais para a DMD (camundongos mdx) submetidos ao exercício físico aeróbico, a fim de acelerar a progressão da doença. Foram utilizados camundongos C57BL/10 e C57BL/10-DMD<sup>Mdx</sup>, machos, com 6 meses de idade. O protocolo de exercício físico teve duração de oito semanas para os grupos treinados (Mdx-T), enquanto os animais dos grupos controle (C) e mdx sedentário (Mdx-S) não passaram por intervenção. Após a eutanásia, os corações foram removidos para serem submetidos às análises: morfométrica (análise da densidade dos núcleos e espessura dos cardiomiócitos e análise do tecido conjuntivo); imunistoquímica para análise *in situ* das proteínas: MMP-2, MMP-9, COX-2 e 8-OHdG. Foi empregado o teste de t de Student para a comparação entre os grupos em relação às variáveis da espessura dos cardiomiócitos, área do perfil dos cardiomiócitos e estereologia do colágeno. Para a imunomarcagem do 8-OHdG e COX-2 utilizou-se ANOVA seguido de comparações múltiplas de Tukey. Como resultados, as fotomicrografias indicaram que os grupos Mdx-S e Mdx-T apresentaram perda difusa dos cardiomiócitos, aumento do espaço de matrix extracelular e das áreas de infiltrado inflamatório e de tecido conjuntivo, sendo essas alterações mais evidentes no Mdx-T. A análise morfométrica mostrou que a espessura dos cardiomiócitos dos animais Mdx-T foi menor que a do Mdx-S. Na análise qualitativa da MMP-2 e 9, foi possível observar imunoreatividade em áreas de acúmulo de tecido conjuntivo nos animais mdx, mais evidentes nos grupo Mdx-T. A imunexpressão da COX-2 foi maior nos animais do grupo Mdx-T do que no Mdx-S e grupo C. Já a presença do 8-OHdG foi maior no grupo Mdx-T e Mdx-S quando comparados ao grupo C. O protocolo de exercícios utilizado foi capaz de exacerbar o quadro de degeneração e atrofia dos cardiomiócitos. Ainda nos animais Mdx-T houve maior degradação do colágeno relacionado às MMPs e exacerbação do quadro inflamatório e estresse oxidativo relacionado a danos ao DNA, evidenciados pela maior presença da COX-2 e do 8-OHdG, respectivamente.

**Palavras-chave:** miocárdio, Distrofia Muscular do Tipo Duchenne, gelatinases, cicloxigenase-2, estresse oxidativo.



## ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive hereditary disease with cardiac involvement. This study aimed to evaluate cardiac remodeling pathways of left ventricle in an animal model of DMD (mdx mice) submitted to aerobic exercise. C57BL/10 and C57BL/10-DMDmdx mice, 6 months old, male, were used. The experimental protocol of physical exercise lasted eight weeks, in which the trained groups (Mdx-T) were submitted to a physical training protocol while the animals of groups control (C) and sedentary mdx (Mdx -S) did not undergo intervention. After euthanasia, the hearts were removed to be submitted to the following analyses: morphometric (analysis of nuclei density and cardiomyocyte thickness and analysis of connective tissue); immunohistochemistry for in situ analysis of proteins: MMP-2, MMP-9, COX-2 and 8-OHdG. Student's t test was used for independent samples in the comparison between groups in relation to the variables cardiomyocyte thickness, cardiomyocyte profile area and collagen stereology. Regarding 8-OHdG and COX-2 immunostaining, ANOVA and Tukey's multiple comparisons were used. The photomicrographs indicated that the Mdx-S and Mdx-T groups showed diffuse loss of cardiomyocyte, increased extracellular matrix space and areas of inflammatory infiltrate and connective tissue, these alterations being more evident in the Mdx-T group. The morphometric analysis showed that the thickness of the cardiomyocytes of the Mdx-T animals was smaller than that of the Mdx-S. In the qualitative analysis of MMP-2 and 9, it was possible to observe their presence in areas of collagen tissue accumulation in mdx animals, more evident in the Mdx-T groups. The immunoexpression of COX-2 was higher in the animals of the Mdx-T group than in the Mdx-S and was higher than in C group. The presence of 8-OHdG was higher in the Mdx-T and Mdx-S groups when compared to C group. The aerobic training protocol was able to increase the process of degeneration and atrophy of cardiomyocytes. In Mdx-T group, there was greater degradation of collagen related to MMPs and exacerbation of the inflammatory condition and oxidative stress related to DNA damage, evidenced by the enhanced presence of COX-2 and 8-OHdG, respectively.

**Keywords:** myocardium, Duchenne Muscular Dystrophy, gelatinases, cyclooxygenase-2, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação da metodologia empregada na mensuração da espessura dos cardiomiócitos com o *software* Axio Vision 4.0, Zeiss®. Com a objetiva de 40x e campos com fibras musculares cardíacas seccionadas longitudinalmente, foi realizada a mensuração da espessura dos cardiomiócitos de acordo com os seguintes critérios: foram selecionados cardiomiócitos com seus limites celulares visíveis e com o núcleo centralizado. Em seguida, com o auxílio do *software* mencionado, traçou-se uma linha perpendicular à estrutura da fibra, tendo o núcleo como referência e para a obtenção da espessura do cardiomiócito em  $\mu\text{m}$ .....33

**Figura 2:** Representação da metodologia empregada na mensuração da área de perfil dos cardiomiócitos com o *software* Axio Vision 4.0, Zeiss®. Com a objetiva de 40x e campos com fibras musculares cardíacas seccionadas transversalmente, foi realizada a mensuração da área de perfil dos cardiomiócitos de acordo com os seguintes critérios: foram selecionados campos que apresentassem cardiomiócitos seccionados transversalmente, com seus limites celulares visíveis e núcleos centralizados na objetiva de 40x. Em seguida, com o auxílio do *software* mencionado, circundou-se estrutura da fibra, tendo o núcleo no centro como referência, para a obtenção da área de perfil do cardiomiócito em  $\mu\text{m}^2$ .....34

**Figura 3:** Representação da metodologia empregada na análise do tecido conjuntivo. Fotomicrografias foram capturadas com objetiva de 20x em um microscópio invertido e grades sistemáticas, contendo 48 pontos uniformes foram sobrepostos às imagens. Foram analisados em média 30 campos por animal, sendo contados os pontos que estivessem sobre o tecido cardíaco e todos os pontos que estivessem sobre o colágeno (setas), ambos quando tangenciassem o canto superior direito da cruz.....36

**Figura 4:** Representação da metodologia empregada para a contagem dos núcleos imunomarcados pelo 8-OHdG. Sistema teste composto por quatro linhas que formaram um quadrado com área conhecida, sendo duas linhas contínuas que representaram as “linhas proibidas” e outras duas linhas pontilhadas que representaram as “linhas permitidas”. Os núcleos que tangenciassem as linhas permitidas eram contabilizados (setas pretas), já os que tangenciassem as linhas proibidas, não eram contabilizados (seta vermelha).....38

**Figura 5:** Fotomicrografias do miocárdio dos grupos Mdx-S e Mdx-T. Observou-se áreas de tecido conjuntivo ( $\Delta$ ), maior espaçamento entre as fibras (\*) e áreas degeneração das fibras do miocárdio (setas). Barra de calibração 50 $\mu$ m.....40

**Figura 6.** Média + DP da espessura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos Mdx-S e Mdx-T. O grupo Mdx-T apresentou menor espessura dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo Mdx-S. (\*) =  $p < 0,05$ .....41

**Figura 7.** Histogramas com a frequência de distribuição da espessura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais Mdx-S e Mdx-T. Em A foi representada a frequência de distribuição apenas do grupo Mdx-S e em B apenas do grupo Mdx-T. Já em C, representação comparativa de ambos os grupos experimentais, sendo que as setas destacam os diferentes picos de frequência de distribuição.....42

**Figura 8.** Área do perfil dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos Mdx-S e Mdx-T. Não houve diferença entre os grupos investigados,  $p > 0,05$ .....43

**Figura 9.** Histogramas com a frequência de distribuição da área do perfil dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais Mdx-S e Mdx-T. Em A foi representada a frequência de distribuição apenas do grupo Mdx-S e em B apenas do grupo Mdx-T. Já em C, representação comparativa de ambos os grupos experimentais, sendo que a seta destaca o pico de frequência comum dos grupos investigados.....44

**Figura 10.** Porcentagem de colágeno do ventrículo esquerdo do coração dos animais Mdx-S e Mdx-T. Não houve diferença estatística entre os grupos,  $p > 0,05$ .....45

**Figura 11:** Fotomicrografias do miocárdio dos grupos Mdx-S e Mdx-T. Observou-se áreas de tecido conjuntivo coradas pelo Pícro Sírius (setas). Barra de calibração 50 $\mu$ m.....45

**Figura 12:** Imunoexpressão da MMP-2 no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. Foram observadas áreas de tecido conjuntivo com imunomarcção da MMP-2 (setas) no grupo Mdx- S e, com maior evidenciação, no grupo Mdx-T. Além disso,

houve maior espaçamento entre as fibras (\*) também no grupo Mdx-T. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra de calibração=50µm.....46

**Figura 13:** Imunoexpressão da MMP-9 no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. Foram observadas áreas de tecido conjuntivo com imunomarcação da MMP-9 (setas) no grupo Mdx- S e, com maior evidenciação, no grupo Mdx-T. Além disso, houve maior espaçamento entre as fibras (\*) em ambos os grupos. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra de calibração=50µm.....47

**Figura 14:** Imunoexpressão da COX-2 no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. A porcentagem de áreas com imunomarcação da COX-2 (setas) no grupo Mdx- S e, com maior evidenciação, no grupo Mdx-T. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra de calibração=50µm.....48

**Figura 15.** Escore da imunomarcação da COX-2 no ventrículo esquerdo do coração dos animais controle, Mdx-S e Mdx-T. Os animais Mdx-T apresentaram maior escore que o controle ( $\# = p < 0,05$ ). Os animais Mdx-S também apresentaram maior escore quando comparados ao grupo controle ( $\$ = p < 0,05$ ). Verificou-se ainda que o Mdx-T apresentou maior escore do que o grupo Mdx-S ( $* = p < 0,05$ ).....48

**Figura 16:** Imunoexpressão da 8-OHdG no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. A porcentagem de núcleos com imunomarcação da 8-OHdG (setas) no grupo Mdx- S e no grupo Mdx-T. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra calibração=50µm.....49

**Figura 17.** Porcentagem dos núcleos imunomarcados para 8-OHdG no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos C, Mdx-S e Mdx-T. O grupo Mdx-T apresentou maior porcentagem de imunomarcação quando comparado ao grupo controle ( $\# = p < 0,05$ ). Além disso, o grupo Mdx-T apresentou também maior porcentagem de imunomarcação nuclear quando comparado ao grupo Mdx-S ( $* = p < 0,05$ ).....50

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Protocolo de adaptação ao exercício.....31

**Tabela 2:** Titulação e especificações dos anticorpos primários utilizados.....37

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A Distrofia Muscular de Duchenne	15
1.2 DMD e o camundongo mdx	18
1.3 DMD, camundongos mdx e a cardiomiopatia.	19
1.4 DMD, camundongos mdx e exercício	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
4. HIPÓTESE	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Formação dos grupos	30
5.2 Protocolo de exercício físico para aceleração do progresso da lesão muscular	30
5.3 Eutanásia e obtenção do tecido	31
5.4 Procedimentos para a análise histopatológica	32
5.5 Análise Morfométrica	33
5.5.1 Espessura dos cardiomiócitos	33
5.5.2 Área de perfil dos cardiomiócitos	34
5.6 Análise do tecido conjuntivo	35
5.7 Análise imunoistoquímica: avaliação das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), inflamação (COX-2) e estresse oxidativo (8-OHdG).	36
5.8 Análise Estatística	38
6.0 RESULTADOS	40
6.2 Análise morfométrica.	41
6.2.1 Espessura dos cardiomiócitos	41
6.2.2 Análise da área do perfil dos cardiomiócitos	42
6.3 Análise do tecido conjuntivo	44
6.4 Análise Imunoistoquímica	46
6.4.1 Análise da MMP-2 e MMP-9	46
6.4.2 Análise da COX-2	47
6.4.3 Análise do 8-OHdG	49
7.0 DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÃO	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO 1	75

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 A Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular recessiva, progressiva, ligada ao cromossomo X, que afeta entre 1 em 3.500 a 1 em 5.000 meninos nascidos vivos (WELLS, 2018) causada pela ausência da distrofina, uma proteína muscular que tem função crucial na conexão entre o citoesqueleto e a matrix extracelular (McGREEVY et al., 2015).

O gene anormal localiza-se no braço curto do cromossomo X, locus Xp21, sub banda Xp212. Esse gene, em condições normais, é o responsável pela produção da distrofina, localizada no sarcolema das fibras musculares (SANTOS, 2006).

A Distrofina é a proteína mais abundante no citoesqueleto facilitando a sua interação com a membrana celular e a matriz extracelular (VENUGOPAL; PAVLAKIS, 2021). Tem forma de bastonete, é flexível e alongada e é encontrada na superfície interna das fibras musculares ligando-se a actina e constitui, portanto, a “ponte” entre o citoesqueleto interno e a matriz extracelular (SARLO; DA SILVA; MEDINA-COSTA, 2009).

A distrofina se encontra associada a outras proteínas no sarcolema; essa associação de proteínas recebe o nome de complexo distrofina-glicoproteína (CDG), e tem função importante na estabilização mecânica durante a contração muscular e na mediação da interação entre o citoesqueleto, membrana e matriz extracelular (LAPIDOS; KAKKAR; MCNALLY, 2004).

O elemento central do complexo CDG consiste em um integrante glicoproteico, o distroglicano  $\beta$  de 43kDa, que interage diretamente com a actina em seu domínio no subsarcolema e com o receptor distroglicano- $\alpha$  na laminina extracelular, e este conjunto de proteínas de superfície forma uma ligação estabilizadora entre a lâmina basal das fibras musculares e o citoesqueleto da membrana da actina no interior das células contráteis (HOLLAND; OHLENDIECK, 2014).

As mutações resultantes de uma produção limitada da proteína distrofina levam à perda da integridade de membrana da miofibrila, aumento da sua fragilidade e permeabilidade, desregulação da homeostase do cálcio e danos oxidativos (VENUGOPAL; PAVLAKIS, 2021).

Além disso, a distrofina tem função importante na absorção de impacto celular estabilizando o sarcolema contra estresse mecânico (BRINKMEYER-LANGFORD, 2018). Em pacientes com DMD a capacidade regenerativa dos músculos parece estar esgotada, as reservas de células satélites estão diminuídas e o tecido adiposo e conjuntivo fibroso substitui gradativamente parte das fibras musculares (VENUGOPAL; PAVLAKIS, 2021).

O processo diagnóstico começa no início da infância após o aparecimento dos primeiros sintomas, como fraqueza muscular, dificuldade para correr e subir escadas, marcha na ponta dos pés, a presença do Sinal de Gowers (BIRNKRANT et al., 2018) e quedas frequentes, normalmente percebidas entre 1 e 3 anos de idade, com os músculos da panturrilha, pelve e membros inferiores inicialmente afetados e aparentemente maiores que o normal (RYDER et al., 2017), quadro descrito como pseudo-hipertrofia, devido o rápido progresso da degeneração e necrose muscular (ANDREWS; WAHL, 2018). Após o aparecimento dos primeiros sintomas, o nível sérico de creatina quinase (CK) aumenta, com pico de dez a vinte vezes maior que o limite normal e, com a evolução da doença, ocorre a tendência de diminuição haja vista a substituição do tecido muscular pelo tecido fibroso e adiposo (VENUGOPAL; PAVLAKIS, 2021).

A progressão da doença pode ser dividida em estágios como *pré-sintomático* (0-3 anos); *fase inicial dos sintomas* (2- 7 anos), caracterizada por considerável perda motora; *fase de transição*, quando há a rápida progressão da perda da função dos membros inferiores resultando em dificuldade para se levantar do chão e subir escadas; *fase inicial da perda da marcha* e *fase tardia da doença* (final da adolescência a fase adulta), conforme descrito por Araújo et al., (2018).

Os avanços do conhecimento sobre a fisiopatologia da DMD tem tornado possível a elaboração de novos tratamentos moleculares (VAN PUTTEN et al., 2019), além do uso de corticóides como o Deflazacort e a prednisona/prednisolona que são os tratamentos padrões na DMD e já mostraram melhorar a força muscular e a desacelerar a progressão da doença (MCDONALD et al., 2019). Atualmente o tratamento para crianças com DMD é mais promissor, com o desenvolvimento de potenciais intervenções terapêuticas nos últimos cinco anos (FOX et al., 2020) com medicamentos que atuam na supressão da mutação *nonsense* como o Ataluren; agentes *exon-skipping* que restauram a leitura do pré mRNA e resultando na produção de distrofina truncada como o Eteplirsen que atua no exon 51 (REINIG; MIRZAEI;



BERLAU, 2017), além de drogas antioxidantes, que atuam no sarcolema e no acúmulo de cálcio, no fluxo sanguíneo e, por fim, drogas antifibróticas (WERNECK et al., 2019). O tratamento do paciente com DMD deve envolver uma equipe multidisciplinar com ações direcionadas para as manifestações respiratórias, cardíacas e ortopédicas (KINNETT et al., 2015).

Como a DMD não tem cura, o tratamento é baseado no manejo dos sintomas, com três intervenções predominantes que incluem o tratamento com corticóides, suporte ventilatório mecânico e a avaliação e tratamento das alterações e sintomas cardíacos (VAN WESTERING; BETTS; WOOD, 2015).

O desenvolvimento de técnicas de intervenção como exercícios, uso de órteses em membros inferiores e o tratamento medicamentoso contribuem para o prolongamento da marcha e do ortostatismo até a dependência de cadeira de rodas (KINALLI et al., 2007), historicamente, por volta dos 12 anos de idade (ANDREWS; WAHL, 2018; MESSINA; VITA, 2018). Com a imobilidade, há a aceleração do declínio da densidade óssea, o desenvolvimento de escoliose e contraturas musculares e a diminuição da força do músculo diafragma, o que favorece a instalação de quadros respiratórios com a presença de insuficiência ventilatória, diminuição da capacidade de tosse, aumento da incidência de infecções respiratórias e distúrbios do sono (TSUDA, 2018). As complicações respiratórias incluem ainda, fadiga dos músculos respiratórios, formação de tampões de muco, atelectasias, pneumonia e a falência respiratória, que levam a morte por parada respiratória ou arritmias cardíacas induzidas pelas alterações pulmonares (BIRNKRANT et al., 2018).

O rastreamento precoce de alterações pulmonares (NASCIMENTO OSORIO et al., 2019) e os avanços no tratamento como a ventilação mecânica não-invasiva e a assistência mecânica a tosse, permitem o prolongamento da expectativa de vida (PENNATI et al., 2019). Com esse prolongamento, o envolvimento cardíaco na DMD é crescente e tem se tornado a principal causa de mortalidade nestes pacientes (NASCIMENTO OSORIO et al., 2019).

A cardiomiopatia geralmente se manifesta aos 10 anos de idade e é prevalente aos 20 anos, com alterações iniciais de dilatação do ventrículo esquerdo e hipertrofia, que progride ao estágio conhecido como cardiomiopatia dilatada (VAN WESTERING; BETTS; WOOD, 2015).

Os pacientes não manifestam sinais clínicos até que a disfunção ventricular esquerda e a fibrose cardíaca estejam avançadas e, quando isso ocorre, a cardiomiopatia dilatada é caracterizada por fibrose extensiva na região posterobasal da parede ventricular e, com o progresso da doença, pode haver o envolvimento dos músculos papilares, regurgitação mitral, além de anormalidade das conduções inter e intra-atriais (VENUGOPAL; PAVLAKIS, 2021).

Um programa de reabilitação adequado deve prover intervenções com base no estágio de progressão da doença, com técnicas que favoreçam a mobilidade e as habilidades funcionais; manobras manuais ou mecânicas de assistência à tosse além da indicação de ventilação não invasiva ou invasiva de uso noturno ou contínuo (ARAÚJO et al., 2018).

## **1.2 DMD e o camundongo mdx**

O estudo da DMD em modelos animais é um passo crítico para melhorar o entendimento da patogênese molecular da mesma, podendo trazer novas estratégias terapêuticas destinadas a atenuar ou parar a progressão da DMD (MORRISON-NOZIK; HALDAR, 2018). Os animais que apresentam naturalmente a doença e aqueles gerados em laboratórios são viáveis ao estudo da patofisiologia, e atualmente há aproximadamente 60 diferentes tipos de modelos animais para a DMD, inclusive alguns não mamíferos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e zebrafish (McGREEVY et al., 2015). Ratos modificados geneticamente, porcos, gatos, coelhos e cães também já foram descritos na literatura (WELLS, 2018).

O modelo de cão mais comum é o Golden Retriever com Distrofia Muscular (GRDM), que apresenta a distrofinopatia de forma espontânea, e foi inicialmente descrito nos anos 80, apresentando sinais de fadiga ao exercício, fraqueza muscular, aumento dos níveis de CK sanguínea e alterações histológicas com presença de infiltrado inflamatório no tecido muscular; esses animais evoluem rapidamente a severidade da doença até os seis meses de idade, sendo análogo aos humanos com DMD aos dez anos de idade (KORNEGAY, 2017). Segundo ainda o mesmo autor, após esse período há uma tendência de estabilização dos sinais clínicos nos cães, enquanto nos humanos há a progressão da doença. Além disso, esse modelo experimental apresenta variação entre os animais e, o número reduzido para cada grupo experimental torna difícil mostrar claramente resultados reprodutíveis (WELLS, 2018).

O modelo mais utilizado para pesquisa é o camundongo mdx, descoberto no início dos anos 80 em uma colônia de animais C57BL/10ScSn, devido ao aumento sérico da CK e sinais histológicos que evidenciavam a miopatia (McGREEVY et al., 2015). O modelo de camundongo mdx abriga um ponto de mutação *nonsense* no exon 23 (transição C- para- T) do gene DMD, que leva a uma interrupção prematura da tradução de proteínas (McGREEVY et al., 2015; VAN PUTTEN et al., 2019). Essa interrupção resulta na perda da expressão da distrofina no animal mdx, sendo que esse modelo murino tem sido usado extensivamente para estudar a patogênese da doença, pois, recapitula o ambiente inflamatório observado nos músculos esqueléticos afetados pela DMD podendo estabelecer os efeitos de diversos tipos de intervenções para o controle da evolução da doença (BRINKMEYER-LANGFORD, 2018).

### **1.3 DMD, camundongos mdx e a cardiomiopatia.**

Além de estar presente no sarcolema e na junção neuromuscular, a distrofina cardíaca também é encontrada no sistema tubular transverso, sugerindo um papel mecânico na manutenção da integridade de membrana (HOLLAND; OHLENDIECK, 2014).

A fragilidade da membrana inicia múltiplos mecanismos patofisiológicos secundários que leva a morte do cardiomiócito; uma delas, decorrente da alta permeabilidade da membrana, é o aumento do nível de cálcio intracelular pela sua passagem passiva pelas lesões na membrana celular e pela ação de canais de cálcio como o potencial receptor transiente e o canal de  $Ca^{2+}$  tipo L que permitem a entrada deste íon em resposta ao alongamento das fibras no cardiomiócito distrófico (MEYERS; TOWNSEND, 2019).

O aumento do cálcio intracelular pode acarretar a liberação e ativação de proteases que degradam as proteínas contráteis do coração (SPURNEY, 2011). As fibras musculares afetadas tornam-se necróticas ou apoptóticas (TURK et al., 2005) e estudos mostram que o processo inflamatório no coração de modelos animais da DMD ocorre provavelmente devido ao dano tecidual prévio, que induz a ciclos de liberação de padrões moleculares associados a danos (do inglês DAMPS) que agem como recrutadores pró-inflamatórios, atraindo linfócitos T (CASCABULHO et al., 2016).

As alterações patológicas no miocárdio ventricular são heterogêneas, provavelmente pela combinação de perda de massa muscular devido a atrofia celular e alterações secundárias como o remodelamento cardíaco devido a diminuição da função sistólica secundária a destruição progressiva dos cardiomiócitos (TSUDA, 2018).

Os macrófagos e células T são as primeiras células do infiltrado celular, e os macrófagos quando estimulados por processo inflamatório destroem as fibras musculares através da produção de óxido nítrico, e a alta concentração de células T e macrófagos persistentes até os estágios mais tardios da doença indica a sua importância na iniciação e progressão da lesão muscular distrófica (EVANS et al., 2009).

O diagnóstico e tratamento das disfunções cardíacas são frequentemente difíceis, pois os pacientes menos ativos não desenvolvem os clássicos sintomas iniciais da falência cardíaca (SPURNEY, 2011). O envolvimento das alterações cardíacas nesta doença começa cedo, mas as disfunções clinicamente significantes, ocorrem durante a segunda década de vida (ANDREWS; WAHL, 2018).

Segundo Meyers e Townsend (2019) o declínio da fração de ejeção em 50% pode ser observado entre os 9-10 anos de idade e pode diminuir a 25-30% nos estágios mais tardios da doença. Ainda de acordo com os autores, no exame de ressonância magnética associado ao uso de realce tardio de gadolínio, pode-se detectar áreas de fibrose cicatricial localizada na região subepicárdica e inferobasal em pacientes mesmo antes dos 10 anos de idade e na maioria dos pacientes acima dos 15 anos, de forma que essa alteração está correlacionada com o declínio da fração de ejeção.

Os pacientes frequentemente exibem anormalidade no ritmo circadiano e variabilidade na frequência cardíaca, progredindo para uma congestão cardíaca severa; e a ativação persistente do sistema nervoso simpático parece ser um dos causadores da formação patológica da fibrose cardíaca; a variabilidade da frequência cardíaca pode ser associada com a falência cardíaca e é uma ferramenta valiosa para prever a disfunção cardíaca que pode levar a morte súbita (DA SILVA et al., 2018).

O camundongo mdx também desenvolve a cardiomiopatia progressiva com a idade, culminando em uma extensa fibrose e falência cardíaca (AU, 2011). Aos 6 meses de idade, através de exames de eletrocardiograma, observa-se no coração do modelo mdx alterações no sistema de condução e, aos 8 meses de idade, os corações apresentam-se dilatados,

hipertrofiados, com áreas fibróticas e diminuição da eficiência contrátil (SHIROKOVA; NIGGLI, 2013).

Regiões do miocárdio de animais mdx com 6 a 12 meses de idade apresentaram diferentes graus de realce por gadolínio em avaliação por ressonância magnética e, mesmo com a natureza difusa da fibrose muscular, isso indica a presença de grande remodelamento e hipertrofia cardíaca, confirmadas pela coloração com Picro- Sírius, na região intraventricular assim como nas paredes do ventrículo direito (STUCKEY et al., 2012).

Apesar do modelo experimental mdx não apresentar todos os sintomas da cardiomiopatia da DMD, ele pode ser um bom modelo, devido à progressão mais lenta da doença, o que auxilia a identificação das sequências dos eventos celulares que levam a alterações cardíacas na doença (SHIROKOVA; NIGGLI, 2013).

Os fibroblastos cardíacos constituem cerca de 90% da população de células cardíacas além dos miócitos, o músculo liso vascular e as células endoteliais, que representam frações menores dessa população (KAMKIN, 2005). O fibroblasto cardíaco sintetiza e secreta colágeno tipo I e III, capazes de formar uma rede tridimensional tolerante ao estresse mecânico, assim, os fibroblastos têm função não somente no miocárdio saudável, mas também no processo de remodelamento em respostas as alterações patológicas (PORTER; TURNER, 2009) já que o número de fibroblastos está muito aumentado durante o processo de remodelamento cardíaco, principalmente dentro e ao redor das áreas lesadas (BANERJEE, 2006).

Algumas regiões cardíacas, como o nó sinoatrial, são ainda mais ricas em fibroblastos do que as demais estruturas cardíacas, e esse conteúdo pode aumentar em várias condições, podendo contribuir para o desenvolvimento de disfunções cardíacas em corações senescentes ou doentes (CAMELLITI; GREEN; KOHL, 2006).

Os fibroblastos estão dispostos paralelamente às fibras cardíacas e, quando aumentados em sua concentração por algum estímulo de lesão com consequente fibrose e remodelamento cardíaco, podem atuar como um isolante, impedindo a transmissão de impulsos elétricos cardíacos, que resultam em arritmias e alterações do eletrocardiograma (KOHL, 2005).

Normalmente, os fibroblastos cardíacos são ativados por lesão miocárdica, desencadeando sua diferenciação em miofibroblastos (MioFb) para facilitar o processo de cicatrização, e comparado aos fibroblastos quiescentes, os miofibroblastos são muito maiores,

proliferam mais ativamente e depositam colágeno em taxas mais altas (NGUYEN; WEISS, 2014).

Os MioFb são responsivos às citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator tumoral alfa, interleucina 1 e interleucina 6 e respondem a esses estímulos alterando suas propriedades proliferativas e migratórias, modificando a produção da matriz extracelular e das metaloproteinases (MMPs) (PORTER; TURNER, 2009).

As MMPs são classificadas em quatro grupos de acordo com o seu substrato específico: colagenases (MMP-1, -8 e -13); gelatinases (MMP-2 e -9); a estromelina (MMP-3, -10 e -11) e um grupo heterogêneo que contém matrilisina (MMP-7), metaloelastase (MMP-12), enamelisina (MMP-20), endometase (MMP-26) e epilisina (MMP- 28) (OGURA,2014). São proteínas pertencentes à família de endopeptidase extracelular zinco dependentes que estão envolvidas em diversas cascatas fisiológicas como a morfogênese, migração celular, proliferação e adesão, assim como em processos patológicos como a inflamação e distrofia muscular, e em circunstâncias de remodelamento cardíaco quando a expressão de algumas formas de MMPs é aumentada (BOZZI; SCIANDRA; BRANCACCIO, 2015).

Quando há a persistência de um quadro inflamatório, a expressão de MMP induz a desestabilização da recém-formada matriz extracelular, formando cicatrizes, além de favorecer o remodelamento e a falha na maturação celular no processo de cicatrização (SPINALE; VILLARREAL, 2014).

Kherif et al. (1999) em seu estudo encontraram, através da zimografia, que entre as MMPs, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) estão envolvidas no remodelamento da matriz extracelular na distrofia muscular nos modelos mdx. O aumento da expressão das gelatinases é observado tanto nos modelos animais quanto em humanos com DMD, que culmina na proteólise da matriz extracelular no coração, na deposição de tecido conjuntivo levando à fibrose e enrijecimento cardíaco e na redução da capacidade contrátil do coração (DELFÍN et al., 2012). A expressão da MMP-2 em humanos pode ser aumentada nas células cardíacas em resposta a diversos fatores, contribuindo para os mecanismos agudos nas disfunções cardíacas e nas alterações da matriz extracelular do coração (KANDASAMY et al., 2009).

Além disso, vários estudos demonstram através da zimografia que há o aumento da MMP-9 nos músculos esqueléticos (LI et al., 2009) e cardíacos (DAHIYA, 2011) de pacientes e modelos animais de distrofia muscular e Nadarajah et al. (2011) demonstraram que a MMP-

9 pode ser um potencial biomarcador para a evolução da DMD. Estudos mostram que os níveis séricos de MMP-9 são maiores em pacientes com DMD quando comparado com indivíduos saudáveis (LOUBARKOS et al., 2017).

Em estudo realizado por AU et al. (2011) em comparação de animais com 6, 29 e 43 semanas de idade, observaram a progressão da fibrose cardíaca dos animais mdx relacionados a idade e com 43 semanas de idade esses animais apresentaram grande extensão de fibrose cardíaca, acompanhada do aumento da expressão da MMP-2 e da MMP-9 observados através do PCR-RT, quando comparado aos controles.

Estudos mais recentes mostraram ainda que, a presença da MMP-2 e MMP-9 podem ser utilizadas como biomarcador sérico em pacientes com DMD, e a presença aumentada MMP-9 parece ter relação com a progressão da doença, mostrando-se elevada nos pacientes com maior fraqueza muscular e lentidão dos movimentos e pior desempenho nos testes funcionais aplicados, enquanto a presença da MMP-2 mostrou correlação inversa com o desempenho no teste de levantar-se da cadeira (ANAYA-SEGURA et al., 2015).

A inflamação crônica e estresse oxidativo são características marcantes da DMD; e tanto em pacientes com DMD quanto em camundongos mdx observam-se altos níveis de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (MÂNCIO, 2017). A inflamação crônica, as disfunções mitocondriais e o estresse oxidativo ocorrem em conjunto para promover a disfunção cardíaca no paciente distrófico (BALLMANN, 2016).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são naturalmente e constantemente formadas dentro do organismo, como resultado da atividade celular, porém em condições extremas ou de doença geram muito mais níveis de ERO que sobrecarregam as defesas antioxidantes celulares, levando à carbonilação de proteínas, danos no DNA e oxidação do RNA; que podem alterar a homeostase do cálcio, o qual se apresenta como outro fator patogênico associado à distrofia muscular (PELOSI, 2017).

Um marcador de dano por radicais livres ao DNA é 8-hidroxi 2'-desoxiguanosina (8-OHdG), que é formada pela hidroxilação de resíduos de guanina, e estudos mostram que as concentrações urinárias de 8-OHdG determinadas por imunoensaio enzimático encontra-se aumentado em pacientes com distrofia muscular quando comparado a grupos controles, podendo ser utilizado como um marcador de dano celular oxidativos nesses pacientes (RODRIGUEZ; TARNOPOLSKY, 2003).

O estresse oxidativo é um possível mediador dos danos as miofibrilas no paciente com DMD, e possíveis fontes de espécies reativas incluem a liberação exógena do infiltrado inflamatório das células musculares necróticas e a produção endógena desencadeada pela entrada patológica de cálcio dentro da célula ou de estresse mecânico ocasionado por contrações musculares extenuantes (PETROF et al., 2002).

A DMD é caracterizada pelos sucessivos ciclos de degeneração e regeneração muscular (KANAGAWA; TODA, 2006) que envolve extensa proliferação de células percussoras muscular e uma resposta inflamatória crônica e produção de citocinas (ALEXAKIS et al., 2007).

A cicloxigenase é a enzima chave na síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, e é associada com duas isoenzimas diferentes: a COX-1 expressa constitutivamente em diversos tecidos e envolvida na função fisiológica e homeostase de vários órgãos e a COX-2 envolvida em processos patológicos, sendo a sua produção induzida rapidamente, principalmente por estímulos inflamatórios (LIPSKY et al., 2000).

Estudo realizado por De Oliveira et al. (2013) mostraram que a imunexpressão da COX-2 está anormalmente presente nos músculos esqueléticos de camundongos mdx, nas regiões com alterações histológicas compatíveis com a necrose e fibrose tecidual, o que pode evidenciar a sua relação na via de inflamação e reparação tecidual nesse tipo de doença.

#### **1.4 DMD, camundongos mdx e exercício**

Apesar do camundongo mdx ser geneticamente similar a DMD e exibir os sintomas e alterações histológicas da doença, a severidade do fenótipo é menor do que em humanos e a progressão da doença ao longo do tempo diferem significativamente, necessitando de inúmeras estratégias para aperfeiçoar o modelo experimental (MANNING; O'MALLEY, 2015).

A depender da intensidade, o exercício físico em animais mdx potencializa a disfunção associada a perda da distrofina, aumentando as micro lesões musculares induzidas pelo estresse mecânico exacerbando a necrose das miofibrilas e a perda da força muscular (MANNING; O'MALLEY, 2015).



O treinamento físico nos animais mdx tem sido utilizado por três motivos: avaliar a sua capacidade física; investigar os efeitos do treinamento nos músculos distróficos e piorar o fenótipo para avaliar a ação de medicamentos. Os métodos utilizados vão dos mais leves, como os exercícios com acesso voluntário em roda giratória, ou ainda natação e esteira em baixa velocidade (<9m/min), aos mais intensos, como corrida em esteira em alta velocidade (>12m/min) ou em declive (HYZEWICZ et al., 2015). Exercícios excêntricos realizados em corrida em declive causam maior dano tecidual nos animais mdx em comparação da corrida em esteira horizontal (GROUNDS et al., 2008). Os danos no tecido muscular esquelético no mdx causados pela contração excêntrica estão associados ao influxo de cálcio sistólico, geração de espécies reativas de oxigênio e a ruptura dos mecanismos responsáveis pela ativação, geração e transmissão de força (LINDSAY et al., 2020).

O exercício físico intenso tem sido utilizado para acelerar o processo da cardiomiopatia em modelos experimentais da DMD, tal qual a progressão da doença, já que as lesões dos cardiomiócitos é aumentada consideravelmente pela imposição da sobrecarga de trabalho e elevação do estresse mecânico agudo, os quais são induzidos pelo exercício (HOLLAND; OHLENDIECK, 2014).

Em seu estudo, Nakamura et al. (2002) observou que em animais mdx de seis semanas de idade exercitados, o tecido cardíaco apresentou maior desorganização das miofibrilas, presença de infiltrado inflamatório e aumento da fibrose intersticial e tecido adiposo. No estudo citado, os animais foram submetidos a dez semanas de exercícios em esteira, com inclinação de 7° por 60 minutos, duas vezes por semana.

A natação realizada seis vezes por semana, durante sessenta minutos/dia por dois meses em animais de onze meses de idade, também se mostrou deletéria ao coração, apresentando maior porcentagem de fibrose cardíaca nos animais exercitados quando comparados aos animais mdx sedentários (BARBIN et al., 2016).

O exercício físico aeróbico realizado por animais mdx a partir de 4 semanas de idade, por 30 minutos, duas vezes na semana por quatro semanas em esteira sem inclinação, também foi capaz de alterar a histologia cardíaca, com aumento das áreas de deposição de colágeno cicatricial, com aumento do colágeno tipo I, quando comparado aos animais mdx sedentários (SCHILL et al., 2016).

Mesmo o exercício voluntário, em roda de corrida, por quatro semanas em animais com sete semanas de idade no início do experimento foi capaz de acelerar o remodelamento cardíaco em animais mdx quando comparados aos animais mdx sedentários e controles (COSTAS et al., 2010).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A Distrofia Muscular de Duchenne é a forma de distrofia mais comum e acarreta comorbidades importantes ao longo de sua evolução. Sabe-se que o tecido cardíaco também sofre alterações morfológicas e estruturais devido à ausência de distrofina, causando alterações na sua contração, condução de impulsos elétricos e dilatação, levando a arritmias e a morte súbita em estágios mais avançados da doença. Dessa maneira, se faz importante a investigação dos efeitos da DMD no tecido cardíaco, mais especificamente no ventrículo esquerdo, para que se entenda a forma que essa doença afeta a estrutura cardíaca e suas vias de lesão, para que novas terapêuticas possam ser estudadas e elaboradas de forma que se reduza a morbidade e melhore a qualidade de vida desses pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral:**

Investigar o remodelamento cardíaco do ventrículo esquerdo de camundongos mdx submetidos ao exercício físico aeróbico, a fim de acelerar a progressão da doença.

#### **Específicos:**

- Caracterizar a morfometria do coração identificando áreas de fibrose e deposição de colágeno;
- Caracterizar a imunexpressão das metaloproteinases do tipo gelatinases 2 e 9;
- Caracterizar a inflamação através da imunexpressão de COX-2;
- Caracterizar o estresse oxidativo pela imunexpressão de 8-OHdG.
- Relacionar os resultados obtidos.

#### **4. HIPÓTESE**

O modelo mdx apresenta uma evolução lenta da doença e as alterações cardíacas se instalam tardiamente ao longo da vida do animal. O exercício físico é utilizado para que se exacerbem os mecanismos de lesão e remodelamento cardíaco. Assim, a hipótese deste estudo é que, com a utilização do treinamento, sejam exacerbados e estudados os mecanismos teciduais que levam ao remodelamento cardíaco no ventrículo esquerdo no modelo experimental mdx. Acredita-se que o treinamento de alta intensidade seja capaz de acelerar os danos mecânicos no miocárdio distrófico, com conseqüente dano oxidativo, inflamação e remodelamento.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Formação dos grupos

Foram utilizados camundongos C57BL/10 e C57BL/10-DMD<sup>Mdx</sup>, machos, com 24 semanas de idade. Os animais foram provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da UNIFESP e foram mantidos na Sala de Guarda de Camundongos do Departamento de Biociências da UNIFESP Baixada Santista, CEUA nº 7387190818 (**Anexo 1**). O ambiente teve a temperatura controlada a 22/24°C, ciclo claro-escuro a cada 12 horas, com período de iluminação iniciando-se às 7h. Foi oferecido aos animais água e ração (Nuvilab®) *ad libitum*. Para realização do protocolo experimental, os animais foram distribuídos em três grupos: C57BL/10 como controle (C), C57BL/10-DMD<sup>Mdx</sup> (n=5); sedentários (Mdx-S) (n=6) e C57BL/10-DMD<sup>Mdx</sup> treinados (Mdx-T) (n=10). O grupo C foi instituído para a comparação do padrão imunoistoquímico da distrofia no tecido cardíaco.

### 5.2 Protocolo de exercício físico para aceleração do progresso da lesão muscular

O protocolo experimental de exercício físico teve a duração de oito semanas, em que os grupos treinados (Mdx-T) foram submetidos a um protocolo de treinamento físico para exacerbação do processo inflamatório muscular, enquanto os animais dos grupos C e Mdx-S não passaram por intervenção, além da rotina da sala de guarda. O protocolo de exercício físico foi composto pela primeira semana de adaptação e por outras sete semanas seguintes de treinamento físico aeróbio.

A semana de adaptação teve como objetivo a familiarização do animal com o ambiente de treinamento, no caso a esteira rolante. No primeiro dia, o animal foi colocado na esteira ainda desligada e permaneceu na mesma por 30 minutos. No dia seguinte, o tempo foi aumentado para 60 minutos. Já no terceiro, quarto e quinto dias de adaptação, a esteira foi ligada e houve um incremento gradual da velocidade: 3, 5 e 7 m/min, respectivamente (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Protocolo de adaptação ao exercício.

	<b>Velocidade (m/min)</b>	<b>Duração da sessão (min)</b>
<b>1º dia</b>	0	30
<b>2º dia</b>	0	60
<b>3º dia</b>	3	60
<b>4º dia</b>	5	60
<b>5º dia</b>	7	60

Findo o período de adaptação, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento físico adaptado a partir de (TANIGUTI et al., 2011), com frequência semanal de cinco vezes. Cada sessão de treino teve duração de 60 minutos, sendo que os primeiros minutos foram utilizados para atingir, de forma progressiva, a velocidade estabelecida para a sessão. A intensidade de cada sessão de treinamento foi alta, para isso, os animais correram na esteira a uma velocidade considerada máxima para o dia de treinamento, partindo da velocidade de 7m/min (velocidade da semana de adaptação) e a cada 1 minuto teve um incremento de 1 metro. A velocidade de cada sessão de treinamento foi a velocidade máxima que o animal conseguiu atingir, permitindo que ele mantivesse o padrão de corrida e completasse os 60 minutos de treinamento.

Tanto a adaptação como o protocolo de treinamento foram realizados em esteira rolante motorizada, com inclinação de 15° em declive, com os animais em raias individuais durante toda a duração do treino. Além disso, todo o procedimento foi realizado no período vespertino.

### **5.3 Eutanásia e obtenção do tecido**

Após 48 horas da última sessão de treino, os animais pertencentes aos três grupos e já com 32 semanas de vida, foram eutanasiados por decapitação após anestesia prévia com Isoflurano (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, LTDA, São Paulo, Brasil). A indução anestésica foi realizada em câmara fechada contendo algodão embebido de isoflurano, com barreira física de separação para que o animal não tenha contato direto com o líquido, sendo

exposto somente ao vapor, evitando irritação de mucosas. Foram verificados indicativos da confirmação da morte caracterizados pela perda dos reflexos, ausência de movimentos respiratórios e de batimentos cardíacos. Foi coletado então o coração do animal. Os restos biológicos dos animais foram acondicionados em sacos plásticos brancos apropriados para rejeitos de lixo infectante e, em seguida, essas carcaças foram congeladas em freezer destinado exclusivamente para esse fim até a coleta por empresa especializada.

O coração removido foi cuidadosamente dissecado e seccionado transversalmente, de maneira a se remover os átrios para que se pudesse avaliar a estrutura dos ventrículos direito e esquerdo. Parte dos espécimes coletados foi imediatamente fixada em solução de formalina 10% tamponada com fosfato durante 24h para as análises histológicas e imunoistoquímicas.

#### **5.4 Procedimentos para a análise histopatológica**

Para as análises histológicas e imunoistoquímicas, findo o período de fixação, procedeu-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e impregnação em Paraplast® (Sigma Aldrich Inc., Darmstadt, Germany) líquido em estufa regulada à temperatura de 60°C, e em seguida, inclusão para a confecção dos blocos histológicos. O coração foi incluído em Paraplast® de modo que a base do coração ficasse voltada para a face de corte do bloco histológico, de maneira que nas secções transversais, pudessem ser observadas as duas câmaras cardíacas. Os cortes histológicos foram obtidos em micrótomo Leica RM 2125 RTS (Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove, EUA) ajustado para quatro micrômetros, distendidos em banho-maria, coletados e montados em lâminas histológicas, previamente identificadas para cada animal e grupo. Os espécimes foram submetidos à coloração rotineira com HE - Hematoxilina-Eosina para a avaliação da morfologia do miocárdio, sendo que a estrutura de interesse foi o ventrículo esquerdo.

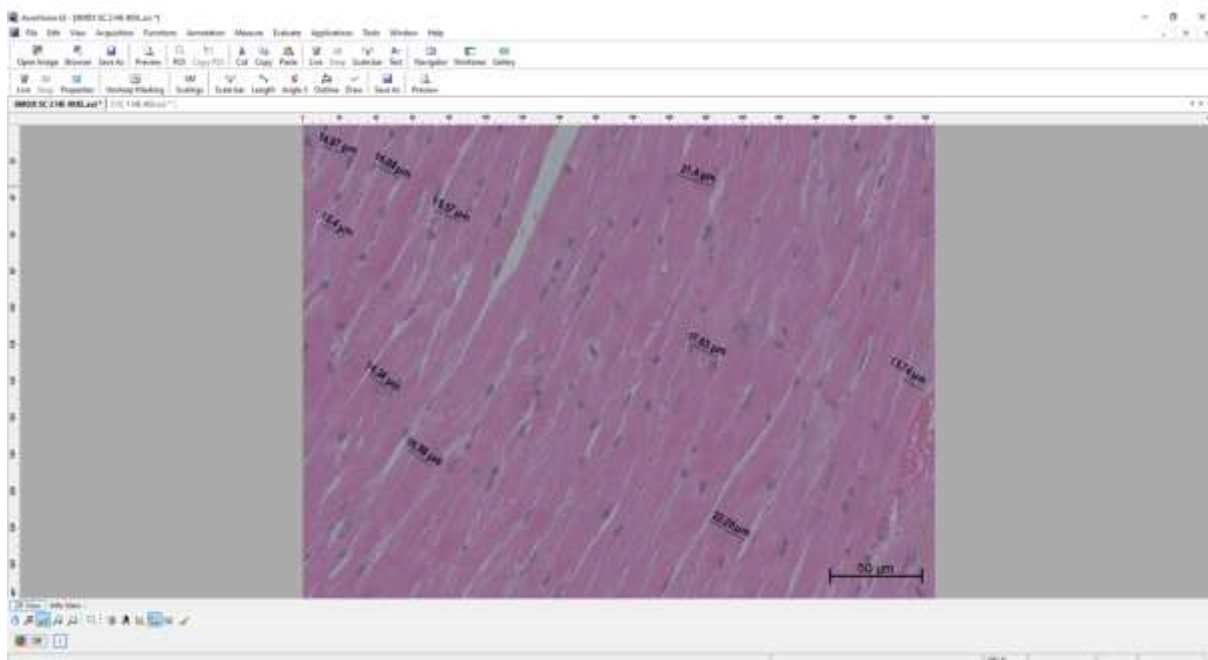


## 5.5 Análise Morfométrica

### 5.5.1 Espessura dos cardiomiócitos

As análises morfométricas foram realizadas nas lâminas coradas com H.E que foram observadas e fotografadas com o auxílio de um microscópio invertido Axio Observer.D1 Zeiss® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a um sistema de imagem computadorizado, o *software* Axio Vision 4.0 da Zeiss®.

Para cada lâmina corada pelo H.E foram selecionados seis campos do miocárdio, cujas fibras musculares se apresentassem em cortes longitudinais, sendo que os campos foram fotografados com objetiva de 40x. Em cada campo, foi realizada a mensuração da espessura dos cardiomiócitos de acordo com os seguintes critérios: foram selecionados cardiomiócitos com seus limites celulares visíveis e com o núcleo centralizado. Em seguida, com o auxílio do *software* mencionado, traçou-se uma linha perpendicular à estrutura da fibra tendo o núcleo como referência, totalizando 50 mensurações por animal, como ilustrado na **Figura 1**.

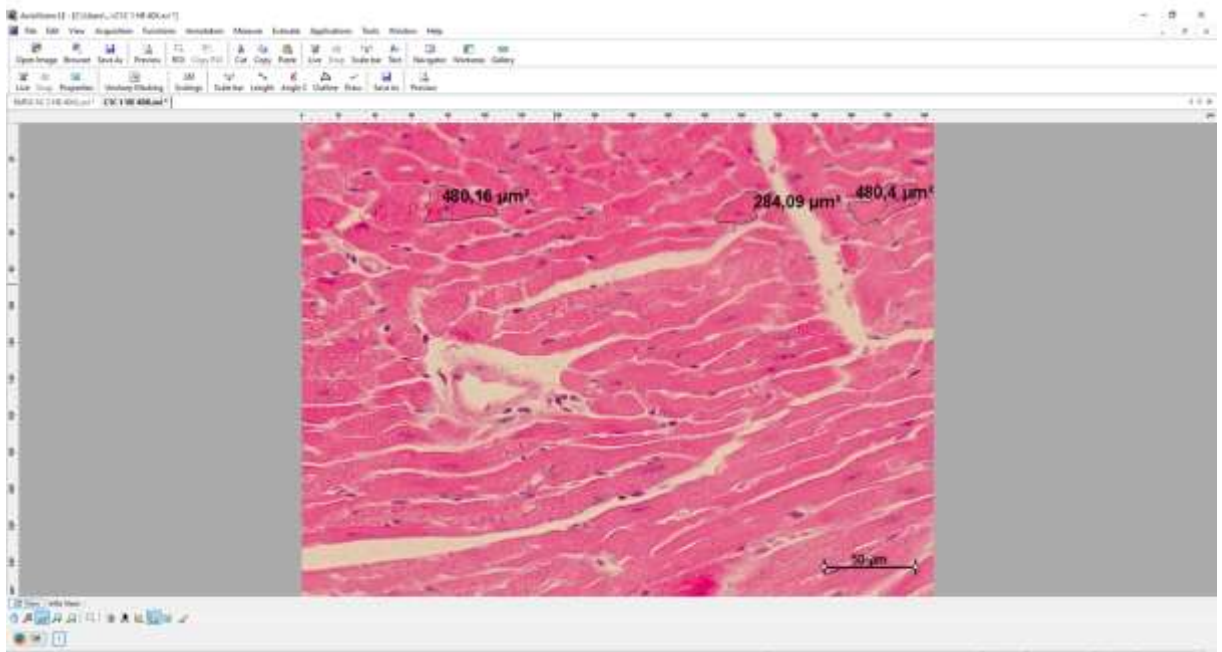


**Figura 1:** Representação da metodologia empregada na mensuração da espessura dos cardiomiócitos com o *software* Axio Vision 4.0, Zeiss®. Com a objetiva de 40x e campos com fibras musculares cardíacas seccionadas longitudinalmente, foi realizada a mensuração da espessura dos cardiomiócitos de acordo com os seguintes critérios: foram selecionados

cardiomiócitos com seus limites celulares visíveis e com o núcleo centralizado. Em seguida, com o auxílio do *software* mencionado, traçou-se uma linha perpendicular à estrutura da fibra, tendo o núcleo como referência e para a obtenção da espessura do cardiomiócito em  $\mu\text{m}$ .

### 5.5.2 Área de perfil dos cardiomiócitos

Para a realização dos procedimentos de mensuração da área do perfil dos cardiomiócitos, a imagem dos cortes foi obtida com o microscópio invertido Axio Observer.D1 Zeiss® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a um sistema de imagem computadorizado, o *software* Axio Vision 4.0 da Zeiss®, de maneira semelhante à mensuração da espessura dos cardiomiócitos, no entanto, analisando-se secções transversais. A mensuração da área de perfil dos cardiomiócitos foi realizada ao nível dos núcleos, de acordo com os seguintes critérios: foram selecionados sete campos que apresentassem cardiomiócitos seccionados transversalmente, com seus limites celulares visíveis e núcleos centralizados na objetiva de 40x. Para cada animal, foram mensurados 50 cardiomiócitos (**Figura 2**).



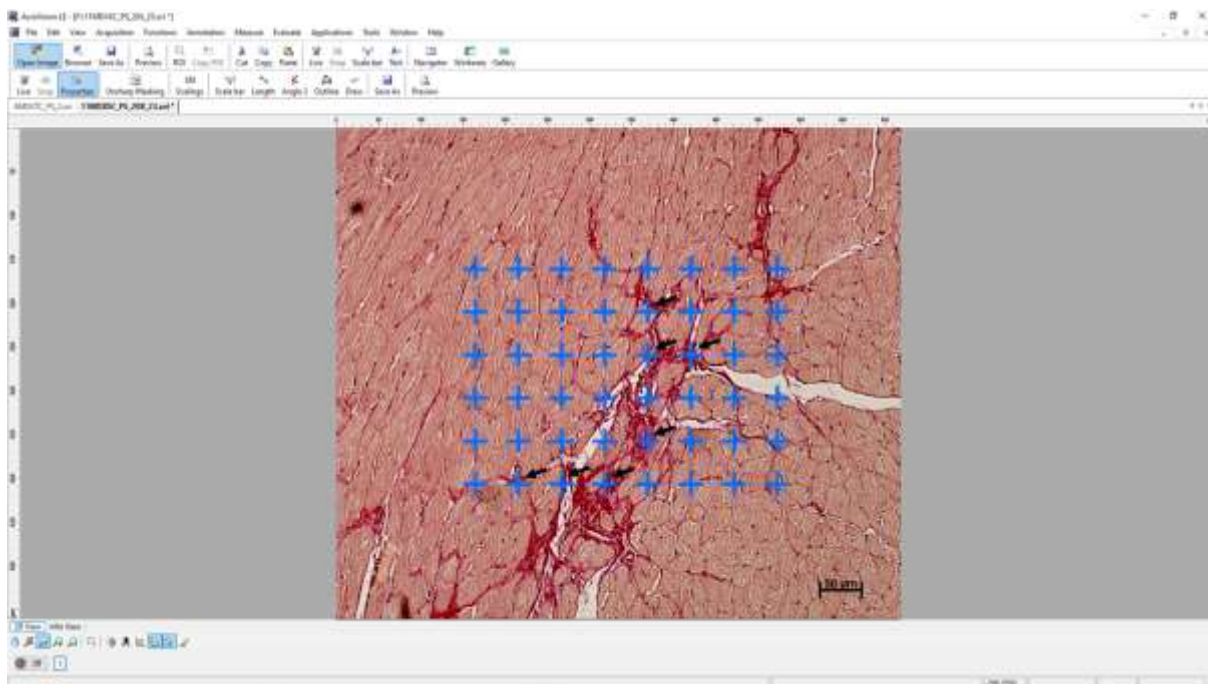
**Figura 2:** Representação da metodologia empregada na mensuração da área de perfil dos cardiomiócitos com o *software* Axio Vision 4.0, Zeiss®. Com a objetiva de 40x e campos com

fibras musculares cardíacas seccionadas transversalmente, foi realizada a mensuração da área de perfil dos cardiomiócitos de acordo com os seguintes critérios: foram selecionados campos que apresentassem cardiomiócitos seccionados transversalmente, com seus limites celulares visíveis e núcleos centralizados na objetiva de 40x. Em seguida, com o auxílio do *software* mencionado, circundou-se estrutura da fibra, tendo o núcleo no centro como referência, para a obtenção da área de perfil do cardiomiócito em  $\mu\text{m}^2$ .

## 5.6 Análise do tecido conjuntivo

Para a análise das fibras colágenas, os cortes foram corados pelo método Picro Sírius (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Essa coloração foi usada para visualizar o colágeno nas secções transversais do ventrículo esquerdo dos animais mdx, as quais foram analisadas através do microscópio de luz, sendo o colágeno evidenciado na cor vermelha (VOGEL et al., 2015).

As lâminas coradas pelo método Picro Sírius foram analisadas inicialmente na objetiva de 2,5x para a localização da parede livre do ventrículo esquerdo (VE) e para a escolha de áreas equidistantes que o abrangesse por completo. Para a estimativa do volume do colágeno tecidual, as imagens foram analisadas pelo método estereológico adaptado de Schipke et al. (2017). No mesmo, as fotomicrografias foram capturadas com objetiva de 20x em um microscópio invertido Axio Observer.D1 Zeiss® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a um sistema de imagem computadorizado (Axio Vision 4.0, Zeiss®) e grades sistemáticas, contendo 48 pontos uniformes os quais foram sobrepostos às imagens (**Figura 3**). Foram analisados em média 30 campos por animal, sendo contados os pontos que estivessem sobre o tecido cardíaco [P(ve); referência de volume] e todos os pontos que estivessem sobre o colágeno [P(col); estrutura de interesse]. Após a contagem dos pontos, a densidade de volume (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003) do colágeno foi estimada através da fórmula  $V_v(P_{col}/P_{ve}) = P_{col}/P_{ve}$ . A porcentagem de colágeno foi calculada pela multiplicação do resultado da densidade de volume por 100.



**Figura 3:** Representação da metodologia empregada na análise do tecido conjuntivo. Fotomicrografias foram capturadas com objetiva de 20x em um microscópio invertido e grades sistemáticas, contendo 48 pontos uniformes foram sobrepostos às imagens. Foram analisados em média 30 campos por animal, sendo contados os pontos que estivessem sobre o tecido cardíaco e todos os pontos que estivessem sobre o colágeno (setas), ambos quando tangenciassem o canto superior direito da cruz.

### **5.7 Análise imunoistoquímica: avaliação das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), inflamação (COX-2) e estresse oxidativo (8-OHdG).**

As seções transversais do miocárdio foram submetidas à técnica imunoistoquímica para análise *in situ* das proteínas: MMP-2, MMP-9, COX-2 e 8-OHdG. Foi realizado primeiramente a fixação dos tecidos com paraformaldeído a 4%, lavagem em tampão Tris salino (TBS) com Tween-20 0,1% (TBST) TBST a 10%, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 1%, lavagem com TBST 10%, bloqueio de proteínas com BSA 1% diluído em TBST 10% e incubação *overnight* com os anticorpos primários (MMP-2, MMP-9, COX-2 e 8-OHdG) titulado em TBST-BSA 1% (**Tabela 2**). Após a lavagem com TBST foi realizada a incubação

com o anticorpo secundário biotilado, lavagem com TBST 10%, em seguida a incubação com streptoavidina peroxidase, lavagem com TBST 10% e a revelação com cromógeno DAB do kit Starr trek Universal HRP Detection (Biocare Medical, EUA). Por fim, foi feita a contra coloração com hematoxilina de Harris. Foi realizada análise qualitativa das metaloproteinases e semiquantitativa da COX-2 e do 8-OHdG.

**Tabela 2:** Titulação e especificações dos anticorpos primários utilizados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Titulação</b>	<b>Especificações</b>
MMP-2	1:100	(8B4) Santa Cruz Biotechnology- 13595
MMP-9	1:100	(2C3) Santa Cruz Biotechnology-21733
COX-2	1:200	(M-19) Santa Cruz Biotechnology-1747
8-OHdG	1:100	(15A3) Santa Cruz Biotechnology-66036

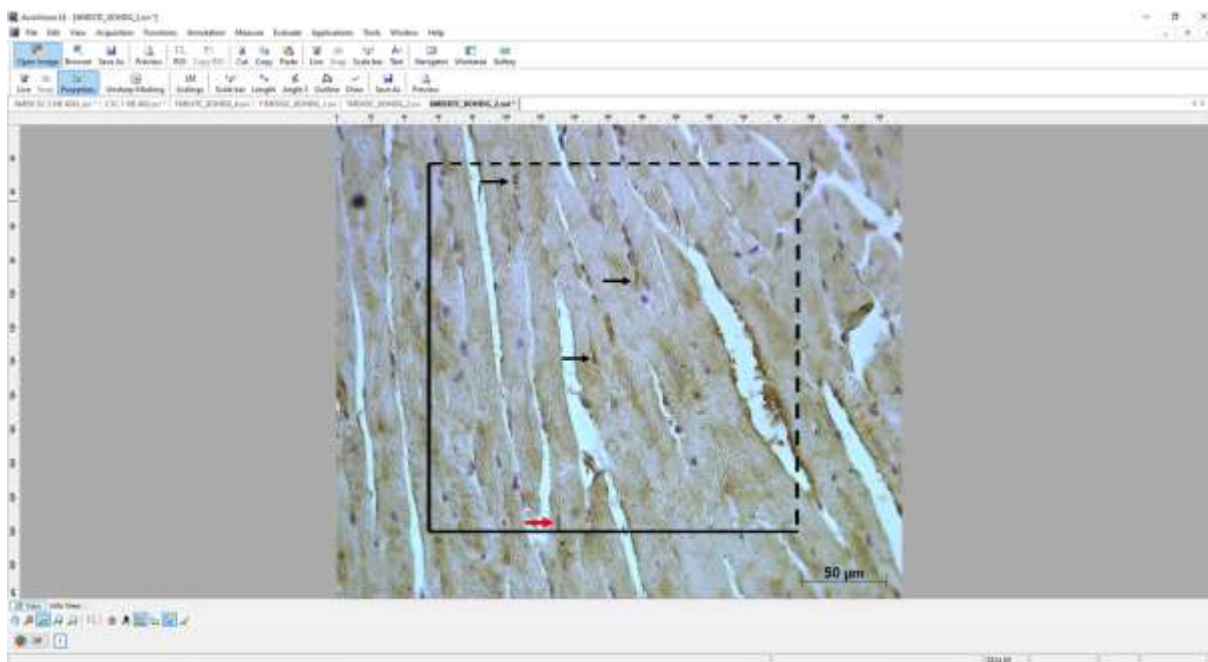
As lâminas imunocoradas foram analisadas inicialmente na objetiva de 2,5x para a localização da parede livre do ventrículo esquerdo (VE) e para a escolha de quatro áreas equidistantes que o abrangesse por completo. As imagens foram então ajustadas e capturadas na objetiva de 40x em um microscópio invertido Axio Observer.D1 Zeiss® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a um sistema de imagem computadorizado, o *software* Axio Vision 4.0 da Zeiss®.

As lâminas imunocoradas pelas metaloproteinases 2 e 9, foram analisadas de forma qualitativa para descrição do padrão e localização da imunomarcção e posterior discussão e correlação aos outros achados morfométricos e imunoistoquímicos.

As áreas imunocoradas pelo COX-2, com característica de imunomarcção predominantemente citoplasmática, foram analisadas de forma semiquantitativa através de um escore de 0 a 4, de acordo com a porcentagem de imunomarcção para cada campo, conforme proposto por Sinicrope et al. (1995). Os valores de escore foram: 0 para 0 < 5%; 1 para 5–25%; 2 para 25–50%; 3 para 50–75%; e 4 para 75–100%. As análises foram realizadas por dois avaliadores independentes.

As lâminas imunocoradas pelo 8-OHdG, com característica de imunomarcção nuclear, foram submetidas a um sistema teste composto por quatro linhas que formaram um quadrado com área conhecida de 22.632  $\mu\text{m}^2$ , sendo duas linhas contínuas que representaram as “linhas proibidas” e outras duas linhas pontilhadas que representaram as “linhas permitidas” (Figura

4). Para a quantificação dos núcleos totais (NT) e núcleos imunomarcados (NI), todas as células contidas dentro do sistema-teste foram contabilizadas, incluindo aquelas que tangenciaram as linhas permitidas, enquanto as que tangenciaram as linhas proibidas foram desconsideradas. Após esse procedimento, foi calculado a porcentagem da imunomarcação (SIN et al., 2013; QUINTANA et al., 2015) do 8-OHdG nos diferentes grupos: %de núcleos imunomarcados (8-OHdG) = (NI).100/(NT).



**Figura 4:** Representação da metodologia empregada para a contagem dos núcleos imunomarcados pelo 8-OHdG. Sistema teste composto por quatro linhas que formaram um quadrado com área conhecida, sendo duas linhas contínuas que representaram as “linhas proibidas” e outras duas linhas pontilhadas que representaram as “linhas permitidas”. Os núcleos que tangenciassem as linhas permitidas eram contabilizados (setas pretas), já os que tangenciassem as linhas proibidas, não eram contabilizados (seta vermelha).

## 5.8 Análise Estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram apresentados em forma de gráficos, com a média e desvio padrão e analisados através do *software* “Statistica” versão 13.5. Para estudar o

comportamento das variáveis de interesse foi empregado o teste de t de Student para amostras independentes na comparação entre os grupos em relação as variáveis espessura dos cardiomiócitos, área do perfil dos cardiomiócitos e para a estereologia do colágeno entre os grupos Mdx-S e Mdx-T. Em relação as variáveis de imunomarcção do 8-OHdG e COX-2 foi utilizado a análise de variância de um fator (ANOVA) e as comparações múltiplas de Tukey entre os grupos Controle, Mdx-S e Mdx-T. Para todas as análises, foi adotado nível de significância  $p \leq 0,05$ .

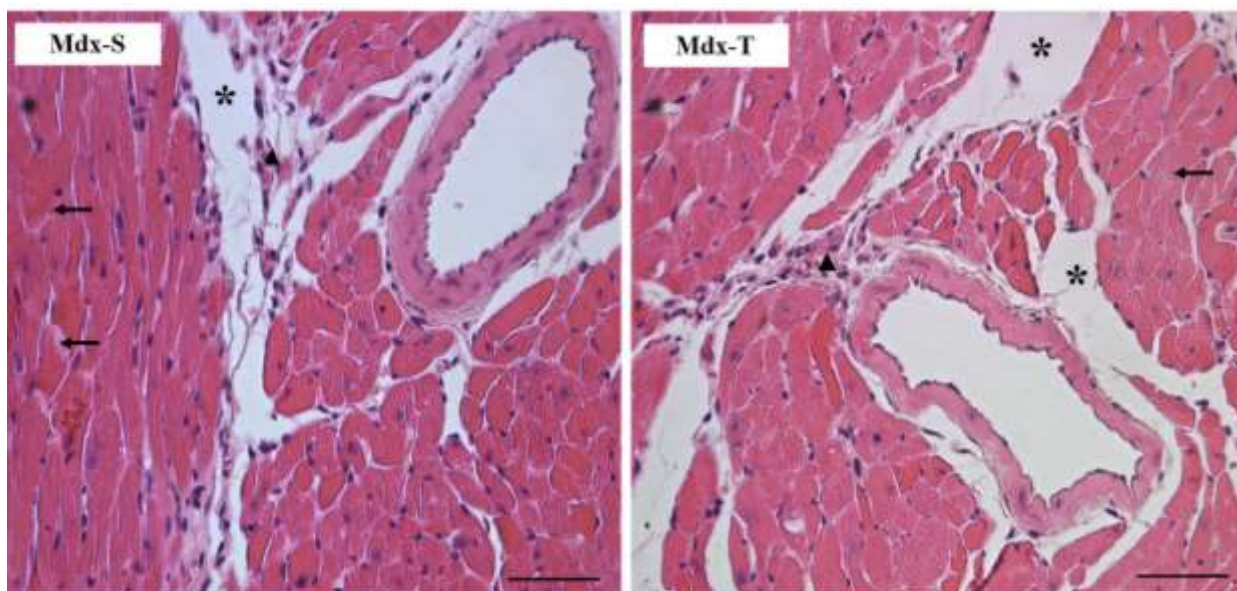


## 6.0 RESULTADOS

A seguir, estão apresentados os resultados das análises histopatológica, morfométrica, do tecido conjuntivo e imunistoquímica do coração dos grupos investigados. Todos esses resultados foram baseados na análise de fotomicrografias do ventrículo esquerdo e, quando quantitativos, apresentados na forma de gráficos com a representação da média e desvio padrão dos parâmetros investigados.

### 6.1 Análise histopatológica

Nas fotomicrografias do miocárdio obtidas das lâminas coradas pelo HE foi possível observar nos grupos Mdx-S e Mdx-T o processo de degeneração dos cardiomiócitos, aumento do espaço de matrix extracelular e das áreas de infiltrado inflamatório e de tecido conjuntivo, sendo essas alterações mais evidentes no grupo Mdx-T (**Figura 5**).



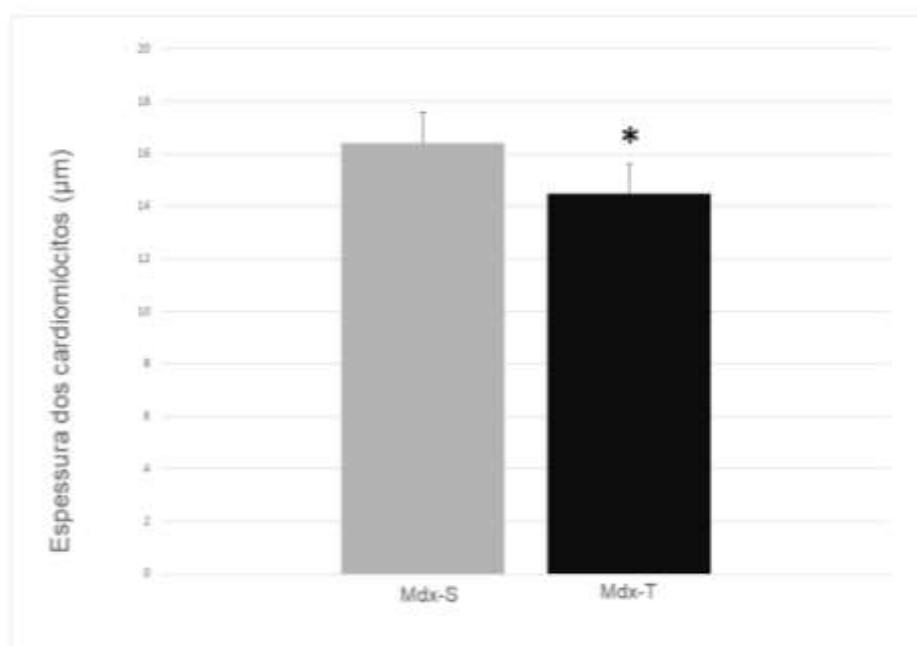
**Figura 5:** Fotomicrografias do miocárdio dos grupos Mdx-S e Mdx-T. Observou-se áreas de tecido conjuntivo ( $\Delta$ ), maior espaçamento entre as fibras (\*) e áreas degeneração das fibras do miocárdio (setas). Barra de calibração 50 $\mu$ m.



## 6.2 Análise morfométrica.

### 6.2.1 Espessura dos cardiomiócitos

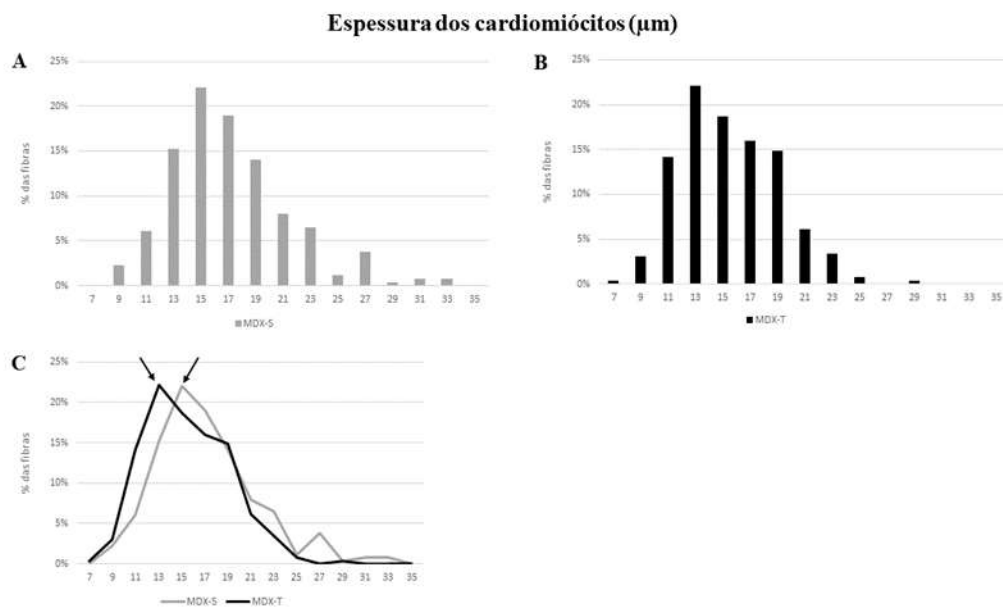
A análise da espessura dos cardiomiócitos mostrou que, na comparação entre os grupos de animais mdx, o grupo Mdx-T apresentou menor espessura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo Mdx-S (**Figura 6**).



**Figura 6.** Média + DP da espessura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos Mdx-S e Mdx-T. O grupo Mdx-T apresentou menor espessura dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo Mdx-S. (\*) =  $p < 0,05$ .

Na análise da frequência de distribuição da espessura das fibras cardíacas do ventrículo esquerdo dos diferentes grupos de animais mdx foi possível observar que houve ampla heterogeneidade no tamanho das fibras, com valores que variaram entre 7 e 35µm (**Figura 7C**). Quando comparado os dados entre os grupos, pôde-se observar que a frequência de espessura dos cardiomiócitos apresentou diferentes picos, destacando-se o pico de frequência de

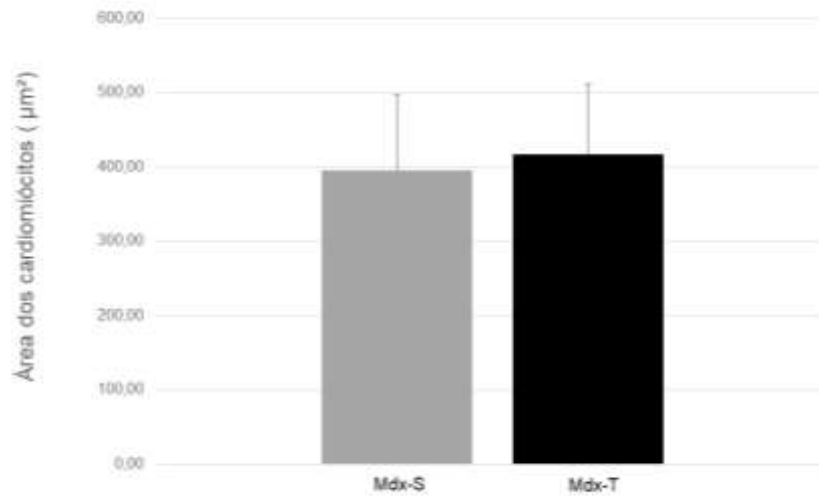
distribuição dos animais Mdx-S equivalente a 13 $\mu$ m e, dos animais Mdx-T, igual a 15  $\mu$ m (Figura 7).



**Figura 7.** Histogramas com a frequência de distribuição da espessura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais Mdx-S e Mdx-T. Em A foi representada a frequência de distribuição apenas do grupo Mdx-S e em B apenas do grupo Mdx-T. Já em C, representação comparativa de ambos os grupos experimentais, sendo que as setas destacam os diferentes picos de frequência de distribuição.

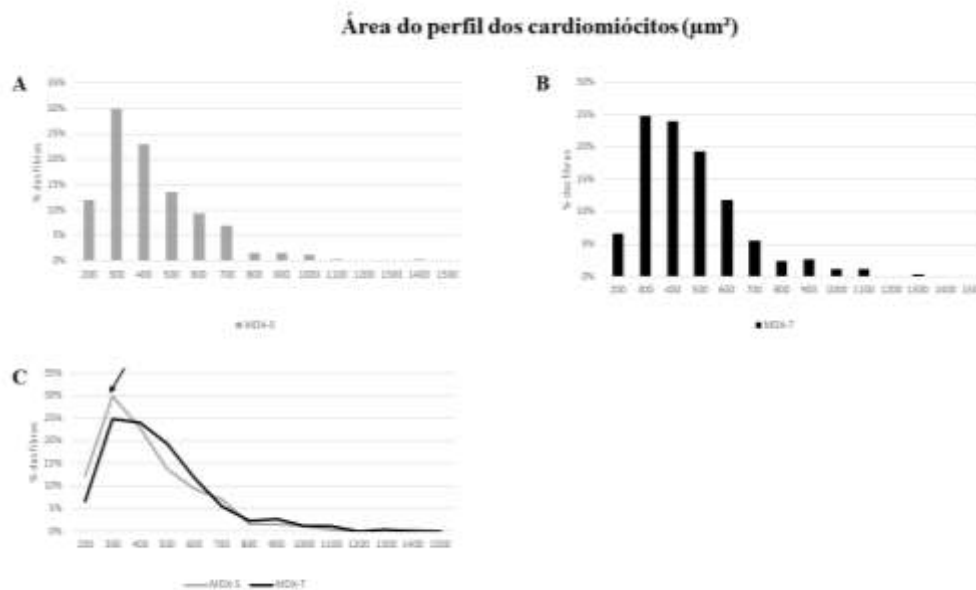
### 6.2.2 Análise da área do perfil dos cardiomiócitos

A seguir estão apresentados os resultados das análises histomorfométricas das lâminas coradas com H.E das análises da área do perfil dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos diferentes grupos investigados. Não foram observadas diferenças entre os grupos analisados (Figura 8).



**Figura 8.** Área do perfil dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos Mdx-S e Mdx-T. Não houve diferença entre os grupos investigados,  $p > 0,05$ .

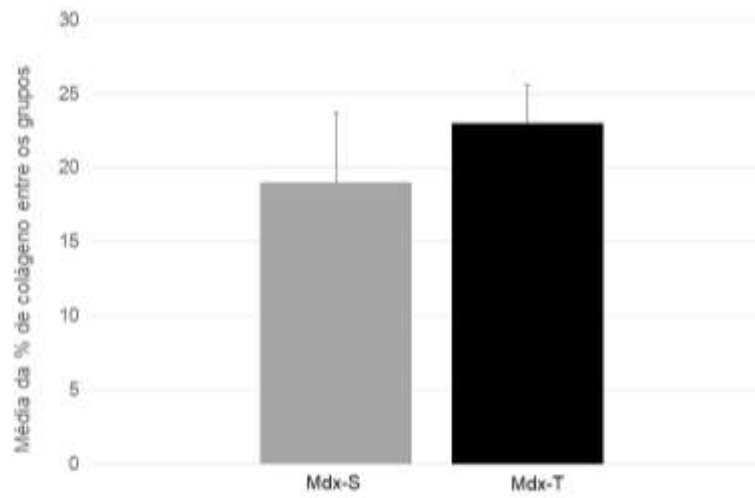
Na análise da frequência de distribuição da área do perfil dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos diferentes grupos, foi possível observar que houve heterogeneidade nos valores de área que variaram entre 200 e 1.500  $\mu\text{m}^2$  (**Figura 9C**). Já na comparação dos picos de frequência, observou-se que ambos os grupos apresentaram o pico de frequência em comum, no valor de 300 $\mu\text{m}^2$  (**Figura 9**).



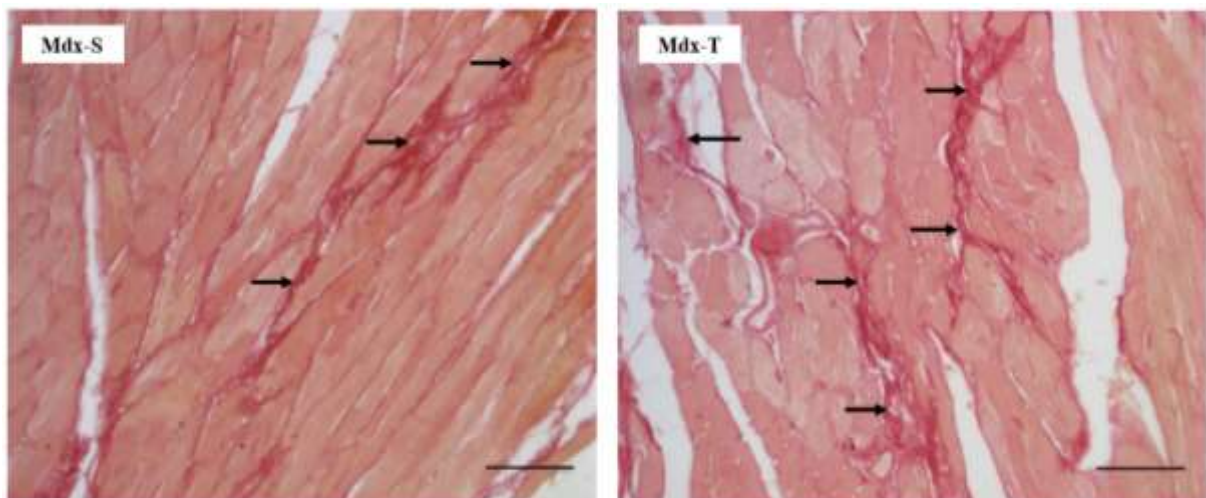
**Figura 9.** Histogramas com a frequência de distribuição da área do perfil dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais Mdx-S e Mdx-T. Em A foi representada a frequência de distribuição apenas do grupo Mdx-S e em B apenas do grupo Mdx-T. Já em C, representação comparativa de ambos os grupos experimentais, sendo que a seta destaca o pico de frequência comum dos grupos investigados.

### 6.3 Análise do tecido conjuntivo

A seguir estão apresentados os resultados das análises histomorfométricas das lâminas coradas pelo método Pícro Sirius. Foi possível observar áreas com deposição de colágeno em ambos os grupos, porém não houve diferença estatística entre os grupos,  $p > 0,05$ , (**Figura 10**).



**Figura 10.** Porcentagem de colágeno do ventrículo esquerdo do coração dos animais Mdx-S e Mdx-T. Não houve diferença estatística entre os grupos,  $p > 0,05$ .

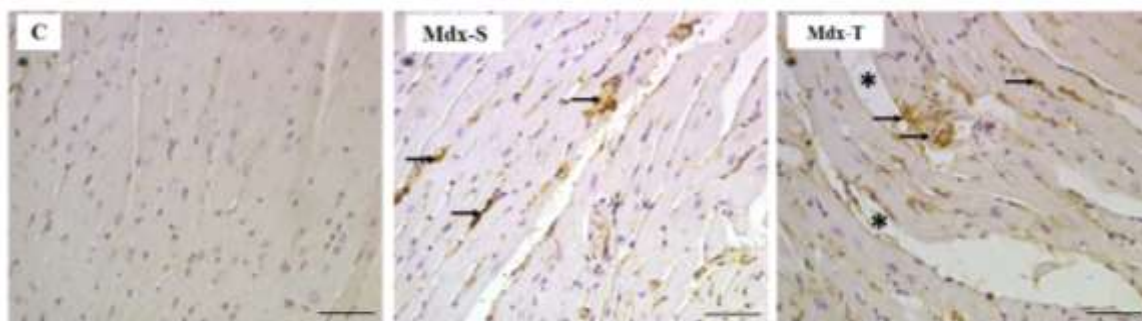


**Figura 11:** Fotomicrografias do miocárdio dos grupos Mdx-S e Mdx-T. Observou-se áreas de tecido conjuntivo coradas pelo Pícro Síríus (setas). Barra de calibração 50 $\mu$ m.

## 6.4 Análise Imunoistoquímica

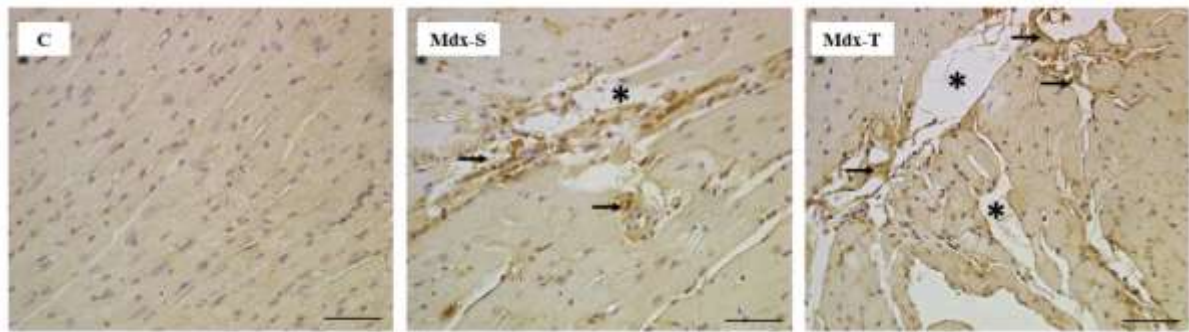
### 6.4.1 Análise da MMP-2 e MMP-9

Nas fotomicrografias do ventrículo esquerdo do coração dos animais C, Mdx-S e Mdx-T para a análise *in situ* da proteína MMP-2, foi possível observar apenas nos grupos Mdx-S e Mdx-T a presença da imunomarcação em regiões de acúmulo de tecido conjuntivo. Essas regiões com maior acúmulo de colágeno foram ainda mais evidentes no grupo Mdx-T quando comparado ao grupo Mdx-S, sendo que no grupo controle não houve quantidade significativa de regiões imunomarcadas (**Figura 12**).



**Figura 12:** Imunoexpressão da MMP-2 no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. Foram observadas áreas de tecido conjuntivo com imunomarcação da MMP-2 (setas) no grupo Mdx- S e, com maior evidenciação, no grupo Mdx-T. Além disso, houve maior espaçamento entre as fibras (\*) também no grupo Mdx-T. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra de calibração=50 $\mu$ m.

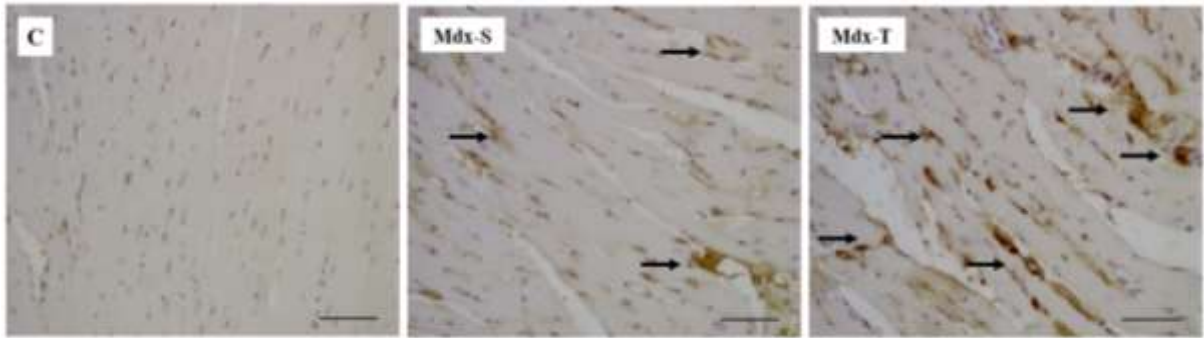
Já nas fotomicrografias do miocárdio obtidas das lâminas imunomarcadas para a análise *in situ* da proteína MMP-9, foi possível observar nos grupos Mdx-S e Mdx-T a presença da imunomarcação nas regiões em processo de degeneração das membranas celulares e maior espaçamento entre as fibras musculares. Essas regiões com maior acúmulo de colágeno também foram mais evidentes no grupo Mdx-T quando comparado ao grupo Mdx-S, sendo que no grupo controle não houve quantidade significativa de regiões imunomarcadas (**Figura 13**).



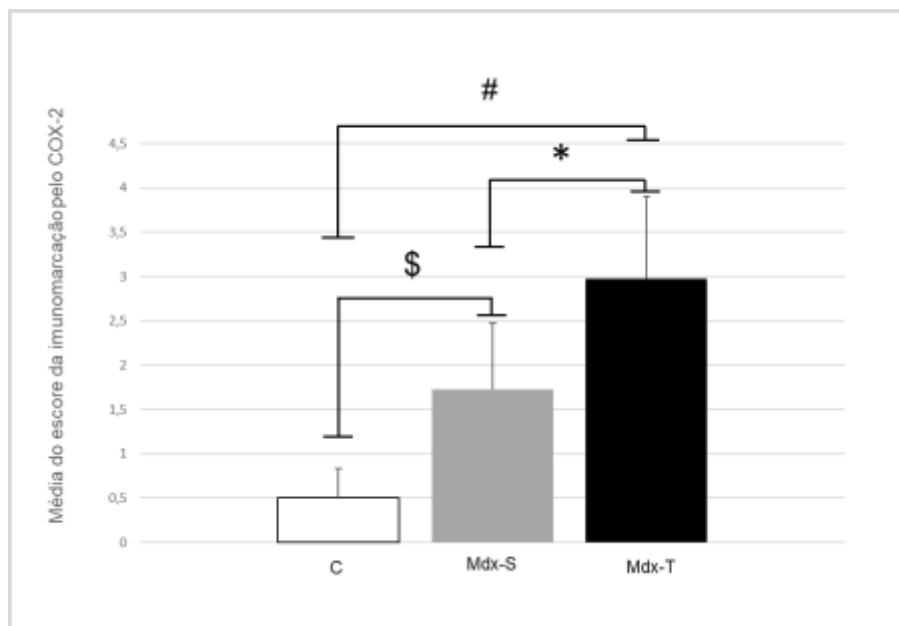
**Figura 13:** Imunoexpressão da MMP-9 no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. Foram observadas áreas de tecido conjuntivo com imunomarcagem da MMP-9 (setas) no grupo Mdx- S e, com maior evidenciação, no grupo Mdx-T. Além disso, houve maior espaçamento entre as fibras (\*) em ambos os grupos. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra de calibração=50 $\mu$ m.

#### 6.4.2 Análise da COX-2

Na avaliação da imunoexpressão da COX-2 no ventrículo esquerdo do coração, foi possível observar marcação preferencialmente no meio extracelular e de forma difusa (**Figura 14**). Através da análise do escore adotado para avaliação, foi possível observar que os animais Mdx-T apresentaram maior escore que o controle ( $p < 0,05$ ). Os animais Mdx-S também apresentaram maior escore quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Já na comparação entre os animais mdx, verificou-se ainda que o Mdx-T apresentou maior escore do que o grupo Mdx-S ( $p < 0,05$ ) **Figura 15**.



**Figura 14:** Imunoexpressão da COX-2 no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. A porcentagem de áreas com imunomarcção da COX-2 (setas) no grupo Mdx- S e, com maior evidenciação, no grupo Mdx-T. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra de calibração=50 $\mu$ m.

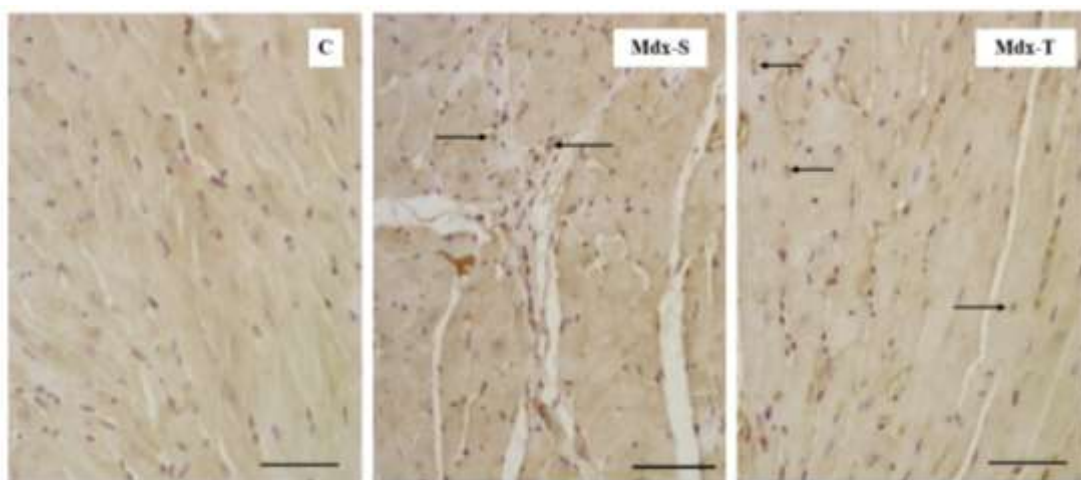


**Figura 15.** Escore da imunomarcção da COX-2 no ventrículo esquerdo do coração dos animais controle, Mdx-S e Mdx-T. Os animais Mdx-T apresentaram maior escore que o controle (#=p<0,05). Os animais Mdx-S também apresentaram maior escore quando comparados ao grupo controle (\$=p<0,05). Verificou-se ainda que o Mdx-T apresentou maior escore do que o grupo Mdx-S (\*=p<0,05).

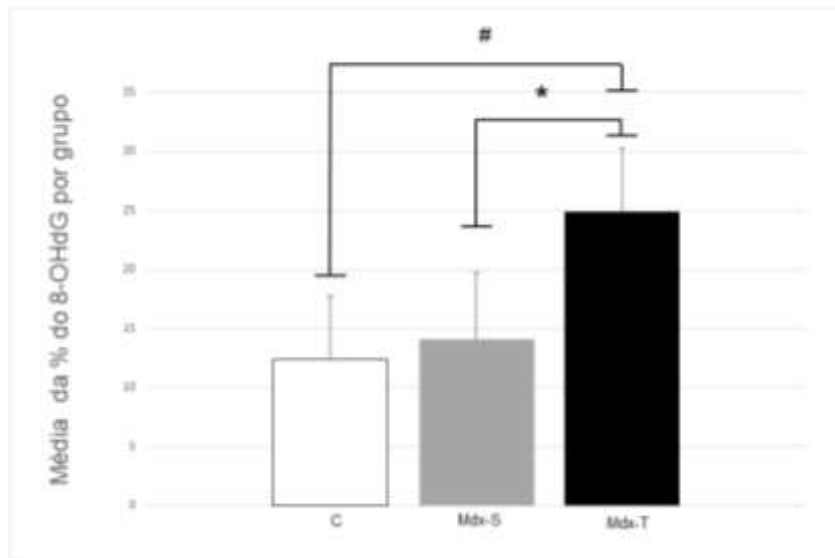


### 6.4.3 Análise do 8-OHdG

Na análise da porcentagem dos núcleos imunomarcados para 8-OHdG no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos C, Mdx-S e Mdx-T (**Figura 16**), foi possível observar que o grupo Mdx-T apresentou maior porcentagem de imunomarcação quando comparado ao grupo controle ( $p<0,05$ ). Além disso, o grupo Mdx-T apresentou também maior porcentagem de imunomarcação nuclear quando comparado ao grupo Mdx-S,  $p<0,05$ , (**Figura 17**).



**Figura 16:** Imunoexpressão da 8-OHdG no ventrículo esquerdo do coração dos grupos controle (C), Mdx- S e Mdx-T. A porcentagem de núcleos com imunomarcação da 8-OHdG (setas) no grupo Mdx- S e no grupo Mdx-T. Tais características não foram observadas no grupo controle. Barra calibração=50 $\mu$ m.



**Figura 17.** Porcentagem dos núcleos imunomarcados para 8-OHdG no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos C, Mdx-S e Mdx-T. O grupo Mdx-T apresentou maior porcentagem de imunomarcção quando comparado ao grupo controle ( $\# = p < 0,05$ ). Além disso, o grupo Mdx-T apresentou também maior porcentagem de imunomarcção nuclear quando comparado ao grupo Mdx-S ( $* = p < 0,05$ ).

## 7.0 DISCUSSÃO

Os mecanismos patológicos que acarretam a insuficiência cardíaca na DMD não estão totalmente esclarecidos, haja vista que são inúmeras as hipóteses que justificam o dano e morte dos cardiomiócitos e substituição deles por tecido fibrótico com conseqüente perda funcional cardíaca. A instabilidade do sarcolema devido à ausência da distrofina parece ser o evento principal para as alterações mecânicas e metabólicas que levam ao quadro de inflamação crônica, morte celular e fibrose nesta população.

Apesar de não ter cura, os recentes avanços tecnológicos, incluindo o suporte ventilatório, tem aumentado a sobrevivência desses pacientes (CHA et al., 2022) e embora a doença cardíaca seja recentemente reconhecida como a primeira causa de mortalidade nessa população, o diagnóstico é difícil devido ao seu progresso lento, com natureza insidiosa e início abrupto nos estágios mais avançados da doença (D'AMÁRIO et al., 2018). Assim, este estudo teve como objetivo a investigação das principais alterações histopatológicas no ventrículo esquerdo do coração de animais mdx, após um protocolo de exercício que exacerbasse o fenótipo da doença nesses animais.

Como principais achados do presente estudo, foi possível identificar que o miocárdio dos animais mdx apresentaram áreas de degeneração celular e acúmulo de colágeno, além da diminuição da espessura dos cardiomiócitos, sendo esse último resultado verificado principalmente nos animais que foram submetidos ao exercício. Associado a esses dados, encontrou-se aumento da imunoexpressão das proteínas ligadas ao processo de fibrose, inflamação e danos ao DNA também exacerbados pelo exercício físico.

Nos dados morfométricos, o ventrículo esquerdo dos animais treinados apresentou menor espessura dos cardiomiócitos e maior espaçamento entre as miofibrilas cardíacas, e esse achado histopatológico sugere o processo de atrofia do cardiomiócito. Em seu estudo Matsuoka et al., (1987) descreveram as alterações encontradas na biópsia cardíaca de pacientes com DMD, com grande variação no tamanho e formato dos cardiomiócitos, e áreas de atrofia cardíaca rodeada por áreas de fibrose. Assim, as alterações observadas em nosso estudo evidenciam um processo de degeneração celular, e alteração da estrutura cardíaca, e Tsuda et al., (2018) descreveram em seu trabalho que o remodelamento no coração distrófico é secundário à alteração do volume muscular cardíaco e da diminuição da função sistólica.

Esperava-se encontrar nos animais Mdx-T maior presença da fibrose cardíaca, porém a análise do colágeno não demonstrou diferença entre os grupos em animais com 32 semanas, e resultado semelhante foi encontrado por Taniguti et al. (2011), em animais com a mesma idade e submetidos ao mesmo protocolo de exercícios, no qual o miocárdio não apresentou alteração das áreas de fibrose, mas encontraram diferenças quanto ao infiltrado inflamatório. No presente estudo, esses achados podem também ser justificados pelo protocolo de exercício utilizado, visto que nos mesmos animais foram observadas alterações nos músculos esqueléticos ao longo do experimento, impactando no desempenho ao exercício desses animais (LAZZARIN, 2021) e conseqüentemente em uma demanda cardíaca menor. Ainda, como já descrito, os animais mdx apresentam um fenótipo mais brando e desenvolvem a cardiomiopatia de forma mais lenta e tardia ao longo da vida, o que pode favorecer a identificação das sequências de eventos celulares que levam da ausência da distrofina à doença cardíaca (SHIROKOVA; NIGGLI, 2013).

Entretanto, apesar da fibrose cardíaca não apresentar diferenças entre os grupos mdx, foi observado no grupo Mdx-T o que pode ser considerado os efeitos do protocolo de exercício, e como os estágios que antecedem o remodelamento cardíaco, como as alterações na morfometria dos cardiomiócitos, no aumento da presença das metaloproteinases que evidenciam a degeneração do colágeno, do 8-OHdG associado aos danos ao DNA e da COX-2, um importante sinalizador de inflamação.

O reparo cardíaco após lesão ocorre através de uma série de eventos iniciado por um processo inflamatório e infiltração celular, seguido por uma fase reparatória e resolução da inflamação, formação de miofibroblastos e formação da cicatrização, porém uma fase inflamatória prolongada pode levar a dano tecidual e promover remodelação cardíaca adversa (PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016). O alongamento das fibras cardíacas na presença do processo inflamatório é um gatilho essencial para ativação do miofibroblastos e da formação da fibrose cardíaca, que é regulada por células inflamatórias, e por enzimas de degradação do colágeno como as MMPs (FRANTZ et al., 2022).

Em nosso estudo, em conjunto ao achado morfométrico, foi possível observar a presença da ativação das MMP-2 e MMP-9 nos animais Mdx. Acredita-se que, apesar da estereologia do colágeno não indicar uma massiva fibrose muscular nesses animais, a presença das metaloproteinases avaliadas nesse estudo indica sua ação no processo de fibrose cardíaca

ainda em andamento, já que foi mais evidenciada nas regiões com acúmulo de tecido conjuntivo.

Resultado semelhante foi encontrado por Danielsen et al. (1998) em um modelo de isquemia e reperfusão do miocárdio em porcos, em que a atividade das MMP-2 e MMP-9 encontrava-se aumentada no tecido cardíaco isquêmico e maior imunexpressão da MMP-9 no tecido intersticial entre os cardiomiócitos e no tecido conjuntivo perivascular. Corroborando com esses dados, Delfin et al. (2012) demonstraram em seu estudo, quanto a localização da expressão das MMP-2 e MMP-9, a atividade *in situ* das gelatinases identificadas através da zimografia correspondiam a locais de perda dos cardiomiócitos e deposição de tecido colágeno quando analisadas nas lâminas de Hematoxilina e Eosina.

Ainda, estabelecendo o papel das MMP-2 e MMP-9 no remodelamento estrutural cardíaco, Ducharme et al. (2000) e Hayashidani et al. (2003), mostraram em seus estudos que nos animais com deleção da MMP-9 e MMP-2, respectivamente, as respostas deletérias cardíacas são atenuadas quanto à lesão induzida, menor área de deposição de colágeno, maior taxa de sobrevivência dos animais após indução isquêmica, e melhores achados quanto a avaliação ecocardiográfica nos diâmetros do ventrículo esquerdo, quando comparados ao grupo controle (com expressão das MMP- 2 e MMP-9).

As metaloproteinases 2 e 9 tem ação de degradação dos colágenos IV e V, da laminina, gelatina, fibronectina e elastina, e os produtos dessa degradação exibem ação quimiotática e estimula a migração de células inflamatórias (MATSUMARA et al., 2005) e nos animais mdx o dano muscular secundário a alteração da distrofina acarreta na presença de infiltrado inflamatório, caracterizado por células mielóides, macrófagos e células T, ativadas padrões moleculares associados a danos, do inglês *DAMPs* (CASCABULHO et al., 2016).

Ainda, Pauschingner et al. (1999) demonstraram em seu estudo que na biopsia cardíaca de pacientes com cardiomiopatia dilatada há aumento da presença do mRNA dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 e podem estar relacionados ao remodelamento da matrix extracelular nesses pacientes e Taniguti et al. (2011) encontraram em seu estudo o aumento da TGF- $\beta$ 1 em corações de animais mdx e o exercício em esteira foi capaz de aumentar os níveis nesses animais.

Já foi descrito que a COX-2 é ativada principalmente em resposta a diversos estímulos inflamatórios como a interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)-a, e fator de

crescimento transformador (TGF)-  $\beta$ , como um gene imediato-precoce (KHAN et al., 2022). A imunexpressão da COX-2 já foi descrita no tecido muscular esquelético de animais mdx por De Oliveira et al. (2012). LaPointe et al. (2004), em estudo com ratos, mostraram que a COX-2 é induzida 24 horas após o infarto do miocárdio e após 16 dias foi possível detectar sua imunexpressão nos miócitos. No mesmo estudo, LaPointe et al. (2004) demonstraram que a inibição do COX-2 foi capaz de melhorar a função cardíaca e a deposição de colágeno após lesão induzida.

Observou-se, no presente estudo, o aumento da imunexpressão da COX-2 nos animais mdx quando comparado ao controle, e mais expressivo naqueles que foram submetidos ao exercício, sendo possível inferir que o miocárdio desses animais está em um processo inflamatório e o exercício físico foi capaz de aumentar esse quadro, visto a diferença entre os grupos Mdx-S e Mdx-T e que a COX-2 é um importante marcador inflamatório nesses animais.

Ainda, sobre o envolvimento da COX-2 na cardiomiopatia na DMD, a utilização de inibidores da COX representa uma nova categoria farmacêutica recentemente introduzida nos pacientes com DMD. D'Amário et al. (2018) e Uaesoontrachoon et al., (2014) encontraram resultados favoráveis quanto a função cardíaca em animais mdx tratados em longo prazo com um composto inibidor da cicloxigenase, com menores efeitos colaterais quanto ao uso da prednisolona.

Ainda sobre o processo inflamatório e sua relação com o remodelamento cardíaco, no presente estudo verificou-se aumento da imunexpressão da 8-OHdG nos animais mdx, com maior expressão no grupo treinado. Salienta-se que uma hipótese que explica a fisiopatologia do cardiomiócito distrófico está associada ao dano recorrente à membrana celular, que acarreta aumento do influxo de cálcio e, este por sua vez, pode ativar proteases e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (identificadas nesse estudo pela análise da imunexpressão do 8-OHdG), o que leva ao aumento da atividade das vias de citocinas pró-inflamatórias e da inflamação que promove degeneração muscular e necrose (SHIH; FOLCH; WONG, 2020).

Sabe-se que os exercícios de alta intensidade e os que exigem contrações excêntricas são deletérios ao músculo estriado esquelético (LINDSAY et al., 2020). Em situações patológicas do miocárdio, as contrações excêntricas se tornam mais prevalentes e extenuantes e experimentos *in vitro* realizados no miocárdio distrófico mostrou que contrações excêntricas

repetitivas induziram a maior deterioração do desenvolvimento de força e presença de fibrose quando comparado ao miocárdio sadio (XU et al., 2011).

De acordo com os achados do presente estudo, o exercício físico mostrou contribuir com as alterações cardíacas já que os achados histomorfométricos da espessura dos cardiomiócitos no grupo Mdx-T foram menores quando comparados ao grupo Mdx-S. Resultados semelhantes sobre o agravamento cardíaco foram encontrados por Nakamura et al. (2002) e Barbin et al. (2016) com a utilização de exercícios de alta intensidade, em esteira e natação, respectivamente, com dano tecidual e funcional do miocárdio de animais mdx.

O remodelamento cardíaco envolve alterações moleculares, celulares e intersticiais, e se manifesta clinicamente na mudança do tamanho, formato e função cardíaca após um dano ou estímulo estressor (KEHAT; MOLKENTIN, 2010). Na DMD e nos animais mdx esse remodelamento é descrito inicialmente como a dilatação do ventrículo esquerdo seguido pelo acometimento das outras câmaras cardíacas com a evolução da doença (SCHULTHEISS et al., 2019) decorrentes de um processo inflamatório crônico.

Salienta-se que o presente estudo apresentou limitações. Uma delas, está relacionada ao fato de o miocárdio ser um tecido de características anisotrópicas, graças à disposição espiralada de suas fibras musculares no coração. Essa característica faz com que os estudos morfométricos e estereológicos dependam da disposição das fibras durante a confecção das lâminas histológicas, bem como de suas localizações e captura para análise, porém, essa característica ocorre tanto para os grupos mdx quanto para o grupo controle. Outra limitação a ser descrita, está relacionada às diferenças dos animais no desempenho e nas diferentes adaptações ao protocolo de exercício físico oferecido, resultando em diversidades adaptativas do miocárdio e do remodelamento cardíaco.

Os achados nesse estudo são relevantes quanto ao entendimento dos eventos que caracterizam o remodelamento cardíaco nesses animais. Espera-se que futuros estudos com estratégias terapêuticas efetivas na preservação da função cardíaca para os pacientes com DMD sejam realizados, haja vista o envolvimento cardíaco e a alta taxa de mortalidade nessa população.

## **8. CONCLUSÃO**

Os dados observados nesse estudo evidenciaram o processo inflamatório no coração de animais mdx, pela presença de um marcador de dano ao DNA (8-OHdG) e da COX-2, e aumento das MMPs, além da diminuição da espessura dos cardiomiócitos, sugerindo dano celular. Essas alterações foram maiores no grupo treinado, o que comprova que o protocolo de exercícios utilizado foi capaz de exacerbar o processo de dano celular e inflamação prévios à instalação da fibrose e remodelamento cardíaco.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abresch RT, Carter GT, Han JJ, McDonald CM. Exercise in neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012;23(3):653-673. doi:10.1016/j.pmr.2012.06.001

Adams V, Linke A, Wisloff U, Döring C, Erbs S, Kränkel N, Witt CC, Labeit S, Müller-Werdan U, Schuler G, Hambrecht R. Myocardial expression of Murf-1 and MAFbx after induction of chronic heart failure: Effect on myocardial contractility. *Cardiovasc Res*. 2007 Jan 1;73(1):120-9. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.10.026. Epub 2006 Nov 1. PMID: 17145048.

Alexakis C, Partridge T, Bou-Gharios G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(2):C661-C669. doi:10.1152/ajpcell.00061.2007

Andrews JG, Wahl RA. Duchenne and Becker muscular dystrophy in adolescents: current perspectives. *Adolesc Health Med Ther*. 2018; 9:53-63. Published 2018 Mar 15. doi:10.2147/AHMT.S125739

Anaya-Segura MA, García-Martínez FA, Montes-Almanza LA, Díaz BG, Avila-Ramírez G, Alvarez-Maya I, Coral-Vazquez RM, Mondragón-Terán P, Escobar-Cedillo RE, García-Calderón N, Vazquez-Cardenas NA, García S, López-Hernandez LB. Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy and Carrier Detection. *Molecules*. 2015 Jun 17;20(6):11154-72. doi: 10.3390/molecules200611154. PMID: 26091074; PMCID: PMC6272409.

Araujo APQC, Nardes F, Fortes CPDD, Pereira JA, Rebel MF, Dias CM, Barbosa RCGA, Lopes MVR, Langer AL, Neves FR, Reis EF. Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy. Part 2: rehabilitation and systemic care. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018 Jul;76(7):481-489. doi: 10.1590/0004-282X20180062. Erratum in: *Arq Neuropsiquiatr*. 2018 Oct;76(10):1. PMID: 30066800.

Assereto S, Piccirillo R, Baratto S, Scudieri P, Fiorillo C, Massacesi M, Traverso M, Galiotta LJ, Bruno C, Minetti C, Zara F, Gazzero E. The ubiquitin ligase tripartite-motif-protein 32 is

induced in Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest.* 2016 Aug;96(8):862-71. doi: 10.1038/labinvest.2016.63. Epub 2016 Jun 13. PMID: 27295345.

Au CG, Butler TL, Sherwood MC, Egan JR, North KN, Winlaw DS. Increased connective tissue growth factor associated with cardiac fibrosis in the mdx mouse model of dystrophic cardiomyopathy. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(1):57-65. doi:10.1111/j.1365-2613.2010.00750.x

Ballmann C, Denney TS, Beyers RJ, Quindry T, Romero M, Amin R, Selsby JT, Quindry JC. Lifelong quercetin enrichment and cardioprotection in Mdx/Utrn<sup>+/-</sup> mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017 Jan 1;312(1):H128-H140. doi: 10.1152/ajpheart.00552.2016. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27836895.

Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1080:76-84. doi:10.1196/annals.1380.007

Barbin IC, Pereira JA, Bersan Rovere M, de Oliveira Moreira D, Marques MJ, Santo Neto H. Diaphragm degeneration and cardiac structure in mdx mouse: potential clinical implications for Duchenne muscular dystrophy. *J Anat.* 2016;228(5):784-791. doi:10.1111/joa.12443

Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Alman BA, Apkon SD, Blackwell A, Case LE, Cripe L, Hadjiyannakis S, Olson AK, Sheehan DW, Bolen J, Weber DR, Ward LM; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* 2018 Apr;17(4):347-361. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30025-5. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29395990; PMCID: PMC5889091.

Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(6):E469-E484. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014

Bozzi M, Sciandra F, Brancaccio A. Role of gelatinases in pathological and physiological processes involving the dystrophin-glycoprotein complex. *Matrix Biol.* 2015;44-46:130-137. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.005

Brinkmeyer-Langford C, Chu C, Balog-Alvarez C, Yu X, Cai JJ, Nabity M, Kornegay JN. Expression profiling of disease progression in canine model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2018 Mar 19;13(3):e0194485. doi: 10.1371/journal.pone.0194485. Erratum in: *PLoS One.* 2020 Jul 23;15(7):e0236916. PMID: 29554127; PMCID: PMC5858769.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010 Jan;9(1):77-93. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6. Epub 2009 Nov 27. PMID: 19945913.

Camelliti P, Green CR, Kohl P. Structural and functional coupling of cardiac myocytes and fibroblasts. *Adv Cardiol.* 2006; 42:132-149. doi:10.1159/000092566

Cascabulho CM, Beghini DG, Meuser-Batista M, Penido C, Henriques-Pons A. Chemotaxis and Immunoregulatory Function of Cardiac  $\gamma\delta$  T Cells in Dystrophin-Deficient Mice. *J Immunol.* 2016;197(9):3531-3544. doi:10.4049/jimmunol.1600335

Cha JJ, Kim IS, Kim JY, Choi EY, Min PK, Yoon YW, Lee BK, Hong BK, Kwon HM, Cho HE, Choi WA, Kang SW, Rim SJ. The association between cardiac involvement and long-term clinical outcomes in patients with Duchenne muscular dystrophy. *ESC Heart Fail.* 2022 May 17. doi: 10.1002/ehf2.13970.

Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell.* 1999;98(5):555-558. doi:10.1016/s0092-8674(00)80043-4

Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibacache M, Criollo A, Nemchenko A, Hill JA, Lavandero S. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell*

Death Dis. 2011 Dec 22;2(12):e244. doi: 10.1038/cddis.2011.130. PMID: 22190003; PMCID: PMC3252742.

Costas JM, Nye DJ, Henley JB, Plochocki JH. Voluntary exercise induces structural remodeling in the hearts of dystrophin-deficient mice. *Muscle Nerve*. 2010;42(6):881-885. doi:10.1002/mus.21783

Csibi A, Leibovitch MP, Cornille K, Tintignac LA, Leibovitch SA. MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *J Biol Chem*. 2009;284(7):4413-4421. doi:10.1074/jbc.M807641200

Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Jul;30(7):1431-42. doi: 10.1006/jmcc.1998.0711. PMID: 9710810.

Dahiya S, Givvimani S, Bhatnagar S, Qipshidze N, Tyagi SC, Kumar A. Osteopontin-stimulated expression of matrix metalloproteinase-9 causes cardiomyopathy in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Immunol*. 2011;187(5):2723-2731. doi:10.4049/jimmunol.1101342

D'Amario D, Amodeo A, Adorisio R, Tiziano FD, Leone AM, Perri G, Bruno P, Massetti M, Ferlini A, Pane M, Niccoli G, Porto I, D'Angelo GA, Borovac JA, Mercuri E, Crea F. A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy. *Heart*. 2017 Nov;103(22):1770-1779. doi: 10.1136/heartjnl-2017-311269. Epub 2017 Jul 1. PMID: 28668906.

da Silva TD, Massetti T, Crocetta TB, de Mello Monteiro CB, Carll A, Vanderlei LCM, Arbaugh C, Oliveira FR, de Abreu LC, Ferreira Filho C, Godleski J, Ferreira C. Heart Rate Variability and Cardiopulmonary Dysfunction in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy: A Systematic Review. *Pediatr Cardiol*. 2018 Jun;39(5):869-883. doi: 10.1007/s00246-018-1881-0. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29696428.

de Oliveira F, Quintana HT, Bortolin JA, Gomes OA, Liberti EA, Ribeiro DA. Cyclooxygenase-2 expression in skeletal muscle of knockout mice suffering Duchenne

muscular dystrophy [published correction appears in *Histochem Cell Biol.* 2013 Apr;139(4):621. Flavia, De Oliveira [corrected to de Oliveira, Flavia]]. *Histochem Cell Biol.* 2013;139(5):685-689. doi:10.1007/s00418-012-1056-7

Delfin DA, Zang KE, Schill KE, Patel NT, Janssen PM, Raman SV, Rafael-Fortney JA. Cardiomyopathy in the dystrophin/utrophin-deficient mouse model of severe muscular dystrophy is characterized by dysregulation of matrix metalloproteinases. *Neuromuscul Disord.* 2012 Nov;22(11):1006-14. doi: 10.1016/j.nmd.2012.05.002. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22749475; PMCID: PMC3484217.

Duan D. Challenges and opportunities in dystrophin-deficient cardiomyopathy gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 2(SPEC):R253-R261. doi:10.1093/hmg/ddl180

Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(1):55-62. doi: 10.1172/JCI8768. PMID: 10880048; PMCID: PMC517910.

Eisner DA. Ups and downs of calcium in the heart. *J Physiol.* 2018;596(1):19-30. doi:10.1113/JP275130

Eisner D. Calcium in the heart: from physiology to disease. *Exp Physiol.* 2014;99(10):1273-1282. doi:10.1113/expphysiol.2013.077305

Evans NP, Misyak SA, Robertson JL, Bassaganya-Riera J, Grange RW. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R.* 2009;1(8):755-768. doi:10.1016/j.pmrj.2009.04.010

Fanchaouy M, Polakova E, Jung C, Ogrodnik J, Shirokova N, Niggli E. Pathways of abnormal stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into dystrophic mdx cardiomyocytes. *Cell Calcium.* 2009;46(2):114-121. doi:10.1016/j.ceca.2009.06.002

Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2486-95. doi: 10.1172/JCI32827. PMID: 17786241; PMCID: PMC1957544.

Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch*. 2011;461(3):325-335. doi:10.1007/s00424-010-0919-9

Fox H, Millington L, Mahabeer I, van Ruiten H. Duchenne muscular dystrophy. *BMJ*. 2020 Jan 23;368:l7012. doi: 10.1136/bmj.l7012. PMID: 31974125.

Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J*. 2022 May 4:ehac223. doi: 10.1093/eurheartj/ehac223. Epub ahead of print. PMID: 35511857.

Gao Y, Arfat Y, Wang H, Goswami N. Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. *Front Physiol*. 2018; 9:235. Published 2018 Mar 20. doi:10.3389/fphys.2018.00235

Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*. 2008 Jul;31(1):1-19. doi: 10.1016/j.nbd.2008.03.008. Epub 2008 Apr 9. PMID: 18499465; PMCID: PMC2518169.

Greally E, Davison BJ, Blain A, Laval S, Blamire A, Straub V, MacGowan GA. Heterogeneous abnormalities of in-vivo left ventricular calcium influx and function in mouse models of muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013 Jan 16;15(1):4. doi: 10.1186/1532-429X-15-4. PMID: 23324314; PMCID: PMC3564732.

Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late

remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep;285(3):H1229-35. doi: 10.1152/ajpheart.00207.2003. Epub 2003 May 29. PMID: 12775562.

Hyzewicz J, Ruegg UT, Takeda S. Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(4):325-342. doi:10.3233/JND-150106

Holland A, Ohlendieck K. Proteomic profiling of the dystrophin-deficient mdx phenocopy of dystrophinopathy-associated cardiomyopathy. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:246195. doi:10.1155/2014/246195

Jarrah AA, Schwarskopf M, Wang ER, LaRocca T, Dhume A, Zhang S, Hadri L, Hajjar RJ, Schecter AD, Tarzami ST. SDF-1 induces TNF-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Apoptosis*. 2018 Jan;23(1):79-91. doi: 10.1007/s10495-017-1438-3. PMID: 29236198; PMCID: PMC6019273.

Johnstone VP, Viola HM, Hool LC. Dystrophic Cardiomyopathy-Potential Role of Calcium in Pathogenesis, Treatment and Novel Therapies. *Genes (Basel)*. 2017;8(4):108. Published 2017 Mar 24. doi:10.3390/genes8040108

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979 Jul;11(4):447-55. doi: 10.1007/BF01002772. PMID: 91593.

Kamogawa Y, Biro S, Maeda M, Setoguchi M, Hirakawa T, Yoshida H, Tei C. Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload in vivo. *Cardiovasc Res*. 2001 Jun;50(3):509-15. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00205-x. PMID: 11376626.

Kamkin A, Kiseleva I, Lozinsky I, Wagner KD, Isenberg G, Scholz H. The Role of Mechanosensitive Fibroblasts in the Heart. In: Kamkin A, Kiseleva I, eds. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. Moscow: Academia; 2005.

Kanagawa M, Toda T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet.* 2006;51(11):915-926. doi:10.1007/s10038-006-0056-7

Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):413-423. doi:10.1093/cvr/cvp268

KANAGAWA, Motoi; TODA, Tatsushi. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *Journal of human genetics*, v. 51, n. 11, p. 915, 2006.

Kaprielian RR, Severs NJ. Dystrophin and the cardiomyocyte membrane cytoskeleton in the healthy and failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000;5(3):221-238. doi:10.1023/A:1009805419285

Kehat I, Molkenin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation.* 2010 Dec 21;122(25):2727-35. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268. PMID: 21173361; PMCID: PMC3076218.

Khan H, Sharma K, Kumar A, Kaur A, Singh TG. Therapeutic implications of cyclooxygenase (COX) inhibitors in ischemic injury. *Inflamm Res.* 2022 Mar;71(3):277-292. doi: 10.1007/s00011-022-01546-6. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35175358.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdière-Sahuqué M, Fardeau M, Alameddine HS. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol.* 1999 Jan 1;205(1):158-70. doi: 10.1006/dbio.1998.9107. PMID: 9882504.

Kinali M, Main M, Eliahoo J, Messina S, Knight RK, Lehovsky J, Edge G, Mercuri E, Manzur AY, Muntoni F. Predictive factors for the development of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2007 May;11(3):160-6. doi: 10.1016/j.ejpn.2006.12.002. Epub 2007 Jan 25. PMID: 17257866.



Kinnett K, Rodger S, Vroom E, Furlong P, Aartsma-Rus A, Bushby K. Imperatives for DUCHENNE MD: a Simplified Guide to Comprehensive Care for Duchenne Muscular Dystrophy. PLoS Curr. 2015;7:ecurrents.md.87770501e86f36f1c71e0a5882ed9ba1. Published 2015 Aug 7. doi:10.1371/currents.md.87770501e86f36f1c71e0a5882ed9ba1

Kohl P, Camelliti P, Burton FL, Smith GL. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. J Electrocardiol. 2005;38(4 Suppl):45-50. doi:10.1016/j.jelectrocard.2005.06.096

Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. Skelet Muscle. 2017;7(1):9. Published 2017 May 19. doi:10.1186/s13395-017-0124-z

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. Circ Res. 2004;94(8):1023-1031. doi:10.1161/01.RES.0000126574.61061.25

LaPointe MC, Mendez M, Leung A, Tao Z, Yang XP. Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Apr;286(4):H1416-24. doi: 10.1152/ajpheart.00136.2003. Epub 2003 Dec 11. PMID: 14670812.

Lazzarin, Mariana Cruz. Caracterização da regeneração, inflamação e estresse oxidativo no músculo de modelo experimental para distrofia muscular de Duchenne com fenótipo exacerbado pelo exercício. 2021. 91 f. Tese (Doutorado Interdisciplinar em Ciências da Saúde) - Instituto de Saúde e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2021.

Li H, Mittal A, Makonchuk DY, Bhatnagar S, Kumar A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2009;18(14):2584-2598. doi:10.1093/hmg/ddp191

Lindsay A, Baumann CW, Rebbeck RT, Yuen SL, Southern WM, Hodges JS, Cornea RL, Thomas DD, Ervasti JM, Lowe DA. Mechanical factors tune the sensitivity of mdx muscle to eccentric strength loss and its protection by antioxidant and calcium modulators. Skelet Muscle.

2020 Feb 1;10(1):3. doi: 10.1186/s13395-020-0221-2. PMID: 32007101; PMCID: PMC6995146.

Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R, Graham D, Simon LS, van de Putte LB, Abramson SB. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med.* 2000 Apr 10;160(7):913-20. doi: 10.1001/archinte.160.7.913. PMID: 10761955.

Lodka D, Pahuja A, Geers-Knörr C, Scheibe RJ, Nowak M, Hamati J, Köhncke C, Purfürst B, Kanashova T, Schmidt S, Glass DJ, Morano I, Heuser A, Kraft T, Bassel-Duby R, Olson EN, Dittmar G, Sommer T, Fielitz J. Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016 May;7(2):165-80. doi: 10.1002/jcsm.12057. Epub 2015 Sep 7. PMID: 27493870; PMCID: PMC4863828.

Lourbakos A, Yau N, de Bruijn P, Hiller M, Kozaczynska K, Jean-Baptiste R, Reza M, Wolterbeek R, Koeks Z, Ayoglu B, de Klerk D, Champion G, Zaharieva I, Nadarajah VD, Nilsson P, Al-Khalili Szigyarto C, Muntoni F, Lochmüller H, Verschuuren JJ, Goemans N, Tulinius M, Niks EH, de Kimpe S, Aartsma-Rus A, 't Hoen PAC, Spitali P. Evaluation of serum MMP-9 as predictive biomarker for antisense therapy in Duchenne. *Sci Rep.* 2017 Dec 20;7(1):17888. doi: 10.1038/s41598-017-17982-y. PMID: 29263366; PMCID: PMC5738430.

Mâncio RD, Hermes TA, Macedo AB, Mizobuti DS, Rupcic IF, Minatel E. Dystrophic phenotype improvement in the diaphragm muscle of mdx mice by diacerhein. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182449. Published 2017 Aug 7. doi:10.1371/journal.pone.0182449

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003 Dec;75(4):469-86. doi: 10.1590/s0001-37652003000400006. Epub 2003 Nov 4. Erratum in: *An Acad Bras Cienc.* 2007 Mar;79(1):51. PMID: 14605681.

Manning J, O'Malley D. What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? *J Muscle Res Cell Motil.* 2015;36(2):155-167. doi:10.1007/s10974-015-9406-4

Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, Okamoto H, Ogawa S, Okada Y. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):599-609. doi: 10.1172/JCI22304. PMID: 15711638; PMCID: PMC548314.

Matsuoka S, Ii K, Akita H, Tomimatsu H, Kurahashi Y, Nakatsu T, Miyao M. Clinical features and cardiopulmonary function of patients with atrophic heart in Duchenne muscular dystrophy. *Jpn Heart J*. 1987 Sep;28(5):687-94. doi: 10.1536/ihj.28.687. PMID: 3430730.

McDonald CM, Sajeev G, Yao Z, McDonnell E, Elfring G, Souza M, Peltz SW, Darras BT, Shieh PB, Cox DA, Landry J, Signorovitch J; ACT DMD Study Group and the Tadalafil DMD Study Group. Deflazacort vs prednisone treatment for Duchenne muscular dystrophy: A meta-analysis of disease progression rates in recent multicenter clinical trials. *Muscle Nerve*. 2020 Jan;61(1):26-35. doi: 10.1002/mus.26736. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31599456; PMCID: PMC6973289.

McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*. 2015;8(3):195-213. doi:10.1242/dmm.018424

Messina S, Vita GL. Clinical management of Duchenne muscular dystrophy: the state of the art. *Neurol Sci*. 2018;39(11):1837-1845. doi:10.1007/s10072-018-3555-3

Meyers TA, Townsend D. Cardiac Pathophysiology and the Future of Cardiac Therapies in Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17):4098. Published 2019 Aug 22. doi:10.3390/ijms20174098

Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet*. 2011;20(9):1787-1799. doi:10.1093/hmg/ddr062

Morrioni J, Schirone L, Vecchio D, Nicoletti C, D'Ambrosio L, Valenti V, Sciarretta S, Lozanoska-Ochser B, Bouchè M. Accelerating the Mdx Heart Histo-Pathology through Physical Exercise. *Life (Basel)*. 2021 Jul 17;11(7):706. doi: 10.3390/life11070706. PMID: 34357078; PMCID: PMC8306456.

Morrison-Nozik A, Haldar SM. Probing the Pathogenesis of Duchenne Muscular Dystrophy Using Mouse Models. *Methods Mol Biol*. 2018; 1687:107-119. doi:10.1007/978-1-4939-7374-3\_8

Nadarajah VD, van Putten M, Chaouch A, Garrood P, Straub V, Lochmüller H, Ginjaar HB, Aartsma-Rus AM, van Ommen GJ, den Dunnen JT, 't Hoen PA. Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul Disord*. 2011 Aug;21(8):569-78. doi: 10.1016/j.nmd.2011.05.011. Epub 2011 Jul 2. PMID: 21724396.

Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett*. 2002;520(1-3):18-24. doi:10.1016/s0014-5793(02)02739-4

Nascimento Osorio A, Medina Cantillo J, Camacho Salas A, Madruga Garrido M, Vilchez Padilla JJ. Consensus on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurologia (Engl Ed)*. 2019 Sep;34(7):469-481. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2018.01.001. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29526319.

Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: the road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 70:83-91. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.10.018

Nouet J, Himelman E, Lahey KC, Zhao Q, Fraidenraich D. Connexin-43 reduction prevents muscle defects in a mouse model of manifesting Duchenne muscular dystrophy female carriers. *Sci Rep*. 2020;10(1):5683. Published 2020 Mar 30. doi:10.1038/s41598-020-62844-9

Ogura Y, Tajrishi MM, Sato S, Hindi SM, Kumar A. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol.* 2014; 2:11. Published 2014 Apr 1. doi:10.3389/fcell.2014.00011

Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation.* 1999 Jun 1;99(21):2750-6. doi: 10.1161/01.cir.99.21.2750. PMID: 10351968.

Pelosi L, Forcina L, Nicoletti C, Scicchitano BM, Musarò A. Increased Circulating Levels of Interleukin-6 Induce Perturbation in Redox-Regulated Signaling Cascades in Muscle of Dystrophic Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:1987218. doi:10.1155/2017/1987218

Pennati F, Arrigoni F, LoMauro A, Gandossini S, Russo A, D'Angelo MG, Aliverti A. Diaphragm Involvement in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): An MRI Study. *J Magn Reson Imaging.* 2020 Feb;51(2):461-471. doi: 10.1002/jmri.26864. Epub 2019 Jul 13. PMID: 31301202.

Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(11 Suppl):S162-S174. doi:10.1097/00002060-200211001-00017

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 2009;123(2):255-278. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.002

Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* 2016 Jun 24;119(1):91-112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577. PMID: 27340270; PMCID: PMC4922528.

Quintana HT, Bortolin JA, da Silva NT, Ribeiro FA, Liberti EA, Ribeiro DA, de Oliveira F. Temporal study following burn injury in young rats is associated with skeletal muscle atrophy,

inflammation and altered myogenic regulatory factors. *Inflamm Res.* 2015 Jan;64(1):53-62. doi: 10.1007/s00011-014-0783-8. Epub 2014 Nov 21. PMID: 25413930.

Reinig AM, Mirzaei S, Berlau DJ. Advances in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. *Pharmacotherapy.* 2017 Apr;37(4):492-499. doi: 10.1002/phar.1909. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28152217.

Rodriguez MC, Tarnopolsky MA. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(9):1217-1220. doi:10.1016/s0891-5849(03)00141-2

Ryder S, Leadley RM, Armstrong N, Westwood M, de Kock S, Butt T, Jain M, Kleijnen J. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017 Apr 26;12(1):79. doi: 10.1186/s13023-017-0631-3. PMID: 28446219; PMCID: PMC5405509.

Santos MA, Costa Fde A, Travessa AF, Bombig MT, Fonseca FH, Luna Filho B, Mussi A, Souza Dd, Oliveira Ad, Povia R. Distrofia muscular de Duchenne: análise eletrocardiográfica de 131 pacientes [Duchenne muscular dystrophy: electrocardiographic analysis of 131 patients]. *Arq Bras Cardiol.* 2010 May;94(5):620-4. Portuguese. doi: 10.1590/s0066-782x2010005000024. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20379617.

Santos, N. M., de Moraes Rezende, M., Terni, A., Hayashi, M. C. B., Fávero, F. M., Quadros, A. A. J., ... & Oliveira, A. S. B. (2006). Perfil clínico e funcional dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne assistidos na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). *Revista neurociências*, 14(1), 15-22.

Sarlo, L. G., da Silva, A. F. A., & Medina-Acosta, E. (2009). Diagnóstico molecular da distrofia muscular Duchenne. *Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos*, 4(1), 02-09.

Schill KE, Altenberger AR, Lowe J, Periasamy M, Villamena FA, Rafael-Fortney JA, Devor ST. Muscle damage, metabolism, and oxidative stress in mdx mice: Impact of aerobic running. *Muscle Nerve.* 2016 Jun;54(1):110-7. doi: 10.1002/mus.25015. PMID: 26659868; PMCID: PMC4905810.

Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, Escher F, Hershberger RE, Lipshultz SE, Liu PP, Matsumori A, Mazzanti A, McMurray J, Priori SG. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 May 9;5(1):32. doi: 10.1038/s41572-019-0084-1. PMID: 31073128; PMCID: PMC7096917.

Shin J, Tajrishi MM, Ogura Y, Kumar A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(10):2266-2279. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.001

Shih JA, Folch A, Wong BL. Duchenne Muscular Dystrophy: the Heart of the Matter. *Curr Heart Fail Rep*. 2020 Jun;17(3):57-66. doi: 10.1007/s11897-020-00456-0. PMID: 32270339.

Schipke J, Brandenberger C, Rajces A, Manninger M, Alogna A, Post H, Mühlfeld C. Assessment of cardiac fibrosis: a morphometric method comparison for collagen quantification. *J Appl Physiol (1985)*. 2017 Apr 1;122(4):1019-1030. doi: 10.1152/jappphysiol.00987.2016. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28126909.

Shirokova N, Niggli E. Cardiac phenotype of Duchenne Muscular Dystrophy: insights from cellular studies. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 58:217-224. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.12.009

Sinicrope FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1995 Oct;1(10):1103-10. PMID: 9815900.

Sin TK, Pei XM, Teng BT, Tam EW, Yung BY, Siu PM. Oxidative stress and DNA damage signalling in skeletal muscle in pressure-induced deep tissue injury. *Pflugers Arch*. 2013 Feb;465(2):295-317. doi: 10.1007/s00424-012-1205-9. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23322113.

Spinale FG, Villarreal F. Targeting matrix metalloproteinases in heart disease: lessons from endogenous inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2014;90(1):7-15. doi:10.1016/j.bcp.2014.04.011

Spurney CF. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. *Muscle Nerve*. 2011;44(1):8-19. doi:10.1002/mus.22097

Stuckey DJ, Carr CA, Camelliti P, Tyler DJ, Davies KE, Clarke K. In vivo MRI characterization of progressive cardiac dysfunction in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *PLoS One*. 2012;7(1):e28569. doi:10.1371/journal.pone.0028569

Sun R, Zhang S, Hu W, Lu X, Lou N, Yang Z, Chen S, Zhang X, Yang H. Valproic acid attenuates skeletal muscle wasting by inhibiting C/EBP $\beta$ -regulated atrogin1 expression in cancer cachexia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016 Jul 1;311(1):C101-15. doi: 10.1152/ajpcell.00344.2015. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27122162.

Taniguti AP, Pertille A, Matsumura CY, Santo Neto H, Marques MJ. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- $\beta$ 1 blocker. *Muscle Nerve*. 2011;43(1):82-87. doi:10.1002/mus.21869

Tsuda T. Clinical Manifestations and Overall Management Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol*. 2018; 1687:19-28. doi:10.1007/978-1-4939-7374-3\_2

Turk R, Sterrenburg E, de Meijer EJ, van Ommen GJ, den Dunnen JT, 't Hoen PA. Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics*. 2005; 6:98. Published 2005 Jul 13. doi:10.1186/1471-2164-6-98

Uaesoontrachoon K, Quinn JL, Tatem KS, Van Der Meulen JH, Yu Q, Phadke A, Miller BK, Gordish-Dressman H, Ongini E, Miglietta D, Nagaraju K. Long-term treatment with naproxenod significantly improves skeletal and cardiac disease phenotype in the mdx mouse model of dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2014 Jun 15;23(12):3239-49. doi: 10.1093/hmg/ddu033. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24463621; PMCID: PMC4030778.

Van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol*. 2015;44-46:224-231. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.005

Van Erp C, Loch D, Laws N, Trebbin A, Hoey AJ. Timeline of cardiac dystrophy in 3-18-month-old MDX mice. *Muscle Nerve*. 2010;42(4):504-513. doi:10.1002/mus.21716



van Putten M, Putker K, Overzier M, Adamzek WA, Pasteuning-Vuhman S, Plomp JJ, Aartsma-Rus A. Natural disease history of the D2-*mdx* mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J*. 2019 Jul;33(7):8110-8124. doi: 10.1096/fj.201802488R. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30933664; PMCID: PMC6593893.

Van Morrisoing TL, Betts CA, Wood MJ. Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *Molecules*. 2015;20(5):8823-8855. Published 2015 May 15. doi:10.3390/molecules20058823

van Westering TL, Betts CA, Wood MJ. Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *Molecules*. 2015 May 15;20(5):8823-55. doi: 10.3390/molecules20058823. PMID: 25988613; PMCID: PMC6272314.

Vogel B, Siebert H, Hofmann U, Frantz S. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*. 2015;2:124-134. Published 2015 Feb 21. doi:10.1016/j.mex.2015.02.007

Venugopal V, Pavlakis S. Duchenne Muscular Dystrophy. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 14, 2021.

Xia P, Liu Y, Cheng Z. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:9583268. doi:10.1155/2016/9583268

Xu Y, Delfin DA, Rafael-Fortney JA, Janssen PM. Lengthening-contractions in isolated myocardium impact force development and worsen cardiac contractile function in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* (1985). 2011;110(2):512-519. doi:10.1152/jappphysiol.00253.2010

Yasuda S, Townsend D, Michele DE, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature*. 2005;436(7053):1025-1029.

Wagner S, Knipp S, Weber C, Hein S, Schinkel S, Walther A, Bekeredjian R, Müller OJ, Friedrich O. The heart in Duchenne muscular dystrophy: early detection of contractile performance alteration. *J Cell Mol Med*. 2012 Dec;16(12):3028-36. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01630.x. PMID: 22970922; PMCID: PMC4393731.

Wells DJ. Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech*. 2018;11(6):dmm035774. Published 2018 Jun 13. doi:10.1242/dmm.035774

Werneck LC, Lorenzoni PJ, Ducci RD, Fustes OH, Kay CSK, Scola RH. Duchenne muscular dystrophy: an historical treatment review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019 Sep 5;77(8):579-589. doi: 10.1590/0004-282X20190088. PMID: 31508685.

Williams IA, Allen DG. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(2):H846-H855. doi:10.1152/ajpheart.00688.2006

Willis MS, Ike C, Li L, Wang DZ, Glass DJ, Patterson C. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res*. 2007;100(4):456-459. doi:10.1161/01.RES.0000259559.48597.32

## ANEXO 1



# Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do remodelamento cardíaco de camundongos MDX submetidos a treinamento aeróbico.", protocolada sob o CEUA nº 7387190818 (ID 007747), sob a responsabilidade de **Luciana Alécio Cabanelas e equipe; Flávia de Oliveira** - 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 Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 18/10/2018.

We certify that the proposal "Cardiac remodeling characterization of MDX mice submitted to aerobic training.", utilizing 0 isogenics mice (), protocol number CEUA 7387190818 (ID 007747), under the responsibility of **Luciana Alécio Cabanelas and team; Flávia de Oliveira** - 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 Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2018 a 10/2022** Área: **Biociências**

Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade: 16 a 16 semanas N: 0
Linhagem:	C57BL/10-DMDmdx		Peso: 25 a 30 g
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade: 16 a 16 semanas N: 0
Linhagem:	C57BL/10		Peso: 25 a 30 g

Local do experimento: UNIFESP Baixada Santista; Laboratório de Estudos Morfofuncionais (sala 328) da Unidade Silva Jardim.

São Paulo, 23 de agosto de 2020

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo