

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**Luana Lima Rocha da Silva
Tábata Gabriely Pereira Barbosa de Souza**

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO E RESISTÊNCIA NOS MÚSCULOS
DIAFRAGMA E BÍCEPS BRAQUIAL DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS
MACHOS E FÊMEAS**

ALFENAS/MG

2025

Luana Lima Rocha da Silva
Tábata Gabriely Pereira Barbosa de Souza

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO E RESISTÊNCIA NOS MÚSCULOS
DIAFRAGMA E BÍCEPS BRAQUIAL DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS
MACHOS E FÊMEAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Túlio de Almeida Hermes

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Luana Lima Rocha da.

Efeitos do treinamento de natação e resistência nos músculos diafragma e bíceps braquial de camundongos distróficos machos e fêmeas / Luana Lima Rocha da Silva, Tábata Gabriely Pereira Barbosa de Souza . - Alfenas, MG, 2025.

45 f. : il. -

Orientador(a): Túlio de Almeida Hermes .

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Distrofia Muscular de Duchenne. 2. Camundongos mdx. 3. Exercício. 4. Treinamento de resistência. 5. Natação. I. Souza , Tábata Gabriely Pereira Barbosa de . II. Hermes , Túlio de Almeida, orient. III. Título.


**Luana Lima Rocha da Silva Tábata
Gabriely Pereira Barbosa de Souza**

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO E RESISTÊNCIA NOS
MÚSCULOS DIAFRAGMA E BÍCEPS BRAQUIAL DE CAMUNDONGOS
DISTRÓFICOS MACHOS E FÊMEAS**


O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 9 de Dezembro de 2025


Prof. Dr. Túlio de Almeida Hermes
Assinatura: Universidade Federal de Alfenas

Documento assinado digitalmente
 **TULIO DE ALMEIDA HERMES**
Data: 16/12/2025 18:59:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Flávia de Ré Guerra
Assinatura: Universidade Federal de Alfenas

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIA DA RE GUERRA**
Data: 16/12/2025 10:55:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Luciano Falconi Sobrinho
Assinatura: Universidade Federal de Alfenas

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ LUCIANO FALCONI SOBRINHO**
Data: 16/12/2025 15:38:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Dedicamos este trabalho a todas as pessoas que nos acompanharam durante esse percurso e que nos incentivaram na realização dessa conquista, dando apoio, compreensão, paciência e amor. Um agradecimento especial aos nossos familiares, pelo suporte que foi a base de tudo. Aos nossos amigos, pela cumplicidade e pelos momentos de descontração. Aos nossos colegas e professores, pelo compartilhamento de conhecimento e pela jornada compartilhada. Agradecemos ao nosso orientador Túlio Hermes não só pela oportunidade, mas por acreditar em nosso potencial desde o primeiro dia. Por fim, reconhecemos que este estudo não seria possível sem as instituições de fomento como a CAPES, CNPq e FAPEMIG concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, à qual expressamos nossa gratidão. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A cada um de vocês, o nosso mais sincero obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença miodegenerativa grave. No modelo murino mdx, os efeitos do exercício físico são controversos e a influência do sexo biológico é frequentemente negligenciada. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da natação (N) de intensidade moderada/baixa e do treinamento de resistência (TR) nos músculos bíceps braquial (BB) e diafragma (DIA) de camundongos mdx machos (M) e fêmeas (F). Os animais foram divididos em seis grupos: machos sedentários (mdxCtM), fêmeas sedentárias (mdxCtF), machos nadadores (mdxSwM), fêmeas nadadoras (mdxSwF), machos resistência (mdxRtM) e fêmeas resistência (mdxRtF). O protocolo de natação teve duração de 4 semanas (30 min/dia, 4 dias/semana) e o treinamento de resistência consistiu em subida de escada (3 séries de 10 repetições). Avaliamos o desempenho funcional (suspensão de quatro patas), a creatina quinase (CK) sérica e a histopatologia (área inflamatória e núcleos centrais). Nossos resultados demonstram que o sexo biológico foi um determinante mais significativo do fenótipo distrófico do que a modalidade de exercício. Fêmeas em todos os grupos apresentaram desempenho funcional superior em comparação aos machos. As duas modalidades de exercício causaram aumento no número de fibras com núcleo central no DIA em relação aos seus controles. No BB, apenas o grupo mdxRtM apresentou uma porcentagem reduzida de fibras com núcleos centrais em comparação ao grupo mdxCtM. O protocolo de natação no mdxSwM apresentou menor concentração sérica de CK, entretanto, não melhorou o desempenho funcional destes animais. Em conclusão, os protocolos de treinamento aplicados demonstraram efeitos distintos nas diferentes variáveis (sexo biológico, modalidade de exercício e grupo muscular), demonstrando a necessidade da adaptabilidade de protocolos para seus devidos usos.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne; camundongos mdx; exercício; treinamento de resistência; natação; dimorfismo sexual.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a severe myodegenerative disease. In the mdx mouse model, the effects of physical exercise are controversial, and the influence of biological sex is often overlooked. This study aimed to evaluate the effects of moderate/low-intensity swimming (Sw) and resistance training (Rt) on the Biceps Brachii (BB) and Diaphragm (DIA) muscles of male (M) and female (F) mdx mice. Animals were divided into six groups: sedentary male (mdxCtM) , sedentary female (mdxCtF) , swimming male (mdxSwM) , swimming female (mdxSwF) , resistance male (mdxRtM) , and resistance female (mdxRtF). The swimming protocol lasted 4 weeks (30 min/day, 4 days/week) , and resistance training involved ladder climbing (3 sets of 10 repetitions). We assessed functional performance (four-paw suspension), serum Creatine Kinase (CK) , and histopathology (inflammatory area and central nuclei). Our results demonstrate that biological sex was a more significant determinant of the dystrophic phenotype than the exercise modality. Females across all groups exhibited superior functional performance and a less severe histopathological profile compared to males, indicating a protected phenotype. The mdxRtM (resistance male) group showed the worst functional performance , significantly elevated CK levels , and the highest levels of inflammation, particularly in the Diaphragm. This group also presented a reduced percentage of central nuclei in the BB, suggesting impaired regeneration. The swimming protocol (mdxSwM) failed to improve functional performance. In conclusion, the resistance training protocol was detrimental to mdx males, exacerbating the pathology, especially in the diaphragm. The swimming protocol, as applied, did not provide clear therapeutic benefits. These findings underscore that sex is a critical biological variable that must be considered in preclinical DMD studies.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy; mdx mice; exercise; resistance training; swimming; sexual dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Protocolo de natação..	24
Figura 02 - Protocolo de resistência.	25
Figura 03 - Carga adaptada do protocolo de resistência.	26
Figura 04 - Aplicação da carga no animal.	26
Figura 05 - Teste de suspensão das quatro patas.	28
Figura 06 - Histopatologia dos músculos	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Avaliação do tempo de suspensão pelas quatro patas	30
Gráfico 02 - Níveis de Creatina Quinase (CK)	31
Gráfico 03 - Área de inflamação do músculo Bíceps Braquial	32
Gráfico 04 - Área de inflamação no músculo Diafragma	33
Gráfico 05 - Porcentagem de núcleos centrais no músculo Bíceps Braquial	34
Gráfico 06 - Porcentagem de núcleos centrais no músculo Diafragma	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CDG	Complexo Distrofina-Glicoproteínas
CK	Creatina Quinase
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
IgG	Imunoglobulina G
IFN γ	Interferon gamma
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HSPs	Proteínas de Choque Térmico
LDH	Lactato Desidrogenase
LOOH	Peróxido Lipídico (LOOH)
MAPKs	Quinases Ativadas por Mitógeno
NF- κ B	Via do Fator Nuclear kappa B
O ₂ \cdot^-	Radical superóxido
OH \cdot	Radical Hidroxila
PMCA	Bomba ATPase de Ca ²⁺ da Membrana Plasmática
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TLRs	Ligantes de Receptores Toll-Like
RNA	Ácido Ribonucléico
SOD	Superóxido Dismutase
ssRNA	Ácido Ribonucléico de fita simples
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Distrofia muscular de Duchenne	13
1.2. Fisiopatologia da DMD	14
1.2.1. Mionecrose	15
1.2.2. Inflamação	16
1.3. Modelo murino da DMD: a linhagem mdx	18
1.4. Aplicação de exercício em camundongos mdx	19
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Materiais e protocolos experimentais	21
4.1.1. Protocolo de natação	22
4.1.2. Protocolo de treinamento de resistência	23
4.1.3. Teste e suspensão das 4 patas	26
4.2. Coleta e preservação das amostras	27
4.2.1. Dosagem de Creatina-Quinase (CK) em amostras de sangue	27
4.2.2. Análise histopatológica (n=7)	28
4.3. Análise estatística	28
5. RESULTADOS	28
5.1. Análise do desempenho funcional	28
5.2. Dano muscular: Níveis séricos de Creatina Quinase (CK)	29
5.3. Análise histopatológica	30
5.3.1. Inflamação	30
6. DISCUSSÃO	34
6.1. O sexo biológico como fator determinante nas diferenças patológicas	34
6.2. As diferenças obtidas por modalidades de intensidades distintas	35
6.3. A variação dos efeitos locais (BB) e sistêmicos (DIA)	36
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Distrofia muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio genético grave, ligada ao cromossomo X, que causa degeneração progressiva da musculatura esquelética e afeta principalmente indivíduos do sexo masculino, com prevalência de 1 a cada 3.500-6000 meninos nascidos em todo o mundo (Duan *et al.*, 2021). Em mulheres, existem poucos dados populacionais em relação à prevalência da DMD, uma vez que na grande maioria se apresenta de forma assintomática. Porém, a mulher portadora da mutação pode ser afetada pela DMD como resultado de mudanças no padrão da inativação ou translocação do cromossomo X (Hoffman *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1981).

Os primeiros sintomas clínicos da DMD aparecem entre 3 e 4 anos com dificuldades para correr, saltar, levantar-se do chão (sinal de Gowers), dificuldade para pular ou subir escadas, quedas e tropeções frequentes, marcha anormal (bamboleante ou andar com os dedos dos pés) e juntamente com hipertrofia da panturrilha (pseudo hipertrofia muscular). A progressão da doença pode ser rápida, tornando-se dependente de cadeiras de rodas entre 7-13 anos (Mercuri *et al.*, 2019). O estágio terminal da doença começa quando os pacientes necessitam de ventilação assistida e geralmente morrem na terceira ou quarta década por insuficiência respiratória ou cardíaca (Moxley *et al.*, 2010).

As anormalidades como as causas da DMD são detectadas no braço curto do cromossomo X (locus Xp21), responsável pela expressão de uma proteína composta por 3685 aminoácidos que integra o sarcolema da fibra muscular denominada distrofina (Francke *et al.*, 1985; Verellen-Dumoulin *et al.*, 1984). A distrofina (427 kDa) apresenta seu domínio carboxila terminal ligado à proteína transmembrana β -dístroglicana, e seu domínio amina terminal ligado à F-actina citoplasmática (Ohlendieck & Campbell, 1991). Com isso, ela se torna um importante componente do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), conectando o interior do citoesqueleto com a matriz extracelular, conferindo organização e estabilidade às células musculares para resistirem às tensões de cisalhamento mecânico que ocorrem durante os ciclos de contração e relaxamento muscular (Bogdanovich *et al.*, 2004). A ausência da distrofina, provoca um desequilíbrio no CDG por interromper a ligação do citoesqueleto com a matriz extracelular, gerando uma instabilidade no sarcolema durante a contração muscular. Dessa forma, ocorre alteração da homeostase intracelular de íons cálcio, hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (Biggar *et al.*, 2002; Bogdanovich *et al.*, 2004).

O diagnóstico da DMD é considerado como resultado de atraso no desenvolvimento ou aumento das concentrações de enzimas séricas, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) ou creatina quinase (CK) (Ciafaloni *et al.*, 2009). Ocasionalmente, um aumento na concentração de ALT, AST e LDH, leva a um foco inadequado na disfunção hepática, atrasando o diagnóstico de DMD (Birnkrant *et al.*, 2018). Apesar dos grandes avanços terapêuticos nos últimos 30 anos, ainda não há cura para a DMD (Duan *et al.*, 2021).

1.2. Fisiopatologia da DMD

O CDG é responsável pela estabilização do citoesqueleto das fibras musculares com a matriz extracelular e seus componentes podem ser divididos em três grupos: o extracelular (α -Distroglicano), a transmembrana (β -Distroglicano, Sarcoglicano e Sarcospan) e o citoplasmático (Distrofina, Distrobrevina, Sintrofina e Óxido nítrico sintase neuronal) (Lapidos *et al.*, 2004). No músculo saudável, a integridade do sarcolema é mantida através das ligações entre o citoesqueleto, o sarcolema e a matriz extracelular através do CDG e do complexo de integrina. Na DMD, a desmontagem do CDG enfraquece o sarcolema, que se torna altamente suscetível a danos por contração (Duan *et al.*, 2021).

A deficiência da distrofina resulta na perda da interação entre a actina e a matriz extracelular, que possuem funções mecânicas importantes e podem levar a amplas consequências nas funções das células musculares (Deconinck & Dan, 2007; Mokri & Engel, 1975), como à necrose intrínseca das miofibras (ou mionecrose), que por sua vez estimula a regeneração da fibra (Aartsma-Rus & van Putten, 2014). A ruptura do sarcolema também pode ser detectada pelo vazamento passivo de proteínas ou corantes circulantes, como albumina, imunoglobulina G (IgG), azul de Evans e vazamento de enzimas musculares, como CK do músculo para o sangue (Aartsma-Rus & van Putten, 2014; Tidball *et al.*, 2018).

A progressão e o agravamento da DMD estão relacionados à fragilidade do sarcolema, assim como a eventos fisiopatológicos como o influxo anormal de cálcio (Ca^{2+}), a mionecrose, a inflamação crônica, estresse oxidativo e o comprometimento da regeneração (Espinosa *et al.*, 2016).

A instabilidade mecânica faz com que os músculos se tornem susceptíveis à lesão durante os ciclos de contração e relaxamento. Em virtude desta fragilidade, ocorrem áreas de descontinuidade do sarcolema permitindo a passagem de substâncias do meio extracelular para o meio intracelular, como o íon Ca^{2+} , e de substâncias do meio intracelular para o meio

extracelular, como a enzima CK (Aartsma-Rus & van Putten, 2014). Com o aumento da permeabilidade do sarcolema ocorre um aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular e a alteração da sua homeostase dentro do músculo (Mareedu *et al.*, 2021). Esta sobrecarga é também parcialmente causada pela entrada anormal de Ca^{2+} no sarcolema através dos canais de cálcio (canais ativados por estiramento, operados por armazenamento, controlados por voltagem e operados por receptores), bomba ATPase de Ca^{2+} da membrana plasmática (PMCA), trocador de sódio-cálcio e microrupturas no sarcolema (Mareedu *et al.*, 2021; Mercuri *et al.*, 2019).

O comportamento anormal do Ca^{2+} é observado na DMD em cultura de células distróficas de humanos e em modelo animal, na qual observa-se o excesso de Ca^{2+} nos miotúbulos, nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático, sendo os dois últimos os locais com maiores concentrações de Ca^{2+} no sarcoplasma (Whitehead *et al.*, 2006). A concentração elevada de Ca^{2+} no músculo distrófico, ocorre disfunção mitocondrial, o que resulta em defeitos metabólicos e a sobrecarga de cálcio e contribui diretamente para a morte muscular, desencadeando vias degradativas, como calpaína protease e fosfolipase A2 dependentes de cálcio e necrose dependente de mitocôndria (Mareedu *et al.*, 2021), promovendo assim a perda de massa muscular através do aumento da proteólise (Tidball & Spencer, 2000).

1.2.1. Mionecrose

Após a lesão de fibra muscular íntegra, pode ocorrer a degeneração localmente nas proximidades do dano, sendo denominado como necrose segmentar (Carpenter & Karpati, 1989; Ciciliot & Schiaffino, 2010). A necrose segmentar normalmente é resolvida através da ação de células satélites (células-tronco), residentes nos músculos que se fundem para regenerar a porção danificada da miofibra (Ciciliot & Schiaffino, 2010). As fibras musculares distróficas eventualmente perdem grande parte de sua capacidade regenerativa, possivelmente devido ao esgotamento do número de células satélites (Sacco *et al.*, 2010). Com os sucessivos ciclos de degeneração/regeneração na DMD, ocorrem geralmente as alterações na estrutura muscular com variação no tamanho das miofibras devido à fusão incompleta de miotubos em regeneração, levando à bifurcação das fibras, esgotamento progressivo da capacidade regenerativa de células satélites e substituição de tecido muscular por tecido fibroso e tecido adiposo, levando à fraqueza muscular (Ciciliot & Schiaffino, 2010).

Nos músculos saudáveis, as fibras têm tamanho aproximadamente semelhante, núcleos localizados periféricamente e quase nenhum tecido conjuntivo no perimísio e no endomísio, já os músculos de pacientes com DMD e modelos animais da doença, apresentam diâmetros

altamente variáveis de suas miofibras com presença de nucleação central nas células musculares (Dubowitz *et al.*, 2013). Dependendo da idade e do grau de atividade física do indivíduo, algumas características são evidentes nos músculos como o aglomerados de fibras necróticas com células inflamatórias basofílicas em seu interior, sarcoplasma fragmentado, fibras hipercontraídas densamente coradas, infiltração celular leve ou grave, grupos de pequenas fibras musculares arredondadas em estágio inicial de regeneração ou normalmente espalhadas por fibras saudáveis de tamanho médio e hipertróficas (Morgan *et al.*, 2018).

As características primárias da mionecrose são identificados em tecido muscular e amostras de biofluidos como sangue e urina (Grounds *et al.*, 2020). No músculo, o método de captação de IgG é baseado em características celulares que caracterizam a morte necrótica, incluindo a perda da integridade da membrana plasmática com a liberação de padrões moleculares associados a danos e a captação de proteínas plasmáticas (Bencze *et al.*, 2019). Biomarcador clássico no sangue (plasma), amplamente utilizado para DMD é a enzima CK, que está elevada em pacientes e em modelos de DMD em roedores e cães, no entanto pode ser altamente variável (Dowling *et al.*, 2019).

1.2.2. Inflamação

A inflamação, em condições normais, é necessária para a recuperação do tecido após a lesão. No entanto, na DMD, onde há lesão crônica devido à membrana muscular instável, a inflamação torna-se crônica e super ativada em todo o músculo (Chen *et al.*, 2005).

A instabilidade da membrana causada pela deficiência de distrofina leva à liberação contínua de conteúdo citoplasmático, em particular, padrões moleculares associados a danos, Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) que são ligantes de receptores toll-like (TLRs), purinoceptores (P2RX7) e outros receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em células musculares e imunológicas (Henriques-Pons *et al.*, 2014). Após a ativação dos ligantes, as cascatas de sinalização do PRR iniciam a resposta imune e isto leva à infiltração de uma ampla gama de células imunes, incluindo linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, que posteriormente medeiam a degradação sequencial e a regeneração fibrótica do músculo (Evans *et al.*, 2009).

A liberação contínua de DAMPs, incluindo proteína 1 de caixa de grupo de alta mobilidade (HMGB1), adenosina trifosfato (ATP), ácido ribonucléico (RNA) de fita simples ssRNA, ácido hialurônico e proteínas de choque térmico (HSPs), em resposta aos ciclos contínuos de dano e regeneração em distróficos músculo, prolonga a ativação e recrutamento

de células imunológicas, induzindo um estado inflamatório crônico e isso leva à formação de tecido adiposo e conjuntivo, limitando permanentemente a contração muscular (Kharraz *et al.*, 2014).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na progressão da doença na DMD (Rosenberg *et al.*, 2015). Existem dois tipos de classes de macrófagos no músculo, M1 (pró-inflamatória) e M2 (anti-inflamatória). Os macrófagos M1 são estimulados por citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e Interferon gamma (IFN γ) e contribuem para a lise muscular aumentando a produção de óxido nítrico (Evans *et al.*, 2009). Macrófagos M2, que são estimulados por citocinas produzidas por células Th2, como interleucina (IL) IL-4 e IL-10, promovem o reparo tecidual inibindo a inflamação e a citotoxicidade do M1 e induzindo a proliferação de células satélites (Evans *et al.*, 2009). Há um número maior de macrófagos M1 na DMD inicial, provavelmente contribuindo para o dano muscular e para o ambiente pró-inflamatório e o macrófagos M2 são abundantes na fase de regeneração da DMD (Duan *et al.*, 2021).

Na DMD existem muitas vias de sinalização desreguladas na inflamação e os principais impulsionadores da inflamação crônica na DMD são a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), juntamente com a quinase c-Jun NH2-terminal (JNK) e os fatores reguladores do interferon (IRFs) (Tulangekar & Sztal, 2021). Estes são ativados por citocinas como o TNF- α e a IL-6, que subsequentemente iniciam a via dependente da resposta primária de diferenciação mielóide a jusante 88 (MyD88). Isso, por sua vez, ativa as quinases I κ B (IKKs) e as quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e, em última análise, regula positivamente as vias de sinalização do NF- κ B (Herbelet *et al.*, 2020). O NF- κ B é uma família de fatores de transcrição nuclear que atuam na inflamação, na imunidade, proliferação celular e diferenciação do tecido (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). O aumento da atividade do NF- κ B, através do estresse mecânico, é um fator chave para a degeneração muscular e supressão da regeneração muscular na DMD, que ocorrem no início do processo da doença e precedem a perda da função muscular, além disso, podem apresentar inflamação desproporcional e influenciar no bloqueio da diferenciação dos mioblastos em miotúbulos (Forbes *et al.*, 2014; Hu & Blemker, 2015).

1.3. Modelo murino da DMD: a linhagem mdx

O estudo e compreensão destes e demais eventos biológicos ocorridos na DMD tiveram grande avanço com o aparecimento de linhagem de camundongos mdx (X chromosome-linked muscular dystrophy) (Bulfield *et al.*, 1984). Estudos genéticos demonstraram que nos

camundongos mdx, o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD, apresentando também ausência de distrofina, tornando-o um valioso modelo para estudos da DMD. O camundongo mdx é o modelo animal preferido da DMD, devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (Tanabe *et al.*, 1986). Embora o camundongo mdx apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos, além do fato de os músculos do mdx regenerarem sucessivamente após necrose, pelo menos durante a fase adulta do animal (Cullen & Jaros, 1988). Estudos mostraram que no período entre 21 e 28 dias de vida pós-natal, observa-se extensa área de necrose no músculo tibial anterior destes animais (Shavlakadze *et al.*, 2004). A intensa necrose miofibrilar observada neste período providencia um excelente modelo para o estudo de intervenções terapêuticas designadas para prevenir ou reduzir a necrose, uma vez que a redução da miopatia é facilmente identificada (Radley & Grounds, 2006). Entre 35 e 90 dias após o nascimento, a necrose atinge seu ápice, comprometendo muitas fibras. Neste período, encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (Tanabe *et al.*, 1986).

Estudos com camundongos mdx machos e fêmeas sugerem diferenças entre os sexos, principalmente em relação ao metabolismo energético, composição do tipo de fibra e velocidade contrátil (Grounds *et al.*, 2008). Geralmente, os músculos de machos tendem a ser mais rápidos e com maior potência que o das fêmeas, enquanto os músculos das fêmeas são mais resistentes à fadiga, recuperam-se mais rapidamente das contrações repetidas e apresentam menos danos mecânicos após o exercício (Glenmark *et al.*, 2004). Estas diferenças são em grande parte atribuídas aos níveis de estrógeno presentes nas fêmeas (Grounds *et al.*, 2008). Estudos suportam esta hipótese, demonstrando que hormônios femininos, como o estrógeno, podem promover regeneração muscular em lesões musculares esqueléticas tanto em camundongos normais como em mdx (Tiidus, 2001; Tiidus *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado atenuação de marcadores estruturais e bioquímicos no tecido muscular distrófico de camundongos mdx fêmeas em relação aos machos em resposta ao exercício físico intenso (Hermes *et al.*, 2018).

1.4. Aplicação de exercício em camundongos mdx

Após o período agudo de necrose, a degeneração muscular diminui e permanece

estabilizada entre 6 e 12 semanas de idade do camundongo mdx (Grounds *et al.*, 2008; McGeachie *et al.*, 1993). Neste período a aplicação de exercício voluntário em roda de corrida ou a corrida em esteira em alta intensidade promove o aumento da degeneração muscular dos membros anteriores e posteriores desse animal (Brussee *et al.*, 1997; De Luca *et al.*, 2003; Hodgetts *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2005). Estudos utilizando camundongos distróficos verificaram que músculos submetidos ao exercício excêntrico e/ou concêntrico de alta intensidade em esteira apresentam aumento dos níveis plasmáticos da enzima CK (Vilquin *et al.*, 1998); aumento do número de fibras musculares necróticas (Brussee *et al.*, 1997), diminuição da expressão do fator de crescimento homólogo à insulina tipo-1 (insulin-like growth factor-1, IGF1) e da MyoD (Okano *et al.*, 2005) e significativa fraqueza muscular (De Luca *et al.*, 2003), quando comparados aos músculos distróficos não exercitados e músculos normais exercitados. Desta forma, o exercício de alta intensidade torna o camundongo mdx adulto um modelo experimental mais próximo à DMD humana.

Em contraste, o treinamento de baixa intensidade é benéfico. A expressão de genes de diferenciação mitocondrial (Baltgalvis *et al.*, 2012; Hulmi *et al.*, 2013) e muscular aumentou após corrida voluntária em roda em animais de 4 a 8 semanas de idade. A natação e a corrida de baixa intensidade em camundongos mdx jovens também estimularam uma mudança de músculo glicolítico rápido (tipo IIB) para músculo oxidativo (tipo IIA) e lento (tipo I) (Landisch *et al.*, 2008; Matsakas *et al.*, 2013). A natação, com duração variável de até 10 semanas, parece produzir adaptações à demanda funcional e efeitos benéficos nos músculos dos membros dos camundongos mdx, independentemente da intensidade do exercício (Frinchi *et al.*, 2021).

Como visto acima, o treinamento físico de camundongos mdx pode ser realizado com diferentes propósitos, seja para avaliar as capacidades físicas dos camundongos, bem como, investigar os efeitos do treinamento nos músculos distróficos, ou, piorar o fenótipo antes de avaliar os efeitos de um medicamento (Hyzewicz, Ruegg, *et al.*, 2015). Assim, a literatura apresenta muitas evidências sobre a aplicação do exercício físico com protocolos de corrida e/ou natação, porém, carece de dados sobre a aplicação de protocolos de treinamento resistido (força). Presumivelmente, o músculo esquelético deficiente em distrofina induzido pelo treinamento de exercícios de resistência possui alta suscetibilidade ao dano, muito provavelmente em decorrência das contrações excêntricas máximas, como apontado em estudos prévios (Lindsay *et al.*, 2019; Moens *et al.*, 1993). Dessa maneira, é interessante avaliar quais as modificações do músculo esquelético distrófico do modelo mdx frente a aplicação de exercício resistido. Além disso, considerando que já foi demonstrada que camundongos

distróficos machos e fêmeas apresentam diferenças adaptativas quando submetidos ao exercício de corrida de alta intensidade, faz-se necessário determinar quais os efeitos de outras modalidades de exercício no modelo de DMD de ambos os sexos, seja protocolos de média/baixa intensidade, como a natação, ou o treinamento de resistência.

2. JUSTIFICATIVA

Como já se sabe, o exercício de alta intensidade torna o camundongo mdx um modelo experimental mais semelhante ao paciente com a DMD. Apesar disso, não existem dados que demonstram que a aplicação de protocolos de treinamento de força produz efeito similar. Em contrapartida, cada vez mais estudos apontam que exercícios de média/baixa intensidade, como a natação, podem ser benéficos para os músculos distróficos destes animais. Considerando que camundongos mdx machos e fêmeas manifestam respostas diferentes frente a aplicação de corrida de alta intensidade, é interessante verificar de que forma ambos os sexos comparativamente se comportam em relação à execução de outras modalidades de exercício físico. Estudos já realizados mostraram que há diferenças basais significativas entre os sexos, sendo que as fêmeas mdx apresentam maior capacidade de regeneração do que machos, possivelmente devido a influência do estrógeno. Desta forma, é fundamental avaliar as respostas de camundongos mdx machos e fêmeas frente ao exercício de média/baixa intensidade e de resistência, uma vez que muitos estudos utilizam este modelo experimental como plataforma na busca por terapias mais efetivas para minimizar os efeitos da doença, e a associação destas outras modalidades de exercício pode significar uma vantagem estratégica na determinação de estudos futuros.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da natação de média/baixa intensidade e do treinamento resistido no músculo esquelético distrófico de camundongos mdx, machos e fêmeas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a força muscular de camundongos mdx machos e fêmeas submetidos à natação e ao treinamento de resistência;
- Determinar os níveis de CK sérico em camundongos mdx machos e fêmeas submetidos à natação e ao treinamento de resistência;

- Avaliar a histopatologia (fibras com núcleo central e área inflamatória) do músculo esquelético distrófico de camundongos mdx machos e fêmeas submetidos à natação e ao treinamento de resistência;
- Comparar os efeitos da aplicação da natação e do treinamento de resistência no músculo esquelético distrófico de camundongos mdx machos e fêmeas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e protocolos experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem mdx (Bulfield, Siller *et al.* 1984), de ambos os sexos, com 30 e 45 dias de vida pós-natal, obtidos de casais (1 fêmea e 1 macho por gaiola) mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, DAnat, da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Todos os animais foram eutanasiados com 60 dias de vida, com os animais submetidos à natação iniciando o protocolo com 30 dias de vida (4 semanas de protocolo) e os animais submetidos ao treinamento resistido iniciando o protocolo com 45 dias de vida (2 semanas de protocolo). O número de animais usados está de acordo com as recomendações descritas por Collins e Morgan, 2003; Perrin 2014 e Denayer *et al.*, 2014 sobre o uso do modelo mdx em estudos experimentais (Collins and Morgan 2003, Perrin 2014). As matrizes são oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o desmame e o macho foi separado. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração Nuvilab CR-1 e água ad libitum. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi desenvolvido após ser aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG (0023/2024). Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais, com 7 animais cada:

- I. Grupo mdx sedentário macho (mdxCtM);
- II. Grupo mdx sedentário fêmea (mdxCtF);
- III. Grupo mdx submetido à natação macho (mdxSwM);
- IV. Grupo mdx submetido à natação fêmea (mdxSwF);
- V. Grupo mdx submetido ao treinamento de resistência macho (mdxRtM);
- VI. Grupo mdx submetido ao treinamento de resistência fêmea (mdxRtF).

4.1.1. Protocolo de natação

Camundongos foram introduzidos em um tanque de vidro (41x34x18cm) cheio de água (mantida a $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) a uma profundidade suficiente para forçá-los a nadar. Os animais foram monitorados durante o tempo do experimento para impedir qualquer adversidade que interferisse na integridade do animal. Os animais passaram por um programa de 4 semanas no qual se exercitaram por 30 minutos, 4 dias por semana (segunda, terça, quinta e sexta), enquanto puderam descansar nos outros 3 dias (Hyzewicz, Tanihata, *et al.*, 2015; Hyzewicz *et al.*, 2017). Para o aquecimento da água foi usado um ebulidor de água (Figura 02) e um aquecedor de chão para manter a sala quente. Os animais foram pesados no começo e no final do protocolo e o tempo foi monitorado.

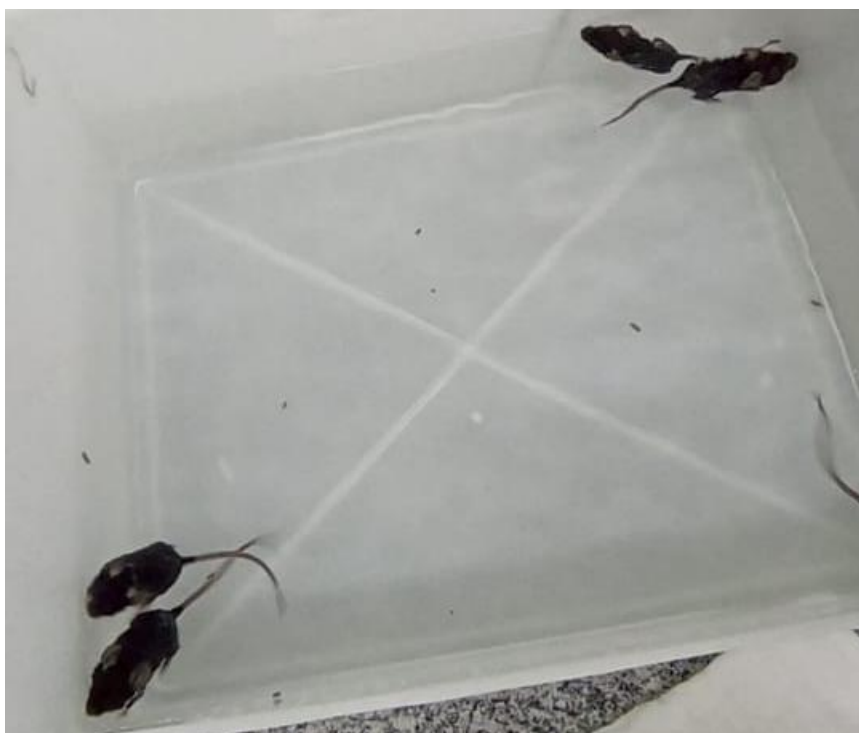


Figura 01 - Camundongos realizando o protocolo de natação. Fonte: Autor (2024).

4.1.2. Protocolo de treinamento de resistência

Uma escada inclinada (80°) com 100×9 cm (comprimento e largura, respectivamente) com barras espaçadas em intervalos de 0,5 cm foi usada neste estudo (Figura 03a). A distância de subida foi definida em 40 cm, evitando assim o possível contato entre a carga e o chão. Para determinar a carga de trabalho, foi realizada uma avaliação prévia do desempenho muscular em dois animais mdx (um de cada sexo) através do método 3RM. Este método consistiu em determinar a carga máxima que o animal conseguiu carregar durante três subidas completas e

consecutivas da escada . A partir desta avaliação, a carga de trabalho para os protocolos experimentais foi padronizada em aproximadamente 10% do peso corporal do animal. Esta carga foi obtida preenchendo-se um tubo Falcon (15 ml) com o volume de água necessário (2,5 ml), que foi aferido em balança de precisão (Figura 04). A carga alvo máxima alcançada foi de 8,73 gramas, e então o tubo foi preso à porção distal da cauda do camundongo com fita adesiva (Figura 05). Este protocolo foi desenvolvido e adaptado a partir do protocolo estabelecido por Ferraresi *et al.*, 2015.



Figura 02 - a) Escada usada no protocolo de resistência do presente trabalho; b) Camundongo realizando o protocolo de treinamento resistido. Fonte: Autor (2024).

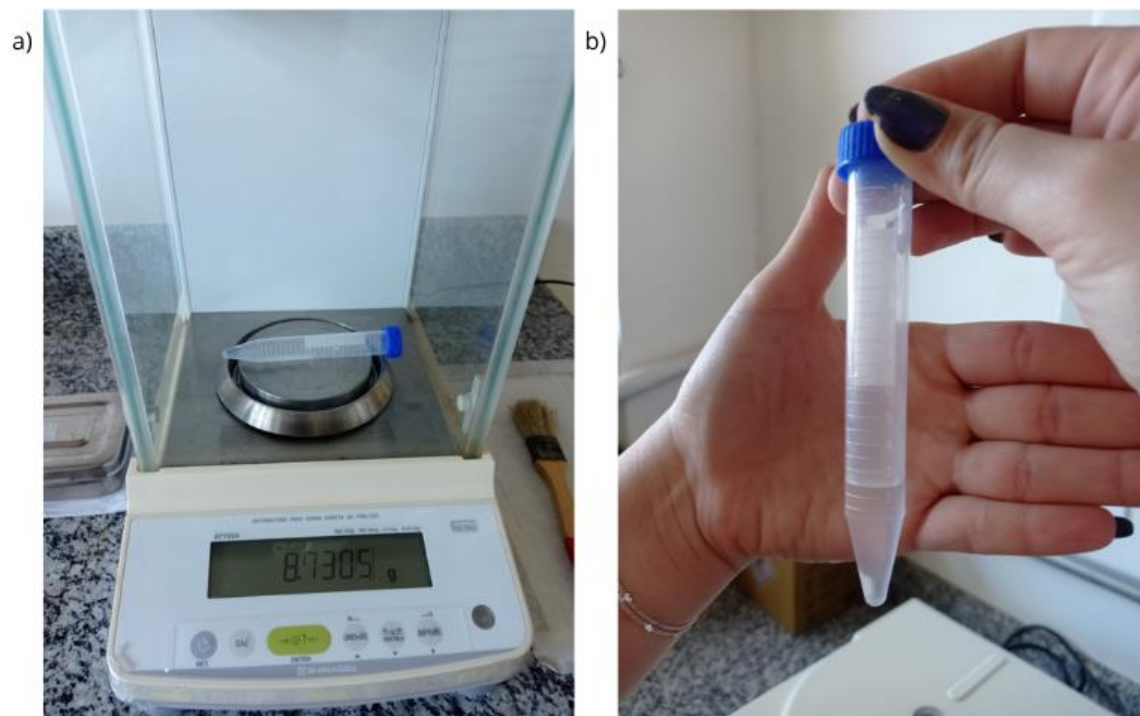


Figura 03 - a) Tubo pesado com 2,5ml de água ($\approx 10\%$ do peso corporal). b) Tubo graduado com fundo cônico (Tipo Falcon 15ml). Fonte: Autor (2025).



Figura 04 - Demonstração da inserção do tubo falcon na cauda dos camundongos, com auxílio de fita crepe. Fonte: Autor (2025).

Primeiramente, os grupos experimentais, foram familiarizados com a escalada em escada um dia antes do início da avaliação e treinamento do desempenho muscular. O procedimento de familiarização foi de 2 séries de 5 subidas na escada (repetições) com períodos de descanso de 2 minutos entre as séries individuais. Nenhuma carga foi presa à cauda do camundongo durante este procedimento. Em seguida, foi realizada a avaliação do desempenho muscular que foi definida como a média da carga máxima carregada por cada animal durante 3 subidas completas consecutivas da escada inclinada (3RM). Uma leve pressão com pinças foi aplicada na cauda se o animal parasse durante uma subida. O teste foi interrompido quando os camundongos não conseguiam subir ou perdiam a pegada na escada devido à falha da contração muscular concêntrica. A primeira tentativa não incluiu nenhuma carga além do próprio peso corporal do animal. Foi aplicado um máximo de 3 tentativas de subida. O animal que conseguiu terminar a série, a carga foi aumentada gradativamente para a próxima subida, enquanto se o camundongo não conseguisse terminar uma subida, a carga seria tirada para a próxima subida.

Cada sessão de treinamento constituiu em 3 séries de 10 repetições (subidas) na escada com um período de descanso de 2 minutos entre cada série ([Figura 03b](#)).

4.1.3. Teste e suspensão das 4 patas

Existem várias formas não invasivas para medição da força muscular dos membros que fornecem informações relevantes sobre a fraqueza muscular, coordenação motora, comprometimento neuromuscular e a eficácia do tratamento em vários modelos de camundongos para distúrbios neuromusculares (Carlson et al, 2010). O teste de suspensão pelas quatro patas é uma medida eficiente e confiável, mas, não é possível relacionar o resultado a um único e específico distúrbio neuromuscular (Carlson, 2011).

O teste seguiu o protocolo TREAT-NMD “*Four limb hang test*” (Carlson, 2011). Os animais passaram por dois testes, na semana inicial (um dia antes do protocolo de exercício) e final (um dia após ao protocolo de exercício) de aplicação dos treinamentos.

Sua fácil aplicabilidade e reprodutibilidade permitiram que o teste fosse feito usando topo de gaiola suspensa a 35 cm do solo, com o solo forrado por 5 a 7 centímetros de maravalha, para evitar que os animais se machucassem ao cair [figura 01](#) (Carlson, 2011). Foram realizados três testes com cada animal, com descanso de dois minutos entre as repetições. Fatores como local e horário de realização e aplicador do teste foram os mesmos para obtenção de valores confiáveis.

O peso corporal do camundongo foi obtido antes de iniciar o teste. O camundongo foi colocado no topo da grade por um período de acomodação de 3 a 5 segundos e o cronômetro foi ativado assim que a gaiola foi invertida. Normalmente, pouco antes de cair, o animal se sustentou com 1 ou 2 patas, e nesse momento, o cronômetro foi parado. Sendo assim, o cronômetro começou a contar quando a gaiola foi invertida, e foi parado quando o animal se soltou ou se suspendeu por 1 ou 2 patas. O tempo foi contado em segundos, sendo 600 segundos o maior tempo obtido e feita a média dos tempos.

O resultado é dado em *gms*, sendo o *Impulso de Segurar (gms) = peso corporal (g) x o tempo que o animal sustentou (seg)*.

Embora exija supervisão constante dos animais e um animal por vez seja analisado, o teste é de fácil realização, baixo custo e alta confiabilidade (Carlson et al, 2010).



Figura 05 - Execução do teste de suspensão das quatro patas. Fonte: Beatriz Godinho (2023).

4.2. Coleta e preservação das amostras

4.2.1. Dosagem de Creatina-Quinase (CK) em amostras de sangue

Após a aplicação dos protocolos de exercício, os animais de cada grupo foram anestesiados com cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina numa proporção de 1:1. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para determinar a atividade de CK. O soro obtido foi utilizado para análise com o kit CK Nac Cinético Crystal da Bioclin. As

amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e as absorvâncias foram lidas a 25°C no equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M.

4.2.2. Análise histopatológica (n=7)

Após administração de anestesia e coleta de sangue, os animais foram perfundidos com PBS para reduzir a influência de componentes plasmáticos nas análises. Após a morte por exsanguinação, os músculos foram retirados e congelados a -90°C em isopentano e nitrogênio líquido. Os cortes dos músculos foram feitos a -28°C em um criostato com 8 µm de espessura, sendo coletados em lâminas. Foram feitas lâminas de cada grupo experimental que foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As fibras musculares regeneradas e normais foram analisadas em um microscópio de luz, contando os núcleos centrais e periféricos. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo conectada a um microscópio óptico Nikon com objetiva de 20X, usando o software NIS-elements AR Advances Researches.

4.3. Análise estatística

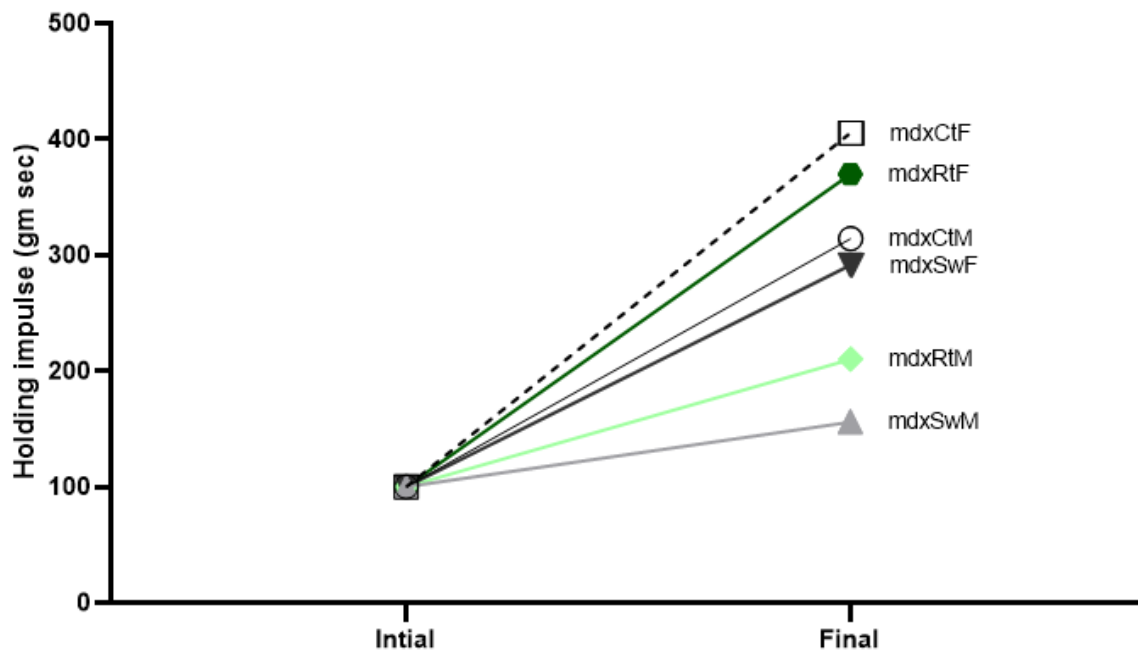
Para análise estatística foi aplicado o teste ANOVA One Way seguido do teste Tukey para as devidas comparações entre os grupos, e os dados apresentados por meio de média e desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Análise do desempenho funcional

O gráfico de linhas ([gráfico 1](#)) ilustra a variação no impulso de sustentação, medido em gramas/segundos, entre um ponto "Inicial" e um ponto "Final" do experimento. A descoberta mais proeminente é uma clara distinção baseada no sexo, onde todos os grupos femininos (mdxCtF, mdxRtF, mdxSwF) alcançaram valores finais substancialmente mais altos que os grupos masculinos. As intervenções dos protocolos de exercício não se mostraram benéficas em comparação aos respectivos controles em ambos os sexos. Notavelmente, o protocolo de natação pareceu ser o menos eficaz, com o grupo mdxSwM apresentando o menor aumento de todos.

Gráfico 01 - Avaliação do tempo de suspensão pelas quatro patas

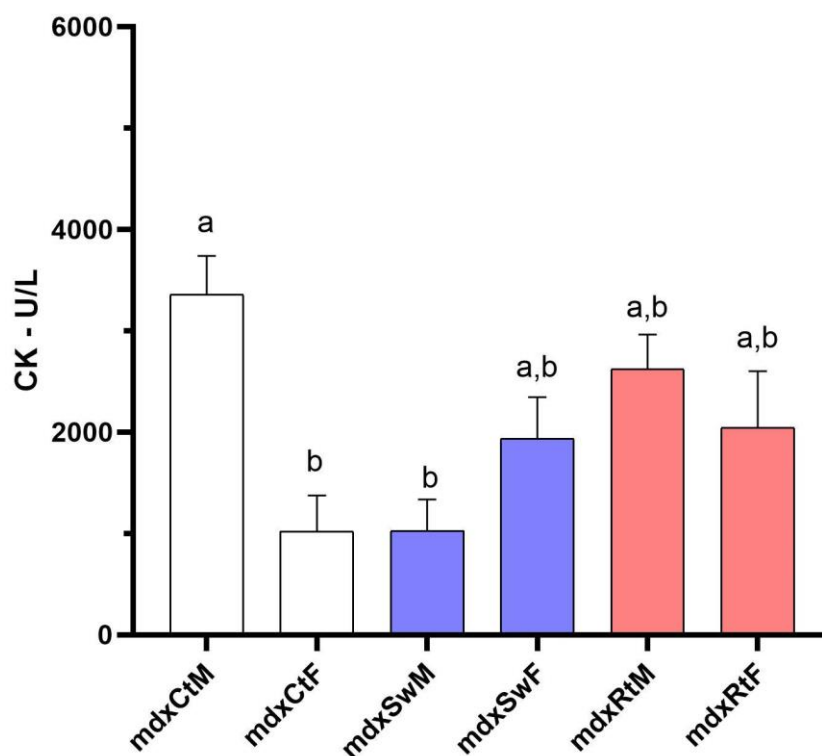


Legenda: Gráfico de linhas que ilustra a mudança no impulso de sustentação (eixo Y, medido em gm/sec) entre dois pontos no tempo: Inicial e "Final" (eixo X). Fonte: Autor (2025).

5.2. Dano muscular: Níveis séricos de Creatina Quinase (CK)

De acordo com os dados obtidos ([gráfico 2](#)), os resultados indicam que o grupo controle masculino (mdxCtM) apresentou o nível de CK mais elevado (aprox. 3400 U/L), o que era esperado. O foco principal da análise recai sobre o grupo mdxSwM (machos submetidos à natação), que apresentou um dos níveis mais baixos de CK observados, aproximadamente 1000 U/L, um valor muito similar ao do grupo controle feminino (mdxCtF). Os demais grupos (mdxSwF, mdxRtM e mdxRtF) apresentaram níveis intermediários de CK (entre 1900 e 2600 U/L), que não foram estatisticamente diferentes nem dos grupos com CK mais alta nem dos grupos com CK mais baixa.

Gráfico 02 - Níveis de Creatina Quinase (CK)



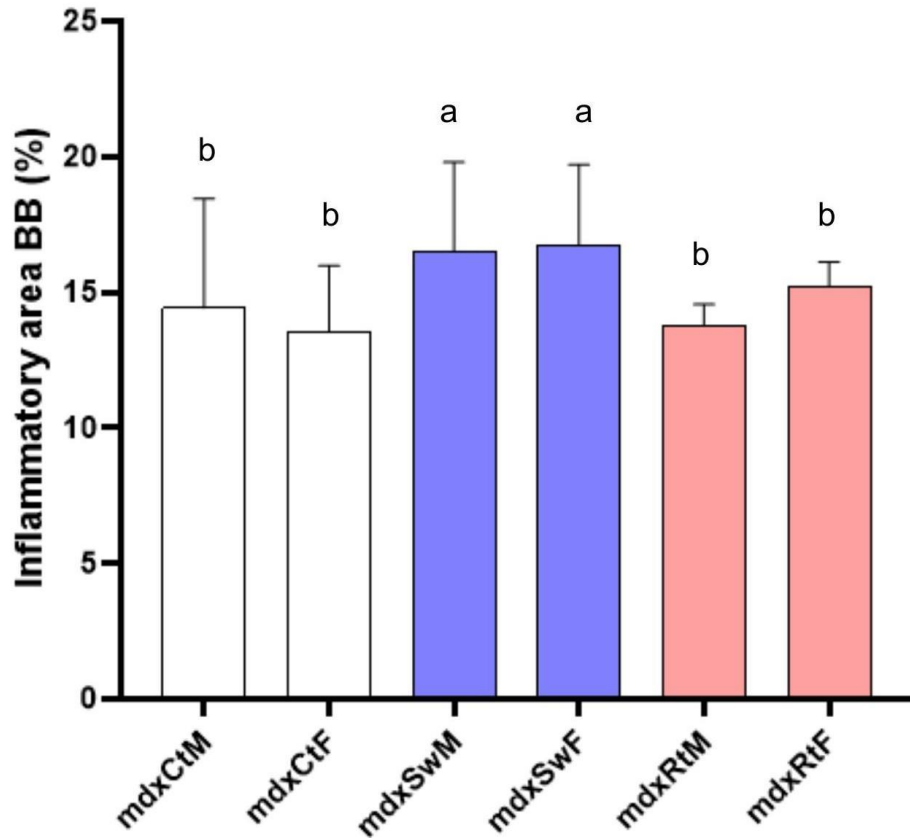
Legenda: (a): mdxCtM - é significativamente diferente de alguns grupos. (a,b): mdxCtF - compartilha semelhanças com ambos mdxCtM e outros grupos. (a,b): mdxSwM - similar ao mdxCtF. (b): mdxRtM - pertence a um subconjunto estatístico diferente de mdxCtM. (b): mdxRtF - estatisticamente igual ao mdxCtM. Fonte: Autor (2025).

5.3. Análise histopatológica

5.3.1. Inflamação

A análise da área inflamatória do Bíceps (gráfico 3) mostrou que todos os grupos apresentaram valores relativamente próximos. Os grupos SwM (16,48%) e SwF (16,76%) destacaram-se com os maiores percentuais de inflamação. Os demais grupos exibiram valores inferiores e muito próximos entre si, variando de 13,55% (CtF) a 15,25% (RtF), com o grupo CtM registrando 14,42%

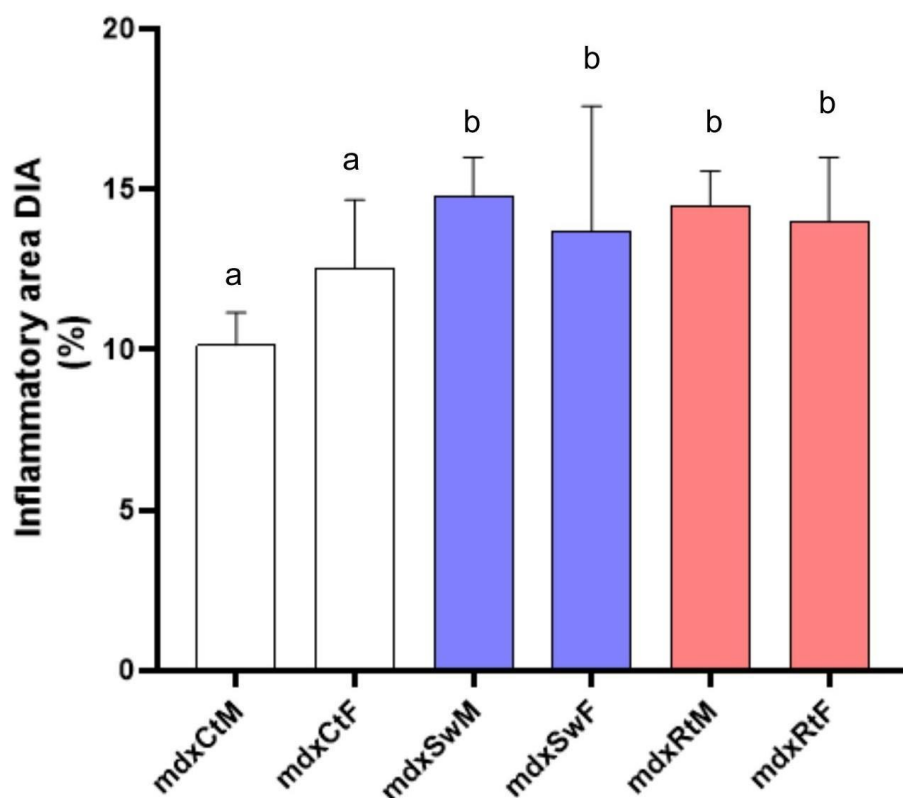
Gráfico 03 - Área de inflamação do músculo Bíceps Braquial



Legenda: Grupos mdxSwM e mdxSwF com maiores percentuais de inflamação (a), em comparação com os demais grupos (mdxCtM, mdxCtF, mdxRtM e mdxRtF) que mantiveram valores próximos entre si (b). Fonte: Autor (2025).

Na análise da área inflamatória do Diafragma ([gráfico 4](#)), embora se observem variações nos valores médios – com o grupo controle masculino (mdxCtM) apresentando a média mais baixa (aprox. 10%) e os grupos de exercício (mdxSwM, mdxSwF, mdxRtM, mdxRtF) apresentando médias ligeiramente mais altas (entre 13,5% e 15%) –, essas diferenças não foram suficientes para atingir significância estatística.

Gráfico 04 - Área de inflamação no músculo Diafragma

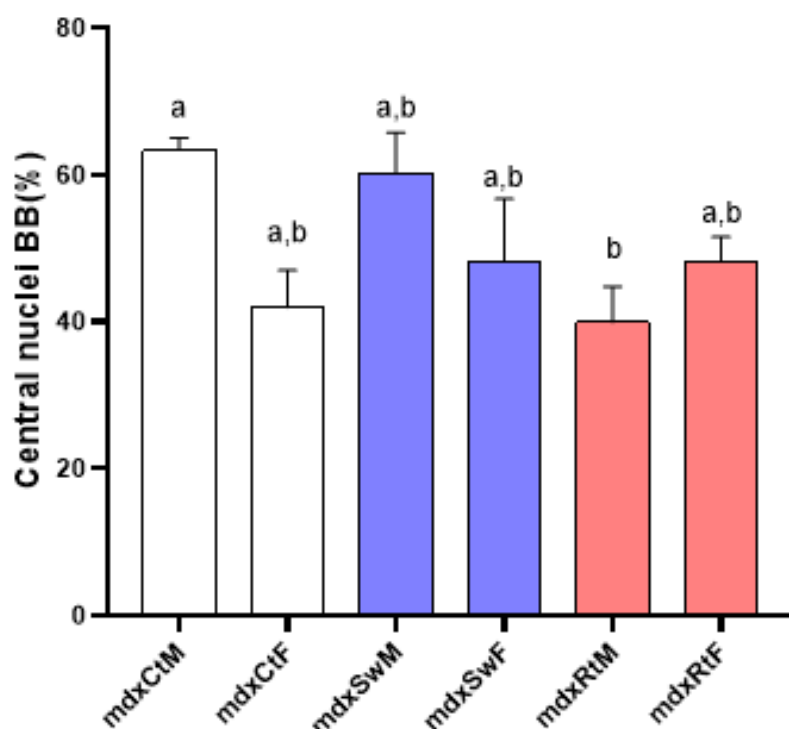


Legenda: gráfico de barras comparando a porcentagem da "Inflammatory area DIA" (Área Inflamatória DIA) no eixo Y, entre os seis grupos experimentais no eixo X. Os grupos submetidos à exercícios (b) obtiveram diferença estatística em relação aos grupos controle sedentário (a). Fonte: Autor (2025).

5.3.2. Regeneração muscular (Núcleos Centrais)

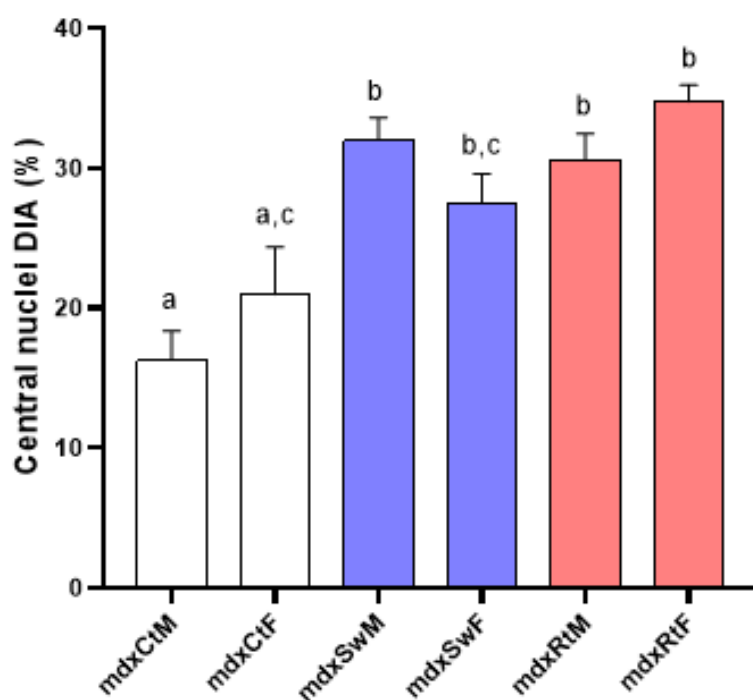
A quantificação de fibras com núcleo central no BB (Gráfico 05) mostrou que o grupo mdxRtM teve menor porcentagem significativa, enquanto o grupo mdxSwM teve maior porcentagem significativa - ambos em relação ao grupo mdxCtM. A quantificação de fibras com núcleo central no DIA (Gráfico 06) demonstrou que todos os animais submetidos aos protocolos de exercício apresentaram aumento significativo no número de fibras musculares, comparado aos grupos de animais sedentários. No entanto, é observado um aumento nos grupos mdxSwM e mdxRtF. Estes dados associados à alta inflamação sugerem um comprometimento adverso do processo regenerativo destes grupos.

Gráfico 05 - Porcentagem de núcleos centrais no músculo Bíceps Braquial



Legenda: Gráfico de barras comparando a porcentagem de "Central nucleí BB" (Núcleos Centrais BB) no eixo Y, entre os seis grupos experimentais no eixo X. O grupo dos machos submetidos ao treinamento resistido (b) tiveram diferença estatística em relação ao grupo controle sedentário macho (a). Fonte: Autor (2025).

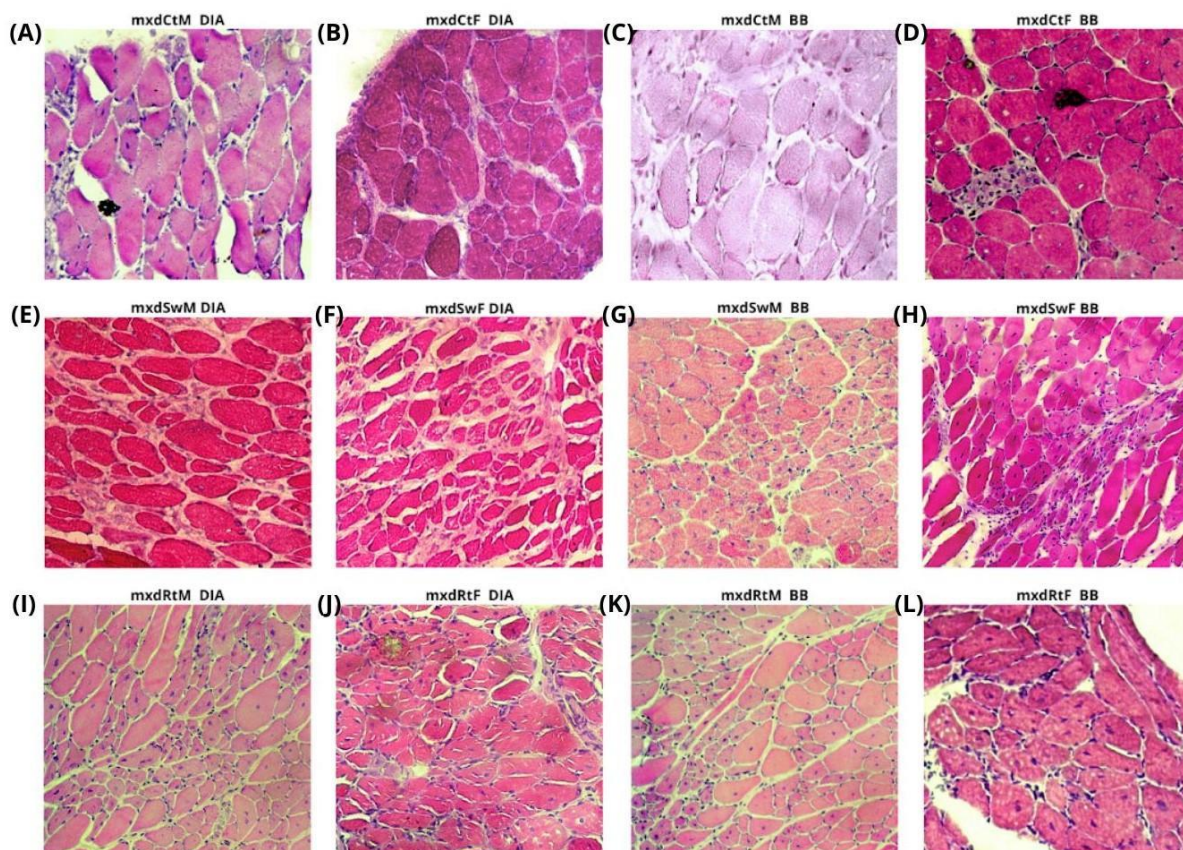
Gráfico 06 - Porcentagem de núcleos centrais no músculo Diafragma



Legenda: Gráfico de barras comparando a porcentagem de "Central nucleí DIA" (Núcleos Centrais DIA) no eixo

Y, entre os seis grupos experimentais no eixo X. Os grupos submetidos à exercícios (b) obtiveram diferença estatística em relação aos grupos controle sedentário (a). Fonte: Autor (2025).

Figura 06 - Histopatologia dos músculos



Legenda: Cortes transversais de músculo esquelético corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). (A) mdxCtM (Controle Macho); (B) mdxSwM (Natação Macho); (C) mdxRtM (Resistência Macho); (D) mdxCtF (Controle Fêmea); (E) mdxSwF (Natação Fêmea); (F) mdxRtF (Resistência Fêmea). Observa-se maior frequência de núcleos centrais e infiltrado inflamatório nos grupos masculinos, especialmente nos submetidos ao exercício. Os grupos femininos apresentam arquitetura muscular mais preservada, com menor evidência de dano degenerativo-regenerativo crônico. Observa-se maior assimetria das fibras musculares da histopatologia do diafragma. Fonte: Autor (2025).

6. DISCUSSÃO

6.1. O sexo biológico como fator determinante nas diferenças patológicas

Os resultados deste estudo destacam o sexo biológico como um fator crítico na modulação da fisiopatologia da distrofia em modelos mdx, um achado que corrobora estudos anteriores (Hermes *et al.*, 2018). Conforme observado na maioria dos parâmetros funcionais e séricos, as fêmeas apresentaram um fenótipo consistentemente menos severo em comparação

com os machos, mesmo quando submetidas aos protocolos de exercício.

A literatura atribui essa vantagem, em grande parte, ao papel protetor do estrogênio (Tiidus *et al.*, 2001). Este hormônio é amplamente reconhecido por sua capacidade de modular a resposta inflamatória, proteger a integridade da membrana muscular contra lesões (especialmente a lesão mediada por influxo de cálcio) e reduzir o estresse oxidativo (Zorov, Juhaszova & Sollott, 2014), proporcionando uma condição fisiológica mais favorável ao indivíduo.

Essa perspectiva é claramente ilustrada no Gráfico 01, que demonstra o impulso de sustentação ao final dos protocolos. Observa-se que os grupos femininos, com exceção de um, alcançaram valores de força acentuadamente superiores aos seus pares masculinos. De fato, o grupo mdxCtF (controle feminino) alcançou o maior desempenho funcional de todo o estudo, superando inclusive o controle masculino (mdxCtM), o que se alinha com trabalhos que demonstram uma preservação da força muscular em fêmeas mdx (Hermes *et al.*, 2018).

Uma observação crucial é a do grupo de natação feminino (mdxSwF). Embora tenha apresentado um grande aumento em relação ao ponto inicial, seu valor final foi ligeiramente inferior ao do controle masculino (mdxCtM). Este achado, no entanto, parece refletir com mais precisão o impacto da modalidade de exercício, que pode ser excessiva. Estudos sobre exercícios de alta intensidade ou longa duração, como a natação forçada, por vezes relatam resultados ambíguos ou até deletérios no modelo mdx (Hyzewicz, Ruegg & Takeda, 2015).

Portanto, o desempenho funcional inferior do grupo mdxSwF (em relação a mdxCtM) sugere que o estresse da natação pode ter sido deletério a ponto de mitigar parcialmente a vantagem biológica feminina. Nos machos, por outro lado, o mesmo estresse (natação) ou o de escalada agravaram severamente o desfecho funcional, reforçando a ideia de que os machos mdx são mais suscetíveis ao dano muscular induzido pelo exercício (Grounds *et al.*, 2008).

6.2. As diferenças obtidas por modalidades de intensidades distintas

A literatura referencial frequentemente posiciona a natação como uma modalidade de baixa a média intensidade, capaz de induzir efeitos benéficos, como a redução do infiltrado inflamatório e a promoção da regeneração muscular (Matsakas *et al.*, 2013; Frinchi *et al.*, 2021). Em contrapartida, o treinamento de resistência foi incluído como uma intervenção de alta intensidade, com potencial para agravar a patologia distrófica (Lindsay *et al.*, 2019).

Surpreendentemente, os resultados funcionais (Gráfico 01) não apenas falharam em demonstrar um benefício da natação, como sugeriram um efeito adverso. Ambos os grupos de

exercício, mdxSwM e mdxRtM, apresentaram o pior desempenho no teste de força, ficando muito abaixo do grupo controle mdxCtM. Isso sugere que, para a função muscular, ambas as modalidades foram deletérias, independentemente da intensidade ou tipo de contração.

A complexidade aumenta ao considerar a duração dos protocolos. A natação, de menor intensidade, foi prolongada (4 semanas), enquanto a escalada, de alta intensidade, foi curta (2 semanas). Essa diferença temporal é crucial para interpretar os níveis séricos de CK (Gráfico 02). O grupo mdxSwM, apesar de ter treinado pelo dobro do tempo, apresentou níveis de CK significativamente mais baixos que o controle mdxCtM, e similares ao controle feminino (mdxCtF).

6.3. A variação dos efeitos locais (BB) e sistêmicos (DIA)

Uma das descobertas mais significativas deste estudo é a demonstração de que os efeitos das intervenções não são homogêneos, apresentando resultados divergentes - e por vezes opostos - dependendo do músculo analisado. A literatura tem consistentemente apontado que a patologia mdx progride de forma diferente entre músculos locomotores (fásicos) e músculos respiratórios (tônicos) (Morgan *et al.*, 2018). A comparação entre o bíceps braquial (BB) e o diafragma (DIA) é, portanto, fundamental para compreender a complexidade da doença e do impacto do exercício.

O contraste mais evidente foi observado nos marcadores inflamatórios. No músculo BB (Gráfico 03), tanto a natação quanto o treinamento resistido induziram um estatisticamente significativo efeito anti-inflamatório, reduzindo a área inflamatória em mais da metade em comparação com o grupo controle masculino (mdxCtM). Este achado corrobora estudos que demonstram a capacidade do exercício moderado em modular a resposta de macrófagos M1/M2 em músculos distróficos (Dumont *et al.*, 2018; Frinchi *et al.*, 2021), sugerindo que, localmente, o exercício foi capaz de modular benéficamente o ambiente inflamatório crônico.

Exatamente o oposto foi observado no DIA (Gráfico 04). Neste músculo, não apenas falhou-se em observar um efeito anti-inflamatório, como os grupos submetidos ao exercício apresentaram as maiores médias de inflamação. O diafragma mdx já opera em um estado de sobrecarga crônica, com inflamação e fibrose severas (Kharraz *et al.*, 2014; Radley & Grounds, 2006). Os nossos dados sugerem que o estresse sistêmico do exercício pode sobrecarregar ainda mais o músculo respiratório, potencialmente agravando seu estado inflamatório.

A mesma divergência foi encontrada nos marcadores de cronicidade da lesão (núcleos centrais). No BB (Gráfico 05), o protocolo de resistência (mdxRtM) foi o único que levou a

uma redução significativa da porcentagem de núcleos centrais em relação ao controle (mdxCtM). Uma redução em núcleos centrais é frequentemente interpretada como uma atenuação do ciclo de lesão-regeneração e uma maior estabilização da fibra muscular (Dubowitz *et al.*, 2013; Grounds *et al.*, 2020). Em contraste, no DIA (Gráfico 06), todos os protocolos de exercício induziram um aumento estatisticamente significativo no número de fibras com núcleo central, quase dobrando os valores vistos nos controles sedentários. Este aumento no DIA é um forte indicador de exacerbação da patologia, refletindo um ciclo fútil de lesão e regeneração que é característico de um fenótipo grave (Morgan *et al.*, 2018).

Em conjunto, estes dados demonstram que uma intervenção sistêmica (exercício) pode ter efeitos diametralmente opostos no mesmo animal. Enquanto a escalada pareceu ter um efeito estabilizador e anti-inflamatório no músculo locomotor (BB), o contrário ocorreu no músculo diafragma (DIA), onde ambas as formas de exercício exacerbaram o processo inflamatório.

Isso indica que o diafragma é particularmente vulnerável ao estresse adicional imposto pelo exercício, levantando questões críticas sobre a segurança de intervenções sistêmicas para a função respiratória (Frinchi *et al.*, 2021).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo conduzem a uma conclusão central e inesperada: o sexo biológico mostrou-se um fator determinante mais significativo para o fenótipo distrófico do que a modalidade de exercício físico aplicada. Esta descoberta alinha-se com a literatura que evidencia o papel protetor do estrógeno na distrofia muscular (Grounds *et al.*, 2008; Tildus, 2001).

Conclui-se, portanto, que os protocolos de natação e resistência, nas intensidades e durações aqui empregadas, não são apropriados como terapias únicas para a Distrofia Muscular de Duchenne, devido ao alto risco de agravar a patologia respiratória. No entanto, o valor deste trabalho reside justamente na caracterização desses resultados aqui obtidos, que são para traçar novos caminhos de pesquisa.

Os protocolos de exercício que se mostraram deletérios, especialmente para o diafragma, podem agora ser utilizados como um "modelo de desafio" ou "agravamento". Em vez de esperar meses pela progressão natural da doença, futuros estudos podem usar este protocolo de exercício para induzir um dano acelerado, permitindo testar a eficácia protetora de novos fármacos em um curto espaço de tempo. Para o desenho de terapias combinadas, os dados que mostram um efeito benéfico no BB (anti-inflamatório) e um efeito deletério no DIA (pró-

regenerativo/lesivo) fornecem um roteiro claro. Abre-se a perspectiva de acoplar um protocolo de exercício leve a um tratamento medicamentoso (como um anti-inflamatório ou protetor de membrana) que vise especificamente proteger o diafragma da sobrecarga induzida pelo exercício, por exemplo.

Dessa forma, este estudo, ao demonstrar efeitos de diferentes exercícios, fornece ferramentas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais seguras e eficazes.

REFERÊNCIAS

- ARTSMA-RUS, A., & van Putten, M. (2014, Mar 27). Assessing functional performance in the mdx mouse model. *J Vis Exp*(85). <https://doi.org/10.3791/51303>
- BALTGALVIS, K. A., Call, J. A., Cochrane, G. D., Laker, R. C., Yan, Z., & Lowe, D. A. (2012, Sep). Exercise training improves plantar flexor muscle function in mdx mice. *Med Sci Sports Exerc*, 44(9), 1671-1679. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31825703f0>
- BENCZE, M., Periou, B., Baba-Amer, Y., & Authier, F. J. (2019, Dec 5). Immunolabelling Myofiber Degeneration in Muscle Biopsies. *J Vis Exp*(154). <https://doi.org/10.3791/59754>
- BIGGAR, W. D., Klamut, H. J., Demacio, P. C., Stevens, D. J., & Ray, P. N. (2002, Aug). Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin Orthop Relat Res*(401), 88-106. <https://doi.org/10.1097/00003086-200208000-00012>
- BIRNKRANT, D. J., Bushby, K., Bann, C. M., Apkon, S. D., Blackwell, A., Brumbaugh, D., Case, L. E., Clemens, P. R., Hadjiyannakis, S., Pandya, S., Street, N., Tomezsko, J., Wagner, K. R., Ward, L. M., Weber, D. R., & Group, D. M. D. C. C. W. (2018, Mar). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol*, 17(3), 251-267. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30024-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30024-3)
- BOGDANOVICH, S., Perkins, K. J., Krag, T. O., & Khurana, T. S. (2004, Feb). Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *J Mol Med (Berl)*, 82(2), 102-115. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0484-1>
- BRADFORD, M. M. (1976, May 7). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- BRUSSEE, V., Tardif, F., & Tremblay, J. P. (1997, Dec). Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord*, 7(8), 487-492. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(97\)00115-6](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(97)00115-6)
- BULFIELD, G., Siller, W. G., Wight, P. A., & Moore, K. J. (1984, Feb). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(4), 1189-1192. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.4.1189>
- BARREIROS, A., & David, J. (2006). Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*.
- CARLSON, G. (2011). The use of four limb hanging tests to monitor muscle strength and condition over time. TREAT-NMD protocol
- CARPENTER, S., & Karpati, G. (1989, Mar). Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers. *J Neuropathol Exp Neurol*, 48(2), 154-170. <https://doi.org/10.1097/00005072-198903000-00003>
- CHOI, M. H., Ow, J. R., Yang, N. D., & Taneja, R. (2016). Oxidative Stress-Mediated Skeletal

Muscle Degeneration: Molecules, Mechanisms, and Therapies. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 6842568. <https://doi.org/10.1155/2016/6842568>

CIAFALONI, E., Fox, D. J., Pandya, S., Westfield, C. P., Puzhankara, S., Romitti, P. A., Mathews, K. D., Miller, T. M., Matthews, D. J., Miller, L. A., Cunniff, C., Druschel, C. M., & Moxley, R. T. (2009, Sep). Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr*, 155(3), 380-385. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.02.007>

CICILLOT, S., & Schiaffino, S. (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des*, 16(8), 906-914. <https://doi.org/10.2174/138161210790883453>

CULLEN, M. J., & Jaros, E. (1988). Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol*, 77(1), 69-81. <https://doi.org/10.1007/BF00688245>

DE LUCA, A.; et al. Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 304, n. 1, p. 453-463, 2003.

DECONINCK, N., & Dan, B. (2007, Jan). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*, 36(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>

DOWLING, P., Murphy, S., Zwyer, M., Raucamp, M., Swandulla, D., & Ohlendieck, K. (2019, Aug). Emerging proteomic biomarkers of X-linked muscular dystrophy. *Expert Rev Mol Diagn*, 19(8), 739-755. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1648214>

DUAN, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E., & Aartsma-Rus, A. (2021, Feb 18). Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3>

DUBOWITZ, V., Sewry, C., & Oldfors, A. (2013). *Muscle Biopsy: A Practical Approach* (E. H. Sciences, Ed. 4th ed.).

ESPINOSA, A., Henriquez-Olguin, C., & Jaimovich, E. (2016, Sep). Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell Calcium*, 60(3), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.010>

EVANS, N. P., Misyak, S. A., Robertson, J. L., Bassaganya-Riera, J., & Grange, R. W. (2009, Jun). Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil*, 88(6), 502-522. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e3181a5a24f>

FERRARESI, C., Parizotto, N. A., Pires de Sousa, M. V., Kaippert, B., Huang, Y. Y., Koiso, T., Bagnato, V. S., & Hamblin, M. R. (2015, Sep). Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics*, 8(9), 740-754. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400087>

FORBES, S. C., Willcocks, R. J., Triplett, W. T., Rooney, W. D., Lott, D. J., Wang, D. J., Pollaro, J., Senesac, C. R., Daniels, M. J., Finkel, R. S., Russman, B. S., Byrne, B. J., Finanger,

E. L., Tennekoon, G. I., Walter, G. A., Sweeney, H. L., & Vandenborne, K. (2014). Magnetic resonance imaging and spectroscopy assessment of lower extremity skeletal muscles in boys with Duchenne muscular dystrophy: a multicenter cross sectional study. *PLoS One*, 9(9), e106435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106435>

FORMAN, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009, Feb-Apr). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 30(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

FRANCKE, U., Ochs, H. D., de Martinville, B., Giacalone, J., Lindgren, V., Distèche, C., Pagon, R. A., Hofker, M. H., van Ommen, G. J., Pearson, P. L., & et al. (1985, Mar). Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet*, 37(2), 250-267. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4039107>

FRINCHI, M., Morici, G., Mudo, G., Bonsignore, M. R., & Di Liberto, V. (2021, Apr 3). Beneficial Role of Exercise in the Modulation of mdx Muscle Plastic Remodeling and Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antiox10040558>

GLENMARK, B., Nilsson, M., Gao, H., Gustafsson, J. A., Dahlman-Wright, K., & Westerblad, H. (2004, Dec). Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor-beta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(6), E1125-1131. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00098.2004>

GROUND, M. D. (2010). Quantification of histopathology in Haematoxylin and Eosin stained muscle sections. TREAT-NMD protocol.

GROUND, M. D., Radley, H. G., Lynch, G. S., Nagaraju, K., & De Luca, A. (2008, Jul). Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*, 31(1), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.008>

GROUND, M. D., Terrill, J. R., Al-Mshhdani, B. A., Duong, M. N., Radley-Crabb, H. G., & Arthur, P. G. (2020, Mar 2). Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Dis Model Mech*, 13(2). <https://doi.org/10.1242/dmm.043638>

HERIQUES-PONS, A., Yu, Q., Rayavarapu, S., Cohen, T. V., Ampong, B., Cha, H. J., Jahnke, V., Van der Meulen, J., Wang, D., Jiang, W., Kandimalla, E. R., Agrawal, S., Spurney, C. F., & Nagaraju, K. (2014, May 15). Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of dystrophin-deficient skeletal and heart muscle. *Hum Mol Genet*, 23(10), 2604-2617. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt656>

HERBELET, S., De Paepe, B., & De Bleecker, J. L. (2020, Dec 3). Description of a Novel Mechanism Possibly Explaining the Antiproliferative Properties of Glucocorticoids in Duchenne Muscular Dystrophy Fibroblasts Based on Glucocorticoid Receptor GR and NFAT5. *Int J Mol Sci*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239225>

HERMES, T. A.; et al. The influence of biological sex on the effects of intensive exercise in dystrophic mdx mice. *Journal of Applied Physiology*, v. 125, n. 6, p. 1891-1902, 2018.

HODGETTS, S., Radley, H., Davies, M., & Grounds, M. D. (2006, Oct). Reduced necrosis of

dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 16(9-10), 591-602. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.06.011>

HOFFMAN, E. P., Pegoraro, E., Scacheri, P., Burns, R. G., Taber, J. W., Weiss, L., Spiro, A., & Blattner, P. (1996, Jun 28). Genetic counseling of isolated carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet*, 63(4), 573-580. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19960628\)63:4<573::AID-AJMG11>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960628)63:4<573::AID-AJMG11>3.0.CO;2-F)

HU, X., & BLEMKERHU, S. S. (2015, Aug). Musculoskeletal simulation can help explain selective muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 52(2), 174-182. <https://doi.org/10.1002/mus.24607>

HULMI, J. J., Oliveira, B. M., Silvennoinen, M., Hoogaars, W. M., Pasternack, A., Kainulainen, H., & Ritvos, O. (2013, Jul 15). Exercise restores decreased physical activity levels and increases markers of autophagy and oxidative capacity in myostatin/activin-blocked mdx mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305(2), E171-182. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00065.2013>

HYZEWICZ, J., Ruegg, U. T., & Takeda, S. (2015, Nov 22). Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *J Neuromuscul Dis*, 2(4), 325-342. <https://doi.org/10.3233/JND-150106>

HYZEWICZ, J., Tanihata, J., Kuraoka, M., Nitahara-Kasahara, Y., Beylier, T., Ruegg, U. T., Vater, A., & Takeda, S. (2017, May). Low-Intensity Training and the C5a Complement Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation. *Am J Pathol*, 187(5), 1147-1161. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.12.019>

HYZEWICZ, J.; et al. Comparison of low-intensity endurance exercise and a moderate-intensity intermittent exercise in mdx mice. *The Journal of Physiological Sciences*, v. 67, p. S85-S86, 2017.

JACOBS, P. A., Hunt, P. A., Mayer, M., & Bart, R. D. (1981, Jul). Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet*, 33(4), 513-518. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7258185>

KHARRAZ, Y., Guerra, J., Pessina, P., Serrano, A. L., & Munoz-Canoves, P. (2014). Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res Int*, 2014, 965631. <https://doi.org/10.1155/2014/965631>

KIM, J. H., Kwak, H. B., Thompson, L. V., & Lawler, J. M. (2013, Feb). Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil*, 34(1), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10974-012-9330-9>

LANDISCH, R. M., Kosir, A. M., Nelson, S. A., Baltgalvis, K. A., & Lowe, D. A. (2008, Oct). Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by mdx mice. *Muscle Nerve*, 38(4), 1290-1303. <https://doi.org/10.1002/mus.21141>

LAPIDOS, K. A., Kakkar, R., & McNally, E. M. (2004, Apr 30). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*, 94(8), 1023-1031. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126574.61061.25>

- LINDSAY, A., Larson, A. A., Verma, M., Ervasti, J. M., & Lowe, D. A. (2019, Feb 1). Isometric resistance training increases strength and alters histopathology of dystrophin-deficient mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 126(2), 363-375. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00948.2018>
- MAREEDU, S., Million, E. D., Duan, D., & Babu, G. J. (2021). Abnormal Calcium Handling in Duchenne Muscular Dystrophy: Mechanisms and Potential Therapies. *Front Physiol*, 12, 647010. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.647010>
- MATSAKAS, A., Yadav, V., Lorca, S., & Narkar, V. (2013, Oct). Muscle ERRgamma mitigates Duchenne muscular dystrophy via metabolic and angiogenic reprogramming. *FASEB J*, 27(10), 4004-4016. <https://doi.org/10.1096/fj.13-228296>
- MCGEACHIE, J. K., Grounds, M. D., Partridge, T. A., & Morgan, J. E. (1993, Nov). Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci*, 119(2), 169-179. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(93\)90130-q](https://doi.org/10.1016/0022-510x(93)90130-q)
- MERCURI, E., Bonnemann, C. G., & Muntoni, F. (2019, Nov 30). Muscular dystrophies. *Lancet*, 394(10213), 2025-2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)
- MOENS, P., Baatsen, P. H., & Marechal, G. (1993, Aug). Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil*, 14(4), 446-451. <https://doi.org/10.1007/BF00121296>
- MOKRI, B., & Engel, A. G. (1975, Dec). Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*, 25(12), 1111-1120. <https://doi.org/10.1212/wnl.25.12.1111>
- MORGAN, J. E., Prola, A., Mariot, V., Pini, V., Meng, J., Hourde, C., Dumonceaux, J., Conti, F., Relaix, F., Authier, F. J., Tiret, L., Muntoni, F., & Bencze, M. (2018, Sep 7). Necroptosis mediates myofibre death in dystrophin-deficient mice. *Nat Commun*, 9(1), 3655. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06057-9>
- MOXLEY, R. T., 3rd, Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D. J., & Campbell, K. (2010, Sep). Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol*, 25(9), 1116-1129. <https://doi.org/10.1177/0883073810371004>
- NAKAE, Y., Stoward, P. J., Kashiya, T., Shono, M., Akagi, A., Matsuzaki, T., & Nonaka, I. (2004, Jun). Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J Mol Histol*, 35(5), 489-499. <https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000045947.83628.a7>
- NAKAMURA, A., Yoshida, K., Ueda, H., Takeda, S., & Ikeda, S. (2005, Jun 10). Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. *Biochim Biophys Acta*, 1740(3), 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.003>
- NORDGREN, M., & Fransen, M. (2014, Mar). Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie*, 98, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.026>
- OECKINGHAUS, A., & Ghosh, S. (2009, Oct). The NF-kappaB family of transcription factors

and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(4), a000034. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>

OHLENDIECK, K., & Campbell, K. P. (1991, Jun 3). Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS Lett*, 283(2), 230-234. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80595-t](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80595-t)

OKANO, T., Yoshida, K., Nakamura, A., Sasazawa, F., Oide, T., Takeda, S., & Ikeda, S. (2005, Aug). Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle Nerve*, 32(2), 191-199. <https://doi.org/10.1002/mus.20351>

POWERS, S. K. (2014, Nov). Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy? *Sports Med*, 44 Suppl 2(Suppl 2), S155-165. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0255-x>

RADLEY, H. G., & Grounds, M. D. (2006, Aug). Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol Dis*, 23(2), 387-397. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.03.016>

ROSENBERG, A. S., Puig, M., Nagaraju, K., Hoffman, E. P., Villalta, S. A., Rao, V. A., Wakefield, L. M., & Woodcock, J. (2015, Aug 5). Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med*, 7(299), 299rv294. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7322>

SACCO, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J. H., Artandi, S. E., & Blau, H. M. (2010, Dec 23). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, 143(7), 1059-1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.039>

SAREILA, O., Kelkka, T., Pizzolla, A., Hultqvist, M., & Holmdahl, R. (2011, Oct 15). NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal*, 15(8), 2197-2208. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3635>

SHAVLAKADZE, T., White, J., Hoh, J. F., Rosenthal, N., & Grounds, M. D. (2004, Nov). Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. *Mol Ther*, 10(5), 829-843. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.026>

TANABE, Y., Esaki, K., & Nomura, T. (1986). Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol*, 69(1-2), 91-95. <https://doi.org/10.1007/BF00687043>

TERRIL, J. R., Radley-Crabb, H. G., Iwasaki, T., Lemckert, F. A., Arthur, P. G., & Grounds, M. D. (2013, Sep). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*, 280(17), 4149-4164. <https://doi.org/10.1111/febs.12142>

TIDBALL, J. G., & Spencer, M. J. (2000, Jan). Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00095-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00095-3)

TIDBALL, J. G., Welc, S. S., & Wehling-Henricks, M. (2018, Sep 14). Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Compr Physiol*, 8(4), 1313-1356. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170052>

- TIIDUS, P. M. (2001, Nov). Oestrogen and sex influence on muscle damage and inflammation: evidence from animal models. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4(6), 509-513. <https://doi.org/10.1097/00075197-200111000-00008>
- TIIDUS, P. M., Holden, D., Bombardier, E., Zajchowski, S., Enns, D., & Belcastro, A. (2001, May). Estrogen effect on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(5), 400-406. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11405243>
- TRACHOOTHAM, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D., & Huang, P. (2008, Aug). Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 10(8), 1343-1374. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1957>
- TULANGEKAR, A., & Sztal, T. E. (2021, Oct 1). Inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy-Exploring the Role of Neutrophils in Muscle Damage and Regeneration. *Biomedicines*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101366>
- VERELLEN-DUMOULIN, C., Freund, M., De Meyer, R., Laterre, C., Frederic, J., Thompson, M. W., Markovic, V. D., & Worton, R. G. (1984). Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. *Hum Genet*, 67(1), 115-119. <https://doi.org/10.1007/BF00270570>
- VILQUIM, J. T., Brussee, V., Asselin, I., Kinoshita, I., Gingras, M., & Tremblay, J. P. (1998, May). Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle Nerve*, 21(5), 567-576. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199805\)21:5<567::aid-mus2>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199805)21:5<567::aid-mus2>3.0.co;2-6)
- WANG, W., & Ballatori, N. (1998, Sep). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev*, 50(3), 335-356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755286>
- WARD, C. W., Prosser, B. L., & Lederer, W. J. (2014, Feb 20). Mechanical stretch-induced activation of ROS/RNS signaling in striated muscle. *Antioxid Redox Signal*, 20(6), 929-936. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5517>
- WHITEHEAD, N. P., Yeung, E. W., & Allen, D. G. (2006, Jul). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(7), 657-662. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04394.x>
- ZOROV, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014, Jul). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94(3), 909-950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

ANEXO - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UNIFAL-MG)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **COMPARAÇÃO DO EFEITO DA NATAÇÃO E DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA EM CAMUNDONGOS MUTANTES DISTRÓFICOS MACHOS E FÊMEAS**, registrada com o nº **0023/2024**, sob a responsabilidade de **Tulio de Almeida Hermes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/12/2024 a 30/11/2026**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/10sccr	42	21	21	Biotério do departamento de anatomia
Roedor / C57bl/10-dmdmdx	42	21	21	Biotério do departamento de anatomia

Alfenas, 15 de Dezembro de 2025

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: b2d40b5b92f8df129e60302680b67db0