

PRISCILLA AVELINO FERREIRA PINTO

Efeito da associação da terapia celular e treino de baixa intensidade no músculo distrófico de camundongos *mdx*

São Paulo

2022

PRISCILLA AVELINO FERREIRA PINTO

Efeito da associação da terapia celular e treino de baixa intensidade em músculo distrófico de camundongo *mdx*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4192 FMVZ	Pinto, Priscilla Avelino Ferreira Efeito da associação da terapia celular e do treino de baixa intensidade no músculo distrófico de camundongo <i>mdx</i> / Priscilla Avelino Ferreira Pinto. – 2022. 84 f. : il. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2022. Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio. 1. Distrofia Muscular de Duchenne. 2. Célula tronco mesenquimal. 3. Treinamento físico. 4. Biologia molecular. 5. Morfologia muscular. I. Título.
-----------------	--

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da associação da terapia celular e treino de baixa intensidade no músculo distrófico de camundongo mdx", protocolada sob o CEUA nº 1275170118 (ID 005062), sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrósio e equipe; Priscilla Avelino Ferreira Pinto** - 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 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/06/2018.

We certify that the proposal "Effect of association of cell therapy and low intensity training on mdx mouse dystrophic muscle", utilizing 46 Isogenics mice (46 males), protocol number CEUA 1275170118 (ID 005062), under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrósio and team; Priscilla Avelino Ferreira Pinto** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/20/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2018](#) a [02/2022](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade:	4 a 5 semanas	N:	40
Linhagem:	C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J			Peso:	0 a 500 g		

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade:	4 a 11 semanas	N:	6
Linhagem:	C57BL/10			Peso:	0 a 500 g		

Local do experimento: Os experimentos serão realizados na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA), USP, Campus Pirassununga.

São Paulo, 10 de julho de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement | Reduction | Refinement



AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Efeito da associação da terapia celular e treino de baixa intensidade no músculo distrófico de camundongo mdx”*, registrado com o número do protocolo **001/2021**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Eduardo de Araujo**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontrase 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). O Protocolo foi **APROVADO ad referendum** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 27 de janeiro de 2021.

Colaboradores: Carlos Eduardo Ambrósio
Priscilla Avelino Ferreira Pinto
Matheus Ferreira de Almeida

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			27/01/2021 a 18/03/2025	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57BL/10ScSn-Dmdmdx	32	18g / 50 dias	Macho	CEMIB UNICAMP
Camundongo / C57BL/10	08	20g / 50 dias	Macho	CEMIB UNICAMP

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2021

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PINTO, Priscilla Avelino Ferreira

Título: **Efeito da associação da terapia celular e do treino de baixa intensidade no músculo distrófico de camundongo mdx**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Maria (*in memoriam*), que sempre me apoiou a seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, por ter me recebido tão prontamente em seu laboratório e ter aceitado me orientar neste projeto, agradeço por toda ajuda para desenvolver esta pesquisa e pela orientação nos meus momentos de desespero. Obrigada pela oportunidade e confiança Caju!

À Dra. Luciana Cristina Machado, por toda ajuda com a parte burocrática de compras e solicitação de manutenção de equipamentos, mas agradeço principalmente pela amizade, obrigada por todo apoio que sempre me deu Lú.

Ao Matheus, que mesmo em meio a uma pandemia se dispôs a viajar durante seis meses para me ajudar no meu experimento *in vivo* e por sempre perguntar “você quer um abraço” (risos) quando eu começava a chorar quando algo dava errado. Obrigada pela amizade e ajuda!

À Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins, por sempre se propor a me auxiliar quando precisei e por me permitir “morar” (risos) por um período no Laboratório de Imuno-histoquímica e Fisiologia Experimental (LIFE).

Ao Prof. Dr. João Eduardo Araújo, pela parceria para realizar este trabalho e se dispor em emprestar os equipamentos para que o experimento *in vivo* fosse realizado.

À médica veterinária Cleide Lúcia Araújo Silva e toda equipe do biotério do Hemocentro da FMRP pela ajuda com o manejo dos meus camundongos.

À Lina e Vitória, pela amizade e por me ensinarem tanto com as coletas e cultivo do saco vitelino.

À Profa. Dra. Thais Peixoto Gaiad, por ter me incentivado seguir no doutorado, pela amizade e pelas discussões sobre protocolos de treinamento dos animais.

À Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan, que sempre se dispôs em me auxiliar quando precisei.

À Cibele Maria Prado Zinni, por sempre me auxiliar no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e a Julia Cristina Benassi Bueno, pelo auxílio no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA).

Ao Renato Alves de Moraes, sempre muito solícito, na ajuda com a parte burocrática de prestação de contas.

Agradeço aos meus colegas do Grupo de Desenvolvimento de Terapias Inovadoras (GDTI), pela contribuição para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos no período inicial do meu doutorado (processo: 141177/2018-7) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos recebida na maior parte do meu doutorado (processo 2018/11752-7), fundamentais para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa.

À minha amiga Kelly, pela amizade e por sempre me receber com tanto carinho em sua casa em São Paulo e as amigas que fiz e compartilhei casa em Pirassununga, Maria, Jullia, Emelda, Eli, Alessandra e Camila, muito obrigada por todo apoio que sempre me deram.

À minha psicóloga Jenifer, pelo apoio fundamental para lidar com o luto e toda a demanda do final do doutorado.

Agradeço sobretudo a minha família, sem vocês eu nunca teria chegado até aqui. À minha avó, minhas primas e tios, por toda ajuda e amor. Aos meus irmãos Anilton, Amanda e Artur, meus sobrinhos Alysson e Emanuelle e meus cunhados, por sempre me apoiarem e me incentivarem.

Ao meu pai, Artur, por seu apoio incondicional, por ser meu exemplo de força e por todo seu amor.

E por fim, agradeço a minha mãe, Maria, por ter sido a melhor mãe que eu poderia ter, pelo seu amor incondicional e por ter lutado sempre pelos meus sonhos.

RESUMO

PINTO, PAF. **Efeito da associação da terapia celular e do treino de baixa intensidade no músculo distrófico de camundongo *mdx***. 2022. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética, ainda sem cura, que leva a degeneração muscular progressiva e processo inflamatório crônico. A terapia celular (TC) tem sido realizada, no entanto a viabilidade das células tem sido limitada pela presença de fibrose muscular e processo inflamatório. O treinamento físico de baixa intensidade (LIT) tem demonstrado reduzir áreas inflamatórias e fibrose intramuscular no músculo distrófico de camundongos *mdx*. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do LIT associado à TC com células tronco mesenquimais (CTM) no músculo distrófico de camundongos *mdx*. As CTM foram obtidas do saco vitelino canino, sendo cultivadas e caracterizadas por curva de crescimento, viabilidade celular, teste de unidade formadora de colônias e caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo. Foram utilizados 32 camundongos *mdx* machos, divididos aleatoriamente em 4 grupos: Grupo *mdxT*+TC – camundongos *mdx* treinados que receberam CTM; Grupo *mdxT* – camundongos *mdx* treinados; Grupo *mdxS*+TC – camundongos *mdx* sedentários que receberam CTM e Grupo *mdxS* – camundongos *mdx* sedentários. Também foi realizado um grupo controle com camundongos wild-type (Grupo WT), sem nenhuma intervenção. O protocolo de treinamento foi realizado em esteira horizontal à 9m/min, 2x/sem, 30min/dia, por 8 semanas. A TC foi realizada após 4 semanas de treinamento, por via intramuscular no músculo quadríceps femoral (QD). Foram realizados testes funcionais *in vivo*. Foi realizada análise da porcentagem de fibras com núcleo central e porcentagem de área de fibrose intramuscular dos músculos QD, tibial cranial, gastrocnêmio e diafragma. Além disso, também foi realizada a análise da expressão das citocinas inflamatórias IL1, IL4, IL6 e TNF α e marcadores relacionados a regeneração muscular IGF β , TGF β e MyoD por RT-qPCR. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos distróficos para os testes funcionais, sendo estatisticamente diferentes do grupo WT. Não houve diferença estatística entre os grupos distróficos quanto a porcentagem de fibras com núcleo central, sendo estatisticamente diferentes do grupo WT. Quanto a porcentagem de área de fibrose intramuscular, o grupo *mdxT*+TC apresentou menor área em relação

ao grupo *mdxS* no músculo QD, e menor área que o grupo *mdxT* no músculo gastrocnêmio. No entanto, os grupos treinados apresentaram maior área em comparação com os grupos sedentários no músculo tibial cranial. Não houve diferença no percentual de área de fibrose dos grupos distróficos no diafragma. Com base nos resultados encontrados, a associação terapêutica proposta, foi capaz de reduzir o percentual de área de fibrose intramuscular no músculo QD em comparação ao grupo sedentário, que não recebeu as CTM, além de ter apresentado uma menor área de fibrose que o grupo treinado sem TC no músculo gastrocnêmio, mostrando um possível efeito parácrino das CTM no músculo próximo à aplicação. Além disso, os animais treinados que receberam a terapia celular, não apresentaram diferença estatística do grupo que recebeu terapia celular e se mantiveram sedentários, respaldando que a associação de treinamento físico de baixa intensidade não foi capaz de alterar negativamente o efeito da terapia celular.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne. Célula tronco mesenquimal. Treinamento Físico. Biologia Molecular. Morfologia muscular.

ABSTRACT

PINTO, PAF. **Effect of the association of cell therapy and low-intensity training on the dystrophic muscle of mdx mice.** 2022. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic disorder, still incurable, that leads to progressive muscle degeneration and chronic inflammatory process. Cell therapy (CT) has been performed; however, cell viability has been limited by the presence of muscle fibrosis and inflammatory process. Low-intensity training (LIT) has been shown to reduce inflammatory areas and intramuscular fibrosis in the muscle of mdx mice. Thus, the objective was to evaluate the effect of LIT associated with CT with mesenchymal stem cells (MSC) in the dystrophic muscle of mdx mice. MSCs were obtained from the canine yolk sac, cultured, and characterized by growth curve, cell viability, colony-forming unit test, and immunophenotypic characterization by flow cytometry. Thirty-two male mdx mice were randomly divided into 4 groups: *mdxT*+CT group – trained *mdx* mice that received MSC; *mdxT* group – trained *mdx* mice; *mdxS*+CT group – sedentary *mdx* mice that received MSC; and *mdxS* group – sedentary *mdx* mice. A control group with wild-type mice (WT group) was also performed, without any intervention. The training protocol was performed on a horizontal treadmill at 9m/min, 2x/week, 30min/day, for 8 weeks. CT was performed after 4 weeks of training, intramuscularly in the quadriceps femoris muscle (QD). In vivo functional tests were performed. Morphometric analysis of the percentage of fibers with central core and percentage of the area of intramuscular fibrosis of the QD, cranial tibial, gastrocnemius, and diaphragm muscles were performed. In addition, we also analyzed the expression of inflammatory cytokines IL1, IL4, IL6 and TNF α and markers related to muscle regeneration IGF β , TGF β and MyoD by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). No statistical difference was found between the dystrophic groups for the functional tests, being statistically different from the WT group. There was no statistical difference between the dystrophic groups regarding the percentage of fibers with central core, being statistically different from the WT group. As for the percentage of area of intramuscular fibrosis, the *mdxT*+CT group had a smaller area compared to the *mdxS* group in the QD muscle, and a smaller area than the *mdxT* group in the gastrocnemius muscle. However, the trained groups had a larger area compared to

the sedentary groups in the cranial tibialis muscle. There was no difference in the percentage of fibrosis area of the dystrophic groups in the diaphragm. Based on the results found, the proposed therapeutic association was able to reduce the percentage of intramuscular fibrosis area in the QD muscle compared to the sedentary group, which did not receive MSCs, in addition to having a smaller area of fibrosis than the trained group. without CT in the gastrocnemius muscle, showing a possible paracrine effect of MSCs in the muscle close to the application. In addition, the trained animals that received cell therapy showed no statistical difference from the group that received cell therapy and remained sedentary, supporting that the association of low-intensity physical training was not able to negatively alter the effect of cell therapy.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy. Mesenchymal stem cell. Physical training. Molecular biology. Muscle morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Complexo Distrofina-glicoproteínas	22
Figura 2 - Esquema do isolamento do SV canino	34
Figura 3 - Esquema do protocolo da viabilidade celular	35
Figura 4 – Esquema do protocolo experimental <i>in vivo</i>	41
Figura 5 - Aplicação das células tronco, treinamento físico e testes funcionais	42
Figura 6 - Isolamento do saco vitelino canino, cultivo e caracterização celular	49
Figura 7 - Diferenciação <i>in vitro</i>	50
Figura 8 - Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo.....	51
Figura 9 - Expressão gênica de marcadores de membrana por RT-qPCR	52
Figura 10 - Análise da fluorescência das células tronco <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	53
Figura 11 Teste de bioluminescência <i>in vitro</i>	54
Figura 12 - Peso e avaliação funcional dos grupos.....	55
Figura 13 - Imunolocalização da proteína distrofina no músculo quadríceps femoral	56
Figura 14 - Morfologia muscular por HE.....	57
Figura 15 - Análise morfométrica do número de fibras com núcleo central.....	58
Figura 16 - Morfologia muscular destacando tecido fibroso	59
Figura 17 - Análise morfométrica do percentual de fibras colágenas na fibrose muscular.....	60
Figura 18 - Análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias	61
Figura 19 - Análise da expressão gênica dos marcadores de regeneração muscular	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio de cultura usado para cultivar as células tronco do SV derivado de cão	34
Tabela 2 - Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das células do SV canino	38
Tabela 3 - Primers utilizados para avaliar a expressão gênica de células tronco derivadas do SV canino	39
Tabela 4 – Sequência dos primers das citocinas inflamatórias e marcadores relacionados a regeneração muscular	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	20
	2.1 Objetivo geral	20
	2.2 Objetivos específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
	3.1 MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO	21
	3.1.1 Complexo distrofina-glicano proteínas	21
	3.1.1.1 Distrofina	22
	3.1.2 Regeneração muscular	23
3.2	Distrofia muscular de duchenne	23
	3.2.1 Sinais clínicos	24
	3.2.2 Fisiopatologia	25
	3.2.3 Reparo muscular na DMD	25
	3.2.4 Modelos Animais	26
	3.2.5 Terapias para DMD	27
	3.2.5.1 Terapia gênica e farmacológica	28
	3.2.5.2 Terapia celular	30
	3.2.5.3 Fisioterapia e treinamento de baixa intensidade	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
	4.1 Experimento 1 - Isolamento e cultivo de células do saco vitelino (SV) canino	33
	4.1.1 Isolamento celular	33
	4.1.2 Caracterização celular	34
	4.1.2.1 Viabilidade Celular	35
	4.1.2.2 Curva de crescimento	36
	4.1.2.3 Unidade Formadora de Colônias fibroblastóide (UFC-F)	36
	4.1.2.4 Diferenciação <i>in vitro</i>	36

4.1.2.5	Caracterização imunofenotípica	37
4.1.2.6	Análise da expressão gênica de marcadores de membrana	38
4.2	Experimento 2 – Efeito da terapia celular com CTM derivados de SV associada ao LIT em camundongos <i>mdx</i>	40
4.2.1	Animais e Grupos experimentais	40
4.2.2	Protocolo de treinamento	41
4.2.3	Protocolo de aplicação das células tronco	42
4.2.4	Avaliações Funcionais	43
4.2.4.1	Rotarod running	43
4.2.4.2	Teste de suspensão com dois membros	43
4.2.5	Coleta de material biológico	44
4.2.6	Análise da localização e expressão da proteína distrofina	44
4.2.7	Análise morfológica e morfométrica do tecido muscular	45
4.2.7.1	Análise de fibras com núcleo central	45
4.2.7.2	Análise de área de fibrose intramuscular	45
4.2.8	Análise de citocinas inflamatórias	46
4.2.9	Análise de marcadores ligados a regeneração muscular	46
4.2.10	Análises dos dados	47
5	RESULTADOS	48
5.1	Experimento 1 - Isolamento e cultivo de células do saco vitelino (SV) canino	48
5.1.1	Isolamento, cultivo e caracterização celular	48
5.1.1.1	Diferenciação <i>in vitro</i>	48
5.1.1.2	Caracterização imunofenotípica	51
5.1.1.3	Análise da expressão gênica dos marcadores de membrana	51
5.1.2	Avaliação da migração das células <i>in vivo</i>	52
5.2	Experimento 2 – Efeito da terapia celular com CTM derivados de SV associada ao LIT em camundongos <i>mdx</i>	54
5.2.1	Avaliações Funcionais	54

5.2.2	Análise da localização da proteína distrofina	56
5.2.3	Análise morfológica e morfométrica do tecido muscular	56
5.2.4	Análise de citocinas inflamatórias	60
5.2.5	Análise de marcadores ligados a regeneração muscular	62
6	DISCUSSÃO	64
6.1	Experimento 1 - Isolamento e cultivo de células do saco vitelino (SV) canino	64
6.1.1	Morfologia celular, Curva de crescimento e UFC-F	64
6.1.2	Diferenciação celular <i>in vitro</i>	65
6.1.3	Imunofenotipagem e Análise da expressão gênica	65
6.1.4	Análise de Bioluminescência <i>in vivo</i>	67
6.2	Experimento 2 – Efeito da terapia celular com CTM derivados de SV associada ao LIT em camundongos <i>mdx</i>	68
6.2.1	Testes Funcionais	68
6.2.2	Análise de fibras com núcleo central e área de fibrose intramuscular	70
6.2.3	Análise de citocinas inflamatórias e marcadores de regeneração muscular	72
7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A DMD é uma doença neuromuscular progressiva, ligada ao cromossomo X, de caráter recessivo, causada pela mutação no gene da proteína distrofina, levando à ausência de proteína distrofina na membrada das fibras musculares esqueléticas e cardiomiócitos (BELLO; PEGORARO, 2019; MACKINTOSH; CHEN; BENDITT, 2020). A proteína distrofina possui função estrutural e sua ausência causa constantes ciclos de degeneração/regeneração muscular, levando a uma substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo e presença de processo inflamatório crônico (SERRANO; MÚÑOZ-CÁNOVES, 2017; BABBS et al., 2020; MACKINTOSH; CHEN; BENDITT, 2020).

A DMD afeta cerca de 1 em 5.000 nascidos vivos do sexo masculino, com início dos sinais clínicos na infância, aproximadamente aos cinco anos de idade (SUN et al., 2020c; SWIDERSKI; LYNCH, 2021). Devido a fraqueza muscular progressiva, ocorre a morte prematura dos indivíduos com DMD, geralmente devido a insuficiência respiratória ou devido a cardiomiopatia (BELLO; PEGORARO, 2019).

As pesquisas utilizando modelos animais têm trazido acréscimos importantes para novas terapias para DMD (KERKIS et al., 2008; COSSU et al., 2016; GAIAD et al., 2017; WASALA; CHEN; DUAN, 2020), sendo o modelo do camundongo da Distrofia Muscular ligada ao X (*mdx*) um dos mais utilizado, para estudos com terapia gênica, farmacológica, celular e física (WASALA; CHEN; DUAN, 2020; SWIDERSKI; LYNCH, 2021).

Visto que a restauração completa da proteína distrofina, e conseqüente cura da DMD, ainda está distante, terapias que visem retardar a progressão da doença e preservar a integridade das fibras musculares estão sendo desenvolvidas. Dentre as terapias utilizadas, a terapia celular tem apresentado resultados positivos para a manutenção da integridade das fibras musculares e redução da fibrose no tecido muscular (COSSU et al., 2016; BIER et al., 2018; SUN et al., 2020c). Estudos utilizando células tronco mesenquimais (CTM) já foram realizados, mostrando uma redução de marcadores inflamatórios e fibrose intramuscular, visto a conhecida característica destas células de imunomodulação (BIER et al., 2018). No entanto, acredita-se que a presença de fibrose muscular e do processo inflamatório crônico pré-existente no músculo distrófico, resultam em uma menor eficiência do enxerto

(COSSU et al., 2015). Deste modo, torna-se necessário entender como viabilizar ou potencializar os efeitos da terapia celular para atingir um maior número de fibras musculares.

Sabe-se que indivíduos treinados, apresentam adaptações musculares em resposta ao acúmulo das sessões de exercício, onde as repetidas contrações musculares promovem adaptações moleculares nos músculos exercitados, apresentando diminuição de marcadores inflamatórios e aumento de fatores regulatórios da miogênese (EGAN; ZIERATH, 2013; ABREU; LEAL-CARDOSO; CECCATTO, 2017). Estudos investigando o treinamento físico de baixa intensidade (*low intensity training* - LIT) em camundongos *mdx* encontraram resultados benéficos, como de melhora nos parâmetros fisiológicos, onde camundongos *mdx* treinados apresentaram uma redução dos níveis dos marcadores de estresse oxidativo (KACZOR et al., 2007; FERNANDES et al., 2019), redução de citocinas inflamatórias (HYZEWICZ et al., 2017) e foi capaz de modular proteínas envolvidas na defesa do estresse oxidativo (FONTANA et al., 2015). Camundongos *mdx* treinados também apresentam uma diminuição de áreas necróticas e infiltrados inflamatórios após treinamento (FRINCHI et al., 2014), além de apresentar uma menor área de fibrose intramuscular (GAIAD et al., 2017; PINTO et al., 2018; MORAIS et al., 2020).

Deste modo, acredita-se que o LIT seja capaz de aumentar a eficácia da terapia celular e a combinação terapêutica seja capaz de diminuir as complicações musculares desta grave doença degenerativa, fazendo-se necessários estudos que visem sua associação no músculo distrófico. Além disso, faz-se necessário conhecer o efeito do treinamento físico associado com a terapia celular, uma vez que os tratamentos com edição gênica, mediados por células, tem demonstrado corrigir parcialmente a distrofina, resultando em um fenótipo semelhante a Distrofia Muscular de Becker, podendo levar a uma maior funcionalidade dos pacientes, necessitando assim de uma melhor compreensão sobre o efeito do treinamento físico combinado com a terapia celular (KOSTEK, 2019).

Dentro do exposto, este estudo tem como hipótese que o treinamento físico de baixa intensidade em esteira horizontal associado à terapia celular com células tronco mesenquimais reduz a degeneração muscular e mantém a integridade da fibra muscular distrófica em modelo de camundongos *mdx*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da associação do treinamento físico de baixa intensidade com a terapia celular no músculo distrófico de camundongos *mdx*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, cultivar e caracterizar células tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino (SV) canino;
- Realizar o rastreamento de células tronco mesenquimais derivadas do SV canino *in vivo* em camundongos;
- Avaliar o efeito da combinação terapêutica com terapia celular e treinamento físico de baixa intensidade, na restauração da proteína distrofina de camundongos *mdx*;
- Avaliar os testes funcionais de Rotarod e teste de suspensão de dois membros, de camundongos *mdx* que realizaram, ou não, a associação terapêutica com treinamento físico de baixa intensidade e terapia celular;
- Avaliar a porcentagem de fibras musculares com núcleo central e percentual de área de fibrose intramuscular de camundongos *mdx* que realizaram, ou não, a associação terapêutica com treinamento físico de baixa intensidade e terapia celular;
- Avaliar a expressão gênica dos marcadores inflamatórios IL1, IL4, IL6, IL10 e TNF α nos camundongos *mdx* que realizaram, ou não, a associação terapêutica com treinamento físico de baixa intensidade e terapia celular.
- Avaliar a expressão gênica dos marcadores relacionados à miogênese IGF β , TGF β e MyoD, nos camundongos *mdx* que realizaram, ou não, a associação terapêutica com treinamento físico de baixa intensidade e terapia celular.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O músculo estriado esquelético é a maior massa de tecido do organismo, representa cerca de 40-45% da massa total no corpo humano e é fundamental para o movimento, sendo originados dos somitos (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; CHAL; POURQUIE, 2017; LIU et al., 2018; YIN et al., 2021). É formado por tecido muscular e tecido conjuntivo denso e possui a capacidade de transformar a energia química em mecânica durante as contrações musculares.

Os músculos esqueléticos originam-se do mesoderma paraxial, sendo dentro dos somitos que a miogênese esquelética é iniciada, as células somíticas do mesoderma se especificam em mioblastos, células musculares uninucleadas, sendo o principal fator relacionado o Pax3. Posteriormente, os mioblastos se unem formando os miocitos, sendo os fatores de regulação miogênica *Myf5 (Myogenic fator 5)* e *MyoD (Myoblast determination protein)* os principais fatores de regulação desta fase. Essas células uninucleares então se fundem, por regulação principal da miogenina, dando origem aos miotubos imaturos, que são células multinucleadas alongadas com núcleo ainda centralizado e posteriormente se diferenciam em fibras musculares multinucleadas com núcleos periféricos (SILVA; CARVALHO, 2007; CHAL; POURQUIE, 2017).

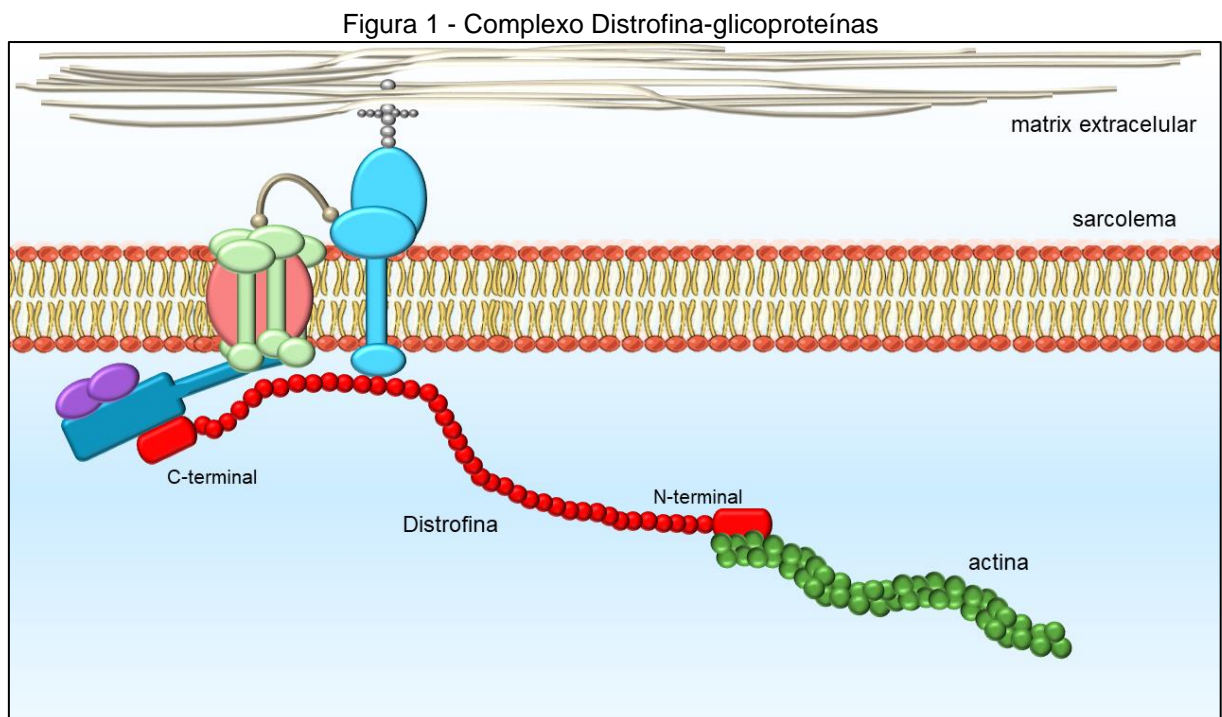
3.1.1 Complexo distrofina-glicano proteínas

O complexo distrofina-glicanoproteínas (DGC) possui função estrutural e estabiliza o sarcolema durante a contração muscular, além de estar envolvido na sinalização das células musculares (BABBS et al., 2020; WASALA; CHEN; DUAN, 2020). O complexo DGC liga o sarcolema aos filamentos de actina e alterações nas proteínas deste complexo estão relacionadas com as distrofias musculares (VAINZOF; ZATZ, 2003).

3.1.1.1 Distrofina

A maior proteína do DGC é a proteína distrofina, uma proteína citoplasmática que possui o maior gene do genoma humano e está localizada imediatamente abaixo do sarcolema e conecta à matriz extracelular com o citoesqueleto interno nas fibras musculares (GUIRAUD; DAVIES, 2017; BABBS et al., 2020; WASALA; CHEN; DUAN, 2020; ZABŁOCKA; GÓRECKI; ZABŁOCKI, 2021; ERKUT; YOKOTA, 2022).

A distrofina conecta os filamentos de actina, na região N-terminal, ao complexo DGC no sarcolema, região C-terminal (Fig. 1), mantendo da estabilidade estrutural nas fibras musculares durante a contração, no entanto, quando a distrofina está ausente na miofibrila, não ocorre a fixação adequada do complexo DGC, resultando em uma instabilidade e rompimento do sarcolema durante as contrações (GUIRAUD; DAVIES, 2017; ZABŁOCKA; GÓRECKI; ZABŁOCKI, 2021).



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Complexo Distrofina-glicoproteínas (DGC). Distrofina (representada em vermelho) com a região C-terminal associado ao complexo DGC, no sarcolema e a região N-terminal da distrofina associada ao filamento de actina (representado em verde).

3.1.2 Regeneração muscular

Durante a miogênese, as células se diferenciam para gerar as fibras musculares, no entanto, algumas células permanecem indiferenciadas e quiescentes, sendo denominadas de células satélites (CS), que receberam esse nome por ficarem na periferia das fibras musculares, na lâmina basal (SILVA; CARVALHO, 2007; PIGA et al., 2019).

O músculo esquelético saudável, após um processo de lesão, possui a capacidade de se reparar, devido às CS. Estas células quiescentes estão localizadas na periferia das fibras musculares, podendo ser ativadas em resposta a estímulos, como o trauma (PIGA et al., 2019). Quando ativadas, elas se proliferam e expressam marcadores miogênicos. Na regeneração muscular, as CS se fundem as fibras musculares para regeneração da fibra muscular. Ao final da regeneração muscular, os núcleos das novas fibras musculas se assemelham morfológica e funcionalmente às antigas (CHAL; POURQUIE, 2017; DELANEY et al., 2017; PIGA et al., 2019; YIN et al., 2021).

3.2 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Dentre as doenças neuromusculares, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma das mais severas das distrofias musculares da infância, e acomete aproximadamente 1 a cada 5000 nascimentos masculinos, sendo a principal doença muscular hereditária da infância (AL-KHALILI SZIGYARTO, 2020; SUN et al., 2020c; VAN DOMMELEN et al., 2020; ERKUT; YOKOTA, 2022). É uma doença muscular progressiva, de caráter recessivo ligado ao cromossomo X, que causa a ausência total da proteína distrofina (PIGA et al., 2019; HOEPERS et al., 2020).

A maior parte das mutações na distrofina acontecem “*out of frame*”, ocasionando a ausência da proteína distrofina, no entanto, nos casos em que acontecem mutações “*in-frame*” que resultam na produção de uma proteína distrofina truncada, mas parcialmente funcional, resultando na Distrofia Muscular de Becker (DMB) (GUIRAUD; DAVIES, 2017; WASALA; CHEN; DUAN, 2020). A DMB tem uma incidência de 1 em 30.000 homens, com início do quadro clínico mais tardio. Devido

a distrofina estar parcialmente preservada na DMB, a progressão é mais lenta e variável (BELLO; PEGORARO, 2019; WASALA; CHEN; DUAN, 2020).

A gravidade dos sinais clínicos varia de acordo com as mutações no gene da distrofina, no entanto, os sinais clínicos geralmente começam ainda em fase pré-escolar, com atraso nos marcos motores, progredindo com gradual perda de força e função motora, resultando em perda da locomoção independente entre 8 e 14 anos de idade. Com os avanços nas terapias de suporte, a expectativa de vida aumentou para aproximadamente 40 anos de idade, para pacientes em uso de suporte respiratório (MACKINTOSH; CHEN; BENDITT, 2020; ERKUT; YOKOTA, 2022).

3.2.1 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da doença têm início ainda na primeira infância, geralmente ainda na idade pré-escolar (ZABŁOCKA; GÓRECKI; ZABŁOCKI, 2021), sendo o declínio da força e a atrofia do músculo esquelético os principais sinais, acometendo inicialmente os músculos posturais proximais e membros inferiores e gerando uma pseudo-hipertrofia da panturrilha, resultante do aumento de tecido adiposo (BARNABEI et al., 2011; PIGA et al., 2019; MACKINTOSH; CHEN; BENDITT, 2020)

Devido a característica progressiva da DMD, a progressiva fraqueza muscular resulta na perda da marcha independente com aproximadamente 12 anos de idade, sendo necessário o uso de suporte ventilatório não invasivo para a insuficiência respiratória entre os 18 a 20 anos de idade (BABBS et al., 2020; MACKINTOSH; CHEN; BENDITT, 2020). Também tem sido relatados déficits cognitivos e comorbidade psiquiátrica em meninos com DMD, possivelmente devido à alterações da distrofina expressa no cérebro (VAN DOMMELEN et al., 2020).

Atualmente, com os avanços das terapias farmacológicas e com a assistência ventilatória, a expectativa de vida tem sido além dos 40 anos de idade e o óbito dos pacientes é devido a insuficiência respiratória ou cardíaca (MACKINTOSH; CHEN; BENDITT, 2020; ERKUT; YOKOTA, 2022).

3.2.2 Fisiopatologia

A ausência da distrofina funcional compromete a função mecânica e de sinalização celular. Como consequência, as células musculares sofrem uma cascata de eventos patogênicos, como a ativação de citocinas pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial, que levam à degeneração, necrose, inflamação e substituição do músculo por tecidos fibrogordurosos (GUIRAUD; DAVIES, 2017; CAMPS et al., 2020).

A perda de distrofina compromete a função mecânica e de sinalização celular, uma vez que, sua ausência na fibra muscular provoca, dentre outras alterações, o enfraquecimento do sarcolema, uma vez que é este complexo proteico que suporta a tensão mecânica da fibra, tornando-o frágil, especialmente durante atividade contrátil intensa (PIGA et al., 2019; BABBS et al., 2020; WASALA; CHEN; DUAN, 2020), gerando recorrentes ciclos de degeneração/regeneração devido a fragilidade da fibra muscular às contrações musculares e aumenta a permeabilidade do sarcolema ao cálcio extracelular (SERRANO; MÚÑOZ-CÁNOVES, 2017; PIGA et al., 2019).

Atualmente, acredita-se que, além das alterações patológicas decorrentes da fragilidade da miofibra pela ausência da distrofina, a patogênese da DMD também está relacionada a anormalidades e divisão assimétrica nas células satélites (SUN et al., 2020a).

3.2.3 Reparo muscular na DMD

Neste processo de reparo muscular, alguns marcadores vistos frequentemente são o MyoD, marcador para as células satélite ativadas, o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), relacionado a proliferação das células satélite e o fator de crescimento tumoral β 1 (TGF- β 1), envolvido na inibição da diferenciação de mioblastos e na formação do tecido conjuntivo (CHAL; POURQUIE, 2017; DELANEY et al., 2017).

Em músculos distróficos a constante degeneração muscular ativa CS para formar uma nova fibra muscular, entretanto estas células não conseguem suprir os constantes ciclos de degeneração/regeneração, levando a uma substituição do tecido muscular por tecido adiposo e fibroso, além do processo inflamatório crônico presente na DMD aumentar as citocinas inflamatórias TNF α e IL1 β , resultando na repressão da

expressão de MyoD (SERRANO; MÚÑOZ-CÁNOVES, 2017; PIGA et al., 2019; BABBS et al., 2020; SUN et al., 2020b).

A regulação das CS tem sido demonstrada pela via Wnt-TGF β , no entanto, no músculo distrófico há níveis aumentados de Wnt3 e TGF β favorecendo a diferenciação fibrogênica e impedindo o desenvolvimento miogênico, resultando em perda de massa muscular progressiva nos pacientes com DMD acompanhado pelo desenvolvimento da fibrose muscular (DELANEY et al., 2017; SUN et al., 2020b).

Além disso, foi demonstrado que a proporção de células que constituem o tecido muscular se difere em indivíduos saudáveis e com distrofia muscular. Essa alteração na proporção das células está relacionada com as células intersticiais (ISC - *interstitial stem cells*), sendo encontrado grande quantidade de ISC relacionadas a via de TGF β (ISC tipo III) em indivíduos distróficos e reduzida população de ISC tipo II, relacionada com a regulação do tecido adiposo. Sabe-se que no músculo saudável, as ISC tipo II evitam o aumento de tecido adiposo, no entanto, no músculo distrófico encontram-se diminuídas, não sendo capaz de regular corretamente a adipogênese, ocorrendo o aumento de adipócitos no tecido muscular (CAMPS et al., 2020).

Além disso, no músculo distrófico também acontece o aumento da fibrose intramuscular decorrente da tentativa de regeneração muscular ineficiente e traduz a perda da função muscular. Ainda que a causa da fibrose não esteja completamente estabelecida, sabe-se que sua presença no tecido muscular está associada à perda de função, devido à conseqüente perda da flexibilidade e dificuldade de vascularização ocasionada por sua presença no tecido, o que dificulta a regeneração muscular (ALEXAKIS; PARTRIDGE; BOU-GHARIOS, 2007; SUN et al., 2020a). Além disso, o processo de degeneração muscular e regeneração contínuo também provaram o aumento da heterogeneidade de tamanho da fibra muscular e grande proporção de fibras musculares com núcleo central, observadas em corte transversal (BRIGUET et al., 2004).

3.2.4 Modelos Animais

As pesquisas utilizando modelos animais para a DMD têm trazido acréscimos importantes, sendo amplamente utilizados para elucidar a patologia e desenvolver novas terapias, sendo os principais modelos murino de camundongo de Distrofia

Muscular ligada ao X (*mdx*) e modelo canino de distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) (WASALA; CHEN; DUAN, 2020).

O camundongo *mdx*, possui a mutação espontânea no exon do gene *dmd*, resultando na ausência da proteína distrofina, e tem sido utilizado desde 1984 (WASALA; CHEN; DUAN, 2020; SWIDERSKI; LYNCH, 2021). O camundongo *mdx* possui homologia genética e bioquímica aos indivíduos com DMD, no entanto a evolução da doença é mais lenta, sendo considerada uma degeneração muscular moderada, e seguida por uma significativa regeneração dos membros pélvicos, no entanto, o músculo diafragma deste camundongo apresenta semelhança na progressão e no fenótipo da DMD em humanos (VAINZOF et al., 2008; WILLMANN et al., 2012; SWIDERSKI; LYNCH, 2021).

Devido ao modelo *mdx* não apresentar severa degeneração dos músculos dos membros, outros modelos de camundongos distróficos foram desenvolvidos, como o modelo de camundongos *mdx* com duplo knockout para distrofina/utrofina (*dko*) e o modelo de camundongo *D2.mdx*, no entanto, estes modelos ainda não são comumente utilizados, devido à dificuldade de estabelecer colônias, a falta de conhecimento da história natural da doença nestes linhagens, além de camundongos duplo knockout gerarem uma dificuldade de transpor os dados para humanos, uma vez que estes não apresentam a mutação no segundo gene (WASALA; CHEN; DUAN, 2020; SWIDERSKI; LYNCH, 2021).

Apesar do modelo *mdx* ter um fenótipo moderado, é o mais utilizado, visto que suas medidas de desempenho já são padronizadas, permitindo uma comparação dos resultados entre diferentes grupos de pesquisas no mundo, sendo indispensável para estudos pré-clínicos, uma vez que pode ser facilmente manejado e reproduzido, além de um maior número de reagentes serem desenvolvidos para modelo murino em comparação com o modelo canino (MANNING; O'MALLEY, 2015; WASALA; CHEN; DUAN, 2020).

3.2.5 Terapias para DMD

Desde 1987 diversas pesquisas, com diferentes estratégias terapêuticas, vêm sendo realizadas, estudos promissores com o uso de terapia celular, genética e fármacos têm sido relatados na literatura, no entanto, nenhuma terapia foi capaz de

restaurar completamente a proteína distrofina (BABBS et al., 2020; SUN et al., 2020c, 2020a), deste modo, terapias de suporte que visem prevenir a perda de função, com o objetivo de retardar a degradação muscular também são recomendadas (GRAGES; BELL; BERLAU, 2020).

3.2.5.1 Terapia gênica e farmacológica

O tratamento farmacológico para a DMD inicialmente foi proposto visando reduzir os danos musculares secundários à ausência da distrofina, já sendo bem estabelecido o uso de corticosteroides, sendo os mais recomendados a prednisona ou deflazacort, pela ação antiinflamatórias, proporcionando melhora da força, aumento a função pulmonar e retarda a perda da marcha independente (GUIRAUD; DAVIES, 2017; GRAGES; BELL; BERLAU, 2020). No entanto, com a evolução das pesquisas, atualmente também tem sido utilizada a terapia farmacológica com o objetivo de corrigir o defeito primário na proteína distrofina (GUIRAUD; DAVIES, 2017).

Terapias gênica para a entrega de distrofina ou o uso de pequenas moléculas para aumentar os níveis de distrofina estão sendo desenvolvidos, no entanto, devido ao tamanho da proteína distrofina, as terapias não apresentaram grandes melhoras funcionais, visto que se estima que seja necessária a restauração de 5 a 15% dos níveis normais de distrofina para que sejam identificados efeitos funcionais (BABBS et al., 2020).

Em pacientes com DMB, que possuem mutações DMD in-frame frequentemente apresentam fenótipos mais leves, o salto de éxon foi proposto para restaurar a marcha independente e melhorar alguns sintomas em pacientes com DMD, por meio de oligonucleotídeos antisense, semelhantes a uma fita simples de ácido nucleico, sintético e curto que podem se ligar ao mRNA de uma maneira específica do local e modular o splicing (ERKUT; YOKOTA, 2022).

O Exondys51 (eteplirsén), da Sarepta Therapeutics, tem sido utilizada em pacientes que apresentam mutação conhecida no éxon 51, uma vez que é um oligonucleotídeo antisense específico para o éxon 51 do gene DMD, aproximadamente 14% dos pacientes com DMD (GUIRAUD; DAVIES, 2017; GRAGES; BELL; BERLAU, 2020). No entanto, terapias com oligonucleotídeos

antisense apresentam efeito transitório, sendo necessário repetir a terapia, gerando um alto custo com aplicações semanais. Além disso, não foi demonstrada melhora clínica nos estudos realizados (GRAGES; BELL; BERLAU, 2020; ERKUT; YOKOTA, 2022).

Outro fármaco utilizado visando restaurar a proteína distrofina, tem sido o Ataluren (também recebe o nome comercial de Translarna™), da PTC Therapeutics, e é indicado para tratamento de pacientes com mutação *nonsense*, cerca de 10-15% dos casos de pacientes com DMD. No entanto, não mostraram efeitos no músculo cardíaco e aplicável a todos os pacientes com DMD, ainda sendo necessários novos estudos (GUIRAUD; DAVIES, 2017; GRAGES; BELL; BERLAU, 2020).

Sabe-se que a proteína distrofina possui o maior gene do genoma humano, porém, foi identificado que as principais regiões responsáveis por manter a função da proteína e estabilizar o sarcolema, são as regiões terminais N e C, enquanto que sua haste central possui repetições que não são essenciais, podendo ser encurtadas, deste modo (BABBS et al., 2020; ASLESH; ERKUT; YOKOTA, 2021).

Terapias gênicas têm tentado disponibilizar formas mais curtas de distrofina, as chamadas microdistrofinas, onde são mantidas as regiões terminais N e C e sendo dispensada a porção do domínio central por meio da técnica de CRISPR/Cas9 entregue por um vírus adeno-associado, no entanto, alguns pacientes apresentam imunidade a vetores virais, além disso, o tratamento não persiste após a replicação e divisão da célula (BABBS et al., 2020; GRAGES; BELL; BERLAU, 2020; SUN et al., 2020b; ERKUT; YOKOTA, 2022).

Na revisão realizada sobre terapias gênicas para DMD, Babbs e colaboradores (2020) acreditam que uma nova terapia que possa melhorar a qualidade de vida dos pacientes pode ser desenvolvida dentro de 5 a 10 anos, no entanto, ainda existem desafios, como a resposta imune após repetidas aplicações virais e a idade em que a terapia deve ser iniciada. Deste modo, ainda se faz necessárias terapias que possibilitem uma melhor qualidade de vida desses indivíduos e manutenção da integridade das fibras musculares.

3.2.5.2 Terapia celular

A terapia celular vem sendo desenvolvida, com o objetivo de manutenção da função e integridade das fibras musculares (SUN et al., 2020a). A terapia celular, na DMD, objetiva gerar novas fibras musculares com a presença da proteína distrofina funcional, para isso, células de indivíduos não distróficos ou modificadas geneticamente, são utilizadas (COSSU et al., 2016; SASAKI et al., 2018; SUN et al., 2020a).

Os mioblastos foram a primeira linhagem celular utilizadas com o objetivo da regeneração muscular devido a capacidade destas células de se diferenciarem em linhagens musculares associada à sua capacidade de autorrenovação, fazendo com que diversas pesquisas utilizando mioblastos e células satélites fossem desenvolvidas para o tratamento de doenças neuromusculares (PIGA et al., 2019; SUN et al., 2020a).

Resultados positivos já foram vistos com o transplante de mioblastos em camundongos *mdx*, no entanto, quando realizado em estudos clínicos, a restauração da distrofina não aconteceu na maioria dos pacientes, mostrando uma ineficiência dos mioblastos com pouca sobrevivência das células injetadas e migração limitada devido a resposta imune (SANDRI, 2015; BREULS; GIACOMAZZI; SAMPAOLESI, 2019; PIGA et al., 2019; SUN et al., 2020a).

Devido às limitações encontradas nas pesquisas com células tronco musculares outras linhagens celulares foram investigadas, como os mesoangioblastos (MAB). Os MAB são uma linhagem de células tronco associadas aos vasos de músculo e possuem capacidades de se diferenciar em todas as linhagens mesodérmicas e são considerados os precursores dos pericitos, células perivasculares residentes no músculo adulto (DELLAVALLE et al., 2007; BREULS; GIACOMAZZI; SAMPAOLESI, 2019). Estudos pré-clínicos com aplicação de MAB demonstraram resultados promissores, uma vez que estas células tronco apresentam capacidade de transpor a barreira vascular, diferente dos mioblastos (SAMP AOLES I et al., 2006a; BREULS; GIACOMAZZI; SAMPAOLESI, 2019). No entanto, acredita-se que a fibrose intramuscular e processo inflamatório reduz a eficiência do enxerto (COSSU et al., 2015).

Com a descoberta do potencial miogênico das células tronco mesenquimais (CTM), diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para aumentar o nível de

incorporação destas células no músculo danificado, já sendo visto sucesso de terapias utilizando CTM derivadas de diversos tecidos, sem o uso de medicamentos imunossupressores, mostrando possibilidades terapêuticas com origem celular diversas (KERKIS et al., 2008; COSSU et al., 2015; BIER et al., 2018).

O saco vitelino (SV) é uma das membranas extraembrionárias presente em todas as espécies de vertebrados, importante para a sobrevivência inicial do embrião e representa uma promissora via de pesquisa em células tronco (MANÇANARES et al., 2015; PINTO et al., 2021). Sabe-se que células isoladas do SV humano durante o estágio embrionário foram capazes de expressar marcadores de CTM, além de conter hemangioblastos, células progenitoras do sistema vascular e hematopoiético (MANÇANARES et al., 2019). Além disso, já foi visto que tecidos de membranas fetais apresentam menor resposta imune, além de estudos com CTM de membranas fetais mostrarem benéficos para a terapia celular (ANTONIADOU; DAVID, 2016; BIER et al., 2018).

No entanto, visto que na terapia celular ainda apresenta sobrevivência e disseminação limitada das células injetadas e incapacidade de alcançar diversos tecidos, além de sua inviabilidade estar relacionada a resposta imune de processos inflamatórios pré-existentes no músculo distrófico (WANG et al., 2009; SANDRI, 2015), torna-se necessário entender como viabilizar ou potencializar os efeitos da terapia celular para atingir um maior número de fibras musculares.

3.2.5.3 Fisioterapia e treinamento de baixa intensidade

Sabe-se que indivíduos treinados, apresentam adaptações musculares em resposta ao acúmulo das sessões de exercício, onde as repetidas contrações musculares promovem adaptações moleculares nos músculos exercitados. As adaptações musculares em resposta ao treinamento físico extrapolam as moleculares e são vistas também mudanças na expressão de proteínas contrateis, expressiva indução gênica, proteica e metabólica (EGAN; ZIERATH, 2013; HAWLEY et al., 2014; KOSTEK, 2019). As respostas induzidas pelo exercício físico (agudo) e treinamento físico (crônico) se diferem, e ambos são capazes de promover alterações na atividade de enzimas e no conteúdo de proteínas. No entanto, o músculo treinado apresenta diminuição de marcadores inflamatórios e aumento de fatores regulatórios da

miogênese. Além disso, o músculo treinado apresenta uma maior adaptação aos mecanismos envolvidos na biogênese mitocondrial (EGAN; ZIERATH, 2013; ABREU; LEAL-CARDOSO; CECCATTO, 2017; KOSTEK, 2019).

Estudos investigando o treinamento físico de baixa intensidade (*low intensity training* - LIT) em camundongos *mdx* têm tido resultados benéficos, sendo encontrada melhora nos parâmetros fisiológicos, onde camundongos *mdx* treinados apresentaram uma redução os níveis dos marcadores de estresse oxidativo (KACZOR et al., 2007), redução de citocinas inflamatórias (HYZEWICZ et al., 2017) e é capaz de modular proteínas envolvidas na defesa do estresse oxidativo (FONTANA et al., 2015). Camundongos *mdx* treinados também apresentam uma diminuição de áreas necróticas e infiltrados inflamatórios após treinamento (FRINCHI et al., 2014), além de apresentar uma menor área de fibras colágenas na fibrose muscular (GAIAD et al., 2017; PINTO et al., 2018; FERNANDES et al., 2019; MORAIS et al., 2020) mostrando que um protocolo de baixa intensidade pode ter ação anti-inflamatória, podendo prevenir ou reduzir o processo de degeneração muscular.

Além disso, faz-se necessário conhecer o feito do treinamento físico associado com a terapia celular, uma vez que os tratamentos com edição gênica e terapia celular não tem mostrado correção em todas as fibras musculares, resultando em um fenótipo semelhante a Distrofia Muscular de Becker, levando a maior funcionalidade dos pacientes e necessitando de melhores evidencias da atividade física combinada as células (KOSTEK, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (nº 1275170118) da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (nº 001/2021) e seguiu as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O trabalho foi dividido em dois experimentos descritos a seguir.

4.1 EXPERIMENTO 1 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DO SACO VITELINO (SV) CANINO

4.1.1 Isolamento celular

Os fetos caninos foram obtidos a partir de histerectomia de cadelas sob anestesia, realizadas em campanhas de castração e/ou em clínicas veterinárias, na cidade de Pirassununga e região. O tempo gestacional de cada feto foi definido de acordo com a classificação de Evans e Sack (1973) e Pieri e colaboradores (2015).

O saco vitelino (SV) foi removido dos fetos, lavados com solução de tampão fosfato-salino (PBS – phosphate buffered saline) com 2% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin – 10,000 U/mL, Gibco™, New York, USA) e 1% de antifúngico (Amphotericin, Gibco™, New York, USA). O tecido do SV foi macerado mecanicamente com lâminas de bisturi e dissociado enzimaticamente com adição de collagenase tipo IV 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em concentração de 1:1, por aproximadamente 40 minutos, à 37,5°C em incubadora de CO₂. Após a dissociação enzimática, foi adicionado meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) para inativação da collagenase e centrifugado em 1200rpm por 5 minutos. O meio foi descartado e o pellet foi ressuspenso em dois diferentes meios de cultivo suplementado (Tab. 1). O protocolo de isolamento celular foi esquematizado na Figura 2.

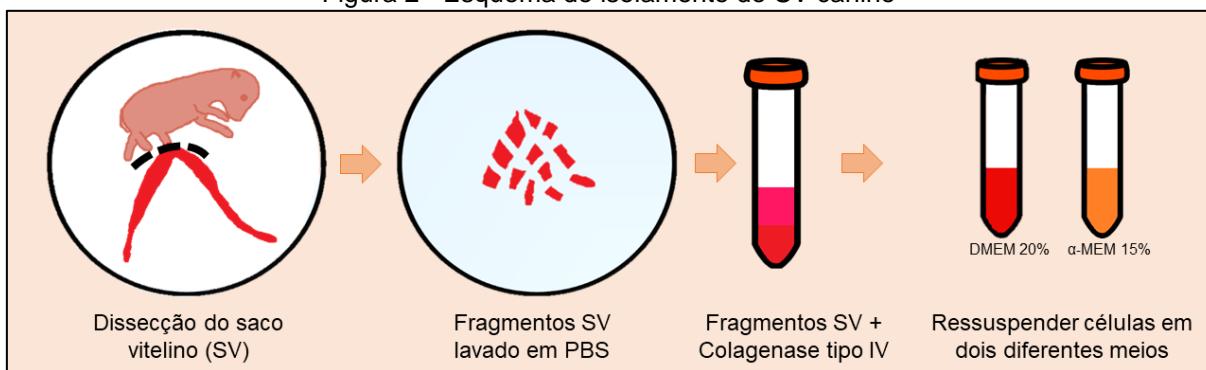
As células foram plaqueadas de acordo com Wenceslau e colaboradores (2011) em placas de cultivo de seis poços (Corning, New York, USA) e incubados em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37,5°C. Após 48 horas, as células não aderentes foram removidas e o meio de cultivo foi substituído.

Tabela 1 Meio de cultura usado para cultivar as células tronco do SV derivado de cão

Meio	Componentes
DMEM 20%	DMEM (Modified Eagles Medium, High glucose – Gibco™, New York, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1% de solução antibiótica de penicilina-streptomicina 10.000 mg/ml (Gibco™, New York, USA), 1% L-glutamina 2 mM (Gibco™, New York, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
α-MEM 15%	α-MEM (Minimum Essential Medium Eagle <i>Alpha</i> Modification – Gibco™, New York, USA), suplementado com 15% de SFB (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1% de solução antibiótica de penicilina-streptomicina 10.000 mg/ml (Gibco™, New York, USA), 1% L-glutamina 2 mM (Gibco™, New York, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Fonte: Pinto (2022).

Figura 2 - Esquema do isolamento do SV canino



Fonte: Pinto (2022).

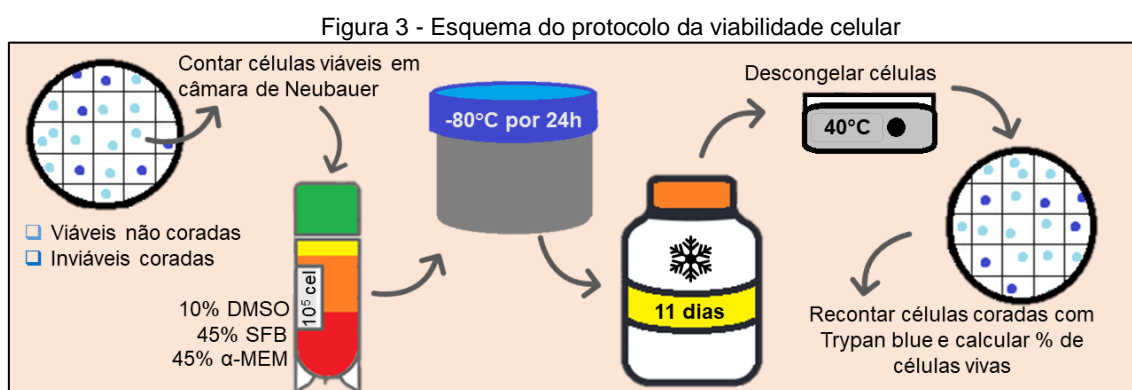
Legenda: O SV foi seccionado do feto, fragmentado mecanicamente e lavado em solução de PBS com antibiótico e antifúngico. A digestão enzimática do tecido foi realizada com Colagenase tipo IV 0,25%, posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em dois diferentes meios de cultivo suplementados.

4.1.2 Caracterização celular

Após definir o melhor meio de cultivo para as células do SV canino, as células foram avaliadas quando a viabilidade celular após criopreservação, a capacidade de se multiplicar *in vitro* indiferenciadas, pela curva de crescimento celular, a capacidade de formar colônias em baixa densidade, pelo teste de Unidade formadora de colônia fibroblastóide (UFC-F) e a capacidade de diferenciação celular *in vitro* em linhagens do mesoderma, seguindo protocolo já descritos na literatura, com pequenas modificações (PINHEIRO et al., 2020). Além disso, foi realizada a caracterização dos marcadores de membrana das células derivadas do SV canino por citometria de fluxo e análise da expressão gênica.

4.1.2.1 Viabilidade Celular

A viabilidade das células foi realizada, onde as células cultivadas em P1 foram desplaqueadas e contadas na câmara de Neubauer, coradas com Trypan blue (Gibco, New York, USA). As células foram congeladas em uma concentração de 10^5 células por criotubo, em proporção de 45% de meio de cultivo, 45% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), mantendo por 24 horas em freezer à -80°C em container de resfriamento (Mr. Frosty™ Freezing Container) e posteriormente foram armazenadas em nitrogênio líquido. Após 11 dias, as células foram descongeladas em banho-maria à 40°C , adicionado meio de cultivo suplementado com 10% de SFB para inativar o DMSO e centrifugado à 1200rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionado meio de cultivo, as células foram contadas novamente para verificar o número de células vivas *versus* células mortas na câmara de Neubauer, através da coloração 1:1 com Trypan blue 0,4% (Gibco™, New York, USA) (PINHEIRO et al., 2020). A viabilidade das células foi esquematizada na Figura 3.



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Esquema do protocolo de viabilidade celular, mostrando a contagem de células viáveis na câmara de Neubauer coradas com Trypan blue, congelando 10^5 células em criotubo em container de refrigeração em freezer -80°C por 24h, posteriormente as células são estocadas em nitrogênio líquido e após 11 dias foram descongeladas em banho-maria à 40°C e recontas para avaliar a porcentagem de células viáveis.

4.1.2.2 Curva de crescimento

Para avaliar a capacidade de propagação em cultivo e o perfil de replicação celular, as células foram plaqueadas numa densidade de 3×10^4 por placa de 12 poços em triplicata biológica. Após 72h, as células atingiram confluência de 90% e o meio de cultura foi retirado e as células foram desplaqueadas com solução de triple Express (Gibco™, New York, USA) por 5 minutos em incubadora de CO₂. Posteriormente, a enzima foi desativada com adição de meio de cultivo suplementado com 10% de SFB e centrifugado por 5 minutos à 1200rpm e o número total determinado pela contagem celular. Em cada repique, foi replaqueado novamente igual número de células até o número total de células contadas após o repique celular ser menor que o número de células plaqueadas inicialmente (PINHEIRO et al., 2020).

4.1.2.3 Unidade Formadora de Colônias fibroblastóide (UFC-F)

Para avaliar a capacidade de formação de colônias das células tronco, as células foram plaqueadas em densidade de 10^3 células, em triplicata biológica, em placa de Petri de 100 mm de diâmetro. As células foram mantidas em cultivo por 15 dias e o meio foi trocado a cada três dias. Após este período as culturas foram lavadas duas vezes por cinco minutos com tampão PBS, fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas novamente três vezes e coradas com Giemsa 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem, foi realizada a visualização, contagem e fotomicrografia das colônias (PINHEIRO et al., 2020).

4.1.2.4 Diferenciação *in vitro*

As células foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em células da linhagem osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas, seguindo as instruções do fabricante do kit de diferenciação. Foi realizada triplicata técnica e biológica e para controle negativo, as células foram cultivadas com meio α -MEM 15%.

Para a diferenciação osteogênica, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, em concentração de 1×10^5 células em meio de diferenciação StemXVivo™

Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Media (CCM007) com adição de 1% de antibiótico. Quando as células atingiram 70% de confluência, o meio foi suplementado com o diferenciador StemXVivo™ Osteogenic Supplement Media Supplement for Human MSC Osteogenesis (CCM008) com adição de 1% de antibiótico, mantendo o cultivo por 21 dias, onde o meio foi trocado a cada 3 dias. Posteriormente, as células foram fixadas durante 30 minutos em paraformaldeído 4%, coradas com Alizarim Red por 15 minutos e fotomicrografadas.

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em placa de 6 poços, suplementadas com meio de diferenciação StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic (CCM007) com 1% de antibiótico. Quando as células atingiram 100% de confluência, o meio foi suplementado com o diferenciador StemXVivo Adipogenic Supplement (CCM011) e foram cultivadas por 21 dias, sendo o meio trocado a cada 3 dias. Ao final do protocolo, as células foram fixadas por 30 minutos em paraformaldeído 4%, lavadas três vezes em PBS, coradas com Sudan Black por 5 minutos e fotomicrografadas.

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, na concentração de 8×10^4 células em forma de gota e mantida em incubadora de CO₂ por duas horas para sua secagem. Posteriormente o meio de diferenciação Osteocyte/Chondrocyte StemPro differentiation basal medium + Chondrogenesis supplement foi adicionado com 1% de antibiótico. As células foram cultivadas por 14 dias, sendo o meio trocado a cada 2 dias. Ao final do protocolo, as células foram fixadas por 30 minutos em paraformaldeído 4%, lavadas três vezes em PBS, coradas com Alcian Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) por 30 minutos e fotomicrografadas.

4.1.2.5 Caracterização imunofenotípica

As células foram caracterizadas imunofenotípicamente por citometria de fluxo, em triplicata técnica e biológica, avaliando os marcadores de superfície CD90, CD105, CD44, CD13, CD31, CD34 e CD45 (Tabela 2). Foi utilizada uma densidade de 10^5 células em P4. O bloqueio foi realizado utilizando PBS + 0,5% Tween 20 + 0,1% BSA (*Bovine serum albumin* – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), por 30 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo primário/conjugado, por 20 minutos em temperatura de 4°C, seguindo de lavagem de PBS. Após as lavagens,

o anticorpo secundário foi adicionado, sendo incubado por 1h à 4°C. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (Accuri) utilizando o software CellQuest e analisados com o software Paint-A-Gate.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das células do SV canino

Anticorpo	Código	Conjugado	Marca	Concentração	Espécie reativa
CD105	156,756	-	Abcam	1:1	Camundongo, rato, cão, humano, macaco
CD90	12-5900-42	PE	eBioscience	1:100	Cão
CD34	12-0340-42	PE	eBioscience	1:100	Cão
CD45	11-5450-42	FITC	eBioscience	1:100	Cão
CD44	MA1-10229	FITC	Invitrogen	1:100	Cão, Humano
CD13	11-0138-42	FITC	eBioscience	1:100	Humano
CD31	11-0319-42	FITC	eBioscience	1:100	Humano
CD117	11-1178-42	FITC	eBioscience	1:100	Humano
Secundário Goat anti-mouse	F0479	-	DAKO	1:50	Mouse

Fonte: Pinto (2022).

4.1.2.6 Análise da expressão gênica de marcadores de membrana

Foi realizada a análise da expressão gênica dos marcadores de membrana CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105, CD117, CD140b e CD146, pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

O RNA foi extraído das amostras utilizando-se RNeasy® mini kit (Qiagen®), seguindo as recomendações e protocolo do fabricante. Para determinar a pureza e a concentração do RNA, as amostras extraídas foram analisadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). As amostras de RNA total extraídas foram tratadas com DNase I (Invitrogen; Carlsbad, CA) e submetidas à transcrição reversa para síntese de cDNA utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e para sua realização foram seguidas as recomendações do fabricante.

As reações foram realizadas utilizando-se o Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems), empregando-se o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, Vilnius, LTU). As sequências dos primers que foram utilizadas foram descritas na Tabela 3. Os genes endógenos 18S rRNA e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram amplificados e utilizados para normalizar os níveis de

expressão gênica. Todas as amostras foram corridas em duplicata técnica e triplicata biológica. Para análise dos dados após amplificação foi utilizado o programa Sequence Detection Software, versão 2.0 (Applied Biosystems). Os resultados foram obtidos como valores do limiar do ciclo (Threshold cycle-Ct), que representa quantas vezes cada sinal de fluorescência passa por um limiar fixo. Os níveis de expressão foram calculados pelo método do $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

O RNA foi extraído e convertido o cDNA de amostras de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (aCTM) e medula óssea (moCTM) canina, para comparar a expressão dos genes avaliados.

Tabela 3 - Primers utilizados para avaliar a expressão gênica de células tronco derivadas do SV canino

Gene	Nome	Sequencia (5' – 3')	Referência
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F - TTCACCACCATGGAGAAGGC R - ACTGATACATTGGGGGTGGG	De Cesaris et al., 2017
18S	18S rRNA	F - CCTGCGGCTTAATTTGACTC R - CTGTCAATCCTGTCCGTGTC	Pinheiro et al., 2020
CD13 (ANPEP)	Membrane aminopeptidase	alanylF - GGTCCCTTACCATCACCTGGC R - CCTAAGGCCATCCATCGTCC	De Cesaris et al., 2017
CD31 (PECAM-1)	platelet endothelial adhesion molecule 1	andF - GCCCGAAGTTCACTCTCAAG cellR - CACTCCTTTGACCCACACCT	De Cesaris et al., 2017
CD34	CD34 molecule	F - GAGATCACCTAACGCCTGG R - GGCTCCTTCTCACACAGGAC	De Cesaris et al., 2017
CD44	CD44 molecule	F - CCCATTACCAAAGACCACGA R - TTCTGCAGGTTCCGTGTCTC	De Cesaris et al., 2017
CD45 (PTPRC)	protein tyrosine phosphatase type C	F - TGTTTCCAGTTCTGTTTCCCCA receptorR - TCAGGTACAAAGCCTTCCCCA	De Cesaris et al., 2017
CD90 (THY1)	Thy-1 cell surface antigen	F - AAGCCAGGATTGGGGATGTG R - TGTGGCAGAGAAAGCTCCTG	De Cesaris et al., 2017
CD105 (ENG)	Endoglin	F - GCTGAGGACAGAGATGACCA R - CACGGAGGAGGAAGCTGAAG	De Cesaris et al., 2017
CD117 (c-Kit)	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	F - CTCAGGGGGTGCGAGGGGAA tyrosineR - TGTGTCTGTGCATTAGTCTGGCTG	Lee et al., 2013
CD140b (PDGFRB)	platelet derived growth factor receptor beta	F - CACGCCTCTGACGAGATTTATG R - CTCGAGAAGCAGCACCAGCT	Aricò et al., 2014
CD146 (MCAM)	melanoma adhesion molecule	cellF - GGGAAATGCTGAAGGAAGG R - CTTGGTGCTGAGGTTCTG	Malagola et al., 2016

Fonte: Pinto (2022).

Legenda: F= forward; R= reverse.

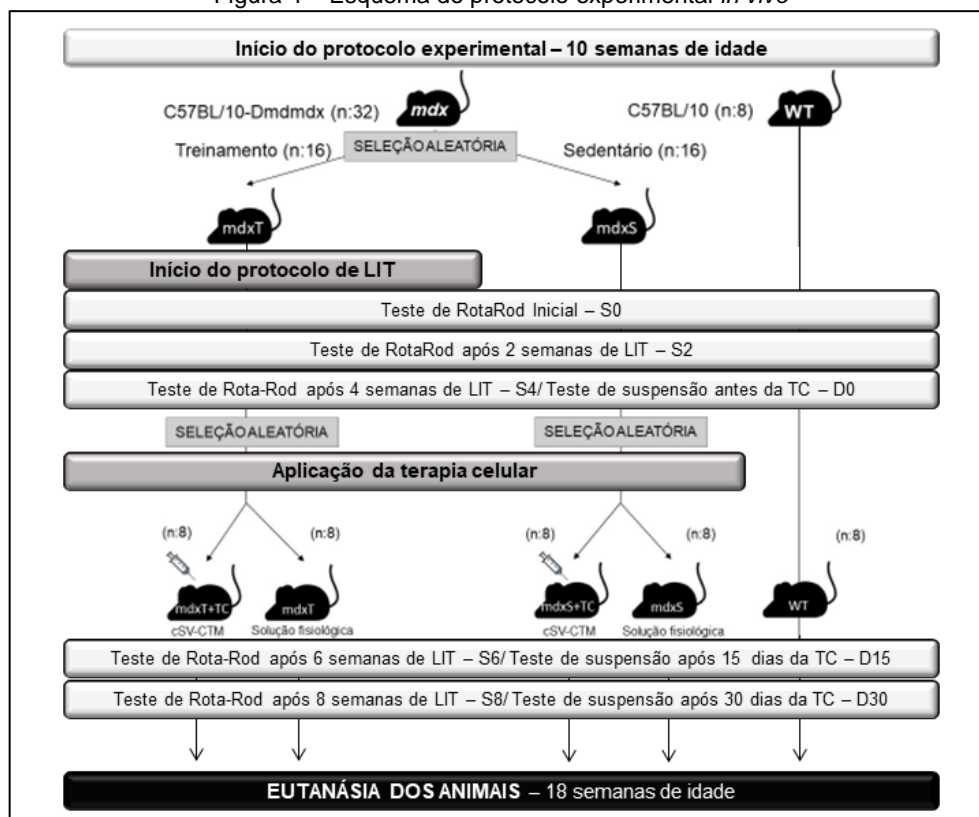
4.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CTM DERIVADOS DE SV ASSOCIADA AO LIT EM CAMUNDONGOS *MDX*

4.2.1 Animais e Grupos experimentais

Foram estudados 32 camundongos machos, adultos e distróficos, denominados camundongos *mdx* (C57BL/10ScSn-Dmdmdx), adquiridos comercialmente no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP.

Os camundongos *mdx* foram inicialmente divididos aleatoriamente em dois grupos (n: 16): camundongos *mdx* treinados (*mdxT*) e sedentários (*mdxS*). Após um mês de protocolo de treinamento, os grupos foram subdivididos aleatoriamente em camundongos que receberam terapia celular (+TC) ou que não receberam terapia celular, sendo aplicado apenas solução fisiológica. Sendo assim, o experimento apresenta os seguintes grupos (n: 8): Grupo *mdxT*+TC – camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT* – camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS*+TC – camundongos *mdx* sedentários, que receberam terapia celular, Grupo *mdxS* – camundongos *mdx* sedentários, que receberam apenas solução fisiológica (Fig. 4). Também foram utilizados 8 animais wild-type (Grupo WT), denominados C57BL/10, que não foram submetidos a nenhuma terapia.

O protocolo experimental foi iniciado as 10 semanas de idade, visto que esta idade é posterior ao intenso processo de degeneração/regeneração, sendo considerada uma idade morfológicamente estável (BRIGUET et al., 2004; GROUNDS et al., 2008).

Figura 4 – Esquema do protocolo experimental *in vivo*

Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Esquema do protocolo experimental *in vivo*. *mdx*: camundongos distróficos *mdx*. WT: camundongos wild-type. LIT: treinamento físico de baixa intensidade. cSV-CTM: célula tronco mesenquimal derivadas do saco vitelino canino.

4.2.2 Protocolo de treinamento

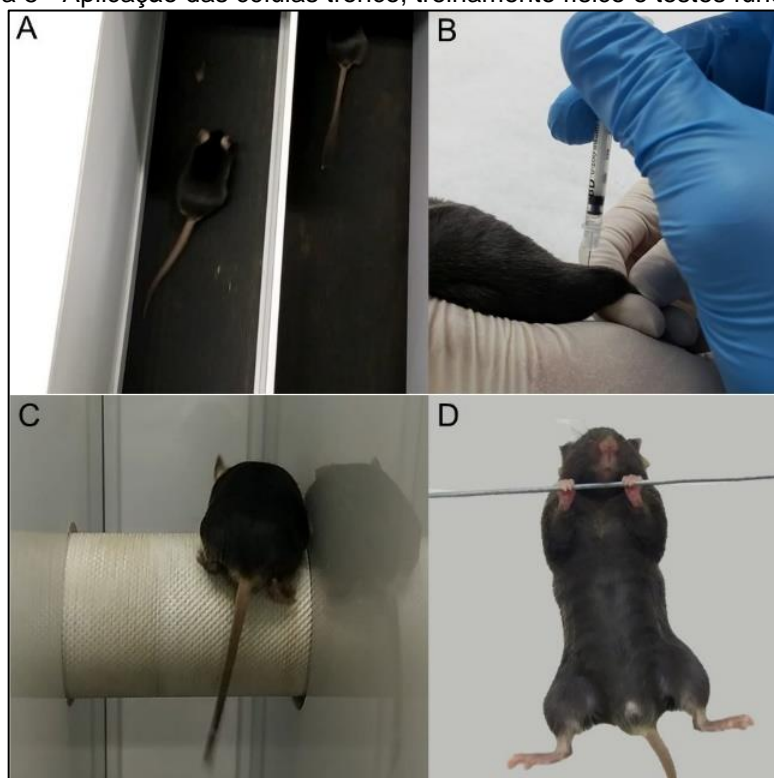
Os animais do grupo *mdxT* passaram por protocolo de adaptação em esteira, seguindo protocolo já descrito anteriormente por Morais e colaboradores (2020), onde a velocidade da esteira foi aumentada gradativamente entre as sessões de adaptação e a velocidade foi aumentada apenas quando o animal foi capaz de correr por dois minutos na velocidade anterior. Após adaptação, com 10 semanas de idade, os animais iniciaram o protocolo de treinamento em esteira horizontal motorizada para ratos (Insight®, São Paulo, Brasil) em velocidade controlada em 9 metros/minuto por 30 minutos/dia, 2 vezes/semana, por 8 semanas (Fig. 5A).

Os parâmetros foram definidos de acordo com protocolo padronizado, sendo considerado um treino terapêutico de baixa intensidade (GRANGE; LUCA, 2013).

Durante o treinamento, os camundongos que não conseguiram correr 30 minutos ininterruptos foram colocados novamente em suas caixas para descanso, após o período de descanso foram colocados novamente na esteira para completar o período de exercício, não sendo computado o tempo fora da esteira (GROUNDS et al., 2008).

Os animais, quando não estavam realizando o protocolo de exercício, permaneceram em caixas de polipropileno, alimentados com ração e água a vontade.

Figura 5 - Aplicação das células tronco, treinamento físico e testes funcionais



Fonte: Pinto (2022)

Legenda: A: Treinamento físico em esteira horizontal. B: Aplicação intramuscular das células tronco multipotentes derivadas do saco vitelino canino. C: Teste funcional no RotaRod. D: Teste de suspensão nos dois membros.

4.2.3 Protocolo de aplicação das células tronco

As células foram injetadas via intramuscular, em concentração de 10^6 células/20 μ L no quadríceps femoral esquerdo em camundongos com 14 semanas de idade, após um mês de treinamento físico (BIER et al., 2018). Os camundongos não

foram submetidos ao protocolo de treinamento por 72h antes e após a aplicação das células. Os camundongos dos grupos que não receberam a terapia celular receberam a aplicação de solução fisiológica no mesmo local e volume que os grupos que receberam a terapia celular (Fig. 5B). O preparo das seringas foi realizado pelo pesquisador principal e a aplicação foi realizada por um profissional treinado que não conhecia a identificação dos animais.

4.2.4 Avaliações Funcionais

4.2.4.1 Rotarod running

Foi realizado teste funcional utilizando o RotaRod (Insight®, São Paulo, Brasil) para avaliar a força muscular, a coordenação e o equilíbrio dos camundongos (AARTSMA-RUS; VAN PUTTEN, 2014) antes do início do protocolo treinamento (S0), após duas semanas (S2), quatro semanas (S4), seis semanas (S6) e ao final das oito semanas de treinamento (S8) (Fig. 5C).

Os animais passaram por protocolo de adaptação, sendo utilizado o protocolo descrito por Moraes e colaboradores (2020). Os animais deveriam andar no RotaRod com aceleração, realizando o teste com tempo máximo de 500 segundos, sendo descontado o período de queda dos animais. O teste foi finalizado ao final do tempo ou quando o animal não se mostrava capaz de se manter no teste após repetidas quedas. A pontuação do teste de cada animal foi realizada por um avaliador cego.

4.2.4.2 Teste de suspensão com dois membros

Foi realizado o teste de suspensão (Fig. 5D), para avaliar a força, equilíbrio e coordenação dos animais antes da aplicação das células tronco (D0), quinze dias após (D15) e ao final do protocolo experimental, trinta dias após a aplicação das células (D30).

Para avaliar os animais, foi realizada o protocolo adaptado de Van Putten (2019), pelo método de “queda” e “alcance”. Os animais iniciavam com 10 pontos, onde a cada queda os animais perdiam 1 ponto e ao alcançar a extremidade, foi adicionado 1 ponto. O teste foi finalizado quando o animal atingia 0 pontos ou ao final de 180 segundos. A pontuação do teste de cada animal foi realizada por um avaliador cego.

4.2.5 Coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados com 18 semanas de vida. Os animais foram eutanasiados com a aplicação intraperitoneal de uma associação anestésica de cloridrato de quetamina (200mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg) para obtenção da ausência do reflexo corneal e parada cardiorrespiratória (MORAIS et al., 2020). Fragmento do diafragma e os músculos quadríceps, gastrocnêmio e tibial cranial do membro pélvico esquerdo, foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e tratado em séries crescentes de etanol (70 a 100%) para desidratação e xilol para diafanização, utilizando-se procedimento convencional para inclusão em parafina (Synth, São Paulo, Brasil) confeccionando-se blocos retangulares. Fragmento do diafragma, os músculos quadríceps, gastrocnêmio e tibial cranial do membro pélvico direito e o coração foram armazenados em criotubos e mantidos em freezer -80°C para análises de biologia molecular. A identificação dos animais foi ocultada nas amostras, para análise cega das amostras.

4.2.6 Análise da localização e expressão da proteína distrofina

Para analisar a localização da proteína distrofina foi realizada a técnica de imunohistoquímica (IHC), utilizando o anticorpo da distrofina (#PA5-32388) (Invitrogen, Carlsbad, CA) com a diluição de 1:50. A IHC foi realizada com protocolo adaptado de Pinto e colaboradores (2018), onde foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas silanizadas. A desparafinização das lâminas foi realizada na estufa a 37°C e xilol, seguida da hidratação em álcool etílico e lavagem com água destilada. Os cortes histológicos do quadríceps femoral foram colocados em solução de ácido cítrico a 0.01M, pH 6.0 e submetidos à temperatura de 95°C por 30 minutos, seguido por bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 40 minutos. Após 20 minutos de descanso, o anticorpo primário foi incubado por 20 horas a 4°C em câmara úmida, o anticorpo primário foi omitido no controle negativo. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada, o anticorpo secundário foi adicionado (Dako, California, USA), sendo incubando por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB

(Dako, California, USA) por 20 minutos e contracoradas com hematoxilina. As lâminas foram fotomicrografadas no microscópio Leica DM500 acoplado à câmera Leica ICC50 HD, e capturadas pelo software Leica LAS EZ.

4.2.7 Análise morfológica e morfométrica do tecido muscular

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica DM500), na espessura de 5µm, para confecção de lâminas com cortes seriados. As lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60°C por 2 horas, na posição horizontal, para melhor aderência dos cortes nas mesmas. Após protocolo de desparafinização, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), para análise estrutural e histopatológicas no músculo distrófico e com a reação de Picrossírius Red, para identificação das fibras colágenas no músculo distrófico. As lâminas foram fotomicrografadas no microscópio Leica DM500 acoplado à câmera Leica ICC50 HD, e capturadas pelo software Leica LAS EZ.

4.2.7.1 Análise de fibras com núcleo central

Foi analisada a porcentagem de fibras com núcleo central em relação ao total de fibras musculares avaliadas, para isso, as lâminas coradas com HE foram fotomicrografadas na objetiva de 10x e obtidas imagens sequenciais de cada animal. Foram analisadas aproximadamente 1000 fibras de cada animal e contado o número de fibras com núcleo central, posteriormente foi calculado o percentual de fibras com núcleo central em relação ao número total de fibras, utilizando o software ImageJ (CAPOGROSSO et al., 2017; PINTO et al., 2018).

4.2.7.2 Análise de área de fibrose intramuscular

Para a quantificação da fibrose intramuscular foram utilizadas as lâminas com a reação histoquímica de picrossírius red, foram realizadas fotomicrografias na objetiva de 10x e obtidas imagens sequenciais de cada animal estudado para realizar a análise de toda a secção transversal do músculo, posteriormente, foi quantificada a

porcentagem de área de fibras colágenas em relação a área total, por análise binária (preto e branco) pelo software ImageJ (PINTO et al., 2018).

4.2.8 Análise de citocinas inflamatórias

Foram avaliadas as interleucinas IL1, IL4, IL6, IL10 e o fator de necrose tumoral (TNF α) por análise da expressão gênica pela técnica de RT-qPCR.

O RNA foi extraído das amostras utilizando-se RNeasy[®] mini kit (Qiagen[®]), seguindo as recomendações e protocolo do fabricante. Para determinar a pureza e a concentração do RNA, as amostras extraídas foram analisadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). As amostras de RNA total extraídas foram tratadas com DNase I (Invitrogen; Carlsbad, CA) e submetidas à transcrição reversa para síntese de cDNA utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e para sua realização foram seguidas as recomendações do fabricante.

As reações foram realizadas utilizando-se o Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems), empregando-se o PowerUp[™] SYBR[™] Green Master Mix (Applied Biosystems, Vilnius, LTU). As sequências dos primers que foram utilizadas foram descritas na Tabela 4. Os genes da beta actina (b-actin) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram amplificados e utilizados para normalizar os níveis de expressão gênica. Para análise dos dados após amplificação foi utilizado o programa Sequence Detection Software, versão 2.0 (Applied Biosystems). Os resultados foram obtidos como valores do limiar do ciclo (Threshold cycle-Ct), que representa quantas vezes cada sinal de fluorescência passa por um limiar fixo. Os níveis de expressão foram calculados pelo método do $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.2.9 Análise de marcadores ligados a regeneração muscular

Foi realizada a análise da expressão gênica dos marcadores ligados a regeneração muscular, fator de crescimento transformador beta (TGF β), fator de crescimento de insulina (IGF β) e proteína de determinação de mioblastos 1 (MyoD). Para tal, foi utilizada a mesma técnica de RT-qPCR descrita anteriormente, as

seqüências de nucleotídeos de cada par de *primer* encontram-se descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Sequência dos primers das citocinas inflamatórias e marcadores relacionados a regeneração muscular

PRIMERS		SEQUÊNCIA (5'- 3')	DESCRIÇÃO
IL-1	f	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	
IL-4	f	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	
IL-6	f	CAGAATTGCCATCGTACAACCTTTTTCTCA	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	
IL-10	f	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT	
TNF- α	f	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC	
TGFB	f	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC	
IGFB	f	TCA GTT CGT GTG TGG ACC GA	(MIYAZAKI et al., 2011)
	r	GCT CCG GAA GCA ACA CTC AT	
MyoD	f	TAC AGT GGC GAC TCA GAC GC	(OKANO et al., 2005)
	r	TAG GCG GTG TCG TAG CCA TT	
GAPDH	f	TTCACCACCATGGAGAAGGC	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	GGCATGGACTGTGGTCATGA	
bActin	f	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	(OVERBERGH et al., 1999)
	r	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	

Fonte: Pinto (2022).

Legenda: f= forward; r= reverse.

4.2.10 Análises dos dados

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico SAS University Edition. Foi realizada prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro- Wilk. As variáveis que não atenderem às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [Log (X+1)]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey para comparação entre as médias dos diferentes grupos experimentais. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DO SACO VITELINO (SV) CANINO

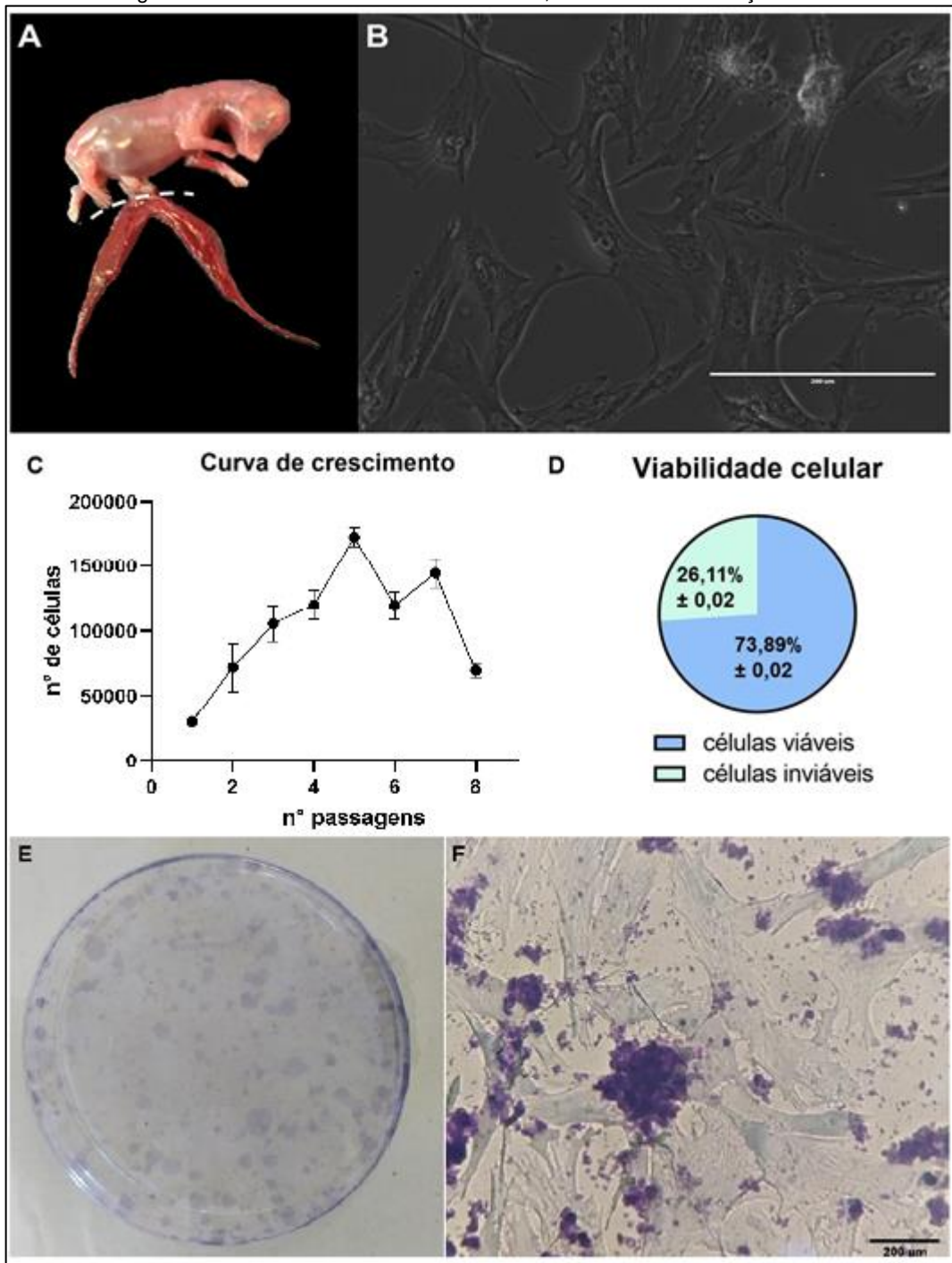
5.1.1 Isolamento, cultivo e caracterização celular

Foram realizadas 21 coletas, com idade gestacional média de $28,6 \pm 3,13$ dias, onde a partir destes, o SV foi isolado e as células foram cultivadas (Fig. 6A). As células provenientes do cultivo com meio α -MEM 15% apresentaram morfologia fibroblástica (Fig. 6B), sendo cultivadas em média por um período de 3 dias para atingirem 80 a 90% de confluência, apresentando o melhor crescimento celular quando comparadas com as células cultivadas com meio DMEM 20%, onde as células demoraram 7 dias para confluência. As células cultivadas em meio α -MEM 15% SFB apresentaram crescimento até a oitava passagem (P8), com pico de crescimento em P5 (Fig. 6C), além disso, permaneceram viáveis após o congelamento celular, apresentando viabilidade maior que 70% após o descongelamento celular (Fig. 5D). No teste de UFC-F, células formaram colônias, sendo contadas $52,3 \pm 2,1$ colônias (Fig. 6E e F).

5.1.1.1 Diferenciação *in vitro*

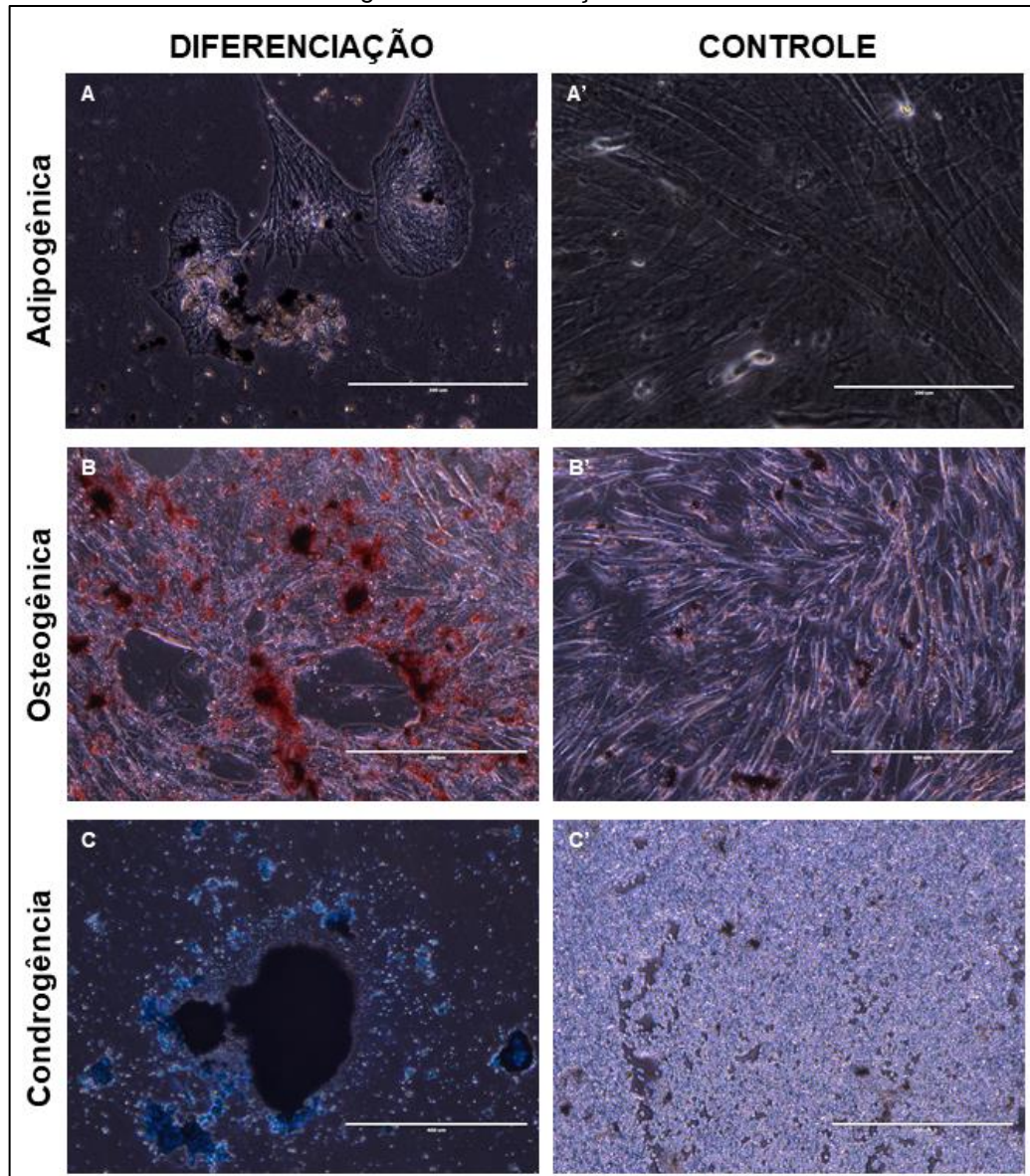
A diferenciação *in vitro* foi realizada para linhagens celulares do mesoderma, mostrando a capacidade das células tronco derivadas do SV canino se diferenciarem na linhagem adipogênica, mostrando vacúolos lipídicos corados com Oil Red (Fig. 7A), enquanto as células em meio de diferenciação osteogênico modificaram sua morfologia, onde a matriz extracelular óssea foi corada com Alizarin Red (Fig. 7B). As células diferenciadas em linhagem condrogênica apresentaram presença de proteoglicanos corados com Alcian Blue (Fig. 7C), mostrando a capacidade das células se diferenciarem *in vitro* quando estimuladas, apresentando clara diferenciação celular em comparação as células dos grupos controle que não foram diferenciadas (Fig. 7A', B' e C').

Figura 6 - Isolamento do saco vitelino canino, cultivo e caracterização celular



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Caracterização das células tronco derivadas do saco vitelino canino. A – Feto com idade em terço médio de gestação, com o saco vitelino ligado ao feto. B – Células derivadas do saco vitelino canino, após 48h de cultivo, em formato fibroblastóide aderidas ao plástico. C – Curva de crescimento celular, crescimento até a oitava passagem (P8), com um pico na quinta passagem (P5). D – Células apresentaram viabilidade celular após criopreservação. E – Placa do teste de Unidade formadora de colônias. F – Fotomicrografia das colônias coradas do teste de Unidade formadora de colônias. Barra: 200µm.

Figura 7 - Diferenciação *in vitro*

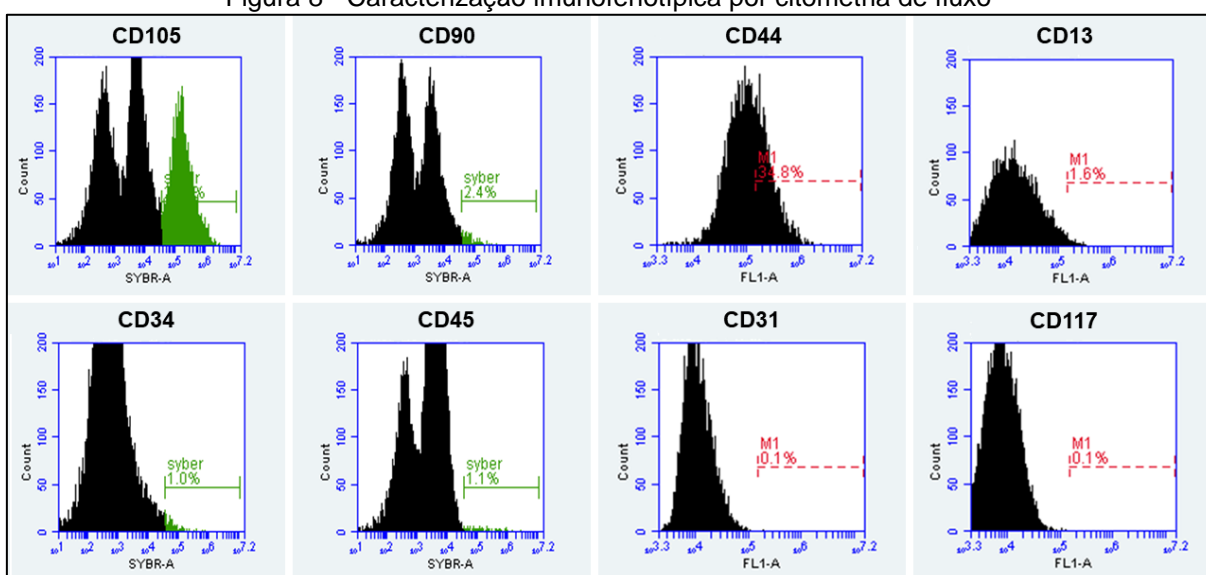
Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Fotomicrografias das células induzidas a diferenciação *in vitro*. A - Células tronco do SV canino cultivadas com o meio de diferenciação adipogênica apresentando morfologia diferenciada em relação ao grupo controle e presença de gotículas de lipídios coradas com Sudan Black. A' - Células tronco do SV canino cultivadas com o meio sem diferenciador, coradas com Sudan Black, com formato fibroblastóide. B - Células tronco do SV canino cultivadas com o meio de diferenciação osteogênica apresentando morfologia diferenciada em relação ao grupo controle e presença de depósitos de cálcio coradas com Alizarin red. B' - Células tronco do SV canino cultivadas com o meio sem diferenciador, coradas com Alizarin red, com formato fibroblastóide. C - Células tronco do SV canino cultivadas com o meio de diferenciação condrogênica apresentando morfologia diferenciada em relação ao grupo controle e presença de proteoglicanos coradas com Alcian Blue. C' - Células tronco do SV canino cultivadas com o meio sem diferenciador coradas com Alcian Blue, com 100% de confluência. Barra: 400µm.

5.1.1.2 Caracterização imunofenotípica

A caracterização imunofenotípica foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo. As células apresentaram expressão positiva de CD44 e CD105 em 34,8% e 26% das células, respectivamente, para CD90, apenas 2,4% das células apresentaram expressão positiva. Os marcadores CD13, CD90, CD31, CD34, CD45 e CD117 apresentaram expressão menor que 1% (Fig. 8).

Figura 8 - Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo



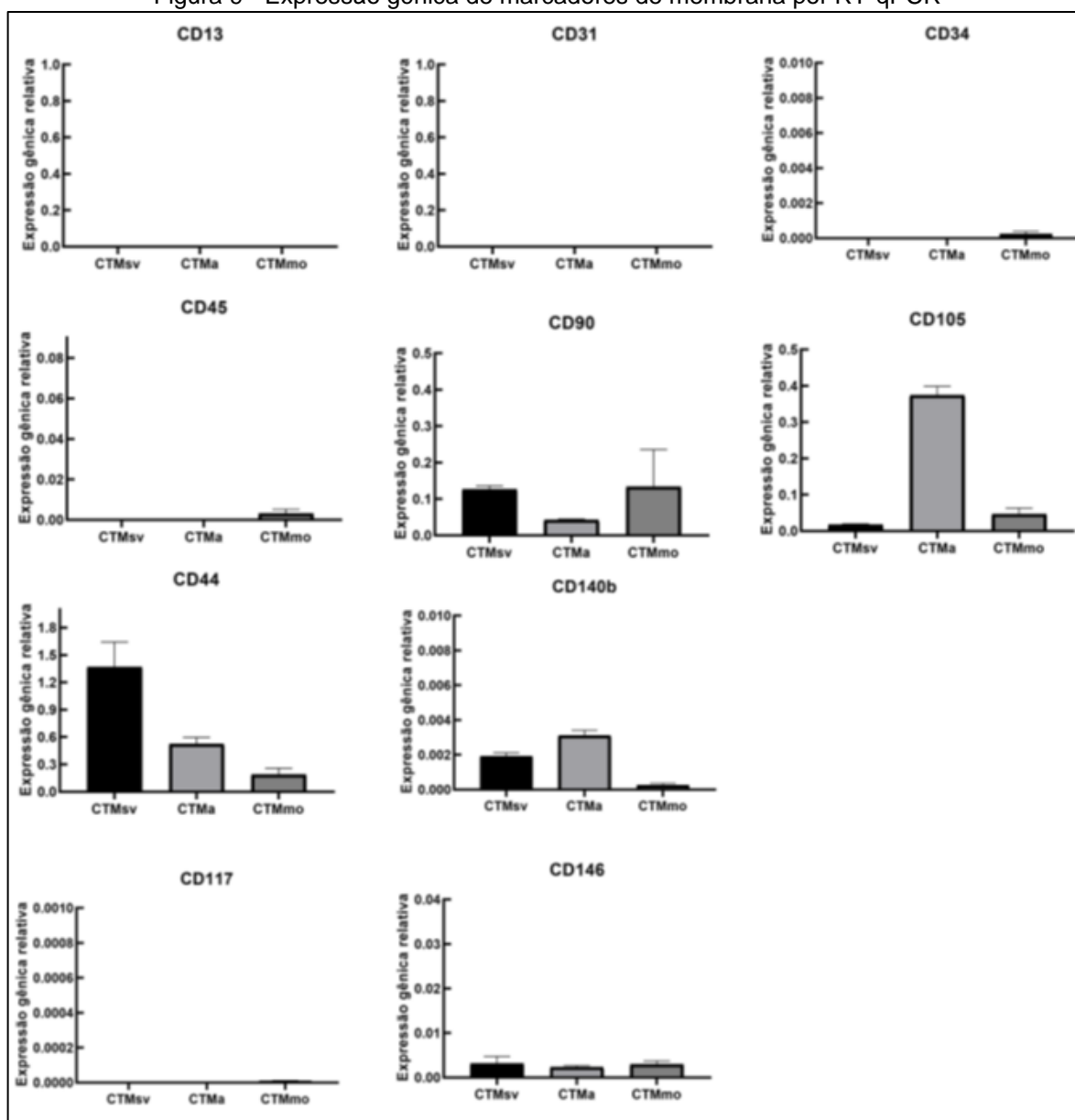
Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das células do saco vitelino cultivadas em meio suplementado com 15% de SFB. Foram analisados os marcadores CD13, CD44, CD90, CD105, CD31, CD34, CD45 e CD117 (c-Kit).

5.1.1.3 Análise da expressão gênica dos marcadores de membrana

Foi realizada a análise da expressão gênica de marcadores de membrana, as CTM derivadas do SV canino (CTM-SVc) não apresentaram expressão de CD13, CD31, CD34, CD117 e CD45 e apresentou expressão gênica de CD44, CD90, CD105, CD146, marcadores característicos para CTM. As células também apresentaram uma baixa expressão de CD140b, marcador característico de pericitos (Fig. 9).

Figura 9 - Expressão gênica de marcadores de membrana por RT-qPCR



Fonte: Pinto (2022).

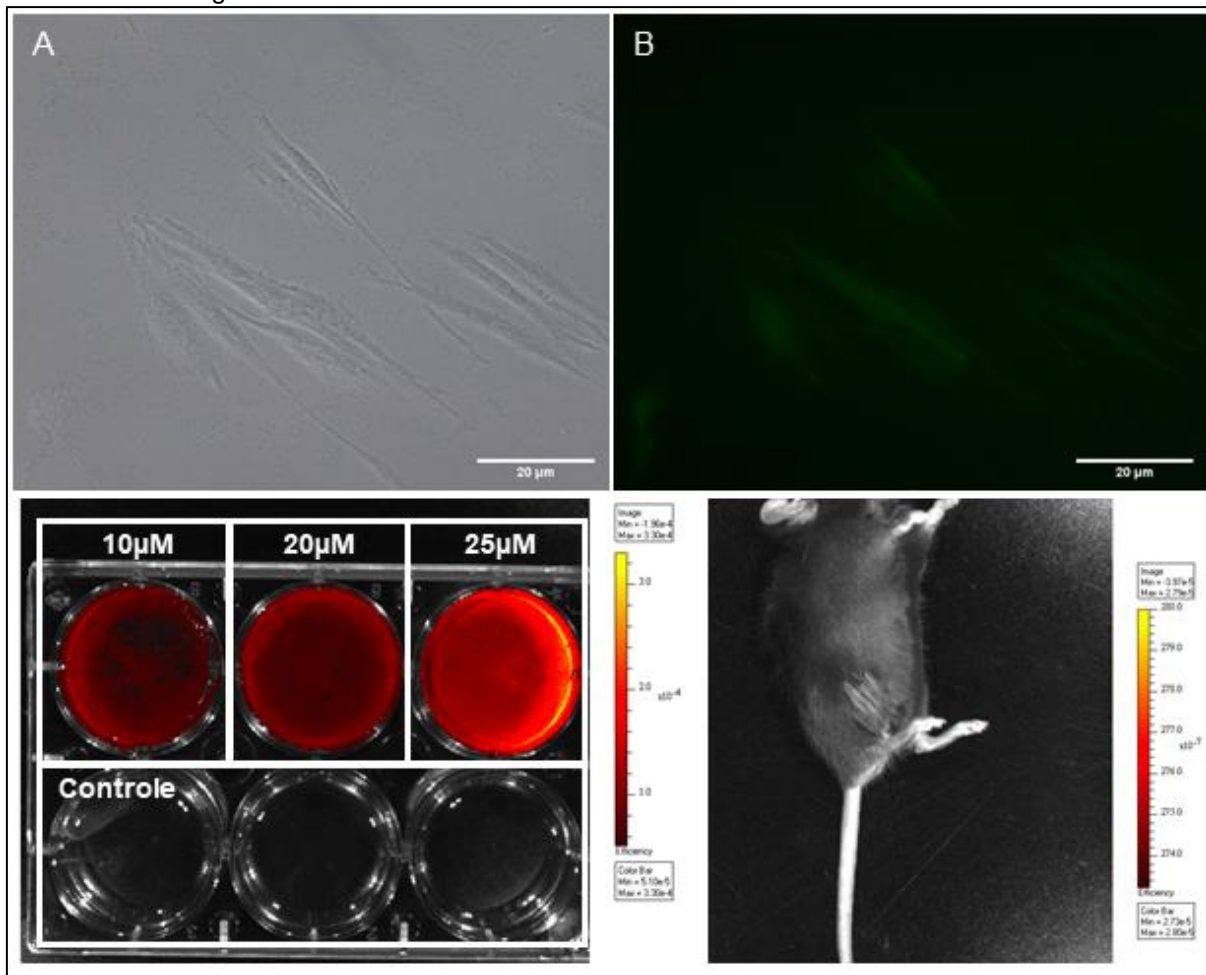
Legenda: Análise da expressão gênica de marcadores de membrana de células tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino (CTMsv) e de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMa) e medula óssea (CTMmo) canina, a fim de comparar a expressão em células provenientes de tecidos diferentes.

5.1.2 Avaliação da migração das células *in vivo*

Foi realizada a marcação das células tronco com o CellTracker Green (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), sendo possível visualizar a fluorescência pela microscopia de fluorescência, além de ser possível visualizar a fluorescência no IVIS-

Lumina, no entanto, quando as células foram aplicadas em camundongo para avaliar a fluorescência *in vivo*, não foi possível identificar a fluorescência (Fig. 10).

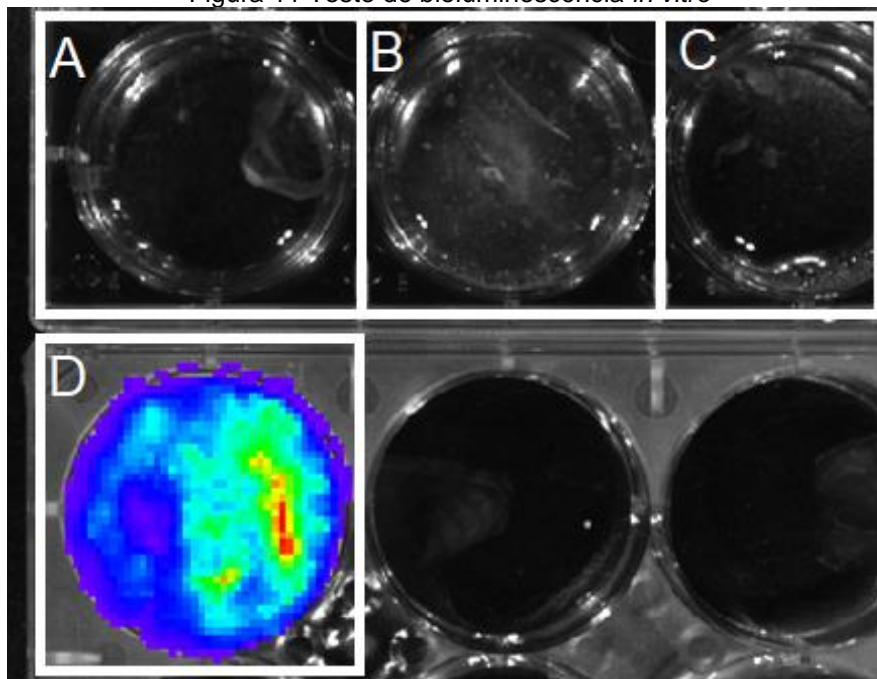
Figura 10 - Análise da fluorescência das células tronco *in vitro* e *in vivo*



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: **A e B** – Células tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino marcadas com CellTracker Green. **A** – Fotomicroscopia em microscópio de luz. **B** – Fotomicroscopia em microscópio de fluorescência. Barra: 20µm. **Imagem inferior esquerda:** Placa de cultivo com diferentes concentrações de CellTracker Green analisadas no IVIS-Lumina mostrando fluorescência das células marcadas e ausência de fluorescência nos poços da placa de controle negativo. **Imagem inferior direita:** Camundongo que recebeu células tronco marcadas com CellTracker Green, analisado no IVIS-Lumina, mostrando ausência de fluorescência.

Além disso, as CTM-SVc também foram transduzidas pelo vírus de luciferase, sendo testada a concentração de 2x vírus/mL (Fig. 11A) e 1x vírus/mL (Fig. 11B), ativadas com luciferina. Também foi utilizado um controle negativo, com CTMsv canina em meio de cultura (Fig. 11C), no entanto, nenhuma das células apresentaram bioluminescência ao serem avaliadas IVIS-Lumina. Um controle positivo foi utilizado, com células 293T transduzidas com o vírus da luciferase, ativadas com luciferina, sendo possível visualizar a bioluminescência nas células (Fig. 11D).

Figura 11 Teste de bioluminescência *in vitro*

Fonte: Pinto (2022).

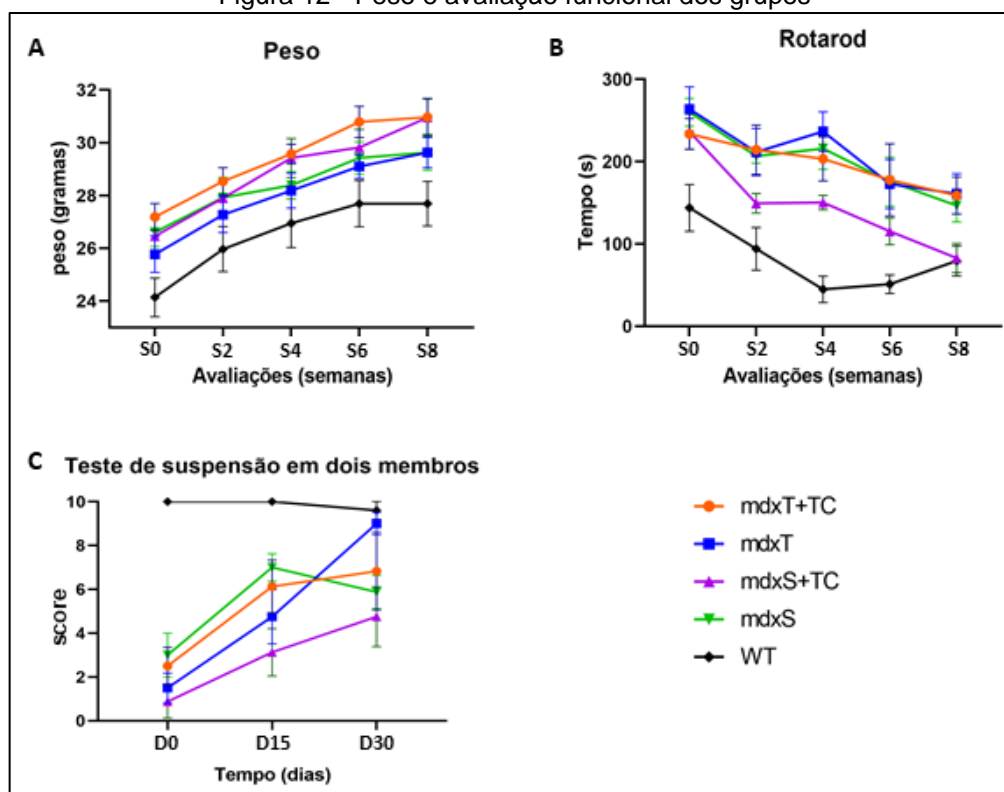
Legenda: Teste de bioluminescência *in vitro* utilizando a IVIS-Lumina. **A** – Células tronco mesenquimais derivadas do SV canino transduzidas com o vírus da luciferase em concentração de 2x vírus/mL, ativadas com luciferina. **B** – Células tronco mesenquimais derivadas do SV canino transduzidas com o vírus da luciferase em concentração de 1x vírus/mL, ativadas com luciferina. **C** – Célula tronco mesenquimal derivada do SV em meio de cultura, controle negativo. **D** – Células 293T transduzidas com o vírus da luciferase, ativadas com luciferina.

5.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CTM DERIVADOS DE SV ASSOCIADA AO LIT EM CAMUNDONGOS *MDX*

5.2.1 Avaliações Funcionais

Todos os animais apresentavam 10 semanas de idade ao início do protocolo experimental. Não houve diferença estatística do peso dos animais dos grupos distróficos ($p > 0.05$), no entanto, o grupo WT apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,001$) (Fig. 12A).

Figura 12 - Peso e avaliação funcional dos grupos



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: **A** – Peso dos animais. S0: Peso inicial; S2: após duas semanas de treinamento; S4: após quatro semanas de treinamento; S6: após seis semanas de treinamento; S8: após oito semanas de treinamento. **B** – Teste funcional de RotaRod. S0: Início do protocolo de treinamento; S2: duas semanas de treinamento; S4: quatro semanas de treinamento; S6: seis semanas de treinamento; S8: oito semanas de treinamento. **C** – Teste de suspensão em dois membros. D0: antes da aplicação das células tronco mesenquimais derivadas do SV canino. D15: quinze dias após a aplicação das células tronco mesenquimais derivadas do SV canino. D30: trinta dias após a aplicação das células tronco mesenquimais derivadas do SV canino.

No teste funcional de RotaRod foi possível observar diferença estatística do grupo WT em relação aos grupos mdxT e mdxS ($p < 0,017$) em S0; em relação aos grupos mdxT+TC, mdxT e mdxS ($p < 0,032$) em S2 e S6, e foi diferente de todos os demais grupos em S4 ($p < 0,015$) (Fig 12B). No entanto, os animais do grupo WT, apesar de passarem pelo protocolo de adaptação no RotaRod, se recusaram a executar o teste, apresentando um baixo desempenho.

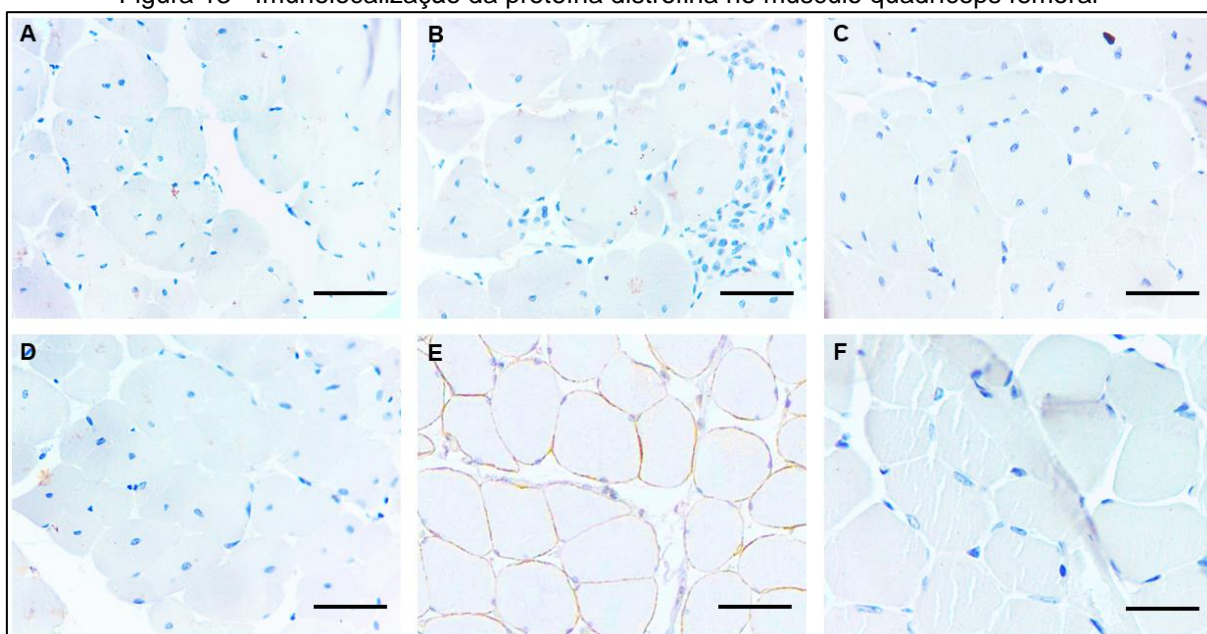
No teste funcional de suspensão nos dois membros foi possível observar que o grupo mdxS+TC apresentou diferença estatística antes da aplicação das células tronco (D0) em relação aos grupos mdxT+TC ($p = 0,035$), mdxS ($p = 0,019$) e WT ($p = 0,004$), no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos no decorrer do

tempo (D15 e D30). Além disso, o grupo *mdxS*+TC foi o único grupo que apresentou melhora significativa no desempenho do teste com o decorrer do tempo ($p < 0,003$) (Fig. 12C).

5.2.2 Análise da localização da proteína distrofina

A proteína distrofina foi encontrada no grupo WT, como esperado, no entanto, não foi identificada nos demais grupos distróficos, mostrando que a aplicação das CTM-SVc não foi capaz de restaurar a proteína distrofina no músculo QD (Fig. 13).

Figura 13 - Imunolocalização da proteína distrofina no músculo quadríceps femoral



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Imunolocalização da proteína distrofina no músculo quadríceps femoral por IHC. **A** – Grupo *mdxT*+TC. **B** – Grupo *mdxT*. **C** – Grupo *mdxS*+TC. **D** – Grupo *mdxS*. **E** – Grupo WT com marcação positiva para proteína distrofina na membrana das fibras musculares. **F** – Controle negativo, sem anticorpo primário do grupo WT. Barra: 50µm.

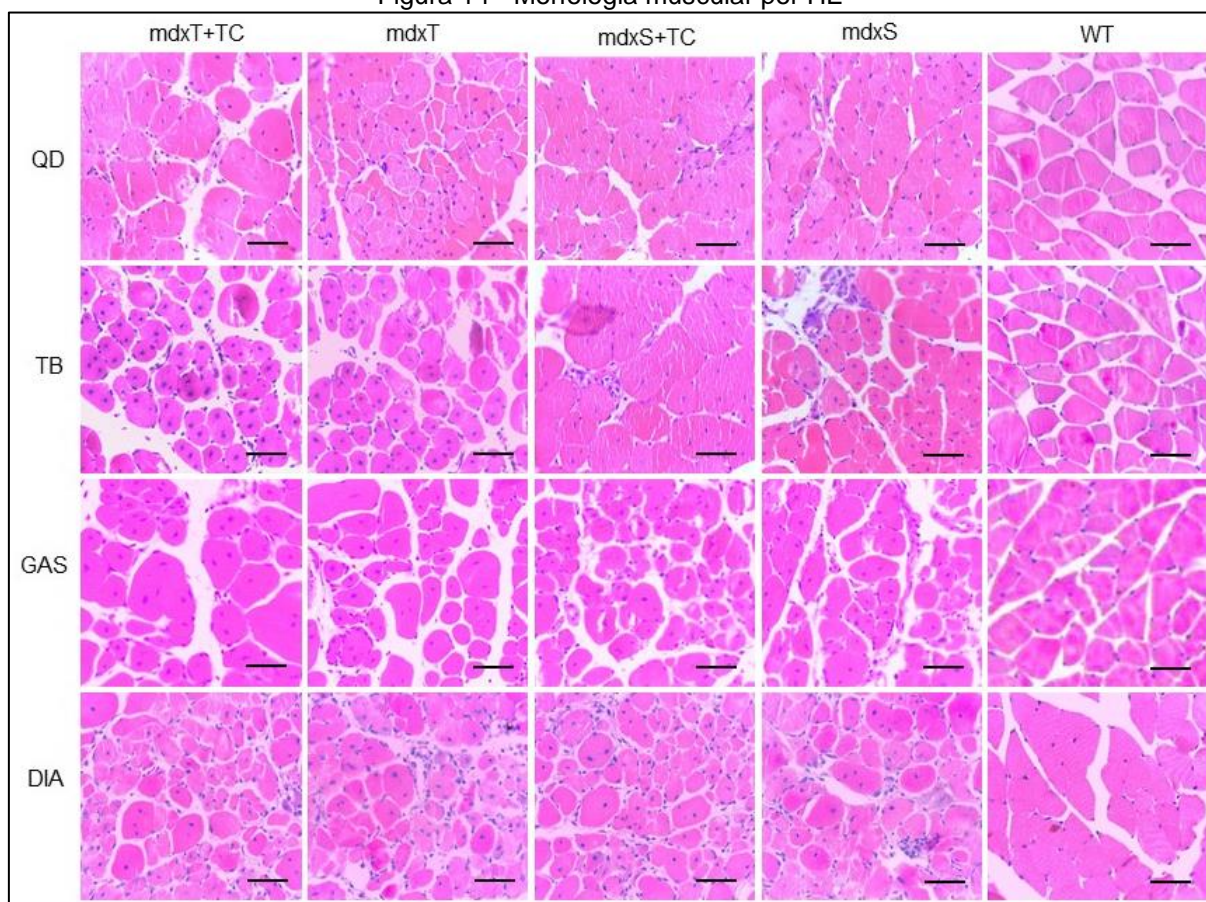
5.2.3 Análise morfológica e morfométrica do tecido muscular

A morfologia dos músculos quadríceps femoral (QD), tibial cranial (TB), gastrocnêmio (GAS) e diafragma (DIA) foram avaliados pela coloração de HE. Os músculos dos grupos distróficos apresentaram características de degeneração muscular, com presença de fibras com núcleo centralizado e diâmetro heterogêneo

das fibras musculares. Em ambos os músculos do grupo WT as fibras apresentaram morfologia preservada (Fig. 14).

Também foi quantificado o número de fibras musculares que apresentaram núcleo central dos músculos QD, TB, GAS e DIA. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos distróficos, no entanto, o grupo WT se diferenciou de todos os grupos, em ambos os músculos avaliados (Fig. 15A-D).

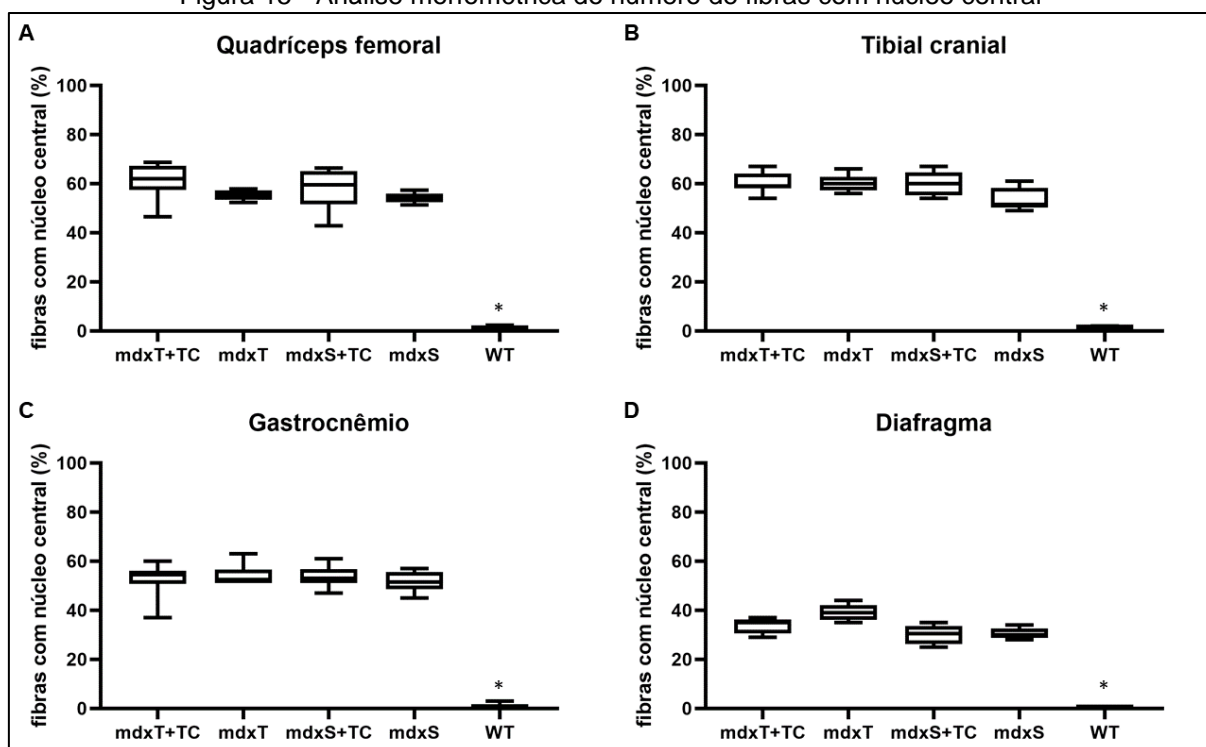
Figura 14 - Morfologia muscular por HE



Fonte: Pinto (2022).

Legenda: Morfologia muscular de ambos os grupos de tratamento, coradas por HE. QD: músculo quadríceps femoral; TB: músculo tibial cranial; GAS: músculo gastrocnêmio, DIA: músculo diafragma. Grupo *mdxT+TC*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS+TC*: camundongos *mdx* sedentários que receberam terapia celular; Grupo *mdxS*: camundongos *mdx* sedentários, sem tratamento; Grupo WT: camundongos wild-type sedentários, sem tratamento. Barra: 50µm.

Figura 15 - Análise morfométrica do número de fibras com núcleo central



Fonte: Pinto (2022)

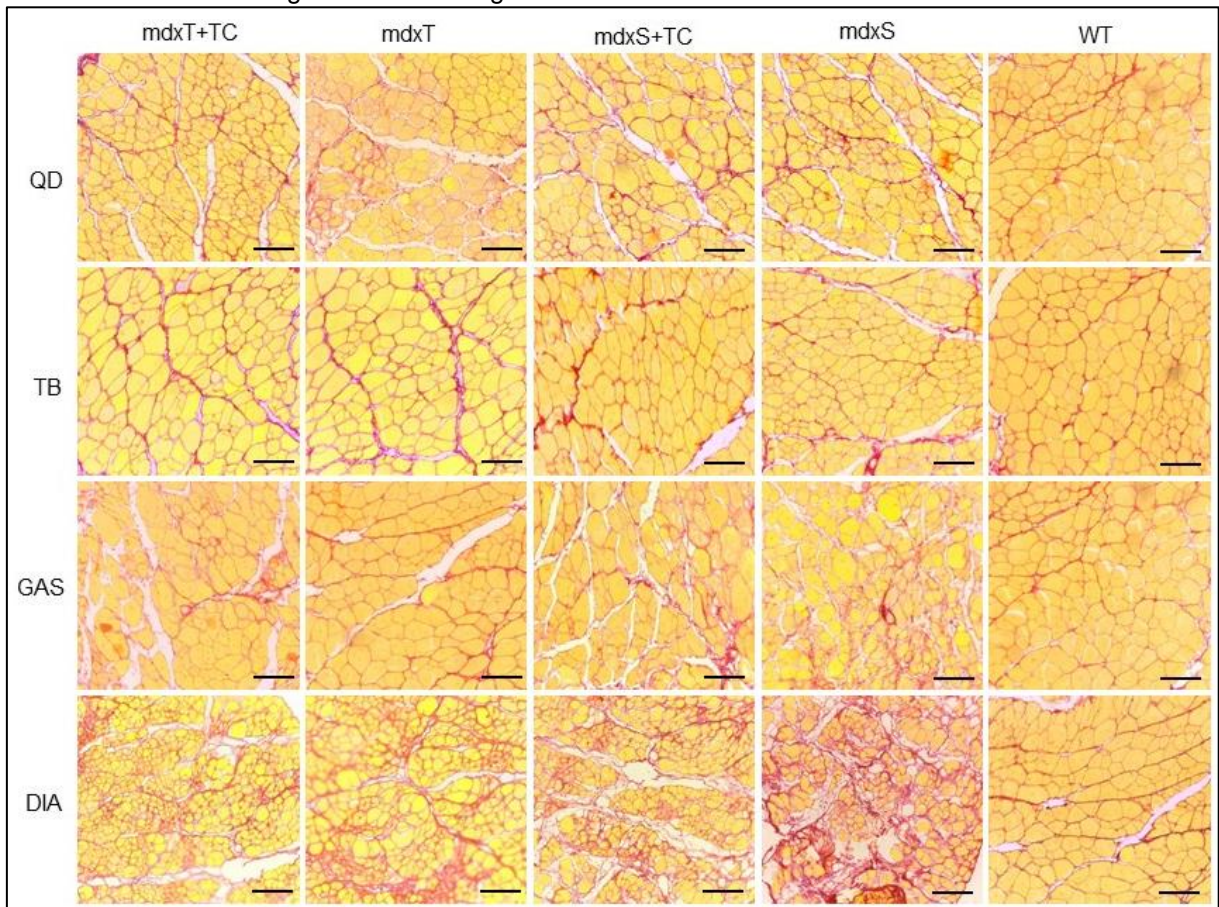
Legenda: Análise morfométrica do número de fibras com núcleo central, realizada pelo software ImageJ. *Diferença estatística em relação aos grupos distróficos, $p < 0.0001$. Grupo *mdxT+TC*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS+TC*: camundongos *mdx* sedentários que receberam terapia celular; Grupo *mdxS*: camundongos *mdx* sedentários, sem tratamento; Grupo WT: camundongos wild-type sedentários, sem tratamento.

Na análise morfológica da fibrose intramuscular, pela reação de picrossirius red, foi observado um espessamento do tecido conjuntivo do endomísio e perimísio nos grupos distróficos, com maior presença de fibrose no músculo diafragma (Fig. 16).

Na análise morfométrica da área de fibrose intramuscular, no músculo QD, o grupo *mdxT+TC* apresentou um percentual de área menor em comparação com o grupo *mdxT* ($p=0,0077$) e ao grupo *mdxS* ($p=0,0429$), não apresentando diferença estatística com o grupo *mdxS+TC* ($p=0,9966$) (Fig. 17A). No entanto, o grupo *mdxS+TC* apresentou uma menor área de fibrose intramuscular no músculo QD em comparação com o grupo *mdxT* ($p=0,0228$). No músculo TB, houve uma maior área de fibrose intramuscular no grupo *mdxT+TC* em relação ao grupo *mdxS+TC* ($p=0,0237$) (Fig. 17B). No entanto, no músculo GAS, houve uma menor área de fibrose intramuscular no grupo *mdxT+TC* em comparação com o grupo *mdxS+TC* ($p=0,0465$)

e ao grupo *mdxT* ($p=0,0056$), não sendo encontrada diferença estatística em relação ao grupo *mdxS* ($p=0,4003$) (Fig.17C). Não houve diferença estatística entre os grupos distróficos para o músculo diafragma (Fig. 17D). O grupo WT apresentou uma menor área de fibrose intramuscular em relação aos grupos distróficos ($p<0,000$) em ambos os músculos avaliados (Fig. 17).

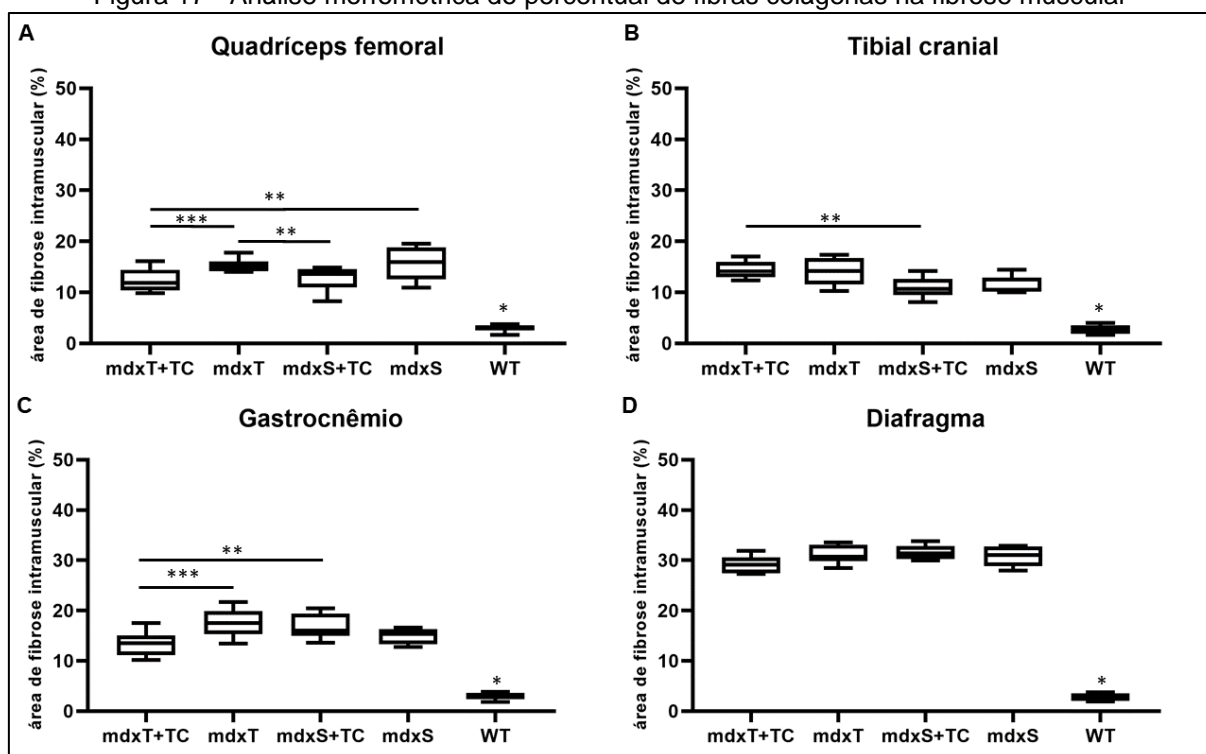
Figura 16 - Morfologia muscular destacando tecido fibroso



Fonte: Pinto (2022)

Legenda: Morfologia muscular de ambos os grupos de tratamento, destacando o tecido conjuntivo fibroso em vermelho, pela reação de picrossirius red. QD: músculo quadríceps femoral; TB: músculo tibial cranial; GAS: músculo gastrocnêmio, DIA: músculo diafragma. Grupo *mdxT+TC*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS+TC*: camundongos *mdx* sedentários que receberam terapia celular; Grupo *mdxS*: camundongos *mdx* sedentários, sem tratamento; Grupo WT: camundongos wild-type sedentários, sem tratamento. Barra: 50 μ m.

Figura 17 - Análise morfométrica do percentual de fibras colágenas na fibrose muscular



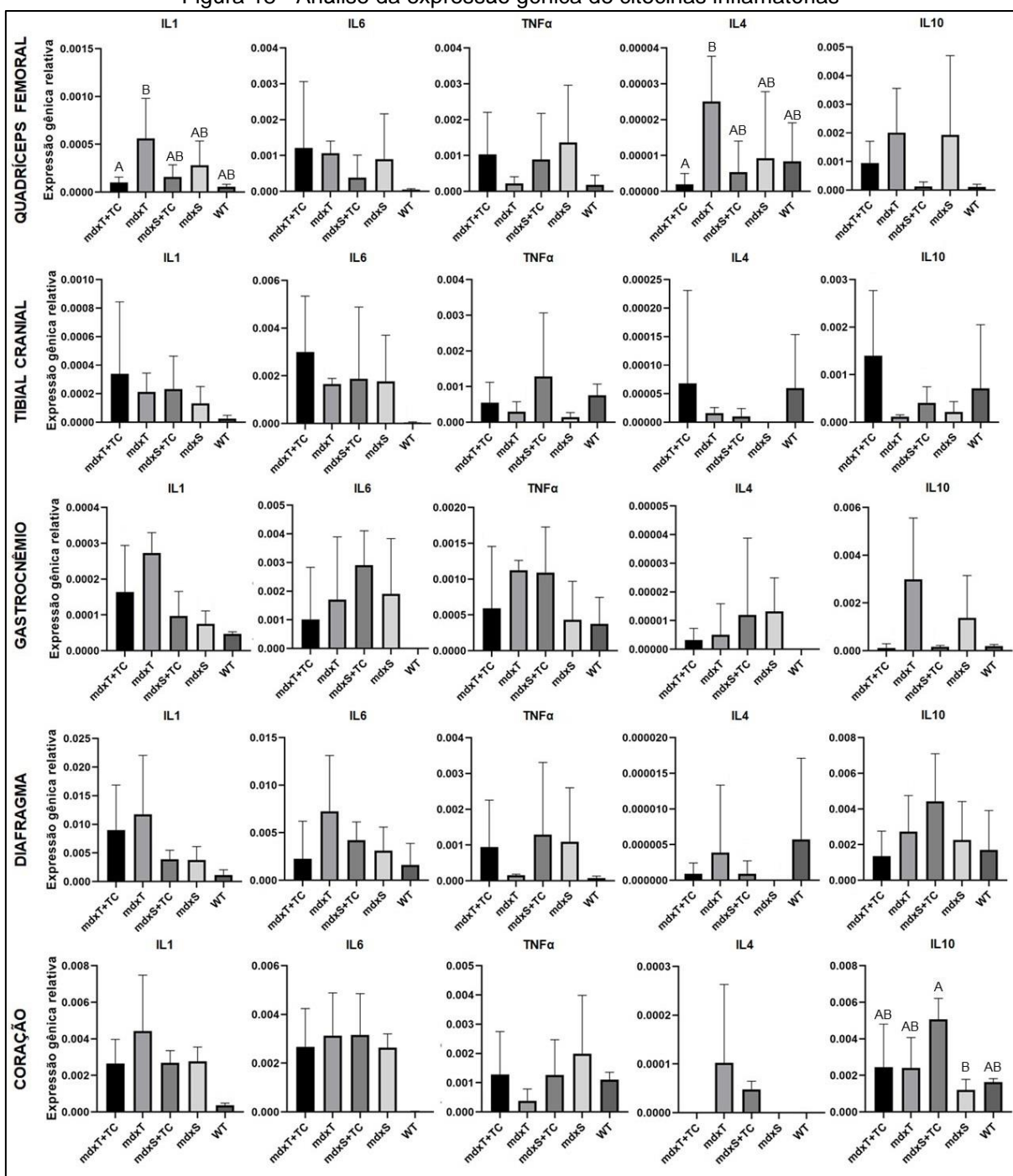
Fonte: Pinto (2022)

Legenda: Análise morfométrica da porcentagem de fibras colágenas na fibrose muscular, realizada pelo software ImageJ. *Diferença estatística em relação aos grupos distróficos, $p < 0,0001$. ** $p < 0,05$. *** $p < 0,007$. Grupo *mdxT+TC*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS+TC*: camundongos *mdx* sedentários que receberam terapia celular; Grupo *mdxS*: camundongos *mdx* sedentários, sem tratamento; Grupo WT: camundongos wild-type sedentários, sem tratamento.

5.2.4 Análise de citocinas inflamatórias

Na análise da expressão gênica das citocinas inflamatórias, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos nos músculos TB, GAS e DIA. No entanto, no músculo QD, houve uma maior expressão no grupo *mdxT* em comparação com o grupo *mdxT+TC* da citocina pró-inflamatória IL1 ($p=0,021$) e da anti-inflamatória IL4 ($p=0,042$), não apresentando diferença em relação aos demais grupos (Fig. 18). No coração não houve diferença entre os grupos para expressão das citocinas IL1, IL6, TNF α e IL6, no entanto, houve diferença entre os grupos *mdxS+TC* e *mdxS* para IL10 ($p=0,0288$) (Fig. 18).

Figura 18 - Análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias



Fonte: Pinto (2022)

Legenda: Análise da expressão gênica dos genes de citocinas inflamatórias. Diferença estatística com $p < 0,05$. Grupo *mdxT+TC*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS+TC*: camundongos *mdx* sedentários que receberam terapia celular; Grupo *mdxS*: camundongos *mdx* sedentários, sem tratamento; Grupo WT: camundongos wild-type sedentários, sem tratamento.

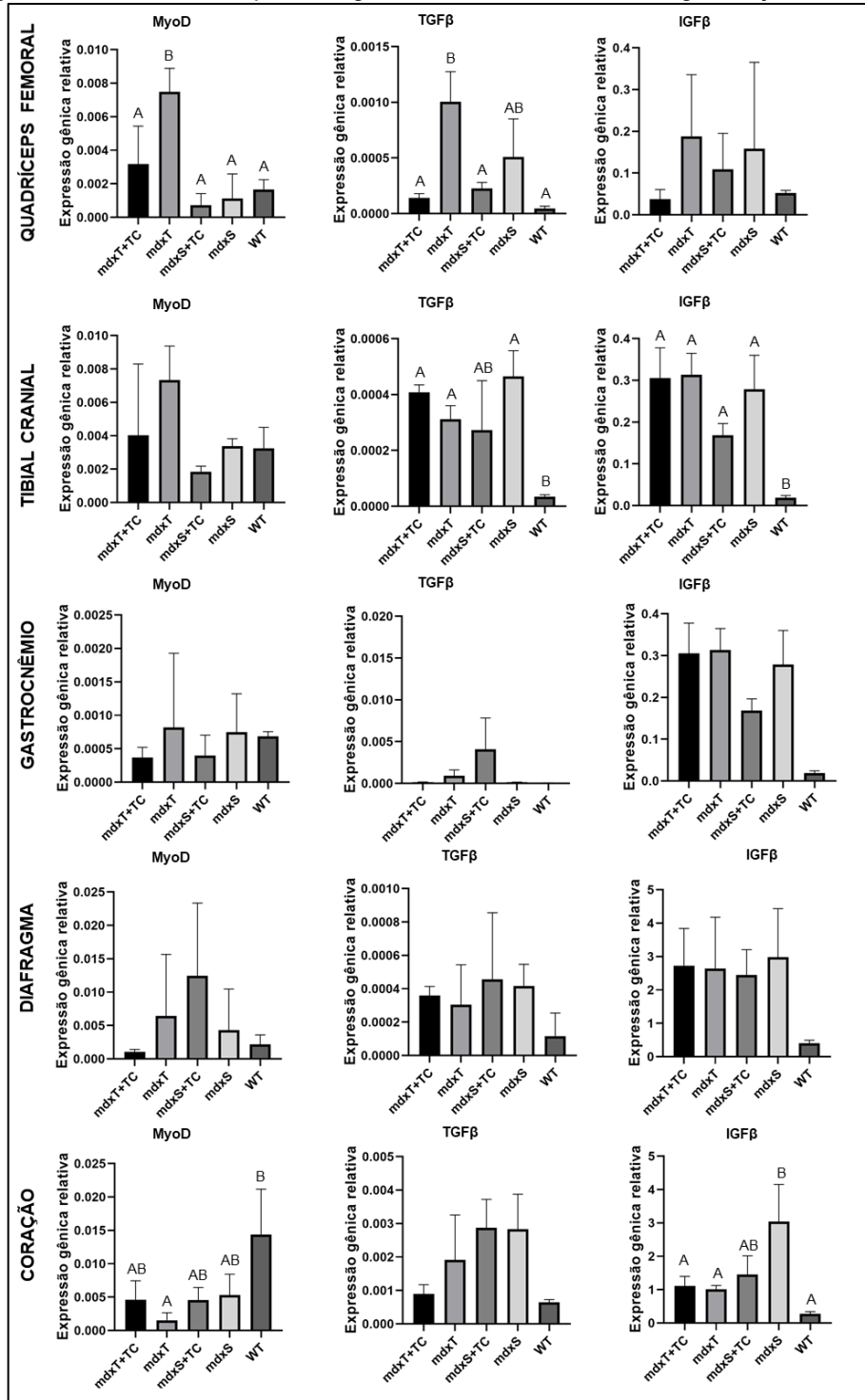
5.2.5 Análise de marcadores ligados a regeneração muscular

Na análise da expressão genica de marcadores relacionados a regeneração muscular, o grupo *mdxT* apresentou maior expressão de MyoD quando comparado com os demais grupos no músculo QD ($p < 0,0256$). Também houve uma maior expressão de TGF β no grupo *mdxT* em comparação aos grupos *mdxT+TC* ($p = 0,0023$), *mdxS+TC* ($p = 0,0049$) e WT ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos na expressão do gene IGF β no músculo QD ($p > 0,05$) (Fig. 19).

No músculo TB, não houve diferença estatística para a expressão de MyoD ($p > 0,05$). No entanto, o grupo WT apresentou menor expressão de TGF β que os grupos *mdxT+TC* ($p = 0,0068$), *mdxT* ($p = 0,0197$) e *mdxS* ($p = 0,0014$), além de ter apresentado menor expressão de IGF β em relação aos grupos distróficos ($p < 0,0492$) (Fig. 19).

Nos músculos GAS e DIA, não houve diferença estatística entre os grupos MyoD, TGF β e IGF β , também não houve diferença estatística na expressão do gene TGF β no coração. No entanto, o grupo WT apresentou maior expressão de MyoD em relação ao grupo *mdxT* ($p = 0,0115$) no coração, e houve uma maior expressão do gene IGF β no grupo *mdxS* em comparação com os grupos *mdxT+TC* ($p = 0,0192$), *mdxT* ($p = 0,0240$) e WT ($p = 0,0022$) (Fig. 19).

Figura 19 - Análise da expressão gênica dos marcadores de regeneração muscular



Fonte: Pinto (2022)

Legenda: Análise da expressão genica dos genes relacionados a regeneração muscular. Diferença estatística com $p < 0,05$. Grupo *mdxT+TC*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico associado a terapia celular; Grupo *mdxT*: camundongos *mdx* que realizaram treinamento físico; Grupo *mdxS+TC*: camundongos *mdx* sedentários que receberam terapia celular; Grupo *mdxS*: camundongos *mdx* sedentários, sem tratamento; Grupo WT: camundongos wild-type sedentários, sem tratamento.

6 DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO 1 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DO SACO VITELINO (SV) CANINO

6.1.1 Morfologia celular, Curva de crescimento e UFC-F

Neste estudo, foi possível identificar que as células tronco derivadas do SV canino aderiram à placa de cultivo e apresentam formato fibroblastóide, além de mostrarem características de células multipotentes, uma vez que se mantiveram indiferenciadas por oito passagens e diferenciam-se *in vitro* quando estimuladas em linhagens mesodérmicas, sendo testado neste estudo as linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica, indo de encontro com os resultados já descritos na literatura em diferentes espécies (FAVARON et al., 2014; BERTASSOLI et al., 2015; MANÇANARES et al., 2015; FERREIRA PINTO et al., 2021)

As células derivadas do saco vitelino canino foram cultivadas com meio de cultivo suplementado com 15% de SFB, como já descrito na literatura para CTM derivadas do SV canino (WENCESLAU et al., 2011). Outros autores também realizaram o cultivo de células tronco derivadas do SV em outras espécies, obtendo CTM com morfologia semelhante a encontrada neste estudo, como no cultivo de células da espécie bovina (MANÇANARES et al., 2015), suína (BERTASSOLI et al., 2015), equina (FRANCIOLLI et al., 2020) e do camundongo do novo mundo (FAVARON et al., 2014).

Também foi possível avaliar a capacidade clonogênica das células, mostrando que estas foram capazes de formar colônias em baixa densidade pela UFC-F, semelhante aos resultados já demonstrados para células tronco mesenquimais derivadas do SV canino (WENCESLAU et al., 2011), bem como para células tronco derivadas do SV bovino (MANÇANARES et al., 2015). As células deste estudo foram cultivadas até a oitava passagem (P8), apresentando um pico de crescimento em P5 na curva de crescimento celular, resultado similar ao encontrado por Mançanares e colaboradores (2015) para as CTM derivadas do SV bovino que foram cultivadas até P11, apresentando alta taxa de proliferação celular entre P3 a P6 e subsequente queda de proliferação das células.

6.1.2 Diferenciação celular *in vitro*

No teste de diferenciação *in vitro* para as linhagens mesodérmicas osteogênica, adipogênica e condrogênica, as células derivadas do SV apresentaram capacidade de se diferenciarem para ambas as linhagens. No estudo de Wenceslau e colaboradores (2011) foi realizada a diferenciação *in vitro* de CTM derivadas do SV canino onde os autores também comprovaram a capacidade das células se diferenciarem em linhagem osteogênica e condrogênica, contudo, não foram capazes de se diferenciarem em linhagem adipogênica. No entanto, células tronco mesenquimais derivadas do SV de diferentes espécies de mamíferos já mostraram sua capacidade de se diferenciarem em linhagens do mesoderma, como em CTM do SV bovino (MANÇANARES et al., 2015), suíno (BERTASSOLI et al., 2015), equino (FRANCIOLLI et al., 2020), camundongo do novo mundo (FAVARON et al., 2014) e em humanos (WANG et al., 2008).

Além de linhagem do mesoderma, as CTM derivadas do SV canino também apresentam a capacidade de se diferenciarem *in vitro*, quando estimuladas e transduzidas com VEGF, para a linhagem endotelial (FRATINI et al., 2016). Além disso, no estudo de Mançanares e colaboradores (2019) foi identificada a capacidade de CTM derivadas do SV bovino se diferenciarem em uma estrutura tubular, tridimensional semelhante à vasos, com expressão gênica de VEGF, levando a crer na existência de uma linhagem de células tronco perivasculares no saco vitelino.

6.1.3 Imunofenotipagem e Análise da expressão gênica

Quanto a caracterização dos marcadores celulares, as células analisadas neste trabalho apresentaram expressão em 26% das células positivas para CD105 e 34,8% das células positivas para CD44 na citometria de fluxo, bem como expressão gênica por RT-qPCR. As células derivadas do SV canino também apresentaram expressão gênica de CD90, apesar de apenas 2,6% das células apresentarem expressão por citometria de fluxo. Associado a isso, houve ausência de expressão de marcadores característicos de células endoteliais e hematopoiéticas, como CD13, CD31, CD34 e CD117, tanto analisado por citometria de fluxo quanto por análise da expressão gênica, mostrando característica imunofenotípica de CTMs (DOMINICI et al., 2006).

As células também apresentaram expressão gênica de CD146 e CD140b, sendo estes marcadores característicos de pericitos, já sendo identificados em pericitos derivados de diferentes espécies e tecidos (ESTEVEES; DONADEU, 2018).

Apesar de haver marcadores característicos de CTM, a expressão de alguns deles pode variar de acordo com o tecido e/ou espécie que as células tronco foram derivadas, sabe-se que CTM derivadas do SV bovino apresentaram expressão positiva em 22,29% e 11,63% das células para CD90 e CD105, respectivamente. No entanto, apenas 1,72% das células apresentaram expressão de CD44, além de expressaram em 7,8% das células CD34, marcador de células tronco hematopoiéticas (MANÇANARES et al., 2015). CTM derivadas do SV suíno também apresentaram expressão de CD105 e CD90, além de marcadores de pluripotência, como Nanog e Oct3/4, no entanto, apresentaram expressão positiva de CD117, marcador característico de células hematopoiéticas (BERTASSOLI et al., 2015). Wenceslau e colaboradores (2011) realizaram a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea canina e identificaram uma alta expressão de CD44, no entanto, menos de 1% das células expressaram CD90, menos de 3% expressaram CD13 e não houve expressão de CD31, CD117 e CD45, mostrando resultados semelhantes ao encontrado neste estudo para CTM derivadas do SV canino.

Wenceslau e colaboradores (2011) também realizaram a caracterização imunofenotípica por imunocitoquímica de CD44 em CTM do sv canino, observando uma alta expressão, indo de encontro aos resultados deste estudo. O CD44 é um marcador presente nas CTM, no entanto não é um dos marcadores essenciais para caracterização destas células, sendo um marcador característico da linhagem de MABs, caracterizados como células CD44+/CD13+ (BERRY et al., 2007). Os MABs são células multipotentes derivadas do músculo esquelético e da aorta embrionária, sendo que MABs derivados do músculo canino, foi identificada a expressão de CD44 e CD13 associado a não expressão dos marcadores CD34, CD45, CD117 ou CD31 (SAMPAOLESI et al., 2006b).

No presente trabalho, as células tronco isoladas do saco vitelino apresentam um perfil semelhante ao descrito no estudo de Cunha e colaboradores (2018), que caracterizaram MABs derivados do músculo esquelético de fetos de ratos, onde as células foram caracterizadas pela expressão de marcadores CD44 e CD146, o

marcador de pericito CD140b e não expressão do marcador endotelial CD31 e hematopoiético CD45, mostrando perfil de expressão de marcadores semelhantes aos encontrados neste experimento.

Uma outra hipótese levantada neste estudo, foi que células tronco derivadas do SV canino, possuam uma população de pericitos, uma vez que estas células também possuem capacidade multipotente e estão associadas aos vasos e já foram identificados em diversos tecidos, como no músculo esquelético, placenta e tecido adiposo (CRISAN et al., 2008). Estas células foram identificadas há décadas como responsáveis pela permeabilidade dos vasos, no entanto, estudos atuais têm mostrado a capacidade destas células de se diferenciarem em linhagens do mesoderma, além de mostrarem estar relacionadas com as CTM, sendo um possível precursor de CTM nos tecidos (CAPLAN, 2008; RÓŻYCKA; BRZÓSKA; SKIRECKI, 2017). Os pericitos apresentam expressão positiva de CD44, CD90, CD105, CD146, bem como expressão de CD140b (DELLAVALLE et al., 2007), marcadores estes, expressos nas células tronco multipotentes derivadas do saco vitelino apresentadas neste estudo.

Deste modo, as células tronco multipotentes derivadas do saco vitelino canino isoladas e caracterizadas neste estudo foram expandidas até a quarta passagem, para se obter uma população mais homogênea, mostrando assim, a ausência de população de células hematopoiéticas, presente em culturas de células tronco derivadas do saco vitelino de outras espécies (FAVARON et al., 2014; BERTASSOLI et al., 2015; MANÇANARES et al., 2015). Ainda assim, as células mostraram uma expressão positiva de marcadores de linhagens mesenquimais e uma baixa expressão gênica de marcadores endoteliais característicos de células perivasculares, levando a crer que, ainda que em pequena quantidade, exista uma população de células tronco perivasculares nas células tronco multipotentes derivadas do saco vitelino canino, podendo ser favorável no tratamento de uma distrofia de acometimento sistêmico como a Distrofia Muscular de Duchenne.

6.1.4 Análise de Bioluminescência *in vivo*

Foi realizada um estudo piloto, com a marcação das células com CellTracker Green e aplicação em camundongo C57BL/10, para tentar avaliar a capacidade de migração celular *in vivo*, no entanto, apesar de ser avaliada a bioluminescência nas

células *in vitro*, não foi possível identificar no animal pelo IVIS Lumina. Apesar de não ter sido possível identificar neste experimento, já foi demonstrado que CTM derivadas de placenta humana permaneceram em camundongos *mdx* por 21 dias após a aplicação intramuscular, sendo demonstrado pela análise de bioluminescência (BIER et al., 2018), por isso, acreditamos que o fato de não ter sido demonstrada a bioluminescência *in vivo* neste trabalho se deve a limitação do equipamento utilizado, em não conseguir identificar em tecidos mais profundos.

6.2 EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CTM DERIVADOS DE SV ASSOCIADA AO LIT EM CAMUNDONGOS *MDX*

6.2.1 Testes Funcionais

Terapias de suporte têm sido realizadas para estudo da DMD em modelos animais, como a terapia celular e treinamento físico visando a manutenção da funcionalidade e retardar o processo de degeneração muscular, uma vez que terapias que levam a cura da doença ainda não são efetivas (CELLS et al., 2019).

Neste estudo optou-se por avaliar os animais pelos testes em Rotarod e teste de suspensão em dois membros, que avaliam não apenas a força, mas também coordenação e equilíbrio dos animais, mostrando uma combinação funcional de fatores (AARTSMA-RUS; VAN PUTTEN, 2014), no entanto não identificamos diferença estatística entre os grupos de tratamento, sendo visto uma melhora no decorrer do tempo apenas do grupo *mdxS* no teste de suspensão em dois membros, possivelmente decorrente da aprendizagem no teste (SIEMIONOW et al., 2020).

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram descritos por Morais e colaboradores (2020), que realizaram protocolo de treinamento em esteira semelhante ao realizado neste estudo, não encontrando diferença estatística entre os animais distróficos sedentários e treinados no teste de Rotarod. No entanto, no teste de preensão os autores identificaram diferença estatística apenas após 15 dias de exercício, não sendo encontrado diferença nas demais avaliações. Além disso, no estudo de Kogelman e colaboradores (2018), camundongos *mdx* sedentários e treinados em roda de corrida voluntária, não apresentaram diferença estatística no

teste de suspensão em dois membros, assim como os resultados encontrados neste experimento.

No estudo de Nitahara-Kasahara e colaboradores (2021) houve a aplicação de células tronco pluripotentes em camundongos *mdx* e demonstraram um aumento na força de preensão em camundongos *mdx* que receberam alta dose de células repetidas vezes, no entanto, a força de preensão não melhorou em camundongos *mdx* que receberam uma aplicação única em dose alta ou repetidas aplicações em baixa dose, indo de encontro aos resultados encontrados no presente trabalho.

Sabe-se que o modelo de camundongo *mdx* não apresentem grandes alterações de função, no entanto, alguns estudos demonstraram que após o treinamento físico, os animais treinados apresentam melhora de força de preensão (HYZEWICZ et al., 2017; MORAIS et al., 2020). No estudo de Zelikovich e colaboradores (2019) houve uma melhora na força tetânica do tibial anterior e força de preensão após seis meses de treinamento em camundongos que realizaram exercício em esteira à 4m/min e 8m/min em comparação com o grupo sedentário. No estudo de Call e colaboradores (2010), camundongos *mdx* que realizaram o treinamento em roda de corrida voluntária livre ou com resistência também apresentaram uma maior força de preensão quando comparado com os camundongos sedentários.

Além disso, no estudo de Pedrazzani e colaboradores (2021), avaliando a força *ex vivo* que realizaram treinamento excêntrico de baixa intensidade em esteira demonstraram melhora dos animais após o treino, na avaliação da força de fibra única do músculo sóleo após 21 dias de treinamento, quando comparado ao grupo sedentário *mdx*.

Hamm e colaboradores (2021) realizaram um estudo com terapia gênica com microdistrofina, associado a treinamento físico em roda de corrida voluntária, foi realizado o teste de fadiga em esteira, onde os camundongos *mdx* treinados que receberam a terapia gênica com microdistrofina apresentaram resultados semelhantes aos camundongos não distróficos treinados. Além disso o estudo demonstrou que a roda de corrida voluntária combinada com terapia gênica com microdistrofina melhorou a resistência a fadiga 2 vezes mais do que a terapia gênica sozinha. No entanto, no teste de força *ex vivo* das fibras musculares do músculo

diafragma, o grupo que recebeu terapia genética e não realizou exercício produziu maior força do que realizou treinamento em roda de corrida voluntária.

Esper e colaboradores (2015) realizaram terapia celular com uso de CTM derivadas da polpa do dente humano em camundongos *mdx* associado à acupuntura e o grupo com tratamento associado apresentou melhor resultado no teste de suspensão em dois membros em relação aos demais grupos de camundongos *mdx* avaliados, no entanto, a forma de avaliação do teste foi adaptada dos padronizados na literatura, sendo diferente dos critérios utilizados neste estudo.

No estudo de Siemionow e colaboradores (2020) foi observado um aumento da força no teste de suspensão em dois membros dos camundongos *mdx* que receberam a aplicação intramuscular de quimera de mioblastos e CTM humanas em comparação aos camundongos que receberam as células não fundidas, nos dias 14 e 42 após a aplicação. No entanto, os autores reforçam que pode haver o viés de aprendizagem no teste, uma vez que este foi repedido diversas vezes durante o experimento.

Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística no presente estudo, um estudo com aplicações múltiplas de CTM derivadas de cordão umbilical em pacientes com distrofias musculares, dentre eles, DMB, facio-escápulo-umeral e de cinturas, encontrou melhora significativa da força dos pacientes, em flexão e adução de quadril e em membros superiores, podendo ser viável a aplicação local de CTM para aumento de força em movimentos específicos, além disso houve melhora da marcha de 6 dos 22 pacientes avaliados (ŚWIĄTKOWSKA-FLIS et al., 2021).

6.2.2 Análise de fibras com núcleo central e área de fibrose intramuscular

No presente estudo, não foram encontradas diferenças morfológicas e na morfometria do número de fibras com núcleo central entre os grupos distróficos, no entanto, houve diferença em relação ao grupo WT. Quando a análise da área de fibrose intramuscular, não houve diferença estatística da área de fibrose intramuscular no músculo QD entre os grupos que receberam a terapia celular, independente de realizarem o protocolo de treinamento. Foi possível observar uma menor área de fibrose intramuscular no grupo *mdxT+TC*, que foi submetido ao LIT associado à TC recebeu a terapia celular, em relação aos grupos que não receberam terapia celular, independentemente de ter realizado o treinamento físico ou terem permanecido

sedentários, mostrando que a associação terapêutica foi melhor que o treinamento isolado ou nenhuma intervenção. No entanto, o grupo *mdxS*+TC, apesar de ter apresentado menor área de fibrose intramuscular quando comparado ao grupo que realizou o LIT, não foi visto diferença em relação ao grupo distrófico sedentário.

Além disso, no músculo GAS, o grupo distrófico que recebeu a associação terapêutica, apresentou uma menor área de fibrose intramuscular que os grupos que receberam as terapias isoladamente, mostrando um possível efeito parácrino das CTM no músculo próximo à aplicação e uma resposta adaptativa ao exercício. No entanto, no músculo TB foi encontrada uma maior área de fibrose intramuscular do grupo *mdxT*+TC comparado ao grupo *mdxS*+TC, podendo ser devido ao LIT, uma vez que o músculo apresenta um menor tamanho e importante função durante o exercício em esteira.

Semelhante ao resultado encontrado neste estudo, Gaiad e colaboradores (2017) também não identificaram diferença estatística entre camundongos *mdx* treinados e sedentários após protocolo de treinamento de baixa intensidade em esteira horizontal, quando avaliado fibras com núcleo central e diâmetro das fibras do tibial anterior, no entanto houve uma redução na área de fibrose intramuscular. Outros estudos que também realizaram um protocolo de LIT semelhante ao realizado neste estudo encontram uma redução da área de fibrose intramuscular nos camundongos treinados no músculo TB (FERNANDES et al., 2019; MORAIS et al., 2020) e gastrocnêmio (PINTO et al., 2018; FERNANDES et al., 2019).

No estudo de Hamm e colaboradores (2021), onde foi realizada terapia gênica com microdistrofina, os camundongos sedentários e treinados em roda de corrida voluntária não apresentam diferença significativa de áreas musculares com alteração patológica. No estudo de Esper e colaboradores (2015) que realizou terapia celular com uso de CTM derivadas da polpa do dente humano em camundongos *mdx* também não houve diferença na morfologia do músculo tibial anterior dos camundongos *mdx* avaliados. No estudo de Kerkis e colaboradores (2008), onde foi aplicado CTM derivadas de polpa de dente humano em cães distróficos, no entanto, houve presença de degeneração muscular, necrose e fibras com núcleo central.

No estudo de Kogelman e colaboradores (2018) também não houve diferença significativa na área patológica do quadríceps de camundongos *mdx* que realizaram exercício voluntário em roda de corrida em relação ao grupo sedentário.

Já no estudo de Frinchi e colaboradores (2014), houve uma redução significativa de áreas necróticas inflamatórias do músculo gastrocnêmio e quadríceps de camundongos *mdx* exercitados em Rotarod em comparação com camundongos *mdx* sedentários. No entanto, não identificaram diferença significativa da área total de necrose-regeneração no diafragma de camundongos *mdx* sedentários e treinados (MORICI et al., 2017).

No entanto, alguns estudos que utilizaram terapia celular apresentaram respostas positivas após aplicação, como no estudo de Siemionow e colaboradores (2020) que realizaram a aplicação intramuscular de quimera de mioblastos e CTM humanas no músculo gastrocnêmio de camundongos *mdx* e observaram uma diminuição do número de fibras com núcleo central em comparação com controles. Shang e colaboradores (2016) CTM foram isoladas de medula óssea de camundongos e pré-tratadas com meio condicionado com Wnt3a, as células foram aplicadas em camundongos *mdx*, via intravenosa, após 16 semanas foi identificada uma redução de fibras com núcleo central e área de tecido conjuntivo no músculo gastrocnêmio. No estudo de Bier e colaboradores (2018) os camundongos *mdx* que receberam CTM derivadas de placenta humana, de forma intramuscular mostraram menor área de infiltrado inflamatório no QD.

6.2.3 Análise de citocinas inflamatórias e marcadores de regeneração muscular

As citocinas inflamatórias analisadas, houve diferença estatística apenas no músculo QD, com aumento da expressão de IL1 e IL4 no grupo *mdxT* em comparação com o grupo treinado que recebeu as CTM e no coração, com aumento da expressão de IL10 no grupo sedentário que recebeu as CTM em comparação com o grupo sedentário que não recebeu a terapia.

Quando aos marcadores de regeneração muscular no QD, foi visto que o grupo *mdxT* apresentou alta expressão de MyoD, relacionados a sinalização para diferenciação de mioblastos, além de alta expressão de TGF β , que está associado a sinalização de vias de fibrose.

No TB foi visto que os grupos distróficos não apresentaram diferença entre si e em relação ao grupo WT na expressão da MyoD, no entanto, foi visto maior expressão de TGF β e IGF β nos grupos distróficos, exceto no grupo *mdxS+TC*, que não houve

diferença em relação ao TGF β . Nos músculos GAS e DIA não houve diferença na expressão dos genes relacionados a regeneração muscular.

No coração, não houve diferença na expressão de IGF β nos grupos distróficos sedentários, no entanto, o grupo que se manteve sedentário e não recebeu a terapia celular apresentou uma maior expressão em comparação aos grupos treinados (com e sem terapia celular) e o grupo controle não distrófico.

Sabe-se que a níveis proteicos o TNFa se encontra em níveis elevados em comparação com controles saudáveis (ICHIM et al., 2010), no entanto, não encontramos diferença na expressão gênica nos músculos avaliados. Sabe-se que o treinamento físico em camundongos distróficos altera macrófagos M1 para M2, mas não se sabe bem sobre citocinas inflamatórias (HYZEWICZ et al., 2017).

Hyzewicz e colaboradores (2017) não encontraram diferença nas citocinas inflamatórias IL1 e TNF α entre camundongos treinados e sedentários. Além disso, no estudo de Bier e colaboradores (2018), camundongos *mdx* que receberam CTM derivadas de placenta humana de forma intramuscular mostraram uma expressão diminuída de IL6 e TNF α nos animais tratados e menor expressão de TGF β no diafragma e coração dos camundongos tratados com CTM, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo. Além disso, no estudo de Morais e colaboradores (2020), onde a foi analisado o TGF β 1 por IHC, foi visto presença no sarcoplasma dos músculos TB e sóleo do grupo sedentário.

Dentro do exposto, acredita-se que as citocinas inflamatórias e os marcadores ligados a regeneração muscular devem ser melhor estudados, para tentar entender os mecanismos responsáveis pela redução da fibrose intramuscular observada neste estudo.

7 CONCLUSÕES

As células tronco multipotentes derivadas do saco vitelino canino apresentaram caracterização imunogênica semelhante ao descrito para células tronco mesenquimais, além de apresentarem expressão gênica de marcadores de membrana semelhantes aos descritos para células perivasculares, sendo uma célula promissora para terapias para doenças sistêmicas, como a Distrofia Muscular de Duchenne.

Em relação ao protocolo experimental proposto neste estudo, foi possível identificar que ambos os grupos distróficos apresentaram respostas semelhantes nos testes funcionais e análise morfológica de fibras com núcleo central.

Com base nos resultados encontrados, a associação terapêutica proposta, foi capaz de reduzir o percentual de área de fibrose intramuscular no músculo QD em comparação aos grupos distróficos treinado e sedentário, que não receberam as CTM, além de ter apresentado uma menor área de fibrose intramuscular que o grupo treinado que não receberam as CTM no músculo gastrocnêmio, mostrando um possível efeito parácrino das CTM no músculo próximo à aplicação.

Os animais treinados que receberam a terapia celular, não apresentaram diferença estatística do grupo que recebeu terapia celular e se mantiveram sedentários no local da aplicação, respaldando que a associação de treinamento físico de baixa intensidade não foi capaz de alterar o efeito da terapia celular e se mostrou benéfico ao reduzir a fibrose intramuscular em comparação ao grupo que realizou apenas o treinamento físico e o grupo de camundongos distróficos sedentários sem terapia celular.

Além disso, as citocinas inflamatórias analisadas, os músculos distróficos tenderam a uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e menor expressão das citocinas anti-inflamatórias. Quando aos marcadores de regeneração muscular, foi visto uma tendência a uma maior expressão de IGF β nos músculos avaliados, assim, estes marcadores devem ser melhor estudados, para tentar entender os mecanismos responsáveis pela redução da fibrose intramuscular observada neste estudo.

REFERÊNCIAS

- AARTSMA-RUS, A.; VAN PUTTEN, M. Assessing functional performance in the Mdx mouse model. **Journal of Visualized Experiments**, v. 85, n. 85, p. 51303, 27 mar. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4158772/>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- ABREU, P.; LEAL-CARDOSO, J. H.; CECCATTO, V. M. Adaptação do músculo esquelético ao exercício físico: Considerações moleculares e energéticas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 23, n. 1, p. 60–65, 2017.
- AL-KHALILI SZIGYARTO, C. Duchenne Muscular Dystrophy: recent advances in protein biomarkers and the clinical application. **Expert Review of Proteomics**, v. 17, n. 5, p. 365–375, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1773806>.
- ALEXAKIS, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: A self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. 661–669, 2007.
- ANTONIADOU, E.; DAVID, A. L. Placental stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 31, p. 13–29, 1 fev. 2016.
- ARICÒ, A. et al. Platelet-derived growth factors and receptors in canine lymphoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 151, n. 4, p. 322–328, 2014.
- ASLESH, T.; ERKUT, E.; YOKOTA, T. Restoration of dystrophin expression and correction of Duchenne muscular dystrophy by genome editing. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 21, n. 8, p. 1049–1061, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1872539>.
- BABBS, A. et al. From diagnosis to therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 3, p. 813–821, 2020.
- BARNABEI, M. S. et al. Exercise and Muscular Dystrophy: Implications and Analysis of Effects on Musculoskeletal and Cardiovascular Systems. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- BELLO, L.; PEGORARO, E. The “ Usual Suspects ”: Genes for Inflammation , Fibrosis , Regeneration , and Muscle Strength Modify Duchenne Muscular Dystrophy. n. Dcm, p. 1–23, 2019.
- BERRY, S. E. et al. Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the *mdx/utrn*^{-/-} mouse model for Duchenne muscular dystrophy. **Regenerative Medicine**, v. 2, n.

3, p. 275–288, 2007. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460751.2.3.275>>.

BERTASSOLI, B. M. et al. Archives of Veterinary Science ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO DE SUÍNOS DOMÉSTICOS (*Sus scrofa*) RESUMO: Anexos fetais como cordão umbilical , membrana amniótica e líquido amniótico foram recentemente sugeridos como fonte. p. 1–10, 2015.

BIER, A. et al. Biomaterials Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy. **Biomaterials**, v. 174, p. 67–78, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.055>>.

BREULS, N.; GIACOMAZZI, G.; SAMPAOLESI, M. (Epi)genetic Modifications in Myogenic Stem Cells: From Novel Insights to Therapeutic Perspectives. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 429, 2019.

BRIGUET, A. et al. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 10, p. 675–682, 2004.

CALL, J. a. et al. Progressive resistnce voluntary wheel running in the mdx Mouse. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 871–880, 2010.

CAMPS, J. et al. Interstitial Cell Remodeling Promotes Aberrant Adipogenesis in Dystrophic Muscles. **Cell Reports**, v. 31, n. 5, p. 107597, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107597>>.

CAPLAN, A. I. **All MSCs Are Pericytes?** *Cell Stem Cell*, , 11 set. 2008. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786406/>>. Acesso em: 9 mar. 2021.

CAPOGROSSO, R. F. et al. Contractile efficiency of dystrophic mdx mouse muscle: In vivo and ex vivo assessment of adaptation to exercise of functional end points. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 4, p. 828–843, 2017.

CELLS, E. S. et al. Precision Medicine and Exercise Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. **Sports**, v. 7, n. 3, p. 64, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.01.021>>.

CHAL, J.; POURQUIE, O. Making muscle : skeletal myogenesis in vivo and in vitro. p. 2104–2122, 2017.

- COSSU, G. et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. v. 7, n. 12, p. 1513–1528, 2015.
- COSSU, G. et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1470–1471, 2016. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emmm.201607129>>.
- CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. **Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: Progress and perspectives** *Theriogenology* Elsevier Inc., 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21463720/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- CRISAN, M. et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 301–313, 11 set. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786417/>>. Acesso em: 9 mar. 2021.
- CUNHA, M. et al. Fate of mesoangioblasts in a vaginal birth injury model : influence of the route of administration. n. October 2017, p. 1–10, 2018.
- DE CESARIS, V. et al. Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2, p. 235–242, 2017.
- DELANEY, K. et al. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biology International**, v. 41, n. 7, p. 706–715, 2017.
- DELLAVALLE, A. et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 255–267, 2007.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, ago. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>>.
- ERKUT, E.; YOKOTA, T. **CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy** *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. .
- ESTEVEZ, C. L.; DONADEU, F. X. Pericytes in veterinary species: Prospective isolation, characterization and tissue regeneration potential. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2018. 1109p. 67–

77.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 2, n. 1, p. 11–45, 1 mar. 1973. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0264.1973.tb00253.x>>. Acesso em: 6 mar. 2021.

FAVARON, P. O. et al. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from New World mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

FERNANDES, D. C. et al. Low intensity training improves redox status and reduces collagen fibers on dystrophic muscle. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 15, n. 2, p. 213–223, 1 abr. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6509444/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3509444/)>. Acesso em: 10 mar. 2021.

FERREIRA LEMES DE MORAIS, A. et al. Treadmill low-intensity training mediates fibrosis and maintains the function of dystrophic muscle: Understanding the effects over time. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 10, n. 4, p. 724–733, 2020a.

FERREIRA LEMES DE MORAIS, A. et al. Treadmill low-intensity training mediates fibrosis and maintains the function of dystrophic muscle: Understanding the effects over time. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 10, n. 4, p. 724–733, 2020b.

FERREIRA PINTO, P. A. et al. Brazilian Journal of Veterinary Medicine. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e001221–e001221, 1 jun. 2021. Disponível em: <<https://rbmv.org/BJVM/article/view/1179>>. Acesso em: 6 abr. 2022.

FONTANA, S. et al. Reduction of mdx mouse muscle degeneration by low-intensity endurance exercise: a proteomic analysis in quadriceps muscle of exercised versus sedentary mdx mice. **Bioscience Reports**, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://bioscirep.org/cgi/doi/10.1042/BSR20150013>>.

FRANCIOLLI, A. L. R. et al. Equine yolk sac: A stem cells source. **International Journal of Morphology**, v. 38, n. 5, p. 1412–1420, 1 out. 2020. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022020000501412&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 16 fev. 2021.

FRATINI, P. et al. Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 71–76, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.11.010>>.

FRINCHI, M. et al. Recovery of damaged skeletal muscle in mdx mice through low-

- intensity endurance exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 1, p. 19–27, 2014.
- GAIAD, T. P. et al. Low-intensity training provokes adaptive extracellular matrix turnover of a muscular dystrophy model. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 13, n. 6, p. 693–703, 2017. Disponível em: <<http://www.e-jer.org>>.
- GRAGES, S. M.; BELL, M.; BERLAU, D. J. New and emerging pharmacotherapy for duchenne muscular dystrophy: a focus on synthetic therapeutics. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 7, p. 841–851, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1732350>>.
- GRANGE, R. W.; LUCA, A. De. Use of treadmill and wheel exercise to assess dystrophic state Official reviewer. **Neuromuscular Network**, n. Id, p. 1–12, 2013.
- GROUND, M. D. et al. NIH Public Access. **Neurobiol Dis.**, v. 31, p. 1–19, 2008.
- GUIRAUD, S.; DAVIES, K. E. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 34, p. 36–48, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2017.04.002>>.
- HAMM, S. E. et al. Voluntary wheel running complements microdystrophin gene therapy to improve muscle function in mdx mice. **Molecular Therapy - Methods and Clinical Development**, v. 21, n. March, p. 144–160, 2021.
- HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738–749, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.029>>.
- HOEPERS, A. et al. Effect of Aerobic Physical Exercise in an Animal Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 10, p. 1552–1564, 2020.
- HYZEWICZ, J. et al. Low-Intensity Training and the C5a Complement Antagonist NOX-D21 Rescue the mdx Phenotype through Modulation of Inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 5, p. 1147–1161, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.12.019>>.
- ICHIM, T. E. et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cellular Immunology**, v. 260, n. 2, p. 75–82, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.10.006>>.
- KACZOR, J. J. et al. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 1, p. 145–154, 2007.

- KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 3 ago. 2008. Disponível em: <<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-6-35>>. Acesso em: 23 mar. 2022.
- KOGELMAN, B. et al. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Voluntary exercise improves muscle function and does not exacerbate muscle and heart pathology in aged Duchenne muscular dystrophy mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 125, n. August, p. 29–38, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.008>>.
- KOSTEK, M. Precision Medicine and Exercise Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. **Sports**, v. 7, n. 3, p. 64, 2019.
- LEE, K. S. et al. Effects of serial passage on the characteristics and chondrogenic differentiation of canine umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 588–595, 2013.
- LIU, J. et al. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>>. Acesso em: 6 mar. 2021.
- MACKINTOSH, E. W.; CHEN, M. L.; BENDITT, J. O. Lifetime Care of Duchenne Muscular Dystrophy. **Sleep Medicine Clinics**, v. 15, n. 4, p. 485–495, 2020.
- MALAGOLA, E. et al. Characterization and Comparison of Canine Multipotent Stromal Cells Derived from Liver and Bone Marrow. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 2, p. 139–150, 2016.
- MANÇANARES, C. A. F. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the yolk sacs of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 887–898, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26143361/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- MANÇANARES, C. A. F. et al. Morphological and molecular analysis of in vitro tubular structures from bovine yolk sac-derived MSCs. **Stem Cells International**, v. 2019, 2019.

- MANNING, J.; O'MALLEY, D. **What has the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease?** *Journal of Muscle Research and Cell Motility* Kluwer Academic Publishers, , abr. 2015. .
- MIYAZAKI, D. et al. Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Human Molecular Genetics*, v. 20, n. 9, p. 1787–1799, 2011.
- MORICI, G. et al. Mild Aerobic Exercise Training Hardly Affects the Diaphragm of mdx Mice. *Journal of Cellular Physiology*, v. 232, n. 8, p. 2044–2052, 2017.
- NITAHARA-KASAHARA, Y. et al. Dental pulp stem cells can improve muscle dysfunction in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2021.
- OKANO, T. et al. Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle and Nerve*, v. 32, n. 2, p. 191–199, 2005.
- OVERBERGH, L. et al. mRNAs USING REAL TIME QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTASE PCR. *Endocrinology*, v. 11, n. 4, p. 305–312, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466698904264>>.
- PEDRAZZANI, P. S. et al. Twenty-one days of low-intensity eccentric training improve morphological characteristics and function of soleus muscles of mdx mice. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-79168-3>>.
- PIERI, N. C. G. et al. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, n. 4, p. 625–631, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25990819/>>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- PIGA, D. et al. Human induced pluripotent stem cell models for the study and treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophies. p. 1–28, 2019.
- PINHEIRO, A. de O. et al. Characterization and immunomodulation of canine amniotic membrane stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, v. 13, p. 43–55, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32440160/>>. Acesso em: 6 mar. 2021.
- PINTO, P. A. F. et al. Low intensity training provokes adaptations on muscle fibrosis of a muscular dystrophy model. *Int. j. morphol*, p. 471–477, 2018. Disponível em:

<[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022018000200471)

95022018000200471>. Acesso em: 6 mar. 2021.

PUTTEN, M. Van. The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time. n. Id, p. 1–12, 2019.

RÓŻYCKA, J.; BRZÓSKA, E.; SKIRECKI, T. Perycyty i ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne * Aspects of pericytes and their potential therapeutic use. v. 5, p. 186–197, 2017.

SAMPAOLESI, M. et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. v. 444, n. November, 2006a.

SAMPAOLESI, M. et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 574–579, 2006b.

SANDRI, M. Memory or amnesia : the dilemma of stem cell therapy in muscular dystrophies. v. 125, n. 12, p. 4331–4333, 2015.

SASAKI, K. et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. **Cell Death and Disease**, v. 82, n. 12, p. 275–288, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13395-015-0055-5>>.

SERRANO, A. L.; MÚÑOZ-CÁNOVES, P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: Mechanisms and translational implications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 64, p. 181–190, abr. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952116303044>>.

SHANG, Y. et al. Activation of Wnt3a signaling promotes myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in mdx mice. **Nature Publishing Group**, v. 37, n. 7, p. 873–881, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/aps.2016.38>>.

SIEMIONOW, A. M. et al. Title : Transplantation of Dystrophin Expressing Chimeric (DEC) Human Cells of Myoblast / MSC Origin Improves Function in Duchenne Muscular Dystrophy Model. p. 1–28, 2020.

SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. suppl, p. 21–31, 2007.

SUN, C. et al. Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Experimental Neurology**, v. 323, n. July 2019, p. 113086, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113086>>.

SUN, C. et al. Therapeutic strategies for duchenne muscular dystrophy: An update.

Genes, v. 11, n. 8, p. 1–25, 2020b.

SUN, C. et al. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update.

Genes 2020, Vol. 11, Page 837, v. 11, n. 8, p. 837, 23 jul. 2020c. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4425/11/8/837/htm>>. Acesso em: 24 mar. 2022.

ŚWIĄTKOWSKA-FLIS, B. et al. The use of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with muscular dystrophies: Results from compassionate use in real-life settings. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1372–1383, 2021.

SWIDERSKI, K.; LYNCH, G. S. Murine models of Duchenne muscular dystrophy: is there a best model? **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 321, n. 2, p. C409–C412, 2021.

VAINZOF, M. et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, n. 3, p. 241–248, 2008.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. v. 36, n. 5, 2003.

VAN DOMMELEN, P. et al. Early developmental milestones in Duchenne muscular dystrophy. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1198–1204, 2020.

VITOR, G. et al. Aquapuncture Using Stem Cell Therapy to Treat Mdx Mice. v. 2015, 2015.

WANG, X. Y. et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2436–2443, 15 fev. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18045971/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.

WANG, Z. et al. Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. **Ilar J**, v. 50, n. 2, p. 187–198, 2009. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/885B5CF2-7994-41B0-AB74-06713803D568>>.

WASALA, N. B.; CHEN, S. J.; DUAN, D. Duchenne muscular dystrophy animal models for high-throughput drug discovery and precision medicine. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 443–456, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1718100>>.

WENCESLAU, C. V. et al. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: Yolk sac, liver, and Bone Marrow. **Tissue Engineering - Part A**, v. 17, n. 17–18, p. 2165–2176, 2011a.

WENCESLAU, C. V. et al. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues:

Yolk sac, liver, and Bone Marrow. **Tissue Engineering - Part A**, v. 17, n. 17–18, p. 2165–2176, 1 set. 2011b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21529262/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.

WILLMANN, R. et al. Enhancing translation: Guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 1, p. 43–49, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896611001350>>.

YIN, L. et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. **Pharmacological Research**, v. 172, n. August, 2021.

ZABŁOCKA, B.; GÓRECKI, D. C.; ZABŁOCKI, K. **Disrupted calcium homeostasis in duchenne muscular dystrophy: A common mechanism behind diverse consequences** *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. .

ZELIKOVICH, A. S. et al. Moderate exercise improves function and increases adiponectin in the mdx mouse model of muscular dystrophy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42203-z>>.