

Treino de baixa intensidade mantem a funcionalidade e fibrose em camundongos *mdx*

Low-intensity training maintains functionality and fibrosis in mdx mice

El entrenamiento de baja intensidad mantiene la funcionalidad y la fibrosis en ratones mdx

Ana Flávia Santos¹, Thaís Peixoto Gaid Machado², Luana Aparecida Alves³, Ana Paula Santos⁴, Alex Sander Dias Machado⁵

1.Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Teófilo Otoni-MG, Brasil.

2.Universidade federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Teófilo Otoni-MG, Brasil. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4688-330X>

3.Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Teófilo Otoni-MG, Brasil. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0078-4648>

4.Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Teófilo Otoni-MG, Brasil. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0952-3249>

5.Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Teófilo Otoni-MG, Brasil.

Resumo

Objetivo. O presente estudo investigou os efeitos de um protocolo de treinamento de baixa intensidade sobre parâmetros funcionais, aeróbios, morfológicos e morfométricos do diafragma e músculo cardíaco de camundongos *mdx*. **Método.** Camundongos *mdx* machos com 8 semanas de idade foram submetidos a um protocolo curto (4 semanas) ou longo (8 semanas) em esteira horizontal (9m/min, 3x/semana, 30min/dia). Os camundongos *mdx* foram distribuídos aleatoriamente no grupo treinado (*mdxT*, n=8) ou não treinado (*mdxNT*, n=8). Medidas de força, equilíbrio, análise do VO₂ máximo, tempo de exaustão dos animais e histomorfometria das fibras de colágeno intramuscular foram avaliadas ao longo do tempo do protocolo no diafragma e músculo cardíaco. **Resultados.** Não houve diferenças no teste de força de preensão e Rotarod ou na deposição de fibrose do músculo cardíaco. No músculo diafragma houve um aumento na porcentagem de fibrose intramuscular no grupo *mdxT* no T4, aumento da fibrose tanto do grupo *mdxT* como *mdxNT* no T8 quando comparados ao grupo controle T0. Nas variáveis VO₂máx e tempo de exaustão, não houve um desempenho significativo mesmo com o fator tempo e treinamento. Os achados histopatológicos são observados com maior frequência no final do protocolo longo (8 semanas) tanto no grupo *mdxT* como *mdxNT*, principalmente no músculo diafragma. **Conclusão.** O treino de baixa intensidade em esteira não influenciou na deposição de fibrose no músculo cardíaco e diafragma *mdx* ao longo do tempo mantendo a força de preensão e a capacidade aeróbia dos camundongos *mdx* durante o protocolo.

Unitermos. modelo *mdx*; diafragma; músculo cardíaco; fibrose; VO₂ max

Abstract

Objective. The present study investigated the effects of a low-intensity training protocol on functional, aerobic, morphological, and morphometric parameters of the diaphragm and cardiac muscle of *mdx* mice. **Method.** Male *mdx* mice at 8 weeks of age were submitted to a short (4 weeks) or long (8 weeks) protocol on a horizontal treadmill (9m/min, 3x/week, 30min/day). The *mdx* mice were randomly assigned to the trained (*mdxT*, n=8) or untrained (*mdxNT*, n=8) group. Measures of strength, balance, analysis of VO₂ max, time to exhaustion of the animals and histomorphometry of intramuscular collagen fibers were evaluated throughout the protocol in the diaphragm and cardiac muscle. **Results.** There were no differences in the grip strength test and Rotarod or in cardiac muscle fibrosis deposition. In the diaphragm muscle, there was an increase in the percentage of intramuscular fibrosis in the

mdxT group at T4, an increase in fibrosis in both the mdxT and mdxNT groups at T8 when compared to the control group T0. In the variables VO2max and time to exhaustion, there was no significant performance even with the time and training factor. Histopathological findings are more frequently observed at the end of the long protocol (8 weeks) in both the mdxT and mdxNT groups, mainly in the diaphragm muscle. **Conclusion.** Low-intensity treadmill training did not influence fibrosis deposition in cardiac muscle and diaphragm mdx over time, maintaining grip strength and aerobic capacity of mdx mice during the protocol.

Keywords. Mdx model; diaphragm; cardiac muscle; fibrosis; VO2 max

Resumen

Objetivo. El presente estudio investigó los efectos de un protocolo de entrenamiento de baja intensidad sobre parámetros funcionales, aeróbicos, morfológicos y morfométricos del diafragma y músculo cardíaco de ratones mdx. **Método.** Se sometió a ratones mdx machos de 8 semanas de edad a un protocolo corto (4 semanas) o largo (8 semanas) en una cinta rodante horizontal (9 m/min, 3x/semana, 30 min/día). Los ratones mdx se asignaron aleatoriamente al grupo entrenado (mdxT, n=8) o no entrenado (mdxNT, n=8). Se evaluaron medidas de fuerza, equilibrio, análisis de VO2 max, tiempo hasta el agotamiento de los animales e histomorfometría de fibras de colágeno intramuscular a lo largo del protocolo en el diafragma y músculo cardíaco. Resultados: No hubo diferencias en el test de fuerza de prensión y Rotarod ni en el depósito de fibrosis del músculo cardíaco al compararlo con el grupo control T0. En las variables VO2max y tiempo hasta el agotamiento, no hubo rendimiento significativo aún con el factor tiempo y entrenamiento. Los hallazgos histopatológicos se observan con mayor frecuencia al final del protocolo largo (8 semanas) tanto en el grupo mdxT como en el mdxNT, principalmente en el músculo diafragma. Conclusión: el entrenamiento en cinta rodante de baja intensidad no influyó en la deposición de fibrosis en el músculo cardíaco y el diafragma mdx a lo largo del tiempo, manteniendo la fuerza de agarre y la capacidad aeróbica de los ratones mdx durante el protocolo.

Palabras clave. modelo mdx; diafragma; músculo cardíaco; fibrosis; VO2 máx

Trabalho realizado: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Teófilo Otoni-MG, Brasil.

Conflito de interesse: não

Recebido em: 03/03/2022

Aceito em: 23/06/2022

Endereço para correspondência: Ana Flávia Santos. Email: ana_dtina@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são doenças de caráter genético e degenerativo, com comprometimento grave e progressivo¹. A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) ocorre a partir de um defeito no gene da distrofina, que é uma proteína do complexo distrofina-glicoproteína, sua ausência causando instabilidade do sarcolema do músculo esquelético e cardíaco, deixando-os suscetíveis a danos induzidos pela contração. Progressivamente as fibras musculares são substituídas por tecido conjuntivo e adiposo^{2,3} causando rápida perda de força muscular com dificuldades em

levantar-se do chão ou usar escadas ainda na infância. No início da adolescência é esperada a perda da capacidade de deambular⁴ período no qual se iniciam as complicações respiratórias⁵.

Uma vez que a DMD não tem cura, os esforços têm sido no sentido da reabilitação e manutenção da funcionalidade dessas pessoas⁴ e visando promover a realização das Atividades e Participação Social⁶.

Pesquisas utilizando modelos animais para a DMD têm trazido acréscimos importantes nesta área. O camundongo *mdx* é o modelo animal que possui homologia genética e bioquímica com humanos que apresentam a DMD, e é muito usado em pesquisas, pela facilidade de manejo, reprodução e maior susceptibilidade ao estresse⁷. Seu fenótipo tem progressão considerada moderada, com exceção do músculo diafragma⁸.

O diafragma é o músculo respiratório mais importante na dinâmica respiratória, portanto sua função e proteção são fundamentais. O diafragma *mdx* oferece uma maior precisão em dados clínicos por sua semelhança morfológica com a DMD humana⁹, apresentando um processo patológico mais grave do que os músculos dos membros em camundongos *mdx*, com uma deposição extensiva de tecido conjuntivo fibroso e tecido adiposo⁷.

A incidência de cardiomiopatia na DMD aumenta com a idade, a maioria dos jovens com 18 anos, demonstram evidências de disfunção cardíaca, se tornando cada vez mais prevalente nesses pacientes^{2,10}. O músculo cardíaco não é

capaz de se regenerar, sendo a lesão seguida pelo processo de fibrose^{11,12}.

O VO₂ máximo (VO_{2máx}) é a maior taxa de consumo de oxigênio pelo músculo possível durante o exercício máximo, está relacionada ao desempenho do metabolismo aeróbio, é geralmente considerado o melhor indicador de resistência cardiorrespiratória e aptidão física^{13,14}. O consumo máximo de oxigênio permanece entre os melhores preditores de mortalidade por todas as causas¹⁵.

As evidências para o planejamento do exercício terapêutico para a DMD continuam com poucos parâmetros definidos (frequência, intensidade e tipo), o que dificulta a comparação entre os estudos¹⁶. Exercícios de baixa intensidade sugerem efeitos benéficos por meio da análise do stress oxidativo muscular em músculos dos membros de camundongos *mdx*^{17,18}. O presente estudo analisou os efeitos longitudinalmente de um treino de baixa intensidade em esteira em parâmetros funcionais, morfológicos, morfométricos do músculo cardíaco e diafragma de camundongos *mdx*, além de parâmetros aeróbios.

MÉTODO

Amostra

Foram estudados 48 camundongos *mdx* machos distróficos (C57BL/10ScSnDmdmdx/J) adquiridos da UniABC, São Paulo, Brasil (CQB-172/02) de 8 semanas de idade, essa idade foi escolhida por ser considerada uma fase morfolologicamente análoga da doença ao modelo *mdx*, uma

vez que os animais já sofreram um importante ciclo de degeneração/regeneração.

Esta pesquisa seguiu o protocolo ARRIVE¹⁹ e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA/UFVJM protocolo nº 025/15). O processamento e análise do material biológico foram realizados de maneira cega no Núcleo de Experimentação Animal (NEA/DFI/UFVJM).

Procedimento

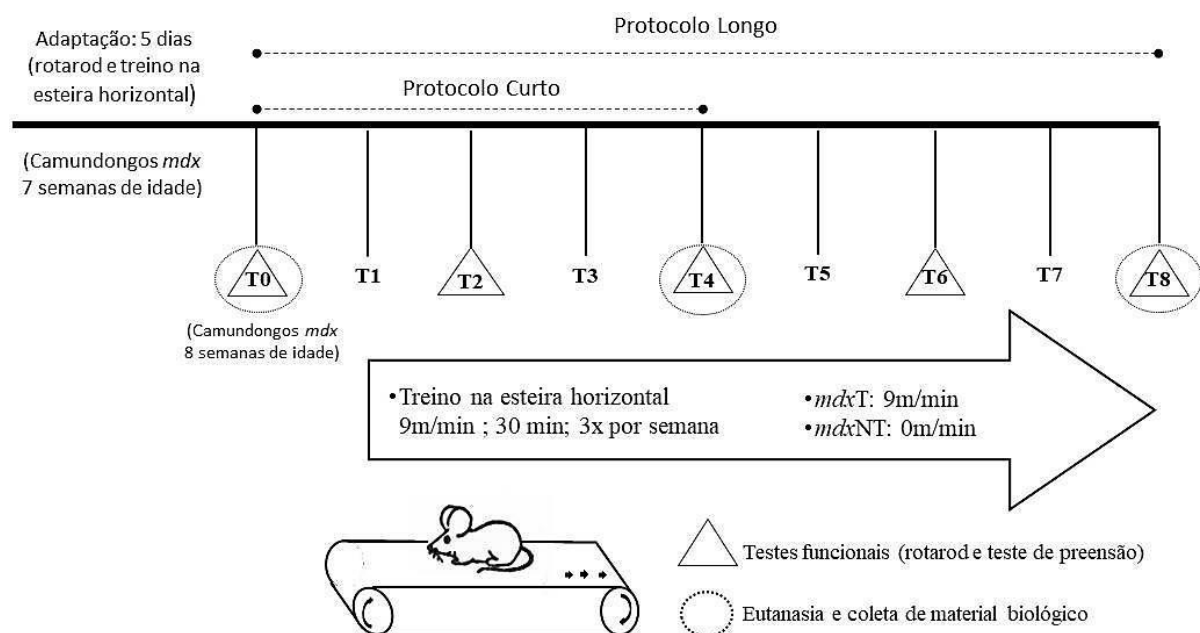
Os animais foram mantidos em gaiolas em ciclo invertido de 12 h dia/12h escuro, com temperatura ambiente controlada a 22°C e supridos com ração e água a vontade. Dos 48 animais mdx, 32 foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo treinado (*mdxT*, n=16); grupo não treinado (*mdxNT*, n=16). Outros 16 animais mdx foram distribuídos aleatoriamente em um grupo controle do tempo inicial, T0 (n=8) e grupo *mdx* treinado do protocolo do VO_{2máx} (*mdxT-VO_{2máx}*).

Delineamento experimental

O protocolo de treinamento em esteira horizontal foi iniciado após a primeira avaliação (T0). No protocolo de curta duração, os animais do grupo *mdxT* realizaram o protocolo por um período de 4 semanas (T4), e no protocolo de longa duração, o grupo *mdxT* realizou o treinamento durante 8 semanas (T8). As avaliações dos testes funcionais (Rotarod

e força de preensão) foram realizadas no grupo *mdxT* e *mdxNT* noT0 e a cada duas semanas de protocolo. No T4 e T8 foram realizadas as eutanásias dos animais e coletas dos materiais biológicos (Figura1).

Figura 1. Delineamento experimental: Período de adaptação ao rotarod e ao treino na esteira horizontal (5 dias), camundongos *mdx* com 7 semanas de idade. Δ - Período de aplicação dos testes funcionais (rotarod e teste de força de preensão) nos camundongos *mdx* do grupo controle T0 e nos grupos *mdxT* e *mdxNT* do T2,T4,T6 e T8. O – Eutanasia e coleta do material biológico (8 animais/grupo) dos camundongos *mdx* do grupo controle T0 e dos grupos *mdxT* e *mdxNT* do T4 eT8.



Protocolo de treinamento

Os animais do grupo *mdxT* passaram por uma adaptação na esteira onde as velocidades foram gradativamente aumentadas. Os animais do grupo *mdxT* foram estimulados a correr em esteira motorizada para ratos (EP 131; *Insight*, Brasil) com a velocidade de corrida

controlada em 9 metros/minutos para que o exercício terapêutico fosse considerado de baixa intensidade, de acordo com o protocolo NMD-treat²⁰. O protocolo consistiu em 30min/dia, 3x/semana durante 4 semanas (protocolo curto T4) ou 8 semanas (protocolo longo T8). Os animais do grupo *mdx*NT foram colocados em esteira horizontal com velocidade de 0m/3x/semana durante 4 ou 8 semanas com o objetivo de serem expostos às mesmas condições ambientais.

Testes funcionais

A força de preensão e o desempenho no Rotarod foram usados como medidas funcionais. Os animais foram avaliados a cada 2 semanas de protocolo. Nestes mesmos momentos os animais foram pesados em uma balança semianalítica (UX-420H 0,001g precisão) para acompanhar o bem-estar dos animais e para normalização dos valores de força de preensão evitando a influência do peso nesta variável²¹.

Teste de força de preensão

Esta medida permite acompanhar a evolução da força de preensão do animal. Os animais eram suspensos pela cauda acima da grade e, depois de agarrarem com os membros torácicos, eram puxados para trás. O valor da força máxima foi registrado pelo medidor de força de preensão *GripStrengthMeter* (*PanLab*®) específico para camundongos. Cada animal foi testado cinco vezes com um

minuto de intervalo entre as tentativas, em seguida a média dos três maiores valores foi calculada para o cálculo da força absoluta, que foi dividida pela massa corporal em gramas^{21,20}. Todas as medidas foram feitas pelo mesmo investigador cego para evitar viés.

Rotarod

Os animais foram testados no aparelho Rotarod que avalia coordenação motora e equilíbrio. Foi utilizado um aparelho Rotarod automatizado (MP13977, *Insight®*, Brasil) e realizada adaptação prévia dos animais aumentando gradativamente o tempo de permanência e as rotações por minuto (rpm). O processo de adaptação iniciou com 250 segundo e 16rpm chegando a 500 segundo e 37rpm. A semana imediatamente anterior ao início do protocolo foi usada para o processo de adaptação, onde a velocidade foi aumentada de maneira gradual, até atingir a velocidade usada no teste. Após adaptação no dispositivo, os camundongos foram colocados no tubo do Rotarod enquanto ele girava a uma velocidade lenta e constante de 5rpm. A corrida começou assim que todos os camundongos estavam em posição. A velocidade do tubo acelerou de 5 a 37rpm e manteve essa velocidade. O teste foi interrompido automaticamente quando os camundongos caíam do tubo, ativando a barra de tempo posicionada logo abaixo, sendo na sequência reposicionados imediatamente para nova tentativa. Os camundongos tiveram no máximo mais duas tentativas, o que lhes permitiu melhorar o tempo de

execução quando caíam. A sessão de teste foi encerrada para camundongos capazes de permanecer por 500 segundos²².

Determinação do consumo máximo de oxigênio - VO₂max

Para investigar se a velocidade de 9m/min recomendada por protocolos prévios para o modelo mdx (Treat-NMD)²⁰ sugere efeitos no condicionamento aeróbio através do Vo₂máx, oito animais (mdx-Vo₂máx) foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento de baixa intensidade descrito anteriormente (9m/min, 3x/semana, 30min). Este grupo não foi submetido aos testes funcionais, e a eutanásia dos animais ocorreu após as 8 semanas de protocolo. Esses animais tiveram seu Vo₂máx medido por um sistema de esteira de 4 faixas (Oxymax FAST Modular; Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Cada pista deste sistema é contida dentro de uma única câmara, permitindo a medição de parâmetros respiratórios individualmente para os camundongos. A esteira estava em protocolo de rampa, com 25° de inclinação, permitindo uma melhor quantificação do VO₂máx²³. Os camundongos foram expostos a um descanso de 5 minutos em esteiras estacionárias mantendo a inclinação. Nos 20 minutos seguintes, a velocidade da esteira foi aumentada para 5,9,12 e 15m/min. em intervalos de 5min. e foi ajustada para aumentar em 1,8m/min. a cada 2min. até a exaustão²⁴. As medidas foram realizadas por calorímetro indireto (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) acoplado a câmara metabólica (fluxo de ar=1,0L/min), local em que os ratos foram acomodados; foi introduzido ar fresco

a 0,6L/min na caixa²³. O sistema foi calibrado com mistura conhecida de gases²⁵. O VO₂ e VCO₂ foram medidos continuamente por meio de sistema computadorizado (Metabolism, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). Foram registrados os gases VO₂ e VCO₂ (L/min) e o tempo que os animais levaram para atingir a exaustão. A exaustão era considerada quando o animal tocava qualquer parte do seu corpo na grade de choque por até 10 segundos²³.

Coleta do material biológico

Os animais foram eutanasiados durante o período do protocolo de acordo com a Figura 1, setenta e duas horas após a última sessão final de exercícios, com exceção dos animais do grupo *mdxT-VO₂2_{máx}* que foram eutanasiados apenas ao final do protocolo de treinamento em T8 (n=8). Todos os animais foram submetidos à overdose de cloridrato de cetamina (200mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg), via injeção intraperitoneal. Osmúsculos diafragma (porção crural) e coração (ventrículo esquerdo) foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído a 4%.

Análise morfológica

Após protocolo de desparafinização, os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) de acordo com os procedimentos histológicos convencionais para identificação de características histopatológicas.

Quantificação do colágeno intramuscular

As lâminas reagiram com picrossirius red e foram analisadas sob luz polarizada em 400x. Aproximadamente 20 imagens seqüenciais decada animal estudado foram realizadas para realizar a análise de toda a secção transversa do músculo²⁶. A quantidade de de posição das fibras colágenas foi calculada pela porcentagem da área das fibras colágenas em relação à área total (57248,52µm²) de cada imagem, por meio de análise binária (preto/branco) e expressa em micrômetros pelo software ImageJ®.

Análise qualitativa dos dados

Na análise qualitativa foram utilizadas três imagens por animal de cada grupo nos três tempos de treino (T0, T4 e T8) para inferir sobre as características morfológicas do músculo diafragma e cardíaco distrófico. Foi observado a presença de infiltrado inflamatório, núcleos centrais, heterogeneidade das fibras musculares, distribuição e espessura das fibras colágenas no endomísio e perimísio.

Análise estatística

Foi analisada a normalidade dos dados, pelo teste de Shapiro-Wilk em nível de 5% para todas as análises. Para análise estatística do consumo máximo de oxigênio e tempo de exaustão dos animais usamos ANOVA de medidas repetidas em nível de significância também de 5%. Para análise da fibrose muscular do coração com dados foi utilizado a ANOVA one-way. Para a análise de fibrose do

diafragma foi constatado não normalidade dos dados em nível de significância de 5% e verificamos que a variância entre os grupos não foi homogênea para $p < 0,05$ de acordo com o teste de Levene, logo foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste post-hoc de *Nemenyi*. Os testes foram realizados utilizando o software SPSS versão 25.

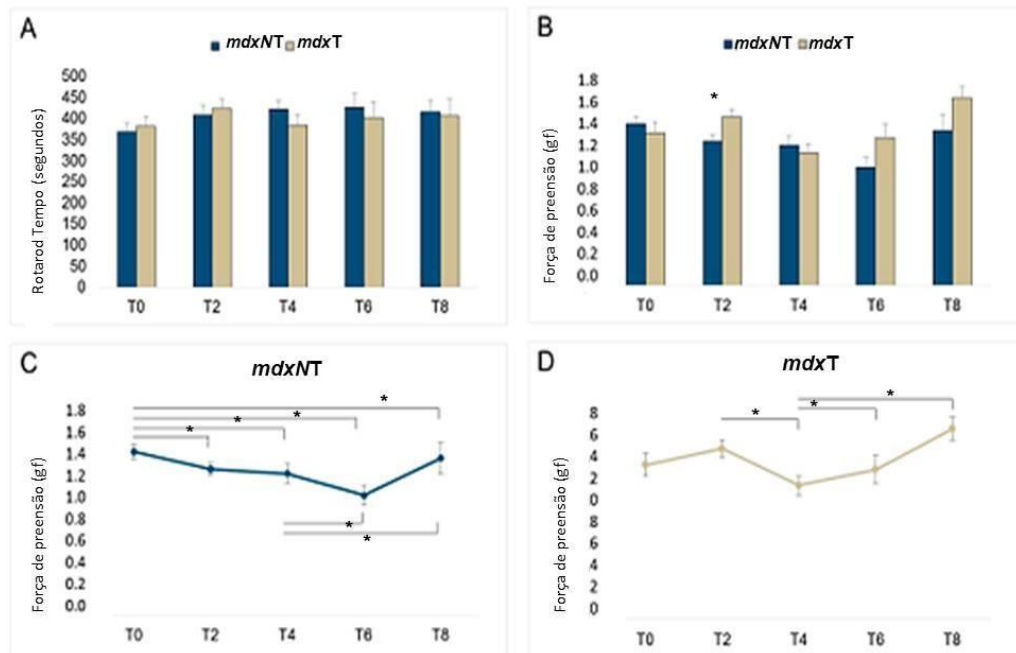
RESULTADOS

Testes Funcionais

Todos os animais *mdxT*, do protocolo de curta duração (4 semanas) e longa duração (8 semanas) terminaram o protocolo de esteira estabelecido, completando 30min/sessão a 9m/min. Os valores médios do tempo de permanência no rotarod não apresentaram diferenças entre os grupos.

No T2 os animais do grupo *mdxT* apresentou valores mais elevados de força de preensão quando comparado com o grupo *mdxNT* ($p = 0,028$). Já no T4 houve uma diminuição dos valores de força de preensão relacionado ao treinamento. O grupo *mdxNT* mostrou uma diminuição gradual nos valores de força até T6 e um ligeiro aumento em T8 não superior a T0. Houve um aumento da força de preensão dos animais treinados (*mdxNT*) no T4 de treinamento até o T8 (Figura 2).

Figura 2. **A:** Média e desvio padrão do tempo de permanência (segundos) no Rotarod comparando os grupos *mdxT* e *mdxNT* ao longo do tempo do protocolo (T0,T4,T8). **B:** Média e desvio padrão da força de preensão comparando os grupos *mdxT* e *mdxNT* ao longo do tempo de protocolo. **C e D:** Comportamento da variável força de preensão dos grupos *mdxNT* e *mdxT* respectivamente, ao longo do tempo. * indicando diferença entre os grupos, $p < 0,05$.



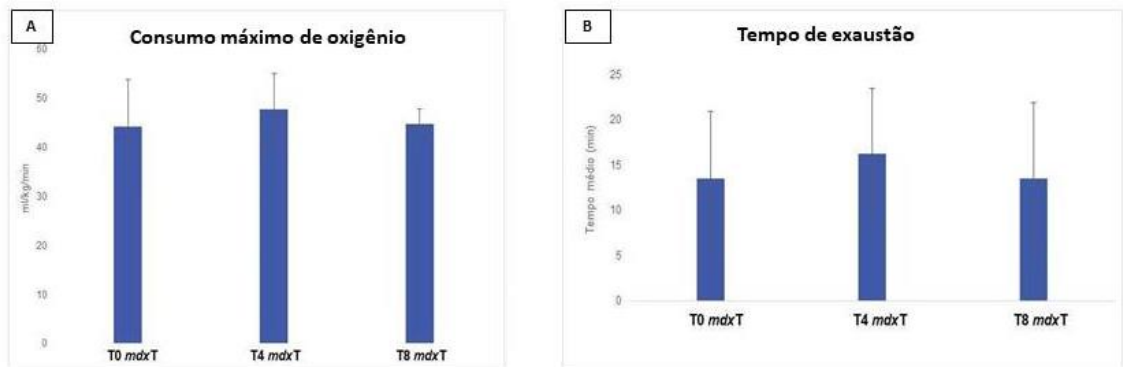
Consumo máximo de oxigênio (VO_{2max})

A média do consumo máximo de oxigênio e desvio padrão dos animais no T0 ($44,2 \pm 9,63$) no T4 ($47,72 \pm 7,32$) e no T8 ($44,76 \pm 3,08$) não foram diferentes entre si ($p = 0,565$; Figura 3A).

Tempo de exaustão

O resultado para o tempo de exaustão dos animais durante o teste do consumo máximo de oxigênio indica que as médias do T0 ($13,5 \pm 7,54$), T4 ($16,22 \pm 7,32$) e T8 ($13,5 \pm 8,44$) avaliados não foram diferentes entre si ($p = 0,73$; Figura 3B).

Figura 3. **A:** Valor médio do $VO_{2\text{máx}}$ ao longo dos diferentes tempos de treinamento do grupo *mdxT*- $VO_{2\text{máx}}$, submetido ao teste máximo para $p<0,05$. **B:** Tempo de exaustão durante o teste do $VO_{2\text{máx}}$, realizado no grupo *mdxT* durante T0, T4 e T8 para $p<0,05$.



Deposição da Fibrose intramuscular

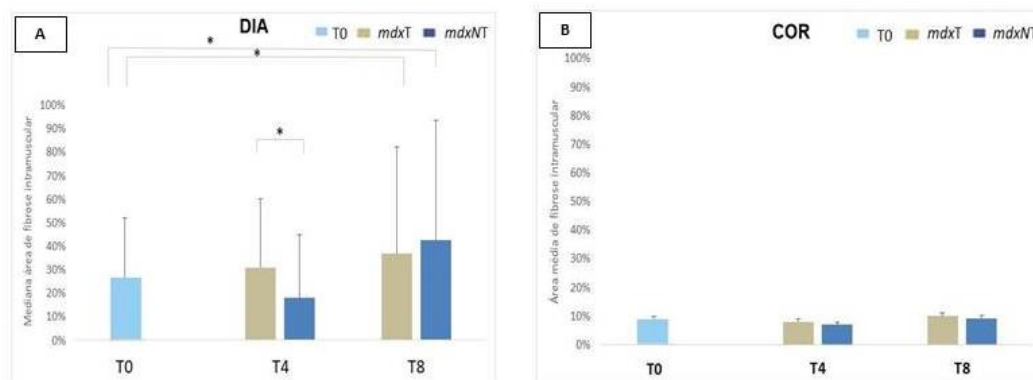
Diafragma mdx

Foi observado um aumento no percentual de fibrose no músculo diafragma no grupo *mdxNT* do T8 quando comparado com o grupo controle T0 ($p<0,01$) e no grupo *mdxT* do T8 quando comparado com o T0 ($p<0,01$); houve também um aumento em *mdxT* do T4 quando comparado com *mdxNT* do T4 ($p=0,01$). O Menor percentual mediano de fibrose foi no grupo *mdxNT* do T4, e o maior no grupo *mdxNT* do T8 (Figura 4A).

Músculo Cardíaco mdx

Não foi encontrada diferença entre as médias dos grupos ($p=0,44$; Figura 4B).

Figura 4. **A:** Mediana e intervalo interquartil da porcentagem de fibrose intramuscular do diafragma *mdx*, nos grupos controle (T0), *mdxT* e *mdxNT* do T0 e T4. *diferença entre os grupos para $p < 0,05$. **B:** Média e desvio padrão da porcentagem de fibrose intramuscular do coração *mdx* nos grupos controle (T0), *mdxT* e *mdxNT* do T0 e T4 para $p < 0,05$.



Análise morfológica

De acordo com a análise morfológica do músculo cardíaco *mdx*, foi observado tanto no grupo *mdxT* como no *mdxNT* presença de necrose, infiltrado inflamatório nos diferentes tempos (T0,T4,T8) sendo discreta a frequência de infiltrado inflamatório no T0 e mais frequente no T8. Poucas fibras com heterogeneidade foram observadas tanto no grupo controle (T0), quanto nos grupos *mdxT* e *mdxNT* nos diferentes tempos (T4,T8). No T8 foi observada a fragmentação do sarcoplasma nos animais do grupo *mdxT* e *mdxNT*, podendo ser visualizada na Figura 5. Na coloração de *picrossiruis red* percebe-se a presença fibras colágenas delgadas no tecido muscular cardíaco em ambos os grupos, tanto no grupo controle (T0) como nos grupos *mdxT* e *mdxNT* nos três tempos analisados (Figura 6).

Figura 5. Morfologia do músculo cardíaco corado na técnica de eosina e hematoxilina (HE) nos grupos controle- T0 (A); treinados- *mdxT* (B,C) e não treinados-*mdxNT* (E, F) ao longo dos tempos (T0, T4, T8) . > indicando núcleo central, >>indicando núcleo periférico; *indicando fragmentação do sarcoplasma; ► indicando infiltrado inflamatório, ➡ indicando área de necrose. Fotomicrografias na objetiva de 40x, barra =100µm.

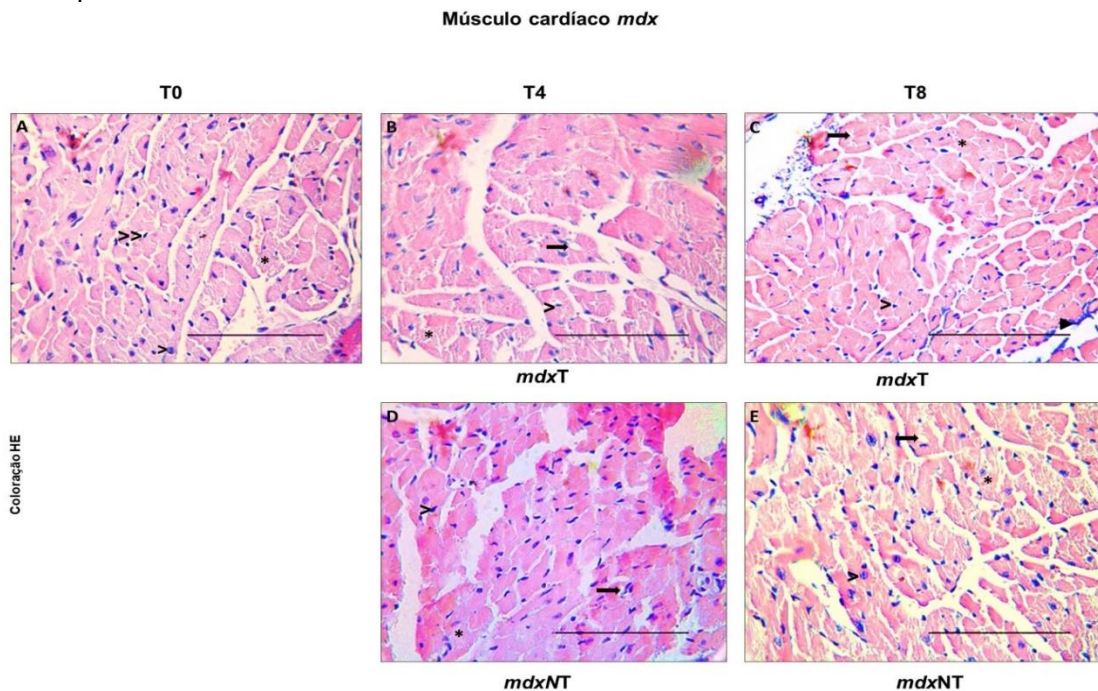
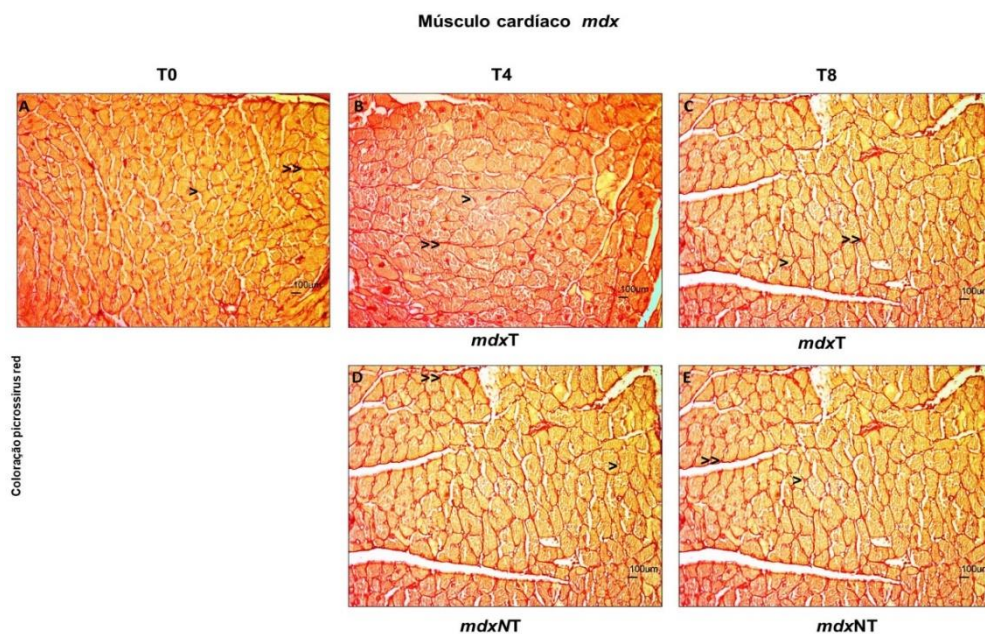


Figura 6. Fibras colágenas no músculo cardíaco corado com picrossirius red nos grupos controle- T0 (A); treinados- *mdxT* (B, C) e não treinados- *mdxNT* (E, F) ao longo dos tempos (T0, T4, T8). >> identificação de deposição de fibras colágenas no epimísio; > identificação de deposição de fibras colágenas no endomísio. Fotomicrografias na objetiva de 40x, barra=100µm.



De acordo com a análise morfológica do diafragma *mdx*, foram observados poucos núcleos centrais e poucas fibras com heterogeneidade no grupo controle (T0), presença de tecido necrótico, heterogeneidade das fibras, infiltrado inflamatório, fragmentação do sarcoplasma e poucos núcleos centrais nos grupos *mdxT* e *mdxNT* nos diferentes tempos, como achado fragmentação do sarcoplasma e infiltrado inflamatório presente em maior frequência nos grupos *mdxT* e *mdxNT* do T8 (Figura 7). Na coloração de *picrossiruis red* percebe-se a presença fibras colágenas mais espessas na estrutura muscular do diafragma em ambos os grupos *mdxT* e *mdxNT*, ao longo do tempo, sendo a frequência de fibras colágenas mais espessas menor no grupo controle (T0), podendo ser visualizado na Figura 8.

DISCUSSÃO

O protocolo de treinamento de baixa intensidade manteve a força de preensão, o tempo de permanência dos animais no Rotarod e não influenciou a deposição de fibrose no músculo cardíaco ao longo do tempo. No músculo diafragma o protocolo de treinamento aumentou a deposição de fibras colágenas na quarta semana de protocolo (T4), quando comparado ao grupo *mdxNT* no mesmo período, mas não interferiu no resultado ao final do protocolo, onde ambos os grupos apresentaram aumento da fibrose em relação ao T0.

Figura 7. Morfologia do músculo diafragma corado com hematoxilina e eosina (HE) nos grupos controle- T0 (A); treinados- *mdxT* (B,C) e não treinados-*mdxNT* (E, F) ao longo dos tempos (T0, T4, T8) . > indicando núcleos centrais, >> indicando núcleo periférico;*indicando fragmentação do sarcoplasma; ► indicando infiltrado inflamatório, ➡ indicando área de necrose. Fotomicrografias na objetiva de 40x, barra =100µm.

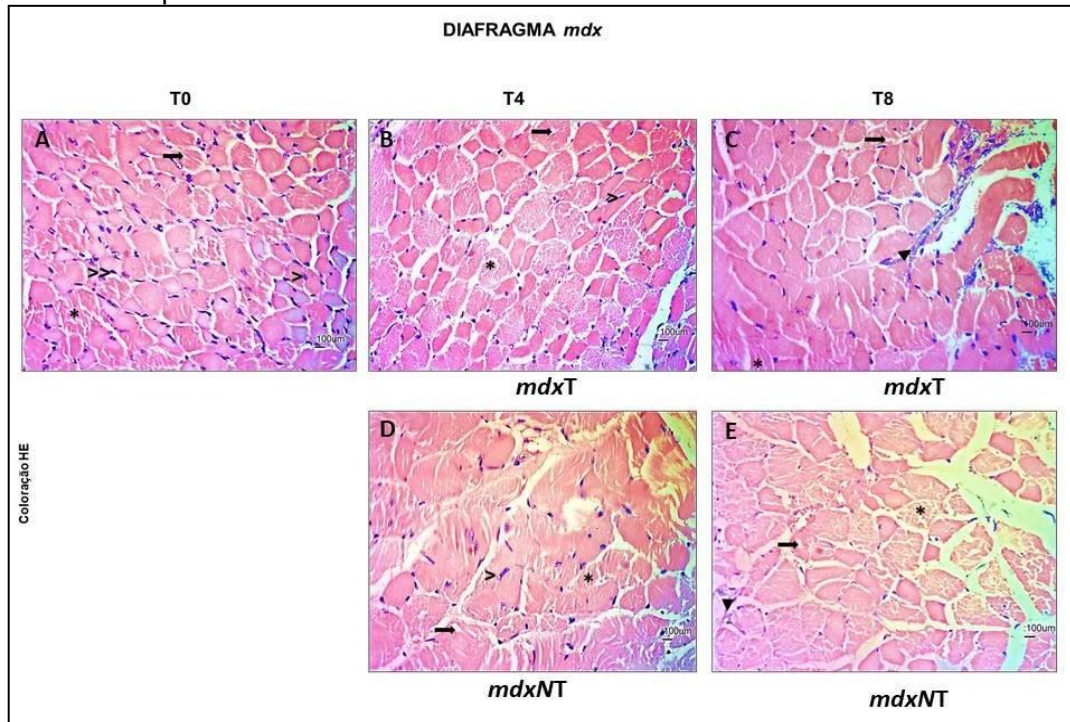
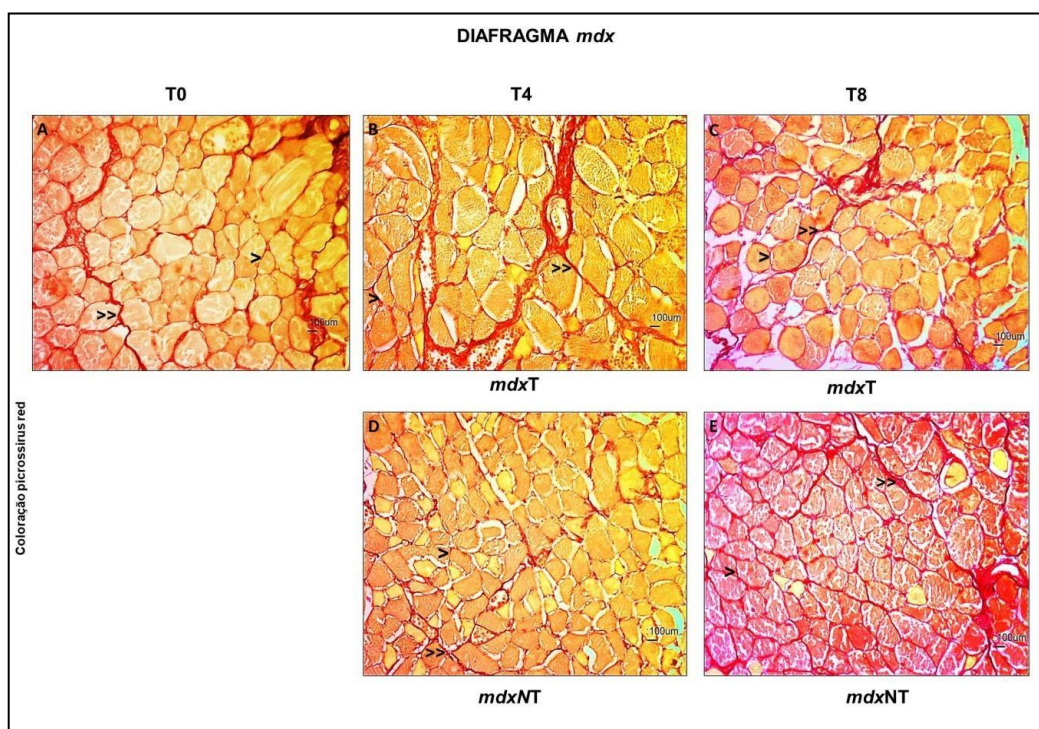


Figura 8. Fibras colágenas no músculo diafragma corado com picrossirius red nos grupos controle- T0 (A); treinados- *mdxT* (B,C) e não treinados- *mdxNT* (E,F) ao longo dos tempos (T0,T4,T8). >>identificação de deposição de fibras colágenas no epimísio; >identificação de deposição de fibras colágenas no endomísio. Fotomicrografias na objetivade 40x, barra=100µm.



Quanto a variável $VO_{2\text{máx}}$ e tempo de exaustão a manutenção dos valores apontam que o protocolo de baixa intensidade utilizado no estudo não foi suficiente para alterar o condicionamento aeróbio dos camundongos *mdx*.

A partir dos ciclos de degeneração/regeneração que ocorrem entre 4 e 15 semanas de idade desses animais²¹, alguns estudos sugerem que a força dos camundongos *mdx* diminui após os 3 meses de idade⁷. No presente estudo, no final do protocolo curto (T4), onde os camundongos tinham 12 semanas de idade, a força de preensão dos *mdxNT* foi menor do que no T0 (controle) e em T8 (8 semanas de protocolo), no grupo *mdxT* também houve uma queda da força em T4 porém somente quando comparada a segunda semana de treinamento (T2). Em outro estudo, submeteram animais de 4 e 5 semanas de idade a um protocolo de 12 semanas de treinamento em esteira, a 12m/min e também encontraram declínio da força de preensão após 4 semanas de protocolo²⁷.

Após um processo de degeneração muscular, a regeneração possibilita recuperar a arquitetura e a função adequada dos músculos esqueléticos típicos. No entanto, o processo inflamatório crônico do músculo distrófico pode ser afetado pelo desenvolvimento excessivo de fibrose, ou seja, deposição excessiva de tecido conjuntivo na matriz extracelular, que pode resultar no mau funcionamento do músculo²⁸. Sendo assim, a compreensão de tais mecanismos pode contribuir para uma melhor compreensão da fibrose muscular²⁹.

Na cardiomiopatia da DMD o ventrículo esquerdo (VE) é mais extensivamente afetado, e a disfunção sistólica do VE é um importante preditor de mortalidade nessa população^{30,31}. A patogênese da miocardiopatia associada à DMD ainda não foi totalmente elucidada³². Os mecanismos fisiopatológicos da DMD envolvidos no miocárdio podem diferir significativamente do processo que ocorre nos músculos esqueléticos; isto é ressaltado pela presença de doença cardíaca significativa em pacientes com níveis reduzidos de distrofina, mas sem doença do músculo esquelético³³.

No presente estudo, o exercício de baixa intensidade não influenciou a deposição de fibrose no músculo cardíaco ao longo do tempo, mesmo no protocolo longo de 8 semanas. Vários estudos sugerem danos ao músculo cardíaco induzido pelo exercício, nas modalidades de baixa e alta intensidade^{18,34,35}. Em contrapartida outros estudos observaram os efeitos da roda voluntária a longo prazo (52 semanas) na função cardíaca, e sugerem que o coração de camundongos distróficos pode sofrer remodelamento benéfico através do exercício sem comprometimentos na função cardíaca^{9,36}. No presente estudo os camundongos *mdx* tinham 8 semanas de idade no início do protocolo de exercício, e após o protocolo longo tinham 16 semanas de idade. Em estudo onde analisaram camundongos *mdx* de 3 a 18 meses e caracterizaram o desenvolvimento de cardiomiopatia durante esse período, atestaram que, embora a deposição de fibras colágenas no músculo cardíaco

e infiltração de macrófagos foi significativamente aumentada em 6 meses, a função ventricular não diminui até 18 meses³⁷. No presente trabalho foi observado infiltrado inflamatório no músculo cardíaco em todos os grupos estudados principalmente na oitava semana de protocolo. No segundo grupo foram analisados camundongos *mdx* de 20 a 22 meses e foi avaliado fenótipo cardíaco. Eles concluíram que camundongos *mdx* mais velhos (20 a 22 meses) exibem fibrose cardíaca, anormalidades no ECG (eletrocardiograma), disfunção sistólica e desempenho de exercício diminuído³⁷. Dessa forma a pouca deposição de fibras colágenas no músculo cardíaco *mdx* ao longo do tempo observada no presente estudo, pode estar relacionada à idade dos camundongos estudados, que com 16 semanas são considerados jovens.

Outro estudo utilizou o delineamento do teste de $VO_{2\text{máx}}$ e estudou camundongos *mdx* com 8 semanas de idade, porém com protocolo de treino em esteira de alta intensidade para induzir a distrofinopatia²³. Foi demonstrada uma diminuição crescente nos valores do $VO_{2\text{máx}}$ ao longo das 8 semanas de treinamento quando comparados aos valores apresentados em camundongos *wild-type* (controle do modelo distrófico). Os dados são diferentes do que obtivemos nesse estudo, pois não utilizamos um protocolo que exacerbasse o quadro distrófico nos levando a pensar que o protocolo de baixa intensidade utilizado no presente estudo pelo período de até 8 semanas de treinamento não foi o suficiente para induzir mudanças no $VO_{2\text{máx}}$. Não é um

resultado inesperado já que camundongos saudáveis apresentam aumento do $VO_{2\text{máx}}$ a partir de protocolos mais intensos³⁸. A manutenção, aumento ou declínio dos níveis de $VO_{2\text{máx}}$, nos fornecem informações importantes sobre manutenção, melhora ou perda da capacidade aeróbia, levando em consideração a evolução natural da distrofia e o fator treinamento ao longo do protocolo. A relação entre a velocidade de corrida e o $VO_{2\text{máx}}$ provavelmente mudará do início ao final de um período de treinamento³⁸. Este fato foi evidenciado em camundongos sedentários, que apresentaram uma curva mais acentuada do $VO_{2\text{máx}}$ após o treinamento. Sendo assim, a adaptação da economia de trabalho dificulta a estimativa da intensidade apenas a partir da velocidade de corrida, pois a mesma velocidade de corrida no estado treinado e não treinado corresponde a níveis diferentes de VO_2 . O que nos leva a questionar sobre a manutenção da intensidade do exercício entre os tempos de treinamento realizados no presente estudo, sendo necessárias pesquisas que retratem a comparação entre diferentes intensidades de exercício (baixa, média e alta) de preferência com monitoramento da intensidade através do $VO_{2\text{máx}}$ ao longo dos tempos de treino, para um controle mais preciso da intensidade e para melhor entendimento do momento de declínio no condicionamento cardiorrespiratório em camundongos distróficos.

O diafragma é um músculo que pode trazer contribuições importantes para o estudo do efeito do exercício na regeneração do músculo distrófico, uma vez que

ele é um dos primeiros músculos a serem afetados na distrofia muscular. Apresentando fibras necróticas e tecido conjuntivo já aos seis dias após o nascimento, além de fibras com núcleo central, um importante indicador de lesão muscular, evidentes a partir de 2 semanas de vida³⁹, dessa forma apresentando semelhança na progressão e no fenótipo da DMD em humanos⁴⁰, enquanto os músculos dos membros apresentam alterações a partir de 2 semanas de idade. Portanto, o diafragma tem sido considerado um músculo sensível para a avaliação da patologia distrófica no camundongo *mdx* e para testar abordagens terapêuticas⁴¹.

Estudos que analisam efeitos de protocolos de treinamentos no diafragma *mdx* são escassos, devido a isso apresentam resultados mal definidos, e em sua maioria sugerem efeitos negativos^{9,42-44}. Em estudo onde foi utilizado camundongos de 8 semanas de idade, com protocolo de treinamento de baixa intensidade em esteira motorizada 5 dias/semana durante 6 semanas, foi observado na análise morfológica áreas total de necrose e núcleos centrais inalterada entre os grupos exercício e controle havendo uma maior tendência para áreas maiores de regeneração (núcleos centrais) do que de necrose no diafragma de camundongos no grupo exercício⁴⁵. No nosso estudo foram evidenciados núcleos centrais, infiltrado inflamatório, fragmentação do sarcoplasma e áreas de necrose das fibras tanto nos camundongos *mdxT* como nos *mdxNT* com maior frequência a oitava semana de treinamento. Ainda no mesmo estudo, os níveis de CX39, uma proteína associada a

regeneração ativa no musculo danificado, foram semelhantes no diafragma dos camundongos exercício e controle⁴⁵. Nossos achados evidenciam uma queda na porcentagem de fibrose no diafragma no grupo *mdxNT* ao final do protocolo curto (4 semanas) quando comparado ao *mdxT* no mesmo período (T4). Já ao final do protocolo longo (8 semanas) os dois grupos apresentaram maior deposição de fibrose em relação ao tempo zero, demonstrando que o treino de baixa intensidade não interferiu na deposição de fibrose ao final do protocolo longo.

Visto que a DMD é uma condição progressiva sem tratamento eficaz, a manutenção de parâmetros funcionais como equilíbrio, força muscular dos membros e preservação da morfologia muscular, nos trazem perspectivas importantes, afim de retardar a evolução da doença.

Este estudo apresenta a limitação de não poder ser diretamente aplicado em humanos com DMD. Ele aponta para uma possibilidade de exercício terapêutico que não danifique a morfologia muscular ao mesmo tempo que mantém os parâmetros funcionais aqui estudados. Revisões sistemáticas recentes sobre o exercício terapêutico nas Distrofias musculares ou em grupos de pessoas com doenças neuromusculares apontam para os benefícios de exercícios aeróbios, principalmente para as condições de progressão lenta. Dessa forma, novos estudos precisam ser conduzidos tanto no modelo *mdx* como com humanos que levem em consideração tanto a estrutura muscular como as atividades funcionais como parâmetros da intervenção.

CONCLUSÃO

Os dados mostram que o treino de baixa intensidade em esteira não modificou a deposição de fibrose no músculo cardíaco *mdx* na idade estudada, aumentou a fibrose no músculo diafragma independente do fator treinamento, ao mesmo tempo que promoveu a manutenção da força muscular dos camundongos *mdx*.

REFERÊNCIAS

- 1.Chakkalakal JV, Thompson J, Parks RJ, Jasmin BJ. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J* 2005;19:880-91. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1956rev>
- 2.Eagle M. Report on the Muscular Dystrophy Campaign workshop: Exercise in neuromuscular diseases Newcastle, January 2002. *Neuromuscul Disord* 2002;12:975-83. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(02\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(02)00136-0)
- 3.Morrison J, Lu QL, Pastoret C, Partridge T, Bou-Gharios G. T-cell-dependent fibrosis in the *mdx* dystrophic mouse. *Lab Invest* 2000;80:881-91. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780092>
- 4.Araujo APQC, Nardes F, Fortes CPDD, Pereira JA, Rebel MF, Dias CM, et al. Brazilian consensus on duchenne muscular dystrophy. Part 2: Rehabilitation and systemic care. *Arq Neuropsiquiatr* 2018;76:481-9. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20180062>
- 5.Lessa TB, Carvalho RC, Spagnolo JD, Silva LCLC, Cortopassi SRG, Ambrósio CE. Laparoscopic guided local injection in the X-linked muscular dystrophy mouse (MDX) diaphragm. an advance in experimental therapies for duchenne muscular dystrophy1. *Acta Cir Bras* 2014;29:715-20. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502014001800004>
- 6.Bendixen RM, Lott DJ, Senesac C, Mathur S, Vandenborne K. Participation in daily life activities and its relationship to strength and functional measures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Disabil Rehabil* 2014;36:1918-23. <https://doi.org/10.3109/09638288.2014.883444>
- 7.Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 2008;31:1-19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.008>
- 8.Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PCG, Martins PCM, Lopes VF, Zilberztajn D, et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci* 2008;34:241-8. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-9023-9>

9. Selsby JT, Acosta P, Sleeper MM, Barton ER, Sweeney HL. Long-term wheel running compromises diaphragm function but improves cardiac and plantarflexor function in the mdx mouse. *J Appl Physiol* 2013;115:660-6. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00252.2013>
10. Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJI. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol* 1990;26:271-7. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(90\)90082-g](https://doi.org/10.1016/0167-5273(90)90082-g)
11. Benigni R, Bossa C, Tcheremenskaia O, Giuliani A. Alternatives to the carcinogenicity bioassay: In silico methods, and the in vitro and in vivo mutagenicity assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6:809-19. <https://doi.org/10.1517/17425255.2010.486400>
12. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature* 2011;473:326-35. <https://doi.org/10.1038/nature10147>
13. Shete AN, Bute SS, Deshmukh PR. A study of VO₂ max and body fat percentage in female athletes. *J Clin Diagnostic Res* 2014;8:BC01-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10896.5329>
14. Ranković G, Mutavdžić V, Toskić D, Preljević A, Kocić M, Nedin-Ranković G, *et al.* Aerobic capacity as an indicator in different kinds of sports. *Bosn J Basic Med Sci* 2010;10:44-8. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2010.2734>
15. Kodama S. CLINICIAN'S CORNER Cardiorespiratory Fitness as a Quantitative Predictor of All-Cause Mortality and Cardiovascular Events. *J Am Med Assoc* 2009;301:2024-35. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.681>
16. Hyzewicz J, Ruegg UT, Takeda S. Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *J Neuromuscul Dis* 2015;2:325-42. <https://doi.org/10.3233/JND-150106>
17. Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic Biol Med* 2007;43:145-54. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.003>
18. Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Low intensity training of mdx mice reduces carbonylation and increases expression levels of proteins involved in energy metabolism and muscle contraction. *Free Radic Biol Med* 2015;82:122-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.023>
19. du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, *et al.* The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020;18:1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
20. Luca A. Use of treadmill and wheel exercise for impact on mdx mice phenotype. *Neuromuscul Netw Protoc* 2011;(Id):1-11. https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/MDX-DMD_M.2.1.001.pdf
21. van Putten M, Winter C, van Roon-Mom W, van Ommen GJ, 't Hoen PAC, Aartsma-Rus A. A 3 months mild functional test regime does not affect disease parameters in young mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2010;20:273-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2010.02.004>

22. Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the Mdx mouse model. *J Vis Exp* 2014;85:1-11. <https://doi.org/10.3791/51303>
23. Rocco AB, Levalley JC, Eldridge JA, Marsh SA, Rodgers BD. A novel protocol for assessing exercise performance and dystropathophysiology in the mdx mouse. *Muscle and Nerve* 2014;50:541-8. <https://doi.org/10.1002/mus.24184>
24. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: Practical implications for exercise training. *Eur J Prev Cardiol* 2007;14:753-60. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3281eacef1>
25. Melo DS, Costa-Pereira LV, Santos CS, Mendes BF, Costa KB, Santos CFF, *et al.* Severe calorie restriction reduces cardiometabolic risk factors and protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. *Front Physiol* 2016;7:1-8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00106>
26. Smith LR, Barton ER. Collagen content does not alter the passive mechanical properties of fibrotic skeletal muscle in mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;306:C889-98. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00383.2013>
27. Capogrosso RF, Mantuano P, Cozzoli A, Sanarica F, Massari AM, Conte E, *et al.* Contractile efficiency of dystrophic mdx mouse muscle: In vivo and ex vivo assessment of adaptation to exercise of functional end points. *J Appl Physiol* 2017;122:828-43. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00776.2015>
28. Bassaglia Y, Gautron J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J Muscle Res Cell Motil* 1995;16:420-9. <https://doi.org/10.1007/BF00114507>
29. Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int* 2017;41:706-15. <https://doi.org/10.1002/cbin.10725>
30. Yucel N, Chang AC, Day JW, Rosenthal N, Blau HM. Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. *NPJ Regen Med* 2018;3:4. <https://doi.org/10.1038/s41536-018-0045-4>
31. Corrado G, Lissoni A, Beretta S, Terenghi L, Tadeo G, Foglia-Manzillo G, *et al.* Prognostic value of electrocardiograms, ventricular late potentials, ventricular arrhythmias, and left ventricular systolic dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiol* 2002;89:838-41. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(02\)02195-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(02)02195-1)
32. Kamogawa Y, Biro S, Maeda M, Setoguchi M, Hirakawa T, Yoshida H, *et al.* Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload in vivo. *Cardiovasc Res* 2001;50:509-15. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00205-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00205-x)
33. Finsterer J, Stöllberger C. The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* 2003;99:1-19. <https://doi.org/10.1159/000068446>
34. Costas JM, Nye DJ, Henley JB, Plochocki JH. Voluntary exercise induces structural remodeling in the hearts of dystrophin-deficient mice. *Muscle Nerve* 2010;42:881-5. <https://doi.org/10.1002/mus.21783>

35. Nakamura A. X-linked dilated cardiomyopathy: A cardiospecific phenotype of dystrophinopathy. *Pharmaceuticals* 2015;8:303-20. <https://doi.org/10.3390/ph8020303>
36. Ferry A, Benchaouir R, Joanne P, Peat RA, Mougenot N, Agbulut O, *et al.* Effect of voluntary physical activity initiated at age 7 months on skeletal hindlimb and cardiac muscle function in mdx mice of both genders. *Muscle Nerve* 2015;52:788-94. <https://doi.org/10.1002/mus.24604>
37. Van Erp C, Loch D, Laws N, Trebbin A, Hoey AJ. Timeline of cardiac dystrophy in 3-18-month-old mdx mice. *Muscle Nerve* 2010;42:504-13. <https://doi.org/10.1002/mus.21716>
38. Schill KE, Altenberger AR, Lowe J, Periasamy M, Villamena FA, Rafael-Fortney JA, *et al.* Muscle damage, metabolism, and oxidative stress in mdx mice: Impact of aerobic running. *Muscle Nerve* 2016;54:110-7. <https://doi.org/10.1002/mus.25015>
39. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, *et al.* Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997;90:717-27. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80532-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80532-2)
40. Willmann R, Possekkel S, Dubach-Powell J, Meier T, Ruegg MA. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2009;19:241-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2008.11.015>
41. Ishizaki M, Suga T, Kimura E, Shiota T, Kawano R, Uchida Y, *et al.* Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul Disord* 2008;18:342-8. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.02.002>
42. Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ, Katz MS. Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. *J Appl Physiol* 1994;77:1736-41. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.4.1736>
43. Barbin ICC, Pereira JA, Bersan Rovere M, Oliveira Moreira D, Marques MJ, Santo Neto H. Diaphragm degeneration and cardiac structure in mdx mouse: Potential clinical implications for Duchenne muscular dystrophy. *J Anat* 2016;228:784-91. <https://doi.org/10.1111/joa.12443>
44. Frinchi M, MacAluso F, Licciardi A, Perciavalle V, Coco M, Belluardo N, *et al.* Recovery of damaged skeletal muscle in mdx mice through low-intensity endurance exercise. *Int J Sports Med* 2014;35:19-27. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343405>
45. Morici G, Frinchi M, Pitruzzella A, Di Liberto V, Barone R, Pace A, *et al.* Mild Aerobic Exercise Training Hardly Affects the Diaphragm of mdx Mice. *J Cell Physiol* 2017;232:2044-52. <https://doi.org/10.1002/jcp.25573>