
BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

GIOVANA ZERBO MARTINEZ

**ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE**

GIOVANA ZERBO MARTINEZ

ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em
Educação Física.

Rio Claro
2021

M385a Martinez, Giovana Zerbo
Adaptações na junção miotendínea em modelo experimental de
Distrofia Muscular de Duchenne / Giovana Zerbo Martinez. -- Rio
Claro, 2021
33 f. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Educação Física) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio
Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Anatomia. 2. Histologia. 3. Músculo esquelético. 4. Doença
neuromuscular. 5. Microscopia eletrônica de transmissão. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família e amigos que estiveram ao meu lado e me apoiaram durante todas as etapas dessa jornada. Às vezes ficamos focados demais na chegada e perdemos toda a beleza do caminho, então deixo aqui registrado meu carinho por todos que me fizeram, de vez em quando, sentar em um banco e tomar um ar antes de voltar para a caminhada. Vocês foram essenciais e levarei comigo todo o aprendizado e crescimento que me proporcionaram.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Polican Ciena, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho da melhor maneira possível e que, mesmo com sua agenda lotada, sempre arranjava um tempinho para sanar minhas dúvidas e acalmar meu coração ansioso. Afinal, não é sempre que se encontra alguém disposto a te guiar passo a passo até o sucesso.

Agradeço aos integrantes do LAMAF por todo o auxílio dado para o desenvolvimento desse trabalho, que mesmo sendo sobre um assunto do qual não sabiam, buscaram aprender sobre para me ajudar. Agradeço também pelos bons momentos, e olha que não foram poucos! Teve muito aprendizado, congressos, confraternizações, viagens e, inclusive, muita comida ("finger foods"). E participar de um laboratório com pessoas incríveis que exalam conhecimento foi absurdamente gratificante e eu não poderia ter escolhido um lugar melhor para estar.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPE); aos técnicos do laboratório de Morfologia da Unesp - Rio Claro que estavam sempre à disposição para ajudar em qualquer etapa do trabalho; e aos animais que deram sua vida para o avanço da ciência, a eles todo meu respeito e zelo.

“A fé na vitória tem que ser inabalável”

O Rappa - Anjos (Pra quem tem fé)

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio neuromuscular genético que compromete a integridade e estabilidade da estrutura muscular, além de ser considerada a mais grave dentre todas as distrofias musculares. Os primeiros sinais clínicos da DMD se manifestam na infância e apresentam uma evolução rápida e progressiva, a qual acarreta em um constante processo de necrose das fibras musculares, perda da sua capacidade contrátil e óbito precoce. Embora o músculo estriado esquelético apresente ampla capacidade de regeneração, os danos causados pela DMD são tão frequentes que impedem o músculo ser reparado eficientemente, ocorrendo a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e adiposo. Diante disso, a interface entre o músculo e o tendão, denominada junçãomiotendínea (JMT), é responsável pela transmissão da força contrátil do tecido muscular para o tecido tendíneo, além de apresentar alta capacidade adaptativa a estímulos internos e externos como envelhecimento, patologias e exercício físico, por exemplo. O objetivo desta pesquisa foi revelar as adaptações estruturais, ultraestruturais e moleculares da JMT do músculo tibial anterior de camundongos distróficos. Foram utilizados 24 camundongos Black machos com 180 dias de idade, divididos em dois grupos: Grupo Controle (n=12; C57bl/10) e Grupo MDX (n=12; C57bl/10^{mdx}). Os resultados foram analisados através das técnicas de Microscopia de Luz, para descrição morfológica das estruturas; Imunofluorescência, para descrição molecular; e Microscopia Eletrônica de Transmissão, para descrição qualitativa e quantitativa das ultraestruturas da JMT. Dessa forma, através da análise morfométrica, o Grupo MDX demonstrou uma redução nas ultraestruturas da JMT (sarcômero distal e proximal; invaginações e evaginações sarcoplasmáticas), as quais refletem no comprometimento da interface formada entre o músculo e o tendão. Concluímos que as adaptações das estruturas musculares e ultraestruturas da JMT demonstram o extenso comprometimento diante o processo de degeneração provocado pela DMD, além de maior suscetibilidade a lesões nesta região de ancoragem entre o músculo e o tendão que reflete numa instabilidade funcional.

Palavras-chave: Sarcômero. Invaginações e evaginações sarcoplasmáticas. Degeneração muscular. Junção mio-tendínea. Distrofia Muscular de Duchenne.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic neuromuscular disease considered the most serious of all muscular dystrophies, and that disorder compromises the integrity and stability of muscle structure. The first clinical signs of DMD have a quick and progressive evolution that starts in childhood and will result in a constant process of necrosis of muscle fiber, loss of its contractile property, functional dependence, and early death. Although the striated skeletal muscle has ample regenerative capacity, the damage caused by DMD is so frequent that it prevents the muscle from being repaired efficiently, with the replacement of muscle tissue by connective and adipose tissue. Therefore, the interface between the muscle and the tendon, called myotendinous junction (MTJ), presents a greater susceptibility to injuries and it is responsible for the transmission of contractile force from muscle tissue to tendon tissue, in addition to having high capacity adaptive to internal and external stimuli, such as aging, pathologies, and physical exercise, for example. The objective of this research was to reveal the structural, ultrastructural, and molecular adaptations of MTJ of the anterior tibial muscle from dystrophic mice. We used 24 male Black mice, with 180 day old, divided into two groups: Control Group (n=12; C57bl/10) and MDX Group (n=12; C57bl/10^{mdx}). The results were analyzed using Light Microscopy techniques, for a morphological description of the structures; Immunofluorescence, to molecular description; and Transmission Electron Microscopy, for a qualitative and quantitative description of the MTJ ultrastructures. Thus through the morphometric analysis, the MDX Group demonstrated a reduction in the MTJ ultrastructures (distal and proximal sarcomere; sarcoplasmatic invaginations and evaginations), which affect the interface formed between the muscle and the tendon and your function of transmitting strength. We conclude that the adaptations of the muscular structures and ultrastructures of the MTJ demonstrate the extensive commitment in the face of the degeneration process caused by DMD, in addition to greater susceptibility to injuries in this anchoring region between the muscle and the tendon that cause functional instability.

Keywords: Sarcomere. Sarcoplasmatic invaginations and evaginations. Muscle degeneration. Myotendinous junction. Duchenne Muscular Dystrophy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Distrofia Muscular de Duchenne	10
2.2 Junção Miotendínea	14
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos específicos.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Microscopia de Luz.....	19
4.3 Imunofluorescência	19
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	20
5 RESULTADOS	21
5.1 Microscopia de Luz.....	21
5.2 Imunofluorescência	22
5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	23
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio neuromuscular genético que acomete 1 a cada 3.500 meninos, além de ser considerada a mais grave dentre todas as distrofias musculares (DE PALMA et al., 2014). É uma doença com evolução progressiva e que compromete a integridade da membrana muscular devido à ausência da proteína distrofina, que em conjunto com outras proteínas, participa de um complexo importante para a manutenção e estabilidade da estrutura muscular durante o processo de contração e relaxamento (MORAES; FERNANDES; MEDINA-ACOSTA, 2011).

A ausência da distrofina acarreta no desequilíbrio da camada lipídica da membrana muscular, que permite uma maior passagem de cálcio para o meio intracelular, resultando em necrose da fibra e perda da sua propriedade contrátil, o que caracteriza o processo de degeneração progressiva da musculatura (HERDY et al., 2015). As fibras necrosadas serão substituídas por outras, até que a frequência de degeneração seja tão significativa a ponto de ocorrer a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e adiposo (GOMES et al., 2011).

Os primeiros sinais clínicos da DMD se manifestam logo na infância, com quedas frequentes, dificuldade para correr, subir escadas, levantar do chão; além das alterações físicas, como escápulas aladas, hiperlordose e a pseudohipertrofia das panturrilhas na tentativa de compensar a fraqueza dos músculos anterolaterais das pernas. Esse quadro evolui levando o paciente à incapacidade de andar por volta dos 15 anos de idade, e ao óbito precoce devido insuficiência cardíaca e/ou respiratória. Embora existam tratamentos que visam preservar a independência funcional do paciente, melhorar sua qualidade de vida e aumentar sua longevidade, ainda não se conhece uma cura para a DMD (ALLEN; WHITEHEAD; FROEHNER, 2015; FREITAS et al., 2019).

Diante disso, temos que o músculo estriado esquelético é um dos tecidos mais abundantes do corpo humano, sendo amplamente innervado e vascularizado, além de ser responsável pelas contrações voluntárias que vão desde a realização de movimentos suaves à movimentos vigorosos. O músculo esquelético é constituído por células multinucleadas alongadas e cilíndricas, conhecidas como fibras musculares, que por sua vez são formadas por miofibrilas dispostas longitudinalmente. Cada miofibrila corresponde a um conjunto de dois tipos

principais de proteínas: actina e miosina; as quais formam os sarcômeros, que proporcionam a aparência estriada ao músculo esquelético e permitem o processo de contração muscular (HENDERSON et al., 2017). Quando ocorre o aumento na concentração de íons cálcio no meio intracelular, devido à ausência da distrofina, a enzima proteolítica denominada Calpaína é ativada, provocando a digestão de proteínas, incluindo as proteínas contráteis do próprio músculo, que apesar da ampla capacidade de regeneração, não consegue reparar de maneira eficiente todo o dano causado pela DMD (HORITA; DA CRUZ, 2015).

Para que a contração muscular aconteça, a participação de íons de cálcio e ATP são fundamentais, assim como a fixação dos músculos aos ossos através dos tendões. O tendão é um tecido conjuntivo de coloração esbranquiçada, composto em sua maioria por fibras colágenas, podendo variar de forma, espessura, largura e disposição; e a área de interação entre o tecido muscular e tendíneo é a região com maior propensão a lesões (HENDERSON et al., 2017; LEONG et al., 2020).

Denominada de junção miotendínea (JMT), essa complexa área microanatômica do aparelho locomotor, localizada entre o músculo e o tendão, é caracterizada por projeções de fibras de colágeno e dobras no sarcolema (membrana plasmática das células do tecido muscular estriado), intituladas respectivamente de invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (KNUDSEN et al., 2015). A interface formada é responsável por aumentar a superfície de contato entre os tecidos, além de ser componente-chave para a função primordial da JMT: transmitir a força gerada a partir das contrações musculares para o tendão (CIENA et al., 2012; ZHAO et al., 2018).

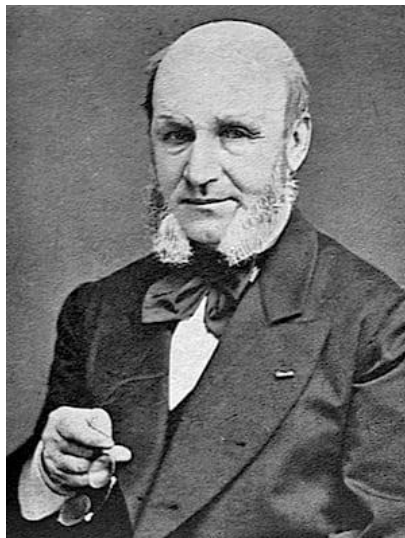
Devido aos altos níveis de estresse mecânico na JMT, há um maior risco de lesões que podem resultar em diversas alterações morfológicas e funcionais, além de adaptações relacionadas à composição histoquímica e sintopia. Dessa forma, a JMT apresenta ampla capacidade adaptativa a diversos estímulos internos e externos, como: envelhecimento, alterações hormonais, patologias e exercício físico (CHARVET; RUGGIERO; LE GUELLEC, 2012; NIELSEN; LAL; SHEARD, 2018).

Pesquisas recentes e estudos translacionais apresentaram avanços promissores para compreendermos melhor a DMD e seu extenso comprometimento do tecido muscular; entretanto, estudos sobre as alterações desencadeadas por essa doença na principal região de transmissão de força do aparelho locomotor, ainda são escassos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distrofia Muscular de Duchenne

Figura 1. Retrato de Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1806-1875).



Fonte: UNIVERSITÉ DE PARIS. Retrato de Duchenne, um neurologista francês, considerado o pai da Eletroterapia e o primeiro a fornecer uma descrição completa e detalhada sobre a distrofia muscular pseudo-hipertrófica, que atualmente é conhecida pelo seu nome como Distrofia Muscular de Duchenne.

Nascido em 17 de setembro de 1806, no norte da França, Guillaume Benjamin Amand Duchenne (Figura 1) foi um neurologista que contribuiu para o meio científico com a descrição de vários distúrbios nervosos e musculares, além de ser pioneiro nos estudos sobre o processo de estimulação elétrica dos músculos. Com difícil aceitação no século XIX, os estudos de Duchenne foram ridicularizados por várias equipes médicas até que finalmente seus talentos foram reconhecidos por alguns clínicos influentes nos hospitais, Hotel-Dieu e Charité (PARENT, 2005; RONDOT, 2005).

Em 1842, com interesse na carreira em eletrofisiologia clínica, Duchenne usava a eletricidade não apenas como agente terapêutico, mas principalmente como uma ferramenta de investigação fisiológica para estudar a anatomia do corpo humano (SANTOS et al., 2005). Denominada de “*électrisation localisée*” (faradização localizada), Duchenne com sua nova abordagem técnica refutou a ideia de que durante movimentos voluntários, os músculos agonistas se contraem e os antagonistas permanecem inativos; e foi capaz de demonstrar experimentalmente que qualquer movimento das extremidades ou tronco, é resultado de uma dupla excitação nervosa, na qual os músculos que exercem ações opostas (extensores e

flexores) se contraem simultaneamente, um para produzir movimento e o outro para modulá-lo (EMERY, 1993; RONDOT, 2005).

Dessa forma, Duchenne estimulou músculos e nervos através da aplicação de dois eletrodos de superfície na pele úmida e percebeu que, se um músculo paralisado se contraísse após o estímulo dos eletrodos, a causa da paralisia estava no sistema nervoso central; enquanto que, se o músculo não se contraísse, era o músculo ou o nervo que estava danificado. Então, através da faradização localizada, prestou atenção especial aos pacientes crônicos que eram negligenciados pela equipe médica e conseguiu fornecer mapeamentos funcionais detalhados de praticamente todos os músculos do corpo, isolados ou em contração com outros músculos, tanto em indivíduos normais quanto em pacientes acometidos por diferentes tipos de paralisia ou distúrbios neuromusculares (SANTOS et al., 2005).

Os estudos eletromiográficos e clínicos detalhados permitiram que Duchenne fornecesse descrições precisas sobre várias doenças neuromusculares, das quais seu nome é atribuído. Em 1861, descreveu um menino sofrendo do que ele chamou de paraplegia hipertrófica congênita da infância, uma condição caracterizada por uma aparente hipertrofia dos gastrocnêmios (EMERY, 2002). E sete anos depois, em 1868, forneceu um relato muito mais detalhado sobre esta patologia, a qual passou a ser chamada de distrofia muscular pseudo-hipertrófica, que é conhecida atualmente como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Embora seu nome esteja associado à doença, Duchenne não foi o primeiro a descrever esta condição patológica (PARENT, 2005). Em 1985, com a técnica de DNA recombinante, descobriu-se que um gene defeituoso causava a DMD, visto que dois anos depois, identificaram a ausência da proteína distrofina em homens acometidos pela doença (KUNKEL et al., 1985; JORGENSEN et al., 2011).

Diante disso, a DMD foi a primeira doença genética a ter seu gene localizado, isolado e clonado graças à identificação da proteína codificada por seu idealizador (DUBOWITZ, 1992). Localizado no cromossomo X (região Xp21), as mutações no gene DMD causam os sintomas clínicos da doença e provocam uma mudança no quadro de leitura do gene, visto que a maioria dos casos de DMD está relacionado com grandes deleções ou duplicações intragênicas, que levam à ausência da distrofina (MALIK et al., 2010).

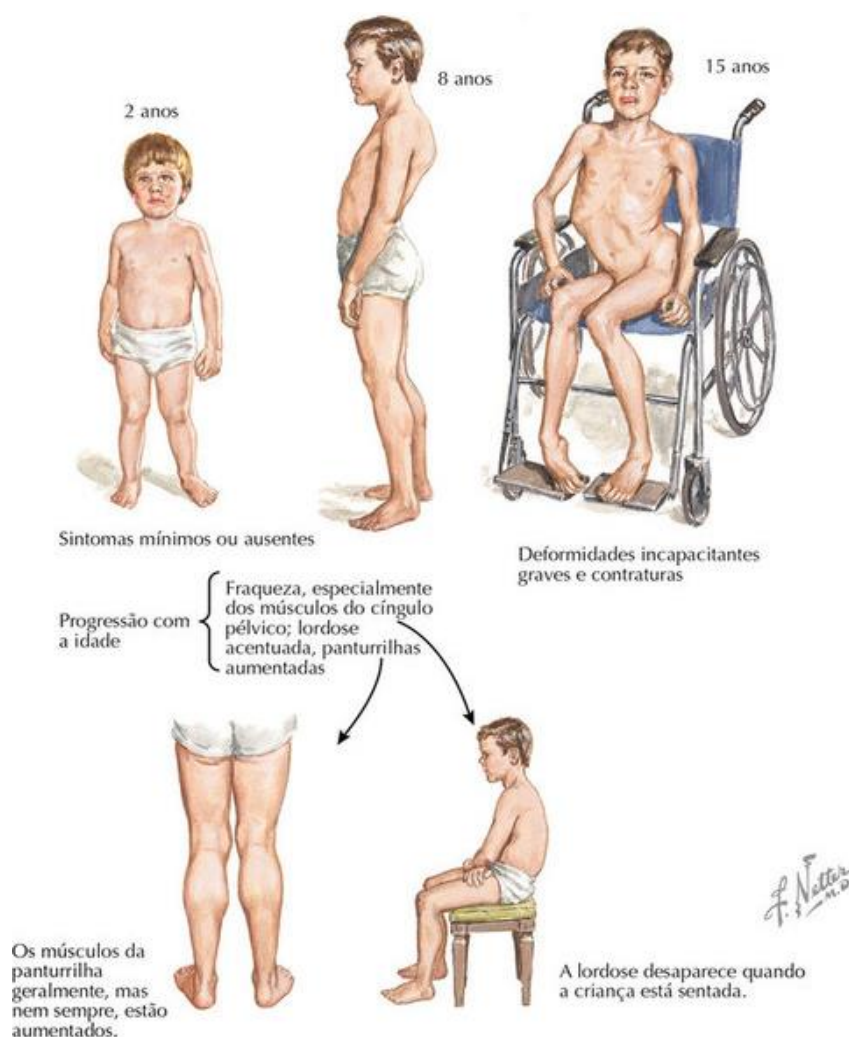
Em relação à proteína distrofina, não se sabe ainda seu papel exato, mas estudos apontam que uma de suas funções é ligar o sarcolema (membrana do

tecido muscular) ao citoesqueleto (PERRONNET; VAILLEND, 2010). E quando há sua falta, ocorrem pequenos rompimentos no sarcolema, que aumentam a concentração de íons de cálcio no meio intracelular, e provocam a ativação de uma enzima proteolítica denominada Calpaína - a qual digere proteínas, incluindo as proteínas contráteis do próprio músculo esquelético (HORITA; DA CRUZ, 2015). E apesar do tecido muscular apresentar ampla capacidade de regeneração, a frequência de degeneração celular é tão significativa que resulta em necrose da fibra, fraqueza muscular e na substituição do tecido muscular por tecido adiposo e conjuntivo, ocasionando uma pseudo-hipertrofia (HERDY et al., 2015; GOMES et al., 2011).

Sabe-se que dentre todas as distrofias musculares, a DMD é o distúrbio neuromuscular genético mais comum e mais grave, além de apresentar um padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X (DE PALMA et al., 2014). Por apresentar caráter recessivo, os homens (XY) são mais comumente afetados e manifestam a doença; enquanto que as mulheres (XX), por apresentarem dois cromossomos X em sua constituição genética, são portadoras assintomáticas, pois o cromossomo saudável é capaz de produzir a proteína distrofina normal. Entretanto, em casos raros, a DMD também pode ser manifestada em mulheres (HERDY et al., 2015).

Os primeiros sinais clínicos da DMD se manifestam na infância e se desenvolvem gradual e rapidamente. As repetidas lesões acometem o sistema de maneira ascendente, simétrica e bilateral, as quais iniciam-se na cintura pélvica e membros inferiores e, em seguida, afetam a musculatura do tronco, cintura escapular, membros superiores, pescoço, músculos respiratórios e músculo cardíaco; além das alterações físicas, como exemplo as escápulas aladas, acentuação da lordose lombar, pseudohipertrofia das panturrilhas, na tentativa de compensar a fraqueza dos músculos anterolaterais das pernas, dentre várias outros acometimentos advindos do processo degenerativo desenfreado (ALLEN; WHITEHEAD; FROEHNER, 2015; FREITAS et al., 2019) (Figura 2).

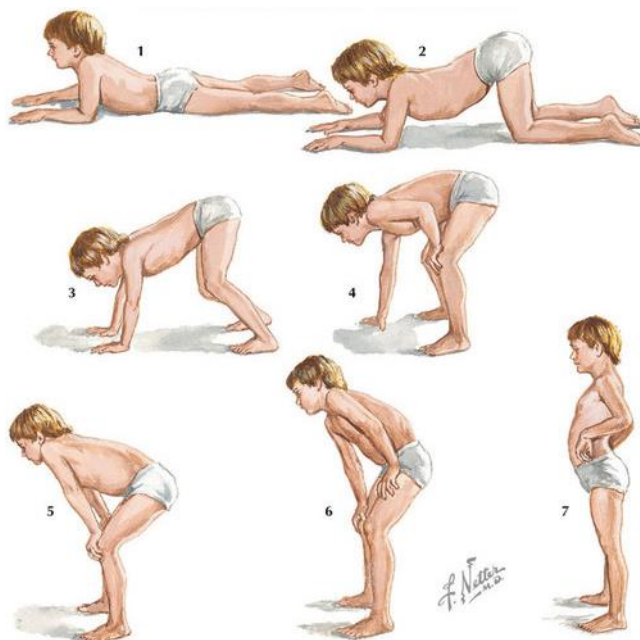
Figura 2. Progressão do quadro clínico de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne.



Fonte: Adaptado de JONES, H. R. (2014). Representação do desenvolvimento dos sinais clínicos da DMD, desde os sintomas mínimos até a perda da locomoção.

Existem também os comportamentos típicos que a criança com DMD apresenta, como dificuldade para correr e subir escadas, instabilidade na marcha, quedas frequentes, dificuldade para se levantar, recorrendo à manobra de Gowers ou o “levantar miopático” (Figura 3), que consiste na criança apoiar as mãos sucessivamente nos diferentes segmentos dos membros inferiores até que esteja totalmente em pé (BUSHBY et al., 2010). Com o passar dos anos esse quadro evolui, levando o paciente à incapacidade de andar por volta dos 15 anos de idade, passando a depender de uma cadeira de rodas, e ao óbito precoce devido insuficiência cardíaca ou respiratória (LIMA; CORDEIRO, 2020).

Figura 3. Manobra de Gowers ou “levantar miopático”.



Fonte: Adaptado de JONES, H. R. (2014). Representação da Manobra de Gowers utilizada por pacientes com DMD na tentativa de atingir a posição ortostática.

Embora a DMD não apresente uma cura, modelos animais para DMD têm sido amplamente utilizados para se compreender cada vez mais a base molecular dessa patologia, visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para preservar a independência funcional e melhorar a qualidade de vida de seus portadores.

2.2 Junção Miotendínea

O corpo humano apresenta três tipos de músculos de acordo com as suas características morfofuncionais: o músculo estriado esquelético, o músculo estriado cardíaco e o músculo liso. Cada um atua de determinada maneira no corpo, porém, com um enfoque no músculo estriado esquelético, este representa um dos tecidos mais abundantes – cerca de 50% da massa corporal – e é amplamente innervado e vascularizado, pois desempenha a movimentação corporal voluntária, desde movimentos suaves à vigorosos (HENDERSON et al., 2017).

Sendo assim, o músculo estriado esquelético é constituído por células multinucleadas, alongadas e cilíndricas denominadas fibras musculares, as quais são as unidades funcionais do músculo e apresentam um papel indispensável na capacidade adaptativa atribuída a esse tecido (SCOTT et al., 2001; TYAGI et al.,

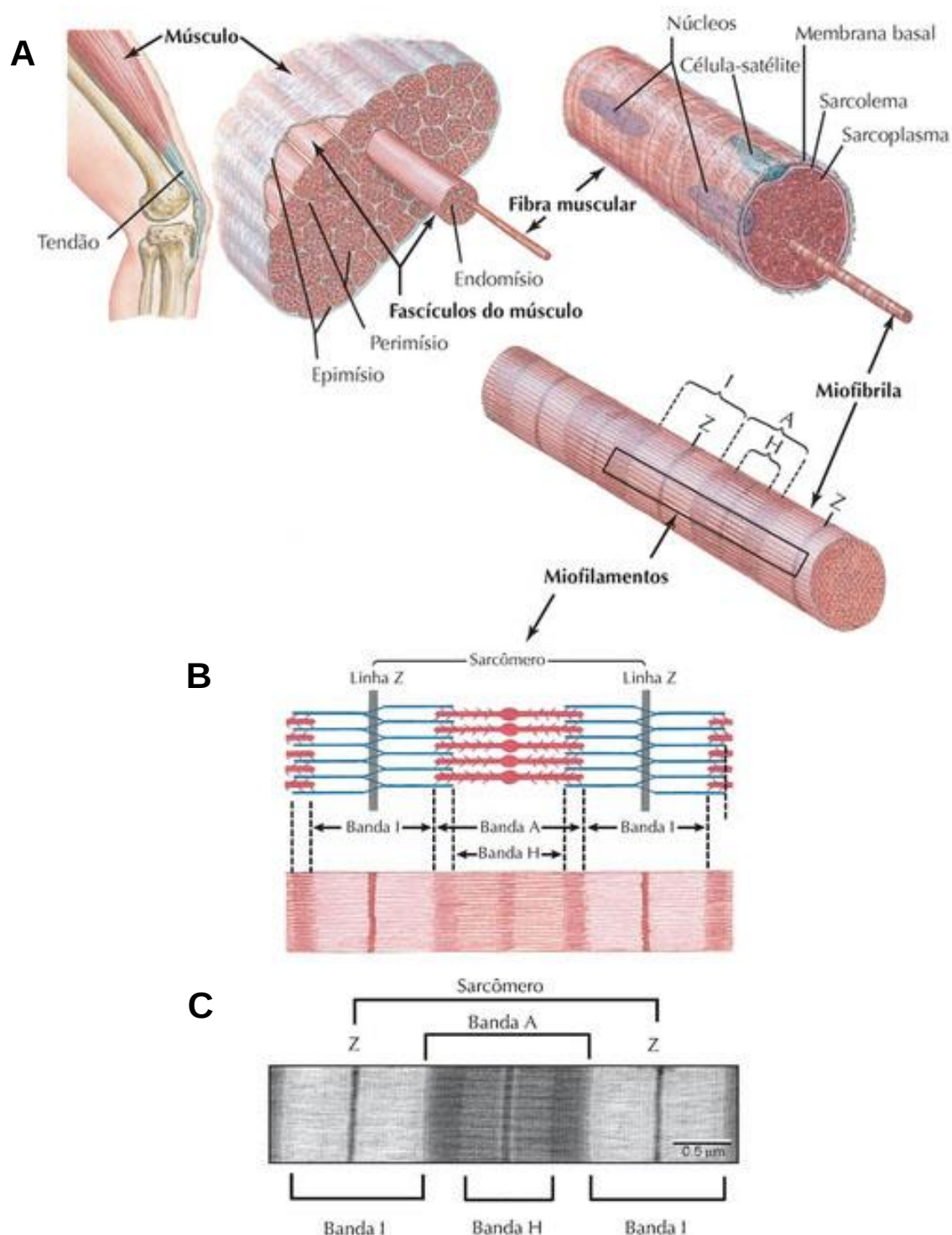
2017). Para garantir a integridade estrutural e funcional das fibras musculares, há um envoltório de tecido conjuntivo intramuscular que as mantém unidas, além de permitir que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro. Dessa forma, o endomísio é responsável por envolver cada fibra muscular, que em conjunto com outras fibras, formarão os fascículos, envolvidos pelo perimísio. O conjunto de fascículos constituirão o ventre muscular, o qual é envolvido pelo epimísio (CAIERÃO et al., 2007) (Figura 4A).

No aspecto morfológico as fibras musculares são formadas por miofibrilas, as quais correspondem a um conjunto de principalmente dois tipos de miofilamentos proteicos: finos e espessos, respectivamente constituídos de actina e miosina; e é a interação entre essas duas proteínas que desencadeia a contração muscular. A aparência estriada do músculo estriado esquelético se dá devido a organização dos miofilamentos proteicos em estruturas denominadas sarcômeros (SQUIRE et al., 2017).

Os sarcômeros são unidades estruturais da fibra muscular, constituídos por inúmeras proteínas contráteis, mas principalmente de actina e miosina. Cada sarcômero é delimitado por duas linhas Z e as faixas claras mais externas são denominadas de Banda I, compostas principalmente por miofilamentos de actina; enquanto que a faixa mais escura é denominada Banda A, composta nas extremidades por miofilamentos de actina e miosina sobrepostos e na sua região central apenas por miosina (Banda H) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) (Figura 4B,C).

Na região distal das fibras musculares os sarcômeros terminais, também denominados distais, são responsáveis pela fixação do tecido muscular ao tecido tendíneo (ROCHA et al., 2020). E a interface entre os tecidos é conhecida como junção miotendínea (JMT), uma complexa região microanatômica que desempenha um papel importante no movimento corporal, visto que atua na transmissão da força gerada pelas proteínas contráteis do músculo para o tendão (JACOB et al., 2018). Além disso, a JMT também auxilia na estabilização articular, resistência muscular e armazenamento de energia elástica (CIENA et al., 2012).

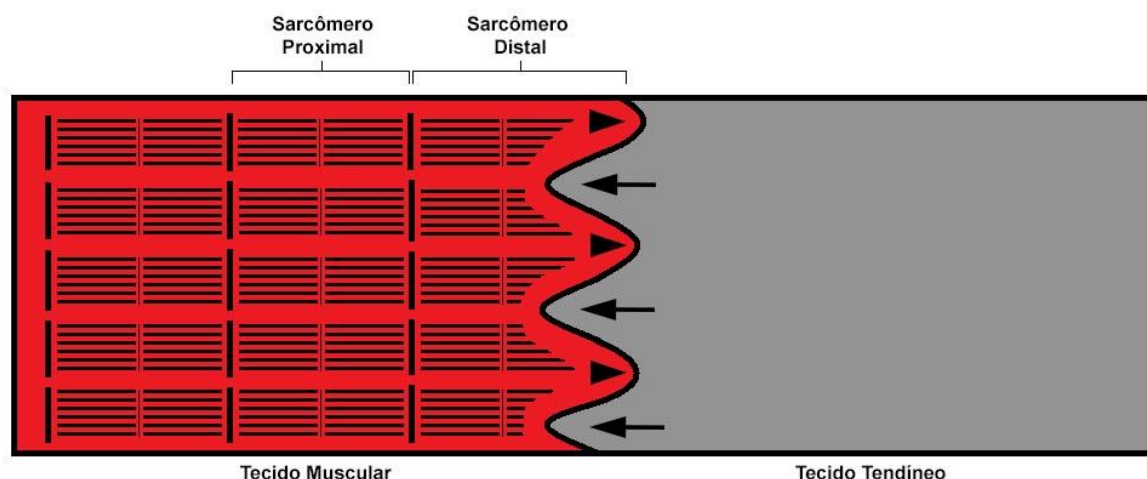
Figura 4. Organização estrutural do músculo estriado esquelético.



Fonte: (A) Adaptado de IANNOTTI, J. P. e PARKER, R. D. (2015); (B, C) Adaptado de OVALLE, W. K. e NAHIRNEY P. C. (2014). (A) Ilustração da divisão das estruturas musculares evidenciando as fibras musculares e seus respectivos envoltórios. (B) Representação de um sarcômero relaxado com as delimitações de suas regiões (bandas). (C) Eletromiografia de um sarcômero relaxado em corte longitudinal. 14.000X.

A JMT apresenta uma complexa organização ultraestrutural, uma vez que é delimitada por projeções de fibras de colágeno provenientes do tecido tendíneo e por dobras no sarcolema, respectivamente denominadas invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (CIENA et al., 2010) (Figura 5). Essa conformação permite uma maior área de contato entre os tecidos para suportar os altos níveis de estresse mecânico, visto que a região da junção apresenta ampla plasticidade, frente à diversos estímulos internos e externos, como envelhecimento, mudanças hormonais, patologias e treinamento, que podem resultar em adaptações morfológicas e funcionais na estrutura miotendínea (CHARVET et al., 2012; NIELSEN et al., 2018; SIERRA et al., 2018; PALMA et al., 2011; CURZI et al., 2016). Uma vez que a DMD acomete o tecido muscular, seus efeitos degenerativos também comprometerão a integridade estrutural da JMT, e um estudo sobre as alterações ocorridas nessa região pode fornecer o entendimento necessário para o desenvolvimento de novas abordagens de tratamentos (YUAN et al., 2020).

Figura 5. Representação esquemática da interface músculo-tendínea (JMT) e seus componentes.



Fonte: Elaborado pela Autora. A interface entre o tecido muscular e tendíneo (JMT) é caracterizada pelos sarcômeros terminais da fibra muscular, denominados de distais (últimos) e proximais (penúltimos). O contato entre esses tecidos ocorre por meio de projeções sarcoplasmáticas, intituladas de invaginações (setas) e evaginações (cabeça de seta) sarcoplasmáticas.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as alterações morfológicas estruturais, ultraestruturais e moleculares da JMT do músculo tibial anterior de camundongos distróficos.

3.1 Objetivos específicos

- Descrever as características estruturais da JMT;
- Revelar as características estruturais das fibras musculares;
- Caracterizar as alterações ultraestruturais dos feixes das células musculares e feixes de miofilamentos;
- Mensurar os comprimentos dos sarcômeros proximais e distais na região da JMT;
- Mensurar os comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 24 camundongos Black, machos, com 180 dias de idade e divididos em dois grupos distintos (n=12):

- **Grupo Controle:** animais saudáveis (C7bl/10);
- **Grupo MDX:** animais modificados geneticamente para DMD (C57bl/10^{mdx}).

Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) e foram alojados em gaiolas de prolipropileno, com 4 animais em cada, no Biotério do Laboratório de Anatomia Humana - Instituto de Biociências da UNESP – Câmpus de Rio Claro. Os animais foram mantidos em temperatura monitorada (23±2 °C), com fotoperíodo claro/escuro (12h) e ração e água “*ad libitum*”. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animal do IB – UNESP - Rio Claro (nº 24/2018).

4.2 Microscopia de Luz

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, submetidos à overdose de anestésico (Ketamina 50 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, foram dissecadas amostras da JMT do músculo tibial anterior, criofixadas em nitrogênio líquido -196 °C e posicionadas sobre cortiças durante 48h. Após esse período, as amostras foram seccionadas longitudinalmente (10 µm) (Criostato HM 505E, MICROM®), coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), para identificação dos núcleos celulares e com Picro-Sírus Red (PSR), para identificação do tecido conjuntivo associado e colágeno, as quais também foram analisadas sob Luz Polarizada (BHUTDA et al., 2017; CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014; FISCHER et al., 2008). As imagens serão obtidas através do microscópio de luz (Carl Zeiss Microimaging, Axiokop 40, Göttingen, Germany).

4.3 Imunofluorescência

Foram utilizados 4 animais de cada grupo experimental, submetidos à overdose de anestésico (Ketamina 50 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) via intraperitoneal,

no qual foram dissecadas amostras da JMT e fixadas em paraformaldeído 4%, durante 48h à 4 °C. Posteriormente, as amostras foram seccionadas longitudinalmente (150 µm) e alocadas em lâminas histológicas; lavadas em solução phosphate buffered saline (PBS); permeabilizadas com Triton X-100 - 0,1% durante 30min; e lavadas com PBS contendo 1% bovine serum albumin (BSA) para bloqueio de marcação inespecífica. Em seguida, foi realizada a incubação “overnight” (16h) com anticorpos monoclonais (mouse) anti- α Tubulina (5 µg/ml) e anti- β Tubulina (3 µg/ml) para imunomarcação do citoesqueleto. Após a lavagem, foram incubadas com anticorpos secundários (Goat anti-mouse) e, posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com “Alexa Fluor 488 Phalloidina” diluído em PBS (1:600), durante 30min, para imunomarcação dos filamentos de α -actina. As lâminas foram finalizadas com ProLong[®] Gold contendo 4’6-diamidino-2-phenylindole dihydrochoryde (DAPI, Molecular Probes[®]) para marcação dos núcleos celulares. As imagens foram obtidas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LEICA TCS-SP5[®], Mannheim, Germany).

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram utilizados 3 animais de cada grupo experimental, submetidos à overdose de anestésico (Ketamina 50 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) via intraperitoneal. As amostras da JMT foram lavadas com solução tampão de fosfato de sódio, pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1%, incluídas em resina Spurr[®] e seccionadas em cortes ultrafinos, coletados em telas de cobre 200 “mesh” (Sigma[®]), contrastados com solução de acetato de uranila 4% e solução aquosa de citrato de chumbo 0,4%, e em seguida foram lavadas com água destilada (CIENA et al., 2012). As telas foram examinadas através do microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM 100[®], ICB/USP, São Paulo - SP, Brazil).

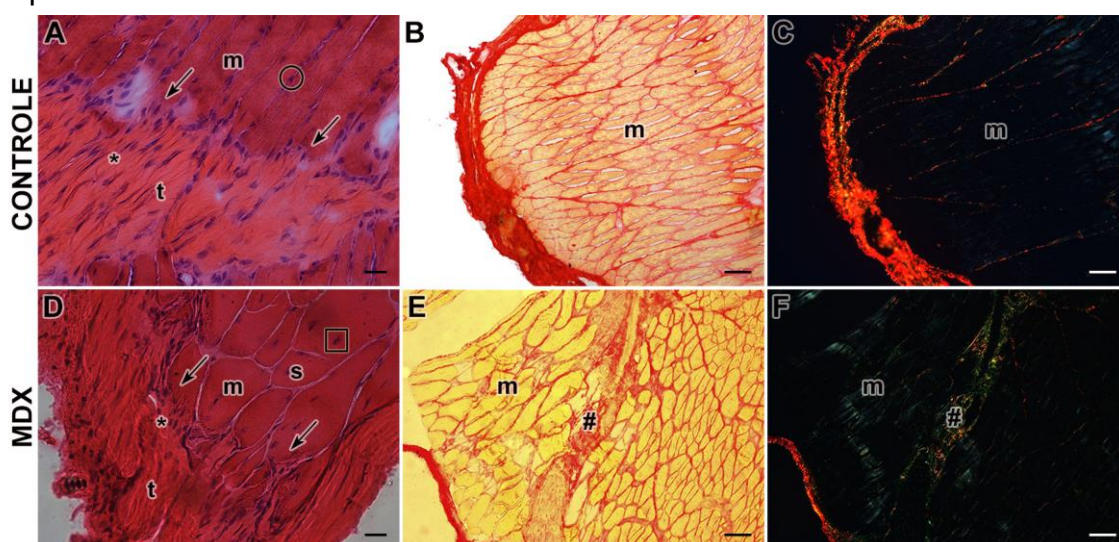
5 RESULTADOS

5.1 Microscopia de Luz

No Grupo Controle observamos uma alta concentração de núcleos na interface miotendínea, assim como as miofibrilas apresentaram núcleos periféricos adjacentes ao todo comprimento da fibra muscular (Figura 6A). Notamos também o tecido conjuntivo intramuscular disposto de forma organizada, com o perímísio e endomísio bem estruturados (Figura 6B); além do predomínio de colágeno tipo I, através da tonalidade vermelha (Figura 6C).

Enquanto que no Grupo MDX, observamos uma extensa área de degeneração e regeneração muscular, visto que os prolongamentos tendíneos se demonstraram alongados e ramificados na interface miotendínea, a qual revelou uma concentração de núcleos disformes e desorientados; seguidos por fibras musculares com variações irregulares em seus diâmetros e formatos, devido sua partição (splitting) longitudinal (Figura 6D). Identificamos também alterações na organização e arranjo do tecido conjuntivo intramuscular, que demonstra a ampla área de fibrose tecidual (Figura 6E) e a predominância de colágeno tipo III, através da tonalidade verde (Figura 6F).

Figura 6. Microscopia de Luz da região da JMT do músculo tibial anterior dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborada pela Autora. Grupo Controle: (A) Coloração em HE, com destaque à JMT (seta), tecido tendíneo (t), tecido muscular (m), núcleos concentrados na JMT (*) e núcleo periférico (círculo). (B) Coloração em PSR, em destaque a organização do tecido conjuntivo associado às fibras musculares (m), endomísio e perímísio. (C) Luz Polarizada da coloração em PSR, identificamos o tecido muscular (m) e o predomínio de colágeno tipo I (vermelho). Grupo MDX: (D) Coloração em HE,

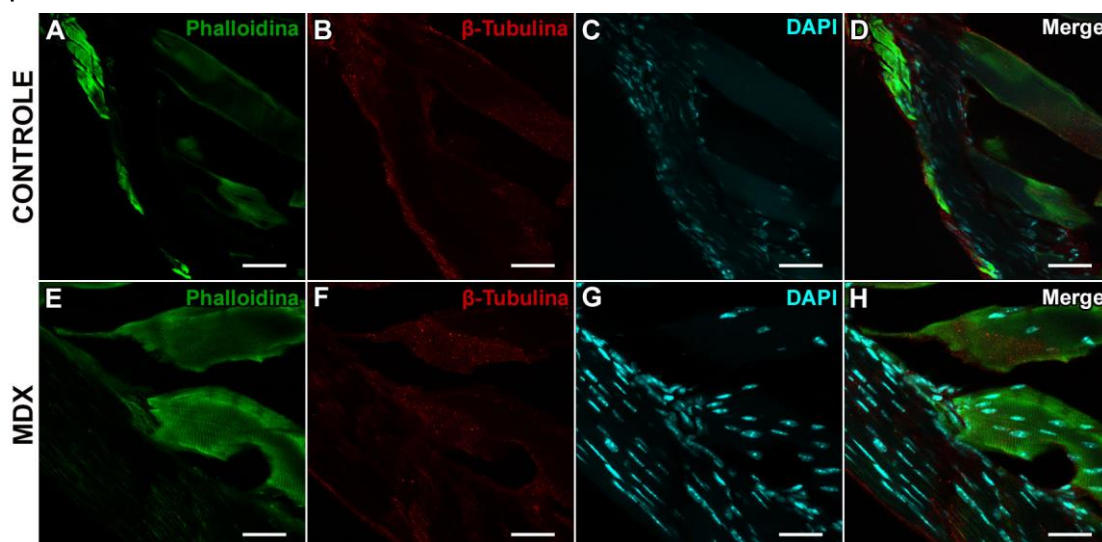
em destaque a JMT (seta), tecido tendíneo (t), tecido muscular (m), splitting (s), núcleos disformes concentrados na JMT (*) e núcleo centralizado (quadrado). (E) Coloração em PSR, em destaque a organização do tecido conjuntivo associado às fibras musculares (m), endomísio e perimísio, acompanhado de uma extensa área de fibrose tecidual (#). (F) Luz Polarizada da coloração em PSR, identificamos o tecido muscular (m) e a extensa área de fibrose tecidual (#) evidenciando a predominância de colágeno tipo III (verde). Barras: 20 μ m (A, D) e 100 μ m (B, C, E, F).

5.2 Imunofluorescência

No Grupo Controle podemos observar os filamentos de actina dispostos paralelamente e bem delimitados (Figura 7A). A formação do citoesqueleto também é demonstrada como principal componente na morfologia tecidual (Figura 7B), além de ser evidente a presença de núcleos tanto na região da junção como na periferia (Figura 7C). Por meio da sobreposição das imagens, é revelada a organização dos elementos demarcados (Figura 7D).

O Grupo MDX revelou filamentos de actina irregulares e a região distal demonstra o extenso processo degenerativo na JMT (Figura 7E). Além disso, é possível observar a modificação estrutural do citoesqueleto (Figura 7F) e a maior densidade de núcleos disseminados pela fibra muscular e tendão (Figura 7G). Por meio da sobreposição das imagens, é revelada a organização dos elementos demarcados (Figura 7H).

Figura 7. Imunofluorescência da região da JMT do músculo tibial anterior dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborada pela Autora. Grupo Controle: (A) Identificação em verde dos filamentos de actina dos feixes de filamentos contrácteis (Phalloidina). (B) Identificação em vermelho do citoesqueleto (β -Tubulina). (C) Imunolocalização em azul dos núcleos das células musculares (DAPI). (D) Imagens imunofluorescentes sobrepostas digitalmente. Grupo MDX: (E) Identificação em verde dos filamentos

delgados de actina dos feixes de filamentos contrácteis (Phalloidina). (F) Identificação em vermelho do citoesqueleto (β -Tubulina). (G) Imunolocalização em azul dos núcleos das células musculares (DAPI). (H) Imagens imunofluorescentes sobrepostas digitalmente. Barras: 30 μ m.

5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

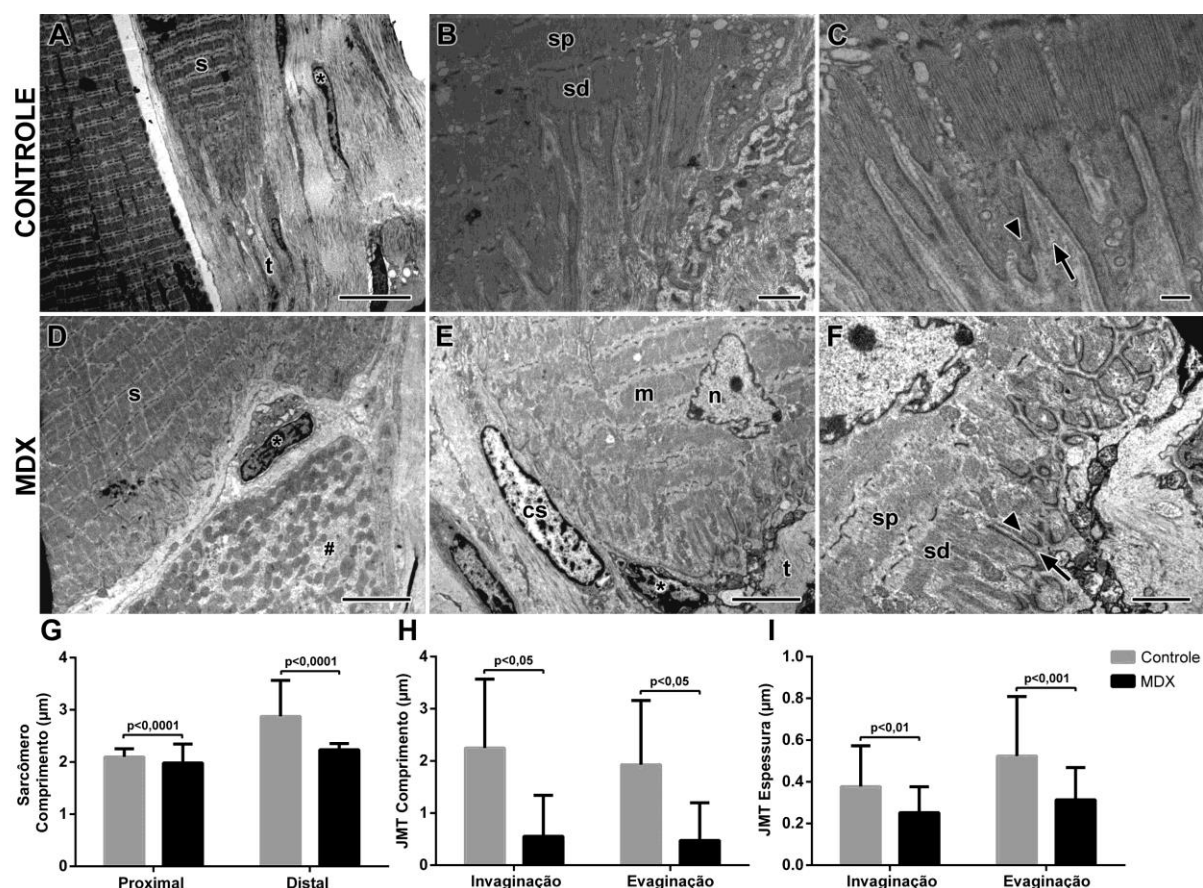
No Grupo Controle observamos os sarcômeros organizados em série ao longo do miofilamento, seguido por feixes de fibras colágenas dispostos na extremidade do músculo; identificamos também em projeção paralela à superfície de adesão da JMT, células estromais recentemente descobertas neste tecido, os telócitos (Figura 8A). Constituindo a região miotendínea, observamos os sarcômeros proximais e distais definidos e alinhados (Figura 8B), próximos ao sistema de ancoragem entre o músculo e o tendão, as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, que se revelaram alongadas, irregulares e assimétricas (Figura 8C).

No Grupo MDX observamos grupos subsarcolêmicos de mitocôndrias próximas ao tendão e adjacentes a um telócito, além dos sarcômeros em série revelarem um padrão atípico em sua disposição e morfologia, evidenciado pela definição irregular das linhas Z (Figura 8D). Em relação à JMT, os prolongamentos das fibras de colágeno provenientes do tendão (invaginações sarcoplasmáticas) demonstraram-se ramificados, em aspecto de rede; como também é evidenciado a presença de um núcleo disposto centralmente na fibra muscular, uma célula satélite e telócitos na região tendínea (Figura 8E).

Além disso, os sarcômeros proximais e distais apresentaram seu alinhamento comprometido, junto à disposição modificada das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, as quais apresentaram alterações em seus comprimentos e espessuras (Figura 8F).

De acordo com as análises morfométricas, o Grupo MDX, quando comparado ao Grupo Controle, apresentou redução de aproximadamente 5% ($p < 0,0001$) no comprimento dos sarcômeros proximais e 22% ($p < 0,0001$) nos distais (Figura 8G). Concomitantemente, as invaginações sarcoplasmáticas revelaram uma redução significativa nos feixes de fibras colágenas tanto em seu comprimento quanto espessura, respectivamente de 75% ($p < 0,05$) e 33% ($p < 0,01$); enquanto que as evaginações demonstraram redução de 75% ($p < 0,05$) em seu comprimento e 40% ($p < 0,001$) em sua espessura (Figura 8H, I).

Figura 8. Micrografias e análise dos componentes da JMT do tibial anterior dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborada pela Autora. Grupo Controle: (A) Micrografia de transmissão, em destaque os sarcômeros definidos e dispostos em série (s), extensa área de tecido tendíneo (t) e estruturas denominadas telócitos (*). (B) Ampliação da JMT, na qual é possível observar a organização dos sarcômeros proximais (sp) e distais (sd). (C) Região da JMT, em destaque a invaginação (seta) e a evaginação (cabeça de seta) sarcoplasmáticas. Grupo MDX: (D) Micrografia de transmissão, em destaque os sarcômeros comprometidos pela degeneração muscular (s), acompanhados de um agrupamento mitocondrial próximo à fibra muscular (#) e a presença de um telócito (*), no qual é possível observar a disposição dos seus telópodos paralelos à JMT. (E) Ampliação da JMT, em destaque as fibras musculares (m) e o tecido tendíneo (t); acompanhado de um núcleo (n) disposto centralmente na fibra muscular e a presença de telócitos (*), próximos à uma célula satélite (cs). (F) Região da JMT, em destaque os sarcômeros proximais (sp) e distais (sd); e invaginação (seta) e evaginação (cabeça de seta) sarcoplasmáticas. (G) Média $\pm$ desvio padrão revelam alterações nos comprimentos dos sarcômeros da JMT, Controle $\neq$ MDX ($p < 0,0001$). (H) Média $\pm$ desvio padrão do comprimento das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas revelam redução em MDX ($p < 0,05$). (I) Média $\pm$ desvio padrão revelam redução nas espessuras das invaginações ($p < 0,01$) e evaginações sarcoplasmáticas ($p < 0,001$) em MDX. Barras: 10 μ m (A), 1 μ m (B), 0.2 μ m (C), 5 μ m (D, E) e 2 μ m (F).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram as adaptações na JMT e seus componentes perante um quadro de degeneração muscular causado pela DMD; dessa forma, as análises estruturais, ultraestruturais e moleculares indicaram alterações que podem contribuir na perda da capacidade motora e impactar na qualidade de vida de seus portadores.

Caracterizada como distúrbio muscular, a DMD promove alterações no posicionamento nuclear, visto que o constante processo de degeneração e regeneração exigem um remodelamento da fibra afetada (FOLKER; BAYLIES, 2013). Roman e Gomes (2018) relataram em seu estudo que a ancoragem nuclear não periférica é frequentemente acompanhada por núcleos desorientados e disformes; sendo assim, em nossos resultados notamos núcleos com características semelhantes e dispostos centralmente na fibra muscular, o que corrobora com os achados de ambos os estudos citados acima.

Através da imobilização do músculo tibial anterior, Kunz et al. (2013), evidenciaram que as alterações morfológicas causadas nas fibras musculares são indicadores de lesão muscular e necrose da fibra, que conseqüentemente promove o aumento do tecido conjuntivo associado, tendo em vista que o mecanismo de resposta dos fibroblastos, células responsáveis por produzir e manter o tecido conjuntivo, é a proliferação e deposição desse tecido frente a uma lesão, objetivando um remodelamento adequado da matriz extracelular. Em nosso estudo o Grupo MDX também apresentou alterações no formato das fibras musculares, assim como o preenchimento dos locais necrosados com tecido conjuntivo associado, caracterizando um quadro de enfraquecimento e estresse mecânico no músculo e suas estruturas.

Ribeiro et al. (2015) descreveram o processo de regeneração em fases, sendo que uma delas se caracteriza pela elevação na concentração de fibroblastos, que produzem e depositam colágeno tipo III, para que posteriormente ocorra o remodelamento e a substituição por fibras colágenas tipo I. Em nossos dados, é notória a presença de colágeno tipo III no Grupo MDX, pois após o tecido muscular ser lesionado constantemente, a sobrecarga do processo de maturação das fibras de colágeno resulta em fibrose tecidual e formação de cicatriz. Diante esses

aspectos, é evidente que o comprometimento do tecido muscular repercute gravemente na modulação da JMT.

Em nossos resultados, observamos em ambos os Grupos a presença de telócitos próximos à JMT, que segundo a literatura, podem estar associados a fatores regenerativos e de reparo; o mesmo foi encontrado no músculo cardíaco por Zhaofu e Dongqing (2016); assim como em diferentes condições patológicas apresentam alterações (WANG; WANG, 2017); e foram recentemente encontrados no músculo estriado esquelético e associados à ativação de células satélite (MANETTI et al., 2019).

Tendo em vista que os músculos predominantemente glicolíticos, como o tibial anterior, são mais afetados pelos efeitos deletérios da DMD e pela disfunção mitocondrial; os grupamentos mitocondriais observados próximos à JMT no Grupo MDX podem indicar alta atividade celular devido às adaptações sofridas nesta região (BARKER et al., 2018).

Jacob et al. (2019) relataram em modelo experimental de menopausa que os estímulos atróficos repercutem em atenuações nos comprimentos dos sarcômeros da JMT. Dessa forma, obtivemos resultados semelhantes, uma vez que o processo desenfreado de degeneração proporciona a atrofia das fibras musculares e, conseqüentemente, um menor comprimento dos sarcômeros proximais e distais.

A literatura afirma que a adição longitudinal de sarcômeros na fibra muscular resulta em redução do espaçamento dos filamentos de proteínas contráteis e, assim, há maior produção de força contrátil (FENWICK; LEIGHTON; TANNER, 2016). Concomitantemente, Lynch et al. (2001) comprovaram que músculos distróficos apresentam menor capacidade de produção de força, devido ao declínio da massa muscular. Desse modo, supõem-se que os menores comprimentos dos sarcômeros encontrados em nosso estudo associados à redução na produção de força, podem ser decorrentes da diminuição longitudinal na quantidade de sarcômeros e menor comprimento muscular, visto que a DMD também ocasiona a atrofia dos músculos.

Curzi et al. (2013) relataram que, após atrofia provocada pela suspensão dos membros posteriores de ratos, a JMT sofre um remodelamento negativo, o qual prejudica o desempenho de sua funcionalidade, visto que seus componentes apresentaram alterações em sua morfologia. Em nossos resultados, a ausência da distrofina causada pela DMD também demonstrou um remodelamento negativo, em que as projeções da JMT apresentaram menores comprimentos e espessuras, tendo

em vista que a morfologia ramificada nos prolongamentos advindos do tendão proporciona uma área de contato mais frágil na interface músculo-tendínea para sustentar a transmissão de força.

Em nossos resultados, a definição irregular das linhas Z e, em algumas partes a sua ausência, corroboram com a ideia de que, com o aumento do influxo de íons de cálcio, as enzimas digestivas ativadas induzem a quebra das linhas Z da miofibrila, comprometendo o ponto de ancoragem dos miofilamentos de actina e o processo de contração muscular (JORGENSEN et al., 2011).

7 CONCLUSÃO

Concluimos que a JMT apresenta significativo comprometimento e maior suscetibilidade a lesões, devido ao constante processo de degeneração e regeneração muscular. As adaptações observadas na região miotendínea resultaram em grave implicação na transmissão de força contrátil e demonstraram a drástica redução e modulação frágil da JMT e seus componentes, uma vez que o enfraquecimento constante do tecido muscular, ocasionado pela a DMD, repercute diretamente nesta região.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, D. G.; WHITEHEAD, N. P.; FROEHNER, S. C. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: Roles of Ca²⁺, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 253–305, 2015.
- BARKER, R. G.; WYCKELSMA, V. L.; XU, H.; MURPHY, R. M. Mitochondrial content is preserved throughout disease progression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy, regardless of taurine supplementation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 314, n. 4, p. C483–C491, 2018.
- BHUTDA, S.; ANIL, A.; SURVE, M.; SINGH, N. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **Bio-Protocol**, v. 7, n. 21, 2017.
- BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **Lancet Neurol**, v. 9, p. 77–93, 2010.
- CAIERÃO, Q. M.; TEODORI, R. M.; MINAMOTO, V. B. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 20, n. 3, p. 87-92, 2007.
- CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, n. 6, p. 655–658, 2014.
- CHARVET, B.; RUGGIERO, F.; LE GUELLEC, D. The development of the myotendinous junction. A review. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 2, n. 2, p. 53–63, 2012.
- CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; BOLINA, C. S.; BOLINA-MATOS, R. S.; RICI, R. E. G.; SILVA, M. C. P.; MIGLINO, M. A.; WATANABE, I. Ultrastructural features of the myotendinous junction of the sternomastoid muscle in Wistar rats: From newborn to aging. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 9, p. 1292–1296, 2012.
- CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; ALMEIDA, S. R. Y.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011–1014, 2010.
- CURZI, D.; LATTANZI, D.; BURATTINI, S.; TIDBALL, J. G.; FALCIERI, E. Morphological changes of myotendinous junction. **Microscopie**, p. 46–52, 2013.
- CURZI, D.; SARTINI, S.; GUESCINI, M.; LATTANZI, D.; PALMA, M. D.; AMBROGINI, P.; SAVELLI, D.; STOCCHI, V.; CUPPINI, R.; FALCIERI, E. Effect of

different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.

DE PALMA, C.; PERROTA, C. PELLEGRINO, P.; CLEMENTI, E.; CERVIA, D. Skeletal muscle homeostasis in Duchenne muscular dystrophy: Modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 1–8, 2014.

DUBOWITZ, V. The muscular dystrophies. **Postgrad Med J**, v. 68, n. 801, p. 500–506, 1992.

EMERY, A. E. H. Duchenne Muscular Dystrophy. **Oxford Monograph on Medical Genetics**, n. 24, 1993.

EMERY, A. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, p. 687–95, 2002.

FENWICK, A. J.; LEIGHTON, S. R.; TANNER, B. C. W. Myosin MgADP Release Rate Decreases as Sarcomere Length Increases in Skinned Rat Soleus Muscle Fibers. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 9, p. 2011–2023, 2016.

FISCHER, A. H.; JACOBSON, K. A.; ROSE, J.; ZELLER, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 5, p. 4986–4988, 2008.

FOLKER, E. S.; BAYLIES, M. K. Nuclear positioning in muscle development and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1–11, 2013.

FREITAS, M. M.; SCHNEIDER, G. M.; SANTOS, S.; SANTOS, A. V. O.; ALMEIDA, L. E. O.; FREITAS, M. M.; SANTOS, B. F. S.; LOPES, L. E. S.; BARROSO, S. S. Qualidade de vida de pacientes com distrofia muscular de Duchenne revisão sistemática. **Revista Interdisciplinar de Estudos em saúde da UNIARP**, p. 240–251, 2019.

GOMES, A. L. O.; PINTO, A. N.; GÓES, É. R.; HIROSUE, L. N.; PEIXOTO, B. O.; CAROMANO, F. A.; BLASCOVI-ASSIS, S. M. Desempenho motor e funcional na Distrofia Muscular de Duchenne: estudo de um caso. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 29, n. 2, p. 131–135, 2011.

HENDERSON, C. A.; GOMEZ, C. G.; NOVAK, S. M.; MI-MI, L.; GREGORIO, C. C. Overview of the muscle cytoskeleton. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 3, p. 891–944, 2017.

HERDY, G. V. H.; PINTO, R. D. B.; COSTA, G. A.; TORBY, A. F. M.; RAMOS, V. G.; VASCONCELOS, M. M. Estudo Clínico e Molecular na Distrofia Muscular de Duchenne. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 28, n. 3, p. 173–180, 2015.

HORITA, S. I. M.; DA CRUZ, F. M. Distrofia muscular de Duchenne. **Anales de Pediatria Continuada**, v. 6, p. 35–44, 2015.

IANNOTTI, J. P.; PARKER, R. D. Coleção Netter de Ilustrações Médicas – Sistema Musculoesquelético Parte III. 2ª edição. **Guanabara Koogan**, 2015.

JACOB, C. S.; ROCHA, L. C.; WATANBE, I.; CIENA, A. P. Effects of physical training on sarcomere lengths and muscle-tendon interface of the cervical region in an experimental model of menopause. **European Journal of Histochemistry**, v. 63, n. 3, p. 131–135, 2019.

JONES, H. R. Coleção Netter de Ilustrações Médicas – Sistema Nervoso Parte II. 2ª edição. **Guanabara Koogan**, 2014.

JORGENSEN, L. H.; BLAIN, A.; GREALLY, E.; LAVAL, S. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle. **Am J Pathol**, v. 178, n. 1, p. 273-83, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: Texto e Atlas. 12ª edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.

KNUDSEN, A. B.; LARSEN, M.; MACKEY, A. L.; HJORT, M.; HANSEN, K. K.; QVORTRUP, K.; KJAER, M.; KROGSGAARD, M. R. The human myotendinous junction: An ultrastructural and 3D analysis study. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 25, n. 1, p. e116–e123, 2015.

KUNKEL, L. M.; MONACO, A. P.; MIDDLESWORTH, W.; OCHS, H. D.; LATT, S. A. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. **Proc Natl Acad**, v. 82, n. 14, p. 4778-82, 1985.

KUNZ, R. I.; CORADINI, J. G.; SOARES, C. L. R.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F.; RIBEIRO, L. DE F. C. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. **UEPG: Ciencias Biologicas e Da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 123–129, 2013.

LEONG, N. L.; KATOR, J. L.; CLEMENS, T. L.; JAMES, A.; EMANOTO-IWAMOTO, M.; JIANG, J. Tendon and Ligament Healing and Current Approaches to Tendon and Ligament Regeneration. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 38, n. 1, p. 7–12, 2020.

LIMA, A. A. R.; CORDEIRO, L. Fisioterapia aquática em indivíduos com distrofia muscular: uma revisão sistemática do tipo escopo. **Fisioter Pesqui**, v. 27, n. 1, p. 100-111, 2020.

LYNCH, G. S.; HINKLE, R. T.; CHAMBERLAIN, J. S.; BROOKS, S. V.; FAULKNER, J. A. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. **Journal of Physiology**, v. 535, n. 2, p. 591–600, 2001.

MALIK, V.; RODINO-KLAPAC, L. R.; VIOLLET, L.; MENDELL, J. R. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. **Ther Adv Neurol Disord**, v. 3, n. 6, p. 379-89, 2010.

MANETTI, M.; TANI, A.; ROSA, I.; CHELLINI, F.; SQUECCO, R.; IDRIZAJ, E.; ZECCHI-ORLANDINI, S.; IBBA-MANENESCHI, L.; SASSOLI, C. Morphological evidence for telocytes as stromal cells supporting satellite cell activation in eccentric contraction-induced skeletal muscle injury. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

MORAES, F. M.; FERNANDES, R. C. S.; MEDINA-ACOSTA, E. Distrofia Muscular de Duchenne: relato de caso. **Revista Científica da FMC**, v. 6, n. 2, p. 11–15, 2011.

NIELSEN, K. B.; LAL, N. N.; SHEARD, P. W. Age-related remodeling of the myotendinous junction in the mouse soleus muscle. **Experimental Gerontology**, v. 104, p. 52–59, 2018.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. Netter Bases da Fisiologia. 2ª edição. Elsevier Editora Ltda, 2014.

PALMA, L. D.; MARINELLI, M.; PAVAN, M.; BERTONI-FREDDARI, C. Involvement of the muscle-tendon junction in skeletal muscle atrophy: An ultrastructural study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 52, n. 1, p. 105–109, 2011.

PARENT, A. Duchenne De Boulogne: A Pioneer in Neurology and Medical Photography. **Can. J. Neurol. Sci.**, v. 32, p. 269-377, 2005.

PERRONNET, C.; VAILLEND, C. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. **J Biomed Biotechnol**, 2010.

RIBEIRO, F. A. Q.; CARVALHO, M. F. P.; PEREIRA, C. S. B. P.; TATENO, D. A. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 60, p. 22-26, 2015.

ROCHA, L. C.; PIMENTEL NETO, J.; SANT'ANA, J. S.; JACOB, C. S.; BARBOSA, G. K.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Repercussions on sarcomeres of the myotendinous junction and the myofibrillar type adaptations in response to different trainings on vertical ladder. **Mycroscopy Research and Technique**, v. 83, n. 10, p. 1190-1197, 2020.

ROMAN, W.; GOMES, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 82, p. 51–56, 2018.

RONDOT, P. G. B. A. Duchenne de Boulogne (1806–1875). **J Neurol**, v. 252, p. 866–7, 2005.

SANTOS, C. M. T.; PEREIRA, C. U.; MORAES, A. A.; SANTOS, E. A. S.; MONTEIRO, J. T. S. Distrofia Muscular de Duchenne. **Moreira Jr. Editora**, 2005.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**, v. 81, n. 11, p. 1810-1816, 2001.

SIERRA, L. R.; FAVÁRO, G.; CERRI, B. R.; ROCHA, L. C.; ALMEIRA, S. R. Y.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research & Technique**, p. 1-7, 2018.

SQUIRE, J. M.; PAUL, D. M.; MORRIS, E. P. Myosin and Actin Filaments in Muscle: Structures and Interactions. **Subcellular Biochemistry**, v. 82, p. 319-71, 2017.

TYAGI, S.; BEQOLLARI, D.; LEE, C. S.; WALKER, L. A.; BANNISTER, R. A. Semi-automated Analysis of Mouse Skeletal Muscle Morphology and Fiber-type Composition. **Journal of Visualized Experiments**, n. 126, p. 1-7, 2017.

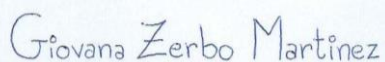
UNIVERSIDADE DE PARIS. Banque d'images et de portraits: DUCHENNE, de Boulogne, Guillaume Benjamin Amond (1806-1875). Disponível em: <<https://www.biusante.parisdescartes.fr/histoire/images/index.php?refphot=anmpx42x0014a>>. Acesso em: 21/12/2020.

WANG, D. C.; WANG, X. Systems heterogeneity: An integrative way to understand cancer heterogeneity. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 64, p. 1–4, 2017.

YUAN, C.; ARORA, A.; GAROFALO, A. M.; GRANGE, R. W. Potential cross-talk between muscle and tendon in Duchenne muscular dystrophy. *Connective Tissue Research*, p. 1–13, 2020.

ZHAO, C.; WANG, S.; WANG, G.; SU, M.; SONG, L.; CHEN, J.; FAN, S.; LIN, X. Preparation of decellularized biphasic hierarchical myotendinous junction extracellular matrix for muscle regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 68, p. 15–28, 2018.

ZHAOFU, L.; DONGQING, C. Vascular Telocytes General Structure of Blood Vessels. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 601, p. 377–395, 2016.



Giovana Zerbo Martinez



Prof. Dr. Adriano Polican Ciena