

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Distúrbios de Coagulação e Alterações Hemostáticas na Distrofia
Muscular de Duchenne

ESTELA KATO DOS SANTOS

CRISTINA FERREIRA RAMOS ROSSETTO

CINTIA YURI MATSUMURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2024**

ESTELA KATO DOS SANTOS

**Distúrbios de Coagulação e Alterações Hemostáticas na Distrofia Muscular de
Duchenne**

Trabalho apresentado à banca examinadora da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho” para a obtenção do título de bacharel
em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof^ª Cristina Ferreira Ramos Rossetto

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Cintia Yuri Matsumura

Botucatu,

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Estela Kato dos.

Distúrbios de coagulação e alterações hemostáticas na
Distrofia Muscular de Duchenne / Estela Kato dos Santos. -
Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Cristina Ferreira Ramos Rossetto

Coorientador: Cintia Yuri Matsumura

Capes: 40101053

1. Camundongos. 2. Coagulação sanguínea. 3. Distrofia
muscular de Duchenne. 4. Hemostasia.

Palavras-chave: Camundongo MDX; Coagulação; Distrofia
Muscular de Duchenne; Hemostasia.


ESTELA KATO DOS SANTOS

DISTÚRBIOS DE COAGULAÇÃO E ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS NA Distrofia Muscular de Duchenne

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 2 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA


Documento assinado digitalmente
 **CRISTINA FERREIRA RAMOS ROSSETTO**
Data: 09/01/2025 09:49:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestre Cristina Ferreira Ramos Rossetto
Afiliações

Wellerson Rodrigo
Scarano:1893221083
7

Assinado de forma digital por
Wellerson Rodrigo
Scarano:18932210837
Dados: 2025.01.08 11:44:02 -03'00'

Prof. Wellerson Rodrigo Scarano
Afiliações

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO**
Data: 08/01/2025 09:26:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro
Afiliações

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença pediátrica letal que leva à fraqueza e desgaste da musculatura estriada esquelética e cardíaca de forma progressiva, o que frequentemente resulta em morte precoce por insuficiência cardiorrespiratória, em torno dos 30 anos de idade. Os pacientes também enfrentam complicações hematológicas de alto risco, como trombose, que pode levar a infartos cerebrais, e embolismo pulmonar. A predisposição a sangramentos são frequentes, incluindo hematomas, hemorragias que persistem após lesões e episódios de epistaxe, indicando defeitos hemostáticos primários e secundários. O camundongo *mdx* é um modelo comumente utilizado na pesquisa da DMD devido à semelhança na reprodução e evolução da doença. Nosso estudo analisou o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e D-Dímero (DD), para analisar o estado hemostático no contexto da distrofinopatia em camundongos distróficos. Os resultados indicaram uma piora significativa nos parâmetros hemostáticos (TP, TTPA e DD) no grupo *mdx* em comparação ao controle, especialmente entre as fêmeas distróficas, sugerindo uma possível influência hormonal. Estes achados reforçam a necessidade de ampliar a investigação sobre a progressão e os mecanismos de disfunção hemostática na DMD, visando contribuir para a literatura e apontar caminhos para abordagens terapêuticas que possam mitigar as complicações vasculares associadas a esta doença.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	5
2. INTRODUÇÃO.....	7
3. METODOLOGIA.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	19
6. AGRADECIMENTOS.....	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
8. ANEXOS.....	25

INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular rara ligada ao cromossomo X que pertence a um grupo de doenças conhecidas como distrofinopatias. A enfermidade é causada por mutações no gene DMD que levam à ausência da distrofina ou a defeitos estruturais desta proteína. A falta de distrofina funcional, por sua vez, prejudica a estrutura e a função das miofibras, que são essenciais para o crescimento fisiológico do tecido muscular. Devido à localização do gene no cromossomo X, a DMD afeta predominantemente crianças do sexo masculino, enquanto as mulheres são consideradas “*healthy carriers*”, sendo assintomáticas na maioria das vezes. A DMD é caracterizada por uma degeneração progressiva dos músculos esqueléticos, com sintomas que se manifestam precocemente, por volta dos 3 anos, causando perda de deambulação aos 13 anos de vida, seguida de complicações cardíacas e distúrbios respiratórios, incluindo a insuficiência cardiorrespiratória crônica, que é a principal causa de morte do paciente distrófico. Na primeira fase da doença, a criança apresenta dificuldade para correr, subir escadas, saltar, levantar-se do chão, com quadros de quedas frequentes e desenvolve uma marcha oscilante com “sinal de Gowers” positivo (FORTUNATO e FERLINI, 2023). Com os avanços na Medicina e na Ciência, a expectativa de vida dos pacientes com DMD aumentou até os quarenta anos, principalmente devido ao desenvolvimento de diretrizes para o cuidado e gerenciamento da saúde desses indivíduos e também ao melhor tratamento da disfunção cardiopulmonar que tem grande impacto na sobrevida do portador de DMD (ANGULSKI *et al*, 2023).

Sendo uma enfermidade de fisiopatologia complexa, afetando diversas áreas do corpo humano - anatomicamente, neurologicamente e até mesmo cognitivamente (FOX *et al*, 2020) -, distúrbios na hemostasia são frequentemente citados pelos pacientes distróficos (SCHORLING *et al*, 2020). Sintomas como tendência a sangramentos recorrentes, epistaxe, defeitos hemostáticos primários e secundários são notados pela Literatura, contudo, a abordagem a esta linha de pesquisa costuma não ser prioridade nos estudos acerca da DMD, por mais importante que seja.

A hemostasia é o processo de preservação da integridade vascular pelo balanço dos processos fisiológicos que mantêm o sangue em um estado fluído sob circunstâncias normais e previne sangramento excessivo após uma lesão vascular. A preservação da fluidez sanguínea depende de um endotélio vascular intacto e uma série complexa de vias reguladoras que mantêm as plaquetas em um estado estável para manter o sistema de coagulação quiescente (ZAIDI e GREEN, 2022). Em contrapartida, a interrupção do sangramento requer a formação

rápida de tampões hemostáticos no local da lesão com a finalidade de prevenir o início de uma hemorragia. Perturbações na coagulação podem levar a sangramentos desnecessários - em condições na falha de interromper o vazamento vascular pela formação defeituosa ou quebra prematura de um tampão hemostático - e até mesmo trombose - quando o estímulo pró-trombótico está desregulado, por exemplo (BONAR, LIPPI e FAVALORO, 2017).

Muitos fatores, genéticos ou adquiridos, podem contribuir para romper esse equilíbrio envolvente na hemostasia, levando aos estados hipercoagulabilidade ou hipercoagulabilidade. Destarte, a hemostasia pode ser dividida em 3 etapas: hemostasia primária, secundária e terciária - ou fibrinólise (DAL MOLIN, 2018).

Na hemostasia primária, após a lesão endotelial, ocorre a exposição do colágeno e vasoconstricção reflexa. Plaquetas circulantes aderem ao colágeno por meio do fator de von Willebrand, liberado pelo endotélio em razão do estresse de cisalhamento. Essa adesão ocorre por intermédio das glicoproteínas Ib (GPIb), também conhecida como CD42, e Ia-IIa localizadas, respectivamente, na superfície das plaquetas e do colágeno. As plaquetas aderidas ao colágeno são ativadas, liberando secreções dos conteúdos granulares (adenosina difosfato, prostaglandinas, tromboxano A2 e serotonina), e sofrem alteração de sua estrutura, expondo outra glicoproteína de membrana: GPIIb/IIIa - responsável pela agregação plaquetária por meio da sua ligação ao fibrinogênio: agregação plaqueta-plaqueta (Figura 1) (DAL MOLIN, 2018). As secreções dos grânulos plaquetários são responsáveis por maiores vasoconstricções, adesão, ativação e agregação plaquetária. Assim, forma-se o tampão plaquetário, responsável pelo controle do sangramento em poucos. Por fim, o tampão plaquetário tem atividade pró-coagulante, por meio da exposição de fosfolípidos pró-coagulantes e complexos enzimáticos na superfície da plaqueta, o que resulta na inter-relação entre ativação plaquetária e ativação da cascata de coagulação (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

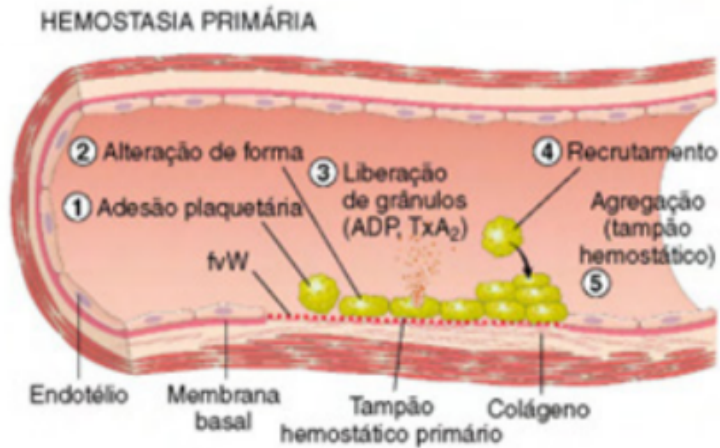


Figura 1: Representação do processo da hemostasia primária. (1) Adesão plaquetária: As plaquetas aderem ao colágeno exposto da matriz subendotelial por meio do fator de von Willebrand (vWF), iniciando o processo de formação do tampão hemostático. (2) Alteração de forma: Após a adesão, as plaquetas mudam de forma, passando de discos para estruturas mais alongadas, o que aumenta a área de contato para interação. (3) Liberação de grânulos: As plaquetas ativadas liberam grânulos contendo ADP, tromboxano A₂ (TxA₂) e outros mediadores, que amplificam o recrutamento de plaquetas. (4) Recrutamento: Novas plaquetas são atraídas ao local da lesão por mediadores liberados, promovendo maior adesão e ativação. (5) Agregação: As plaquetas aderidas se conectam umas às outras formando o tampão hemostático primário, que age como uma barreira inicial para conter a perda de sangue. Figura extraída de KUMAR; ABBAS; FAUSTO; ASTER, 2010.

As reações da cascata de coagulação configuram a hemostasia secundária (Figura 2). Ela consiste na ativação sequencial de uma série de pró-enzimas ou precursores proteicos inativos em enzimas ativas, resultando na formação de fibras de fibrina que fortalecem o tampão plaquetário. Ademais, a cascata de coagulação é dividida em duas vias principais: a via intrínseca (desencadeada por fatores de contato, de carga negativa, presentes no intravascular) e a extrínseca (desencadeada pelo Fator Tecidual - FT), que confluem para uma via comum (CHAPIN e HAJJAR, 2015).

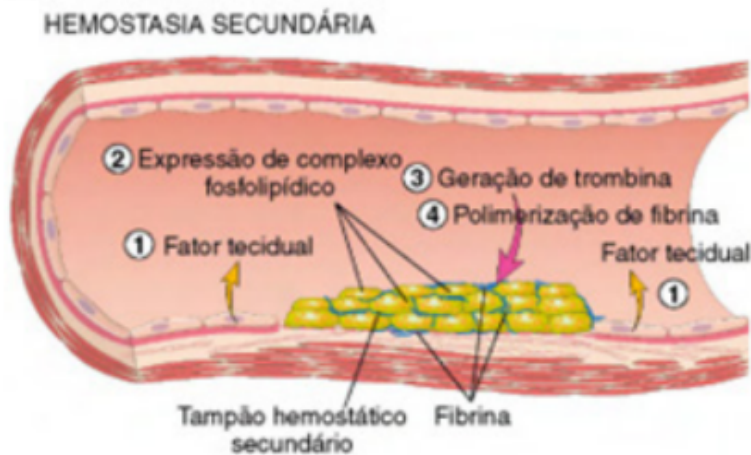


Figura 2: Representação do processo da hemostasia secundária. (1) O fator tecidual é exposto e ativa a cascata de coagulação.(2) As plaquetas ativadas liberam fosfolipídios que facilitam a formação de complexos enzimáticos. Isso leva à geração de trombina (3), que converte o fibrinogênio em fibrina. (4) A fibrina se polimeriza, formando uma rede que estabiliza o coágulo, resultando no tampão hemostático secundário, essencial para conter o sangramento. Figura extraída de KUMAR; ABBAS; FAUSTO; ASTER, 2010.

O mecanismo pelo qual a coagulação permite a hemostasia é um processo complexo que ocorre por meio de uma série de fatores de coagulação, que são produzidos pelo fígado, com exceção do fator VIII e o de von Willebrand, que são secretados pelo endotélio. A via intrínseca consiste nos fatores I, II, IX, X, XI e XII. Respectivamente, cada um deles é denominado fibrinogênio, protrombina, fator Christmas, fator Stuart-Prower, tromboplastina plasmática e fator Hageman (GROVER e MACKMAN, 2019). A via extrínseca consiste nos fatores I, II, VII e X. O fator VII é chamado de fator estável. A via comum consiste nos fatores I, II, V, VIII e X (MACKMAN, TILLEY e KEY, 2007). Os fatores circulam pela corrente sanguínea como zimogênios e são ativados em serina proteases - atuantes como catalisadores na finalidade de clivagem do próximo zimogênio em mais serina-proteases e, por fim, ativar o fibrinogênio. As seguintes serino-proteases são: fatores II, VII, IX, X, XI e XII. Não são serino-proteases: fatores V, VIII e XIII. A via intrínseca é ativada pelo colágeno endotelial exposto, e a via extrínseca é ativada pelo fator tecidual liberado pelas células endoteliais após danos externos (CHAUDHRY *et al*, 2022).

A creatina quinase (CK) é uma enzima que catalisa a fosforilação da creatina, sendo um dímero que existe com uma grande atividade no músculo (CK-MM), coração (CK-MB) e cérebro (CK-BB) (WASHINGTON e HOOSIER, 2012). No músculo, sua quantificação plasmática em níveis elevados está relacionada ao dano contínuo na miofibrila. As lesões musculares liberam a enzima na corrente sanguínea e elevam seus níveis plasmáticos. Ademais, as distrofias musculares são associadas a altos níveis de CK na circulação sanguínea (KATIRJI, 2001). O dano muscular na DMD está intimamente ligado a um processo inflamatório crônico. A ausência de distrofina causa fragilidade na membrana das fibras musculares, que se rompem com o uso cotidiano dos músculos. Este rompimento constante resulta em infiltração de células imunes, como macrófagos e linfócitos, que tentam reparar o tecido afetado. No entanto, devido à incapacidade de regeneração muscular completa e à destruição contínua das fibras, esse recrutamento imune gera uma resposta inflamatória persistente, exacerbando o desgaste ao invés de resolver o dano (NITAHARA-KASAHARA, TAKEDA e OKADA, 2016).

O camundongo *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*) é um modelo experimental amplamente utilizado para o estudo da fisiopatologia da DMD e testagem de novas estratégias terapêuticas em potencial (MANNING e O'MALLEY, 2015). Seu uso foi descoberto no início dos anos 80, onde uma colônia de camundongos C57Bl/10ScSn foi identificada com um aumento no nível de creatina quinase (CK) no sangue, indicando dano muscular. Mais tarde, a linhagem foi descoberta com uma mutação *nonsense* (transição C → T) no exon 23 do gene *Dmd* - levando à ausência da distrofina. A mutação recessiva ligada ao cromossomo X no gene da distrofina assemelha-se ao observado em meninos com DMD. Como resultado, o camundongo carece da proteína. Ademais, o *mdx* também apresenta pseudo-hipertrofia de certos músculos, grande variabilidade no tamanho das fibras musculares, fibrose e infiltrações gordurosas, assim como maior suscetibilidade a lesões (ZAYNITDINOVA et al, 2021). Os sinais característicos da distrofia, tais como a degeneração seguida da regeneração, podem ser observados a partir da segunda quinzena dos camundongos após o nascimento. Destarte, entre o primeiro até o terceiro mês no ciclo de vida do *mdx*, encontram-se sinais típicos do pico da necrose, que é reduzido no quarto mês (TANABE, ESAKI e NOMURA, 1986)

Os camundongos também podem ser amplamente utilizados no estudo da hemostasia e anormalidades na coagulação devido ao seu sistema hemostático ser similar ao humano. Assim, o genoma murino pode ser facilmente manipulado com a finalidade de criar modelos de distúrbios hereditários da coagulação humana (MOHAMMED, MONROE e GAILANI 2020). Entretanto, ainda existem importantes diferenças fisiológicas, anatômicas e bioquímicas entre camundongos e seres humanos que devem ser consideradas ao utilizar camundongos como substitutos clínicos nos estudos da hemostasia. A diferença de tamanho de três ordens de magnitude resulta em grandes diferenças nas forças mecânicas exercidas sobre os tecidos de camundongos quando comparado a humanos, por exemplo. Há também maior propensão dos seres humanos com hemofilia (deficiência de fator VIII ou fator IX) a sangrar nas articulações (hemartrose) do que os camundongos com deficiência dos mesmos fatores, o que é, pelo menos em parte, explicada pelas diferentes magnitudes de força exercidas nos tecidos de bípedes de 70 kg e quadrúpedes de 0,025 kg, por exemplo (CARCAO et al, 2018). Destarte, o plasma de ambos humanos e camundongos possuem componentes similares dos fatores de coagulação e proteínas reguladoras, entretanto, mas devem ser utilizados com cautela para a não interferência e tendenciosidade em seu resultado.

Os testes de hemostasia constituem uma abordagem central na investigação da funcionalidade do sistema de coagulação sanguínea, possibilitando a identificação de desordens em componentes críticos, como a formação do coágulo, sua estabilidade e a

capacidade de dissolução no organismo. Esses testes, amplamente empregados em cenários clínicos e experimentais, fornecem uma visão abrangente dos mecanismos hemostáticos, abordando tanto os fatores de coagulação quanto os processos fibrinolíticos (FAVALORO *et al*, 2023). Podem ser úteis em distúrbios e patologias, como a DMD, em que distúrbios hemostáticos podem influenciar a progressão da doença. Essa avaliação permite uma análise detalhada das alterações no equilíbrio entre coagulação e fibrinólise, contribuindo para diagnósticos e monitoramentos precisos.

O tempo de protrombina (TP) é uma medida da integridade das vias extrínsecas e comum da cascata pró coagulante. O TP representa o tempo, em segundos, para o plasma do paciente coagular após a adição de cálcio e o ativador da via extrínseca (tromboplastina). Ademais, deficiências ou inibidores dos fatores de coagulação nas vias extrínseca e comum resultam na prolongação do tempo de protrombina e o monitoramento do anticoagulante varfarina é a indicação mais comum para o TP já que o mesmo é sensível aos fatores de coagulação afetados pela varfarina (HOFFBRAND e MOSS, 2016). Entretanto, o cálculo por segundos da formação de rede de fibrina formada na reação pode variar por laboratórios devido à diferença na coleta de amostras - como marca de tubo ou anticoagulante exposto, por exemplo -, trazendo um resultado imparcial para o paciente. A fim de um resultado confiável, introduziu-se o cálculo da Razão Normalizada Internacional (RNI) que é uma conversão matemática do tempo de protrombina que considera a sensibilidade da tromboplastina usada no laboratório pela fatoração do valor do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) informado pelo fabricante.

O D-dímero (DD) é um produto de degradação solúvel derivado da plasmina da fibrina reticulada (WEITZ, FREDENBURGH e EIKELBOOM, 2017). A geração de D-dímero requer a atividade sequencial de três enzimas: trombina, fator XIII ativado (fator XIIIa) e plasmina. O processo começa quando a trombina gerada pelo sistema de coagulação converte o fibrinogênio solúvel em monômeros de fibrina. Cada molécula de fibrinogênio é um dímero simétrico composto por 3 pares de 3 cadeias polipeptídicas entrelaçadas, denominadas α , β e γ , que se estendem lateralmente a partir de um núcleo central. As cadeias são mantidas juntas por ligações dissulfeto, de modo que as moléculas de fibrinogênio consistem em um domínio E central ligado por regiões de bobina enrolada a dois domínios D periféricos.

$$RNI = \left(\frac{\text{Tempo de Protrombina}}{\text{Tempo de Protrombina Pool "Normal"}} \right)^{ISI}, \text{ em que}$$

ISI \approx 1,0 a 1,3 (Siemens Healthineers, Munique, Alemanha)

Os distúrbios hemostáticos podem ter um papel importante na progressão da DMD, uma vez que o comprometimento muscular característico dessa doença é frequentemente acompanhado por alterações vasculares e inflamatórias (SAITO *et al*, 2005), que impactam diretamente a coagulação. No modelo *mdx*, amplamente utilizado para estudar os mecanismos da DMD, testes específicos de coagulação, como TP, TTPA e o DD, são essenciais para investigar a presença de anomalias na hemostasia e monitorar o equilíbrio entre coagulação e fibrinólise. Esses exames são particularmente relevantes para detectar desequilíbrios na via extrínseca, comum e na formação de trombos (GUERRERO e LÓPEZ, 2015), contribuindo para uma compreensão mais profunda dos mecanismos de progressão da doença e, potencialmente, para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que possam mitigar o impacto dos distúrbios hemostáticos em pacientes com DMD.

METODOLOGIA

Animais:

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas das linhagens C57BL/10ScCr/PasUnib e C57BL/10-Dmd^{mdx}/PasUnib, obtidos a partir do acasalamento de animais mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP. As matrizes são oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 30º dia de vida pós-natal. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em rack ventilada (AL21, Alesco, SP, Brasil) sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IBB/UNESP, Protocolo nº 1095, anexo 1). No anexo, atesta-se a vigência do protocolo com sua data limite em 2018, entretanto, confirma-se sua validação já que o material já havia sido coletado para outros projetos concomitantes e está sob cuidados do nosso laboratório para prosseguimento dos nossos experimentos.

Grupos experimentais:

Grupo controle: Composto por animais da linhagem C57BL/10ScCr/PasUnib de ambos os sexos, com idade de 30 dias (n=4) e 6 meses (n=4). Grupo utilizado para comparação por não passar pelos ciclos de degeneração e regeneração muscular.

Grupo *mdx*: Composto por animais da linhagem C57BL/10-Dmd^{*mdx*}/PasUnib de ambos os sexos, com idade de 30 dias (n=4) e 6 meses (n=4). Grupo utilizado para observar os ciclos de degeneração e regeneração muscular e outros efeitos da ausência da distrofina.

Coleta de sangue

Após eutanásia, foi feita a laparotomia, afastamento das vísceras abdominais e exposição da veia cava caudal. O sangue foi coletado via punção da veia cava caudal e armazenada em tubo para coleta à vacuo azul com anticoagulante citrato de sódio para a análise hemostática e seringa heparinizada para análise de creatina quinase (CK). Em seguida, o sangue foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 RPM para a separação das frações do sangue. O plasma após ser pipetado, foi armazenado em microtubos e conservado em Biofreezer a -70°C para análise posterior.

Testes de Coagulação:

TP, TTPA e DD foram determinados através do equipamento Sysmex CS-2500 (Siemens, Munique, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Para realizar as análises, uma série de cuvettes foi inserida no aparelho (Sysmex, Siemens, Tóquio, Japão). Todos os reagentes foram colocados e medidos de acordo com as instruções do fabricante. Assim que todos os reagentes e amostras foram adicionadas às cuvettes, a reação foi iniciada. A determinação do TP parou automaticamente diante da formação de coágulo.

Além da análise individual de cada amostra, um pool para maior assertividade no experimento também foi executado através do restante de plasma obtido após passagem das amostras no equipamento.

Análise estatística

O valor de RNI, ISI e resultados de TP, TTPA e DD foram obtidos através da programação já usual do equipamento Sysmex CS-2500 (Siemens, Munique, Alemanha) a partir de sua automatização rotineira e banco de dados do fabricante.

A análise estatística foi realizada através do test-t de Student ($p \leq 0,05$) para observação das médias e desvio padrão entre os grupos *mdx* e controle.

Análise histológica

As lâminas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto e 40 segundos, lavadas em água corrente por 5 minutos e imersas em solução de Ponceau por 1 minuto e 40

segundos. Foram passadas em ácido fosfomolibdico e posteriormente deixadas por 2 minutos imersas em solução de Verde Luz (Light Green). Por fim, as lâminas foram passadas 3 vezes em solução de ácido acético 1%. Para quantificação das áreas de inflamação e de fibras musculares com núcleo periférico e central, utilizamos a coloração por hematoxilina e eosina. As lâminas haviam sido imersas em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto e 40 segundos em temperatura ambiente, lavadas em água corrente por 10 min, imersas em solução de eosina por 40 segundos, com excesso de eosina retirado em água corrente. As lâminas então foram desidratadas em sequência de álcool e xilol e montadas com Entellan (Merck).

OBJETIVOS

Estudar as alterações hemostáticas através da identificação e comparação dos parâmetros de coagulação em camundongos das linhagens C57BL/10-Dmd*mdx*/pasUnib e C57BL/10ScCr/PasUnib.

Objetivos específicos:

- Avaliar parâmetros hemostáticos específicos, como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina ativada (TTPA) e níveis de D-dímero, em camundongos *mdx* e controle.
- Utilizar o modelo murino *mdx* para o estudo das alterações hemostáticas em DMD, considerando semelhanças e diferenças entre os sistemas hemostáticos de camundongos e humanos distróficos comparado a um controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ao verificar os parâmetros de TP e DD verificou-se uma piora no animal distrófico quando comparado a um controle (Tabela 1). Adicionalmente, foi observada uma piora em camundongas fêmeas na quantificação do D-dímero quando comparadas ao sexo masculino dos animais distróficos (Tabela 2).

Ademais, comparando os grupos controle e o distrófico, há um aumento significativo de CK nos *mdx* jovens (jovens $p=0,015$, Tabela 3). Isto corrobora com nossa histologia, uma vez que a presença exacerbada de CK no *mdx* sinaliza níveis altos de dano muscular que podem ser comprovados pela menor porcentagem de fibras com núcleos periféricos no músculo

diafragma, indicando maior degeneração muscular, e substituição das fibras por inflamação no músculo diafragma (DIA) (Figura 3b). O DIA do *mdx* é o músculo que mais se assemelha ao distrófico humano e o mais severamente afetado devido à sua constante carga de trabalho, sendo assim, é um instrumento interessante para a visualização do dano muscular que ocorre na distrofinopatia. Na DMD, com a ausência da distrofina, as fibras musculares ficam suscetíveis a lesões repetitivas, o que desencadeia processos inflamatórios crônicos (REID e ALEXANDER, 2021). Assim, a inflamação prolongada pode induzir alterações no sistema hemostático, resultando em disfunções na coagulação (STARK e MASSBERG, 2021), como as observadas nos parâmetros elevados de TP, TTPa e DD encontrados em nosso estudo. O aumento desses parâmetros nos animais distróficos indica uma predisposição a estados pró-coagulantes e pró-trombóticos, sugerindo que o organismo está em constante tentativa de reparo, levando a um maior consumo de fatores de coagulação. Além disso, o estresse oxidativo e a presença de citocinas pró-inflamatórias, comuns em tecidos distróficos (PAEPE e BLEECKER, 2013), podem afetar diretamente o endotélio e aumentar a liberação de fatores pró-coagulantes, intensificando ainda mais os desequilíbrios hemostáticos nesses animais e do paciente humano.

Grupo/linhagem	TP (segundos)	TP (RNI)	TTPA (segundos)	DD (ng/mL)
Controle	11,6 ± 0,31	1,02 ± 0,10	28,7 ± 1,36	400 ± 23,99
<i>mdx</i>	13,2 ^a ± 0,45	1,25 ^a ± 0,10	31,9 ± 2,82	650 ^a ± 11,65

Tabela 1: Análise dos parâmetros de coagulação tempo de protrombina em segundos (TP), valor do RNI (RNI) tempo de tromboplastina parcial ativada em segundos (TTPA) e D-dímero (DD). Média ± desvio padrão da quantidade encontrada no plasma das amostras por grupo. (a) Diferença significativa ($p \leq 0,05$) comparada ao grupo controle

Grupo <i>mdx</i> /sexo	TP (segundos)	TP (RNI)	TTPA (segundos)	DD (ng/mL)
Machos	13,2 ± 0,45	1,25 ± 0,10	31,9 ± 2,82	650 ± 11,65
Fêmeas	13,8 ± 0,50	1,30 ± 0,12	31,7 ± 3,00	700 ^b ± 15,00

Tabela 2: Análise dos parâmetros de coagulação tempo de protrombina em segundos (TP), valor do RNI (RNI) tempo de tromboplastina parcial ativada em segundos (TTPA) e D-dímero (DD). Média ± desvio padrão da quantidade encontrada no plasma das amostras por grupo. (b) Diferença significativa ($p \leq 0,05$) comparada ao grupo *mdx* de machos

Grupo/linhagem	CK (U/L)
Controle	28,96 ± 9,84
<i>mdx</i>	921,48 ^a ± 588,18

Tabela 3: Quantificação de CK (U/L) nos grupos controle e *mdx* jovens. Média ± desvio padrão. (a) Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo controle e *mdx*.

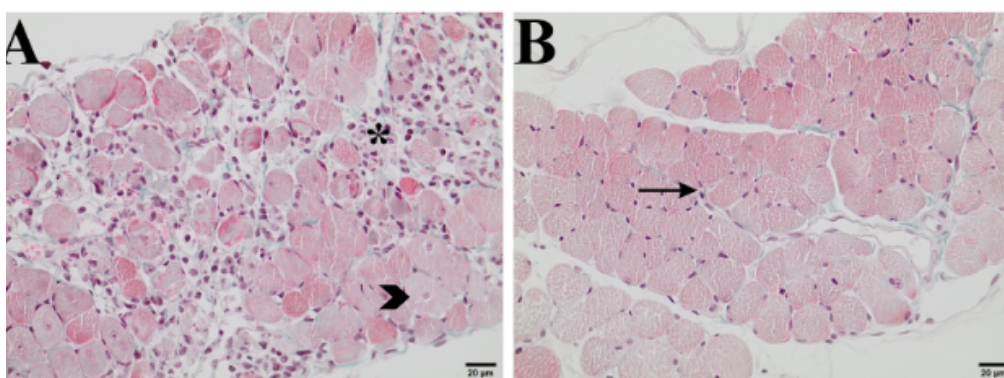


Figura 3: Histologia dos grupos jovens DIA *mdx* (A) e controle (B). Área de inflamação (*), fibras com núcleo central (cabeça de seta) e núcleo periférico (seta). Escala: 20 µm. Coloração de Tricrômio de Masson.

Ademais, a piora nos parâmetros de coagulação em camundongas fêmeas comparadas aos machos distróficos pode estar associada a fatores hormonais e ao papel dos estrogênios, que influenciam o sistema hemostático (BARCELLONA, GRANDONE E MARONGIU, 2024). Os hormônios femininos, especialmente os estrogênios, tendem a aumentar o risco de eventos trombóticos, favorecendo a ativação da cascata de coagulação. Os estrogênios favorecem a ativação da cascata de coagulação ao promoverem uma elevação na síntese hepática de diversos fatores de coagulação, como o fator VII, o fibrinogênio e o fator X. Além disso, eles diminuem a atividade da antitrombina e da proteína C, importantes reguladores anticoagulantes naturais, criando um desequilíbrio que favorece um estado pró-coagulante. Esse efeito é mais evidente durante períodos de aumento hormonal, como a gravidez e o uso de contraceptivos orais, quando os níveis de estrogênios são elevados (GIALERAKI *et al*, 2017). Sobretudo, o impacto dos estrogênios na hemostasia, especialmente em condições de risco como na DMD, pode acentuar o desequilíbrio hemostático, aumentando a predisposição a complicações trombóticas. Contudo, essa predisposição pode ser acentuada pela combinação do estado inflamatório crônico e pela disfunção endotelial associada à DMD, intensificando os níveis dos marcadores de coagulação. Outra possível explicação para essa diferença de sexo pode estar na resposta imunológica. As fêmeas tendem a apresentar uma

resposta inflamatória mais intensa em condições de estresse crônico, resultando em maior desregulação dos mecanismos hemostáticos e agravando ainda mais os parâmetros de TP, TTPa e DD (MARTINS *et al*, 2023; GONTIJO *et al*, 2023).

CONCLUSÃO

O estudo investigou o impacto dos distúrbios hemostáticos em camundongos *mdx*, modelo animal para a Distrofia Muscular de Duchenne, comparando-os a um grupo controle. Observamos que os parâmetros hemostáticos de Tempo de protrombina e D-dímero foram significativamente mais comprometidos no animal distrófico, reforçando a existência de uma disfunção na coagulação em indivíduos com DMD. Além disso, ao analisar os dados segregados por sexo, evidenciamos uma piora mais acentuada nos parâmetro hemostático do D-dímero das fêmeas *mdx* em comparação com os machos, o que sugere a influência de fatores hormonais sobre a progressão desses distúrbios.

Estudos futuros são necessários para visualizar a concentração na progressão dos distúrbios hemostáticos ao longo da vida, incluindo camundongos *mdx* de diferentes faixas etárias, para compreender melhor se a idade pode contribuir para o agravamento dos problemas hemostáticos. Ademais, é essencial expandir o número de amostras e realizar investigações mais detalhadas focadas em fêmeas *mdx*, padronizando idades e condições experimentais para explorar com maior precisão a influência hormonal. Essa continuidade no estudo é fundamental para delinear estratégias terapêuticas que possam atuar na preservação da função hemostática e na melhora da qualidade de vida de pacientes com DMD, que não é amplamente discutida dentro da distrofinopatia.

AGRADECIMENTOS:

Antes de mais nada, quero dedicar um agradecimento especial à minha família, a quem me trouxe até aqui e me criou para que pudesse seguir meus sonhos, que sempre foi meu alicerce e meu maior apoio. Aos meus pais, Regina e Maurício, cujos sacrifícios, dedicação e amor incondicional me deram a força para enfrentar cada desafio e que a cada ligação e abraço apertado após meses de distância, pude lembrar o que é se sentir em casa e ter seu porto seguro quando tudo parece querer desabar. À minha irmã Letícia por deixar a vida mais leve e cheia de alegria, por cada encontro, embora muitas vezes pontuais, são sempre momentos de profundo significado e intimidade. Às minhas vózinhas, duas figuras essenciais na minha vida. Minha querida avó Yolanda, cuja memória e amor continuam vivos em meu coração e sei que me acompanha aonde quer que esteja. Embora não esteja fisicamente presente para ver minha formatura, sinto sua presença em cada conquista e em cada momento importante. E à minha avó Terezinha, cuja sabedoria e ternura sempre foram uma fonte de consolo e inspiração. Aprendi que, mesmo com a distância, nossa conexão se fortaleceu e nos aproximou ainda mais. E à minha tia Márcia, que, com seu carinho, zelo e conselhos, me ajudou a trilhar meu caminho com confiança. Vocês, minha família, são a base sólida sobre a qual construí cada conquista.

Ao Laboratório de Biologia Muscular, onde tive meu primeiro contato com a ciência e encontrei nele uma nova paixão que é a pesquisa. Aprendi a importância da curiosidade e da dedicação no avanço do conhecimento. A cada desafio, tive a oportunidade de crescer e me interessar ainda mais pela ciência. À Profa Cintia, por sua orientação e apoio durante minha iniciação científica, que foram fundamentais para meu desenvolvimento como futura pesquisadora. Ao núcleo de Hematologia, meu obrigada pelo acolhimento e vivência durante meu estágio. Pude aprender responsabilidade, cuidado com o paciente e colaboração dentro de uma equipe. Cada dia foi uma oportunidade de aprendizado, que levarei comigo para sempre. Agradeço à Cris, que me incentivou a tentar o estágio e hoje finalizei este ciclo com a escrita do TCC, ao Phillippe e Fer - que deixavam os dias mais alegres em meio à loucura da rotina -. Ju, Raquel e Ana - por toda a paciência e conhecimento - e Dona Maria e Lázara, mulheres fortes que em toda conversa pude me inspirar e crescer cada vez mais na trajetória do estágio.

Por fim, quero expressar minha gratidão à família que encontrei em Botucatu e que trouxe da minha cidade natal, Santo André: meus amigos, que se tornaram tão próximos quanto qualquer laço sanguíneo. Aprendi que família não é apenas quem nasce com a gente, mas também quem escolhemos para caminhar ao nosso lado. Cada um de vocês, com seu apoio e

amizade, tornou essa jornada mais fácil e significativa. Algumas pessoas entram e saem das nossas vidas, e embora nem todos os que conheci ainda estejam comigo, sou imensamente grata por cada aprendizado que cada um trouxe. Cada amizade, cada momento compartilhado, deixou uma marca profunda e me ajudou a crescer. À República Amazona, meu primeiro lar longe de casa e minha primeira memória positiva da cidade, onde aprendi o que é acolher e o que é ser acolhida. À Nissin, com quem aprendi o conforto em voltar para casa e não ter a sensação de estar sozinha, sentir-se em casa por saber que há alguém esperando por você e te quer bem. À Rafa, Ju, Lorena e Ed que me ajudaram a descobrir a leveza mesmo nos momentos mais tristes. Com você, aprendi a preciosidade da vida e o valor de um sorriso em todas as vezes que te vi triste e você levantou a cabeça. Às amigas e amigo que trouxe de Santo André: Amanda, Anna Pietra, Hellen, Raíssa e Guilherme. Obrigada por cada ligação, cada encontro após tantos meses de distância e cada sensação de conforto em saber que por mais que a vida avance e mude, cada momento continua especial ao lado de quem importa. A vocês, meu mais sincero obrigada. Vocês têm um lugar especial no meu coração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**, 8ª ed., Elsevier/Medicina Nacionais, Rio de Janeiro, 2010.

ANGULSKI, Addeli et al. Duchenne muscular dystrophy: disease mechanism and therapeutic strategies, **Frontiers of Physiology**, 2023. PMC.

BARCELONA, D.; GRANDONE, E.; MARONGIU, F. Hormones and thrombosis: the dark side of the moon: Hormonal therapy and thrombosis. **Blood Transfusion**, 27 abr. 2023.

BONAR, R. A.; LIPPI, G.; FAVALORO, E. J. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. **Methods in Molecular Biology**, p. 3–27, 2017.

CARCAO M, Moorehead P, LILLICRAP D. Hemophilia A and B, in Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J, Salama ME, Abutalib SY. **Hematology: basic principles and practice** (7th edition). 2018. Elsevier, Philadelphia, PA, pgs 2023–2033

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v. 29, n. 1, p. 17–24, jan. 2015.

CHAUDHRY, B. M.; DASGUPTA, D.; CHAWLA, N. Formative Evaluation of a Tablet Application to Support Goal-Oriented Care in Community-Dwelling Older Adults. **Proceedings of the ACM on Human-Computer Interaction**, v. 6, n. MHCI, p. 1–21, 19 set. 2022.

DAL MOLIN. **Principais temas em Hematologia**. 1ª edição. Medcel, São Paulo, 2018

DE PAEPE, B.; DE BLEECKER, J. L. Cytokines and Chemokines as Regulators of Skeletal Muscle Inflammation: Presenting the Case of Duchenne Muscular Dystrophy. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

FAVALORO, E. J. et al. Hemostasis and Thrombosis: An Overview Focusing on Associated Laboratory Testing to Diagnose and Help Manage Related Disorders. **Methods in molecular biology**, p. 3–38, 1 jan. 2023.

- FORTUNATO, F.; FERLINI, A. Biomarkers in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status and Future Directions. **Journal of Neuromuscular Diseases**. v. 10. p. 987-1002, 2023.
- FOX, H. et al. Duchenne muscular dystrophy. **BMJ**, p. 17012, 23 jan. 2020.
- GIALERAKI, A. et al. Oral Contraceptives and HRT Risk of Thrombosis. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 24, n. 2, p. 217–225, 4 jan. 2017.
- GONTIJO, C *et al.* Estresse e imunidade: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 13, p. e22121344094-e22121344094, 26 nov. 2023.
- GROVER, S. P.; MACKMAN, N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 3, p. 331–338, mar. 2019.
- GUERRERO, B.; LÓPEZ, M. Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. **Investigación Clínica**, v. 56, n. 4, p. 432–454, 1 dez. 2015.
- HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. **Hoffbrand's Essential Haematology**. 7. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2016.
- KATIRJI, Bashar, AL-JABERI, Mohammed. Creatine Kinase Revisited. **Journal of Clinical Neuromuscular Disorders** . v.2, p.158-163, 2001
- MACKMAN, N.; TILLEY, R. E.; KEY, N. S. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 8, p. 1687–1693, ago. 2007.
- MANNING, Jennifer; O'MALLEY, Dervla, What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease?, **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 36, n. 2, p. 155–167, 2015. Springer Nature.
<https://doi.org/10.1007/s10974-015-9406-4>
- MARTINS, M. D *et al.* Estresse: O inimigo da imunidade. **Revista FT**. v, 27, 2023. doi: 10.5281/zenodo.795160310.5281/zenodo.7982959
- MOHAMMED, B. M.; MONROE, D. M.; GAILANI, D. Mouse models of hemostasis. **Platelets**, p. 1–6, 28 jan. 2020.

NITAHARA-KASAHARA, Y.; TAKEDA, S.; OKADA, T. Inflammatory predisposition predicts disease phenotypes in muscular dystrophy. **Inflammation and Regeneration**, v. 36, n. 1, 5 set. 2016.

REID, A. L.; ALEXANDER, M. S. The Interplay of Mitophagy and Inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy. **Life**, v. 11, n. 7, p. 648, 4 jul. 2021.

SAITO, T. et al. Coagulation system activated in Duchenne muscular dystrophy patients with cardiac dysfunction. **Brain and Development**, v. 27, n. 6, p. 415–418, set. 2005.

SCHORLING, D. et al. Coagulation disorders in Duchenne muscular dystrophy? Results of a registry-based online survey. **Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology**, v. 39, n. 1, p. 2–12, 1 mar. 2020.

STARK, K.; MASSBERG, S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 9, 6 maio 2021.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T.. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathologica**, [s.l.], v. 69, n. 1-2, p.91-95, 1986. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00687043>.

WASHINGTON, I. M.; VAN HOOSIER, G. Clinical Biochemistry and Hematology. **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**, p. 57–116, 2012.

WEITZ, J. I.; FREDENBURGH, J. C.; EIKELBOOM, J. W. A Test in Context: D-Dimer. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 19, p. 2411–2420, 7 nov. 2017.

ZAIDI, A.; GREEN, L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 23, n. 2, jan. 2022.

ZAGO, Marco Antonio e FALCÃO, Roberto Passetto e PASQUINI, Ricardo. **Hematologia: fundamentos e prática**. . São Paulo: Ed. Atheneu. , 2004

ZAYNITDINOVA, Milyausha et al, Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy, **Transgenic Research**, v. 30, n. 6, p. 709–725, 2021. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00278-3>

Anexo 1: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - IBB/Unesp)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu




Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "MECANISMOS DE PROTEÇÃO E PROGRESSÃO DA DISTROFIA MUSCULAR: ESTUDO METABOLÔMICO EM CAMUNDONGOS MDX", Protocolo nº 1095-CEUA, sob a responsabilidade de **Cintia Yuri Matsumura**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 1/7/2018	Término: 30/4/2021
Espécie/linhagem:	<i>Camundongo C57BL/10ScCr/PasUnib e C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib</i>	
Nº de animais:	90	
Peso:	10-30g	Idade: 30-180 dias
Sexo:	<i>Macho e fêmea</i>	
Origem	<i>Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas - Unicamp – Campinas/SP</i>	

Botucatu, 15 de junho de 2018.


Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Coordenador da CEUA



Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0951 fax 14 3815 3744 e-mail: secda@ibb.unesp.br