

AUDREI DOS REIS SANTOS

**Efeito do treinamento excêntrico sobre o músculo esquelético de camundongo  
modelo da síndrome de Marfan**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo  
2024**

AUDREI DOS REIS SANTOS

**Efeito do treinamento excêntrico sobre o músculo esquelético de camundongo  
modelo da síndrome de Marfan**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Saldanha Aoki

**Versão Corrigida**

**São Paulo  
2024**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Reis Santos, Audrei

Efeito do treinamento excêntrico sobre o músculo esquelético de camundongo modelo da síndrome de Marfan / Audrei dos Reis Santos; orientadora Elen Haruka Miyabara; coorientador Marcelo Saldanha Aoki. -- São Paulo, 2024.

77 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Síndrome de Marfan. 2. Corrida em Declive. 3. Matriz Extracelular. 4. Proteínas de Ligação ao Cálcio.. I. Haruka Miyabara, Elen, orientadora. II. Saldanha Aoki, Marcelo, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do exercício excêntrico sobre músculo esquelético de camundongos com síndrome de Marfan", protocolada sob o CEUA nº 4887250119 (ID 000694), sob a responsabilidade de **Elen Haruka Miyabara e equipe; Tatiana Emy Koike; Meiricris Tomaz da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 19/02/2019.

We certify that the proposal "Effect of eccentric exercise on skeletal muscle of mice with Marfan syndrome", utilizing 20 Genetically modified mice (GMO) (20 males), 20 Isogenics mice (20 males), protocol number CEUA 4887250119 (ID 000694), under the responsibility of **Elen Haruka Miyabara and team; Tatiana Emy Koike; Meiricris Tomaz da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/19/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

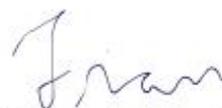
Vigência da Proposta: de 02/2019 a 02/2023 (48 meses) Área: Anatomia

Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Peso ou idade: 3 a 5 meses N: 20
Linhagem:	C57BL/6 Marfan			
Origem:	Biotério Central FMUSP			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Peso ou idade: 3 a 5 meses N: 20
Linhagem:	C57BL/6			

São Paulo, 15 de março de 2024



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



**CERTIFICADO : EMENDA** v08/01/2020

Certificamos que a EMENDA (versão de 08/01/2020) da proposta intitulada "Efeito do exercício excêntrico sobre músculo esquelético de camundongos com síndrome de Marfan", CEUA nº 4887250119 (ID 025475), sob a responsabilidade de **Elen Haruka Miyabara** e equipe; *Audrei dos Reis Santos* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) em 29/01/2020.

Pedido apresentado à CEUA: Venho por meio desta, solicitar a inclusão do membro estagiário *Audrei dos Reis Santos* na equipe de execução deste projeto. Atenciosamente, Elen Miyabara.

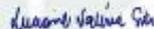
Comentário da CEUA: A CEUA autoriza a inclusão de *Audrei dos Reis Santos* no projeto CEUA Nº 4887250119.

Término previsto: **02/2023** : (48 meses).

**ANIMAIS UTILIZADOS**

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongo geneticamente modificado (OGM)	Machos	20	0
Camundongos isogênicos	Machos	20	0

São Paulo, 15 de março de 2024



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)





**CERTIFICADO : EMENDA** v14/09/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 14/09/2023) da proposta intitulada "Regeneração muscular esquelética: desvendando mecanismos em jovens, idosos e na síndrome de Marfan", CEUA nº 7549191022 (ID 090814), sob a responsabilidade de **Elen Haruka Miyabara** e equipe; *Alana Moreira de Santana; Alice Baldim Tristão; Andrei dos Reis Santos; Isabella Teobaldo Ramos; Marcelo Henrique Pera; Natália Prado Silva; Profa Dra Elen Haruka Miyabara; Rodrigo Alves Dell Aquila; Talita da Costa Marçal; Thiago Cruz Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) em 27/10/2023.

Pedido apresentado à CEUA: À CEUA, Venho por meio desta, solicitar a inclusão da aluna de iniciação científica Natália Prado Silva na equipe deste projeto. Segue a documentação em anexo. Atenciosamente, Elen Miyabara

Término previsto: **02/2027** : (48 meses).

Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 2 a 5 meses	N: +0
Linhagem:	C57Bl6/Marfan		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 20 a 24 meses	N: +0
Linhagem:	C57Bl6/Marfan		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 20 a 24 meses	N: +0
Linhagem:	CB6F1/transgênico HSP70i		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 2 a 5 meses	N: +0
Linhagem:	CB6F1/transgênico HSP70i		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 2 a 5 meses	N: +0
Linhagem:	Friend Virus B (FVB)		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 2 a 5 meses	N: +0
Linhagem:	FVB/knockout adrenoceptor beta 2		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM) sexo: Machos	Peso ou idade: 20 a 24 meses	N: +0
Linhagem:	FVB/knockout adrenoceptor beta 2		



Origem:	Biotério Central FMUSP	sexo:	Fêmeas	Peso ou idade:	1 a 3 meses	N:	0
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	Balb-c						
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia	sexo:	Machos	Peso ou idade:	20 a 24 meses	N:	0
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	C57Bl6						
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia	sexo:	Machos	Peso ou idade:	2 a 5 meses	N:	0
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	C57Bl6						
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia	sexo:	Machos	Peso ou idade:	20 a 24 meses	N:	0
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	CB6F1						
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia	sexo:	Machos	Peso ou idade:	2 a 5 meses	N:	0
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	CB6F1						
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia	sexo:	Machos	Peso ou idade:	20 a 24 meses	N:	0
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	Friend Virus B (FVB)						

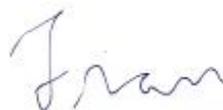
#### ANIMAIS UTILIZADOS

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongo geneticamente modificado (OGM)	Machos	420	0
Camundongos isogênicos	Machos	300	0
Camundongos isogênicos	Fêmeas	32	0

São Paulo, 15 de março de 2024



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



## **Dedico esta tese**

Aos meus pais, José dos Reis Santos e Sirlei dos Santos, por serem pais maravilhosos e cuidar tão bem dos filhos, mesmo diante de inúmeras adversidades. À vocês eu dedico todo o meu trabalho e esforço, pois, sei que diante das opções profissionais e pessoais escolheram os filhos em detrimento de si.

A minha esposa, Luciana Alvarenga da Silva, quem me acompanha desde a graduação - quando nos conhecemos. Desde então, esteve sempre ao meu lado não recuando um só dia, mesmo quando a dificuldade bateu à porta. Este trabalho eu dedico a você pelo apoio e confiança.

A minha irmã, e todos os meus familiares

À vocês, com imenso carinho e admiração.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a DEUS por todas as bênçãos que me concede e por permitir que a cada dia eu tenha força e sabedoria para superar as adversidades. À DEUS, em tudo dou graça.

A minha orientadora, Elen Haruka Miyabara, por ter me aceito como aluno de doutorado – em um momento em que todas as portas haviam se fechado para mim. À você Elen, gratidão pelas oportunidades e ensinamentos, os quais sempre me lembrarei com carinho.

Ao meu co-orientador, Marcelo Saldanha Aoki, quem acreditou em mim desde a graduação. À você meu amigo, gratidão pelas orientações e direcionamento profissional e pessoal.

Ao especialista em laboratório do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), meu amigo e professor Adilson da Silva Alves. Obrigado pela companhia durante os momentos de alegria e dificuldades inerentes ao processo de doutoramento.

Aos meus amigos de pós-graduação, Thiago C. Silva, Alana M. Santana, Tatiana E. Koike, Gabriel U. Sato, Tabata L. Nascimento, Rodrigo A. Dell Aquila e a todos os que já passaram e aos que ainda frequentam o laboratório de plasticidade do músculo esquelético. Sem a ajuda de vocês este trabalho não seria concluído.

A todos os alunos, professores e funcionários do departamento de anatomia. Equipe que mantém a qualidade institucional e acadêmica do ICB3-USP.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.506341/2020-00.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP, processo nº 2018/24946-4 e 2020/15351-7).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

SANTOS, A.R. **Efeito do treinamento excêntrico sobre o músculo esquelético de camundongo modelo da síndrome de marfan.** 2024. 77 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A síndrome de Marfan é uma doença do tecido conjuntivo associada à fibrose muscular e diminuição da massa muscular. O treinamento excêntrico atenua a perda de massa muscular e melhora a função muscular. Este estudo avaliou o efeito do treinamento excêntrico no músculo esquelético de camundongo modelo da síndrome de Marfan. Camundongos com síndrome de Marfan e selvagens foram distribuídos aleatoriamente nos grupos treinado e controle; o primeiro realizou corrida em descida em esteira (declive de 16°) por 30 min, 5 vezes por semana durante 8 semanas, com velocidade constante de 14 m/min. Foram realizadas análises de Western blotting, RNAseq, RT-qPCR, histoquímica e imunohistoquímica. Não houve diferença no peso corporal entre os grupos. O peso úmido dos músculos gastrocnêmio e plantar normalizado para o peso corporal foi menor em camundongos com síndrome de Marfan do que em camundongos selvagem. A porcentagem de fibras musculares com maior área de secção transversal foi menor no músculo gastrocnêmio e plantar de camundongos SMF do que em selvagens. A síndrome de Marfan induziu aumento da fibrose e do número de fibras musculares arredondadas e diminuiu a expressão da fibronectina, enquanto o treinamento excêntrico reduziu esses efeitos. Além disso, a síndrome de Marfan causou aumento do número de macrófagos CD11b+ e neutrófilos Ly6G+ imunomarcados e dos níveis de RNAm das proteínas de ligação ao cálcio S100A8 e S100A9 e das citocinas pro-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e anti-inflamatória IL-10 nos músculos gastrocnêmio e plantar, enquanto o treinamento excêntrico reverteu esses efeitos. Estes resultados sugerem que o treinamento excêntrico melhora a morfologia das fibras musculares e atenua a fibrose muscular e a inflamação em camundongos com síndrome de Marfan, por meio da restauração da expressão de fibronectina e diminuição da expressão de S100A8/A9.

**Palavras-chave:** Síndrome de Marfan. Corrida em declive. Matriz extracelular. Proteínas de ligação ao cálcio.

## ABSTRACT

SANTOS, A.R. **Effect of eccentric training on the skeletal muscle of a marfan syndrome mouse model.** 2024. 77 f. Thesis (Ph. D. In Biology of Systems) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2024.

Marfan syndrome is a connective tissue disorder associated with muscle fibrosis and decreased muscle mass. Eccentric training attenuates muscle wasting and improves muscle function. This study evaluated the effect of eccentric training on the skeletal muscle of a Marfan Syndrome mouse model. Marfan and wild-type mice were randomly distributed into a trained and a control group; the former performed downhill running on a treadmill (inclination of 16°) for 30 min, five times a week for 8 weeks, at a constant velocity of 14 m/min. Western blotting, RNAseq, RT-qPCR, histochemistry, and immunohistochemistry analyses were performed. There were no significant differences in body weight across groups. The gastrocnemius and plantaris muscle wet weight normalized to body weight was lower in Marfan mice than in wild type mice. The percentage of myofibers with a higher cross-sectional area was lower in the gastrocnemius and plantaris muscle of Marfan mice than in wild type mice. Marfan syndrome increased fibrosis and the number of rounded myofibers and decreased fibronectin protein expression, whereas eccentric training reduced these effects. In addition, Marfan increased the number of immunostained CD11b<sup>+</sup> macrophages and Ly6G<sup>+</sup> neutrophils and the mRNA levels of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9, pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in gastrocnemius and plantaris muscles, while eccentric training reversed these effects. These results suggest that eccentric training improves myofiber morphology and attenuates muscle fibrosis and inflammation in Marfan mice, by restoring the expression of fibronectin and decreasing the expression of S100A8/A9.

**Keywords:** Marfan Syndrome. Downhill Running. Extracellular Matrix. Calcium-binding Proteins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genotipagem.....	32
Figura 2 - Protocolo de corrida em declive .....	33
Figura 3 - Expressão proteica de P70S6K e 4EBP1 .....	41
Figura 4 - Fibrose muscular esquelética.....	43
Figura 5 - Fibras musculares arredondadas (sem formato poligonal).....	45
Figura 6 - Expressão proteica de Fibronectina .....	46
Figura 7 - Imunomarcção representativa de Ly6G+.....	47
Figura 8 - Imunomarcção representativa de CD11b+.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers para reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	37
Tabela 2 - Análise do transcriptoma. Alterações na expressão gênica nos músculos GP de camundongos WT e com SMF dos grupos treinado e controle.....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso corporal e Peso úmido muscular.....	39
Gráfico 2 - Percentual de área das fibras musculares.....	40
Gráfico 3 - Expressão gênica de MyoD.....	42
Gráfico 4 - Porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular. ....	43
Gráfico 5 - Expressão gênica de WISP-1 e IL-33 .....	44
Gráfico 6 - Número de fibras musculares arredondadas (sem o formato poligonal) .....	45
Gráfico 7 - Número de células Ly6G+ por mm <sup>2</sup> .....	48
Gráfico 8 - Número de células CD11b+ por mm <sup>2</sup> .....	49
Gráfico 9 - Expressão gênica de S100A8 e S100A9.....	50
Gráfico 10 - Expressão gênica de TNF- $\alpha$ e IL-6 .....	51
Gráfico 11 - Expressão gênica de IL-10.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1</i>
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
AC	<i>Ação muscular concêntrica</i>
AE	<i>Ação muscular excêntrica</i>
AI	<i>Ação muscular isométrica</i>
ALK/1	<i>Activin like kinase-1</i>
ALK/5	<i>Activin like kinase-5</i>
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
AST	Área de Secção Transversal
BMP-2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
cDNA	Fita de DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Co-Smad-4	<i>Common partner Smads 4</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP mix	Solução contendo os quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eIF4G	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4G</i>
FAPs	<i>Fibroblast adipogenic progenitors</i>
Fbn1	Fibrilina em animais
FBN1	Fibrilina em humanos
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GP	Gastrocnêmio e plantar

H&E	Hematoxilina e eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-33	Interleucina 33
KCl	Cloreto de Potássio
M	Média
MCP1	<i>Plasma monocyte chemoattractant protein</i>
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
mTORC1	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MyoD	Fator de transcrição
Oligo-dT	<i>Oligo deoxythymidides</i>
P70S6K	<i>70 kDa ribosomal protein S6 kinase</i>
PB	<i>Phosphate buffer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldeído
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RGB	Filtros <i>red, green and blue</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAseq	<i>Ribonucleic acid sequencing</i>
Rpm	Rotações por minuto
R-Smads	<i>Receptor-regulated Smads</i>
RT	Reverse transcription
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Smad-2	<i>Receptor-regulated Smads isoform 2</i>
Smad-3	<i>Receptor-regulated Smads isoform 2</i>
SMF	Síndrome de Marfan
SP1	<i>Specificity protein 1</i>

sRAGE	<i>Soluble receptor for advanced glycation end products</i>
STE	<i>Sodium Chloride-Tris-EDTA</i>
TC	Treino concêntrico
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween-20</i>
TI	Treino isométrico
TE	Treino excêntrico
TβRI	<i>Type I receptor for TGF-β</i>
TβRII	<i>Type II receptor for TGF-β</i>
TFIID	<i>Transcription factor IID</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tris-HCL	<i>Tris hidroxichloride</i>
USP	Universidade de São Paulo
WT	Wild type
WISP1	<i>Inducible signaling pathway protein 1</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

28s	subunidade ribossomal 28
18s	subunidade ribossomal 18
C1039G	Modelo mais comum de mutações em humanos em que uma cisteína é substituída por uma glicina no resíduo 1039 no EGF da FBN1. Esta mutação induz a síndrome de Marfan
°C	Grau Celsius
CD4	Marcador de células T auxiliares
CD8	Marcador de células T citotóxicas
CD11b	Marcador de macrófago
CD68	Marcador de macrófago
ΔCt	<i>Delta Cycle threshold</i>
ΔΔCt	<i>Delta Delta Cycle threshold</i>
H	Hora

Ly6G	Marcador de neutrófilo
MFS-mg $\Delta$	Modelo de mutação no gene que codifica a Fibrilina 1. Esta mutação induz a síndrome de Marfan
MFS-mg $\Delta^{loxPneo}$	Modelo de mutação no gene que codifica a Fibrilina 1. Esta mutação induz a síndrome de Marfan
mM	Milimolar
min	Minuto
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
m/min	Metros por minuto
MgCl <sup>2+</sup>	Cloreto de Magnésio
mg/kg	Miligramas por kilograma
mg/ml	Miligramas por mililitros
n	Amostra total
nm	Nanômetro
neoR	Cassete resistente a neomicina
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1 Síndrome de Marfan	20
1.2 Treinamento excêntrico	25
1.3 Benefícios do treinamento excêntrico	26
<b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
3.2.1 Objetivo específico 1	29
3.2.2 Objetivo específico 2	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Animais	30
4.2 Grupos experimentais	30
4.3 Animais modelo de SMF	30
4.4 Genotipagem	31
4.5 Protocolo de treinamento excêntrico	33
4.6 Eutanásia e coleta de amostras musculoesqueléticas	33
4.7 Histologia – análises morfológicas e morfométricas	34
4.8 Análise do transcriptoma	34
4.9 Expressão gênica	35
4.9.1 Isolamento do RNA	35
4.9.2 RT-PCR ( <i>Reverse transcripton – Polymerase Chain Reaction</i> )	35
4.9.3 Detecção da expressão gênica em tempo real	36
4.10 Imunohistoquímica	37
4.11 Western Blot	38
4.12 Análise estatística	39
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
5.1 O TE não afeta o peso corporal, a massa muscular e o tamanho das fibras musculares	39
5.2 O TE diminui a porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular e melhora a morfologia muscular na SMF	42
5.3 O TE reduz a expressão de marcadores de inflamação nos músculos SMF	46
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Síndrome de Marfan

A síndrome de Marfan (SMF) é uma doença congênita autossômica dominante, caracterizada por distúrbios do tecido conjuntivo (CAÑADAS et al., 2010; PYERITZ, 2017). Descrita há pouco mais de cem anos pelo pediatra francês Antonine-Bernard Marfan, essa síndrome induz alterações principalmente no aparelho locomotor, sistemas respiratório, ocular e cardiovascular (PYERITZ; MCKUSICK, 1979; KAINULAINEN et al., 1990; PYERITZ, 2000; JUDGE; DIETZ, 2005; COHN et al., 2007; HANELINE; LEWKOVICH, 2007; YUAN; JING, 2010; HAINE et al., 2015). Dessa forma, as principais manifestações clínicas de pacientes com SMF incluem dolicoestenomelia, frouxidão ligamentar, reduzida massa e força muscular, deformidades torácicas, enfisema pulmonar, dolicocefalia, palato alto e arqueado, retrognatismo maxilar e mandibular, hipoplasia malar, miopia, deslocamento da retina, enoftalmia, degeneração das valvas mitral e/ou aórtica, cardiomiopatia dilatada e formação de aneurisma com dissecação ou ruptura da aorta (BROWN et al., 1975; MORSE et al., 1990; TSIPOURAS; SILVERMAN 1999; DE COSTER et al., 2004; FAIVRE et al., 2007; YUAN; JING, 2010; BITTERMAN; SPONSELLER, 2017; BOLLERO et al., 2017).

Embora as alterações cardiovasculares sejam as principais causas de morte de pacientes com SMF (BROWN et al., 1975; MORSE et al., 1990; FAIVRE et al., 2007; JONES; IKONOMIDIS, 2010; FRANKEN et al., 2012; CHIU et al., 2014; VANEM et al., 2018), as alterações musculoesqueléticas contribuem de forma significativa para o aumento da morbidade e consequente pior qualidade de vida (SAYER et al., 2006; BOWEN et al., 2015; TROMBETTI et al., 2016).

O músculo esquelético é o órgão mais abundante do corpo humano, representando cerca de 40% do peso corporal e 50-75% das proteínas corporais (FRONTERA; OCHALA, 2015). Como parte do sistema locomotor, o músculo esquelético proporciona a sustentação e movimentação coordenada do corpo, bem como a manutenção da postura. Além disso, o músculo esquelético é a principal fonte de substratos (aminoácidos) para células do sistema imunológico (RASMUSSEN; PHILLIPS, 2003; GIANNI, 2013; NELKE et al., 2019; ROGERI et al., 2020), e também tem importante papel na respiração, na termogênese, no metabolismo e na produção de hormônios (PRATESI; TARANTINI; DI BARI, 2013; LEGÅRD; PEDERSEN, 2019; MA et al., 2021). O tecido muscular

esquelético é formado por células alongadas, poligonais e multinucleadas chamadas de fibras musculares, cujos núcleos localizam-se na periferia celular (BASSEL-DUBY, OLSON, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LIEBER, 2002; TEN BROEK et al., 2010). Além das fibras musculares, o músculo esquelético também possui tecido conjuntivo, o qual mantém unidas as fibras musculares, bem como possibilita transmissão mais homogênea da força gerada pelos músculos aos tendões e, conseqüentemente, aos ossos. Ademais, o tecido conjuntivo serve de trajeto para nervos e vasos sanguíneos se relacionarem com cada fibra muscular (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; OSTROVIDOV et al., 2014).

Desde as primeiras descrições das características da SMF, Marfan (1896) reportou pobre desenvolvimento da musculatura esquelética e em seguida outros trabalhos relataram diminuição de massa muscular em indivíduos portadores da SMF (FUTCHER, 1938; COHN; DIETZ, 2012; HAINE et al., 2015). As principais manifestações na musculatura esquelética de pacientes com SMF compreendem diminuição da massa e força muscular esquelética, hipotonia e hipoplasia muscular (MCKUSICK, 1966; MARUYAMA et al., 1987; PYERITZ et al., 2000; BEHAN et al., 2003; PERCHERON et al. 2007; HASAN; POLONIECKI; CHILD, 2007; COHN; DIETZ, 2012; HAINE et al., 2015). Além dessas manifestações, a maioria dos indivíduos portadores dessa síndrome mostra dificuldade ou são incapazes de aumentar a massa muscular em resposta a estímulos hipertróficos (COHN; DIETZ, 2012) e alguns indivíduos com SMF podem demonstrar fraqueza muscular, mialgia e câibras (BARRISON et al., 1979; PYERITZ; MCKUSICK, 1979; HONDA et al., 1991; KUMAR; GUPTA; SAGAR, 1994; PYERITZ et al., 2000; PERCHERON et al., 2007; COHN et al., 2007). Ademais, análises histológicas de músculo esquelético de pacientes e de camundongos modelo da SMF demonstraram a presença de fibrose muscular, adipócitos, fragmentação de fibras musculares e diminuído número e tamanho de fibras musculares (COHN et al., 2007; BURKS; COHN, 2011).

A incidência estimada da SMF está entre um em cada 3.000 e um em cada 5.000 indivíduos (PITCHER et al., 2015; BENKE et al., 2017; STENGL et al., 2020). No caso da expectativa de vida, esta vem se aproximando a da população em geral devido, em parte, aos benefícios proporcionados pela cirurgia cardiovascular e à intervenção farmacológica com betabloqueadores (ROBINSON; GODFREY, 2000; HA et al., 2007; PYERITZ, 2016). Para o diagnóstico da SMF, são utilizados critérios revisados conhecidos como nosologia de Ghent,

cuja avaliação considera o histórico familiar e manifestações clínicas de vários sistemas orgânicos (DE PAEPE, et al, 1996). Os principais sinais indicativos para o diagnóstico da SMF incluem: *ectopia lentis* (luxação do cristalino), *pectus excavatum* (depressão do esterno e costelas), escoliose de mais de 20°, dilatação e dissecação da aorta ascendente e ectasia dural lombossacral (PYERITZ, 2000).

A patogênese da SMF ainda não foi totalmente elucidada, sendo que mutações no gene *Fbn1* têm sido indicadas como um efeito negativo dominante (ERENTUĞ et al., 2005). Tal gene está localizado no braço longo do cromossomo 15 (locus 15q-21.1), e codifica a proteína FBN1, uma glicoproteína monomérica pertencente à matriz extracelular (SAKAI et al., 1986; SAKAI et al., 1991). Os monômeros de FBN1 associam-se a fim de formar macroagregados complexos denominados microfibrilas, as quais estão presentes no tecido conjuntivo elástico e inelástico (CAÑADAS et al., 2010). As microfibrilas constituem arcabouço para deposição de tropoelastina durante a fibrilogênese do tecido conjuntivo elástico (RIMOIN et al., 1997; SHERRATT et al., 2001). Além disso, as microfibrilas permitem a redistribuição de carga entre fibras elásticas individuais e servem de ancoragem estrutural para o tecido conjuntivo não elástico (ROBINSON; GODFREY, 2000). De modo geral, mutações do gene *FBN1* induzem anormalidades estruturais de seu transcrito proteico, o que induz interrupção da formação de agregados microfibrilares e, como consequência, o enfraquecimento do tecido conjuntivo (CAÑADAS et al., 2010).

As microfibrilas contendo FBN1 exercem potencial efeito inibitório sobre a ação do *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ). Pertencente à superfamília TGF- $\beta$ , essa molécula é uma citocina multifuncional de ação autócrina-parácrina (MASSAGUÉ, 2012). A via de sinalização da TGF- $\beta$  está envolvida em uma série de funções e processos celulares, tais como crescimento, diferenciação e apoptose celular; regulação da função de fibroblastos e diferenciação de miofibroblastos; remodelamento da matriz extracelular e promoção da expressão de genes profibróticos, como por exemplo o colágeno do tipo I (DIETZ, 2007; BIERNACKA et al., 2011; MASSAGUÉ, 2012). Quando sintetizado, o TGF- $\beta$  liga-se ao seu propeptídeo, formando um complexo latente que o mantém inativo. Esse complexo latente une-se à microfibrila via proteína ligante de TGF- $\beta$ . Uma vez associado à microfibrila o TGF- $\beta$  permanece em sua forma inativa (BARCELLOS-HOFF, 1996). Entretanto, mutações na FBN1 inviabilizam a ligação do complexo latente às microfibrilas (DIETZ, 2007). Como consequência, a forma latente/inativa do TGF- $\beta$  não é formada e a concentração tecidual e

sérica dessa citocina aumenta em pacientes com SMF – o que torna essa molécula um relevante biomarcador prognóstico (MATT et al., 2009; FRANKEN et al., 2013).

Em sua forma ativa, ou seja, dissociada de seu propeptídeo, o TGF- $\beta$  liga-se ao receptor quinase do tipo II (T $\beta$ RII), que se associa ao receptor quinase do tipo I (T $\beta$ RI) – ALK/5 (*activin like kinase-5*) ou ALK/1 (*activin like kinase-1*), formando um complexo heterotramérico (RAHIMI; LEOF, 2007). A formação desse complexo permite o T $\beta$ RII fosforilar o T $\beta$ RI que, por sua vez, fosforila/ativa as proteínas R-Smads Smad-2 e/ou Smad-3 (MASSAGUÉ et al., 2005; RAHIMI; LEOF, 2007). Fosforiladas, essas proteínas interagem com a Co-Smad-4, formando um complexo Smad que migra para o núcleo celular, onde ativa ou inibe a ação de diversos fatores de transcrição (MASSAGUÉ, 2012). Da ativação de AP-1 (*activator protein-1*) e SP1 (*specificity protein 1*), por exemplo, resulta o aumento da expressão de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), cuja ação está associada ao desenvolvimento de aneurisma de aorta em pacientes com SMF (CHUNG et al., 2007). Por outro lado, a inibição dos fatores de transcrição MyoD e miogenina, induz redução da massa muscular esquelética (LI et al., 2004; ZHU et al., 2004), uma manifestação clínica comum em pacientes com SMF (GISKE et al., 2003; PERCHERON et al., 2007).

Mutações na FBN1 induzem aumento na concentração circulante e bioatividade do TGF- $\beta$  em pacientes com SMF (MATT et al., 2009). A hiperatividade dessa citocina está relacionada a uma série de processos, tais como a maior deposição de colágeno na parede da aorta, comprometendo sua integridade estrutural e a tornando dilatada; inibição da sinalização da BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*), imprescindível ao desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso; e aumento na expressão de elastase e MMP2 e MMP9 (CHUNG et al., 2007; BRAGA et al., 2012; BENKE et al., 2013). O elevado nível dessas proteases reduz a elasticidade do tecido conjuntivo ao induzirem, respectivamente, a degradação da elastina e a desintegração de fibras elásticas (CHUNG et al., 2007). Além disso, a hiperatividade do TGF- $\beta$  induz redução da massa muscular esquelética e dificulta os processos de proliferação e diferenciação de células satélite, as células tronco musculares importantes para a manutenção e regeneração da massa muscular (BRAGA et al., 2012). Vale ressaltar que a ação do TGF- $\beta$  induz progressivo aumento do processo de fibrose em muitos órgãos (MENG et al., 2016; KIM et al., 2018). No músculo esquelético, o TGF- $\beta$  atua estimulando a expressão de proteínas fibróticas [fibronectina, vimentina e  $\alpha$ -SMA ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*)], e reduzindo a expressão de fatores regulatórios miogênicos – MyoD e miogenina (LI et al., 2004; GILLIES et al., 2017), o que acarreta em aumento de tecido fibrótico no músculo esquelético e,

consequente, redução da área de secção transversal das fibras musculares e da força contrátil (MENDIAS et al., 2012; GILLIES et al., 2017). Como previamente mencionado, tais comprometimentos musculoesqueléticos foram previamente descritos em pacientes com SMF (DIETZ et al., 1991; GISKE et al., 2003; PERCHERON et al., 2007).

Na SMF, foi relatada a presença de anéis concêntricos de miofibrilas ao redor de fibrilas orientadas transversalmente, condição que induz inapropriada tensão muscular esquelética; miopatia centronuclear, que afeta negativamente o tônus muscular; e hipotrofia de fibras musculares do tipo II (GOEBEL et al., 1973; JADRO-SANTEL et al., 1980; HONDA et al., 1991). Mutações no gene que codifica a FBN1 têm apresentado relevante ligação causal com os sintomas musculares observados na SMF (SAKAI et al., 1986; ZHANG et al., 1995) e o distúrbio do tecido conjuntivo tem sido apontado como a causa de maior relevância das anormalidades funcionais musculares esqueléticas, ao invés de alterações da fibra muscular (BEHAN et al., 2003). Além do mais, a má ancoragem da membrana basal da fibra muscular à matriz extracelular, decorrente de alterações na FBN1, contribui para as disfunções musculoesqueléticas observadas na SMF (PYERITZ, 2000). Corroboram essas ideias os achados de Percheron et al. (2007), que evidenciaram redução no pico de torque produzido pelo músculo quadríceps de mulheres com SMF. Dados semelhantes foram previamente apresentados por Giske et al. (2003), ao evidenciar, em um grupo de mulheres com SMF, uma significativa redução da capacidade aeróbia e no pico de torque isocinético máximo de extensão e flexão de joelho realizados em alta velocidade. Além disso, tem sido demonstrada redução da capacidade regenerativa musculoesquelética em camundongos com SMF (COHN et al., 2007; TOMAZ DA SILVA et al., 2023). Estima-se que esse efeito decorra da redução da expressão de m-caderina e miogenina, marcadores de proliferação de células satélite e início da diferenciação de células miogênicas respectivamente, induzidas por mutação na *Fbn1* (COHN et al., 2007). Ademais, foi recentemente evidenciado que o nicho fibrótico, causado por mutações em *Fbn1*, reduz o potencial miogênico das células satélite e, conseqüentemente, prejudica a regeneração estrutural e funcional do músculo esquelético (TOMAZ DA SILVA et al., 2023).

Considerando-se que a fibrose e a redução da massa muscular têm sido associadas à fragilidade generalizada, à incapacidade física, ao aumento da susceptibilidade às lesões, da fraqueza muscular e da morbidade, bem com a redução da função e regeneração muscular e à depressão do sistema imune (SYDDALL et al., 2003; VISSER et al., 2005; SAYER et al., 2006; CESARI et al., 2009; HAINE et al., 2015; TROMBETTI et al. 2016; MAHDY, 2019), e

consequente redução da qualidade de vida de indivíduos com SMF (DE BIE et al., 2004; RAND-HENDRIKSEN et al., 2010); estratégias capazes de atenuar a fibrose e a perda de massa muscular de indivíduos portadores da SMF são fundamentais para melhorar a qualidade de vida desses indivíduos. Neste contexto, o treinamento excêntrico representa uma viável estratégia para mitigar a fibrose, a queda de massa e a força muscular em indivíduos com SMF, pois este contribui para a redução da concentração de células e citocinas inflamatórias (NOURA et al., 2020; LOMIWES et al., 2023), as quais estão associadas à fibrose (MAHDY, 2019), além de induzir potencial efeito hipertrófico muscular e consequente aumento de força muscular (ROIG et al., 2009; DOUGLAS et al., 2017; MAEO et al., 2018). Assim sendo, segue uma introdução sobre esse modelo de treinamento físico.

## **1.2 Treinamento Excêntrico**

O treinamento excêntrico (TE) consiste em um modelo de treinamento físico que enfatiza a fase negativa do movimento, ou seja, o momento em que o torque da resistência vence o torque gerado pela ação muscular (ENOKA, 1996; ISNER-HOROBETI, 2013). Essa fase corresponde à ação excêntrica (AE) do músculo esquelético e representa a desaceleração do movimento (ISNER-HOROBETI, 2013). Frequentemente, o TE é associado à maior produção de força, maior resposta hipertrófica muscular esquelética e maiores adaptações neurais quando comparado aos modelos de treinamento físico que utilizam apenas as ações musculares concêntrica (AC) ou isométrica (AI). Embora não se conheça os mecanismos específicos, estima-se que essa superioridade do TE decorra da maior estimulação mecânica e potencial ativação de vias moleculares anabólicas induzidas pela AE (ELIASSON et al., 2006; ISNER-HOROBETI, 2013; FRANCHI et al., 2014).

A AE se caracteriza pelo estiramento dinâmico das fibras musculares enquanto ainda há interação das pontes cruzadas de actina e miosina (ENOKA, 1996). O elevado nível de tensão mecânica induzida pelo estiramento de fibras musculares ativas pode promover o desacoplamento dos filamentos contráteis (LOMBARDI; PIAZZESI, 1990). Porém, actina e miosina podem se reconectar rapidamente durante a AE, permitindo maior produção de força em relação às AC e AI (LOMBARDI; PIAZZESI, 1990; JONES ET AL., 2004). Além disso, a AE induz a dissipação de energia mecânica durante a desaceleração do movimento. Nesse momento, os músculos são estirados e geram elevado nível de força a fim de frear o movimento, o que caracteriza a ação de quebra contra o movimento descendente (KONOW; ROBERTS, 2015). Por outro lado, a AE permite a conversão de energia elástica em energia

cinética, ou seja, a energia potencial armazenada durante o estiramento das fibras musculares pode ser liberada na fase de aceleração do movimento (AC), potencializando assim a produção de força muscular (HOPPELER, 2014). Vale ressaltar que a ativação do córtex motor se inicia mais rapidamente e é mais intensa na AE quando comparada às AC e AI (FANG, et al., 2004). Como resultado dessa estratégia neural, as fibras musculares, bem como a matriz extracelular (MEC) desenvolvem maior tensão mecânica; contribuindo para uma maior produção de força durante a AE (FANG, et al., 2004; ISNER-HOROBETI et al., 2013).

O treinamento físico com AE induz maior resposta anabólica muscular esquelética em relação aos demais modelos de treinamento com AC e AI, que pode envolver a ativação e proliferação de células satélite e/ou a ativação molecular de vias anabólicas (YABLONKA-REUVENI, 2011; SCHOENFELD, 2012, FRANCHI et al., 2014; TSENG et al., 2020). Evidências prévias demonstraram que a AE induz potencial aumento na expressão gênica e proteica da mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), molécula indutora de síntese de proteínas musculares (ELIASSON et al., 2006; FRANCHI et al., 2014). Considerado um dos principais promotores do crescimento muscular esquelético, o mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) antagoniza a ação de membros da superfamília TGF- $\beta$  induzindo a síntese proteica (YOON, 2017). O mTORC1 ativa a p70S6K (*70 kDa ribosomal protein S6 kinase*) e inibe 4EBP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) (THOMAS; HALL, 1997; LEE et al., 2007), permitindo que os fatores de iniciação eucariótica eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) e eIF4G (*eukaryotic translation initiation factor 4G*) sejam ativados e interajam entre si, direcionando a maquinaria de tradução ribossomal à região 5' do RNAm. Iniciando assim, a síntese de proteínas musculares e, conseqüentemente, promovendo aumento da massa muscular esquelética (YOON, 2017; YOU et al., 2019).

Vale mencionar que o TE contribui para a redução da concentração plasmática de MCP1 (*plasma monocyte chemoattractant protein*), e monócitos e redução da expressão gênica da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alpha*) no músculo esquelético (NOURA et al., 2020; LOMIWES et al., 2023), sendo estes componentes inflamatórios associados à fibrose (MAHDY, 2019), o que possibilita inferir que o TE poderia ser usado como potencial estratégia para a redução de nicho fibrótico no músculo esquelético.

### **1.3 Benefícios do Treinamento Excêntrico**

O TE é amplamente utilizado na preparação física esportiva, devido ao seu potencial em induzir melhora na coordenação motora, aumento de força e da potência muscular

esquelética (LASTAYO et al., 2003a). Além disso, o TE induz aumento no desempenho de velocidade e em atividades de rebote, como as que envolvem salto (FRANCHI et al., 2017; CHAABENE et al., 2018). Previamente, Lindstedt et al. (2002), demonstraram significativa melhora na altura do salto de jogadores de basquete após seis semanas de TE. Porém, para os jogadores que realizaram apenas levantamento de peso, o desempenho no salto vertical permaneceu inalterado. Em adição, o TE tem sido relacionado à prevenção de lesões de quadril e dor no ombro de atletas de futebol e vôlei, respectivamente (CROISIER et al., 2008; FORTHOMME et al., 2013).

Além de potencializar ganhos morfofuncionais, o TE requer menor demanda metabólica e cardiorrespiratória (LASTAYO et al., 1999; LINDSTEDT et al., 2001). Essas características têm tornado essa estratégia de treinamento físico interessante, não apenas ao desenvolvimento físico atlético, mas também à melhora das capacidades físicas e manutenção da qualidade de vida de idosos ou pacientes com deficiências metabólicas crônicas (GAULT; WILLEMS, 2013; HYLDAHL; HUBAL, 2014; LASTAYO et al., 2014). Em particular, o TE tem sido associado ao fortalecimento dos tendões ao induzir aumento da síntese de colágeno e do fluxo sanguíneo em torno das células presentes nos tendões (GUILHEM et al., 2010). Esse efeito tem permitido utilizar o TE como uma importante estratégia ao tratamento de tendinopatias, principalmente as que acometem o tendão calcâneo, patelar e os tendões que se inserem no epicôndilo lateral (CROISIER et al., 2007; HOPPELER; HERZOG, 2014; KJAER; HEINEMEIER, 2014). Comparado a programas de reabilitação padrão, o TE tem proporcionado melhor recuperação da força, desempenho e nível de atividade do ligamento cruzado anterior – quando utilizado como parte da reabilitação pós-cirúrgica (GERBER et al., 2007; GERBER et al., 2009). Ademais, tem sido demonstrado maior aumento da força do músculo contralateral com TE ao invés do treinamento concêntrico (TC). O que permite incluir o TE como estratégia eficaz de estímulo unilateral em programas de reabilitação cujos membros lesionados não podem ser submetidos ao esforço (HIGBIE et al., 1996; HORTOBAGYI et al., 1997).

Em relação à população idosa, tem sido demonstrado que o TE induz maior aumento da massa e força muscular esquelética, além de proporcionar maior mobilidade e capacidade de realizar tarefas funcionais, quando comparado ao efeito do TC (LASTAYO et al., 2003a; REEVES et al., 2009; GAULT; WILLEMS, 2013). Vale ressaltar que, comparado ao treinamento de força convencional, a intervenção com TE tem sido mais eficaz na atenuação da sarcopenia e de limitações associadas a idosos muito frágeis com idade aproximada de 80

anos (LASTAYO et al. 2003a). Em adição, idosos com aproximadamente 78 anos e submetidos ao TE por 11 semanas, demonstraram significativo aumento da área de secção transversal e força muscular, equilíbrio, capacidade de descer escadas e redução do risco de quedas (LASTAYO et al., 2003b). Em relação às disfunções crônicas, a intervenção com TE comparada ao treinamento físico convencional, tem demonstrado maior ganho de força muscular esquelética e aprimoramento da capacidade funcional em pacientes com substituição total do joelho, com câncer ou doença de Parkinson (HYLDAHL; HUBAL, 2014). Aos pacientes em fase de recuperação de acidente vascular encefálico, o TE tem sido sugerido como estratégia mais eficaz à melhora da ativação neuromuscular e da marcha do que o TC (ENGARDT et al., 1995; CLARK; PATTEN, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que o TE é capaz de promover redução na complacência arterial, o que indica potencial diminuição do risco associado ao treinamento de força convencional em pacientes com doenças coronarianas (OKAMOTO et al., 2006). Vale ressaltar, que o TE constitui uma alternativa eficiente e segura para pacientes com insuficiência cardíaca, pois, induz melhora na capacidade funcional de modo semelhante ao TC, porém, com menor demanda no sistema cardiovascular durante o exercício (BESSON et al., 2013).

Em casos de distrofia muscular, o efeito do TE não foi investigado em humanos e sugere-se que sua utilização piora o quadro degenerativo muscular (HYLDAHL; HUBAL, 2014). Porém, estudos utilizando ratos jovens distróficos têm demonstrado que o TE melhora a capacidade regenerativa funcional de músculos esqueléticos desses animais (RIDGLEY et al., 2009; CALL et al., 2011). Especificamente, foi demonstrado que a corrida em declive não aumentou o infiltrado inflamatório e foi responsável pela redução da mionecrose em camundongos jovens mdx (modelo da distrofia muscular de Duchenne) (LAZZARIN et al., 2023), além de promover aumento da imunoexpressão de miogenina, o que colabora o avanço da maturação dos mioblastos nesses animais (LAZZARIN et al., 2023).

A corrida em declive é um modelo de TE bastante utilizado em modelo animal. Especificamente, tem sido demonstrado que a corrida em declive acomete menos a função muscular, induz menores danos musculares, contribui para uma recuperação mais rápida do desempenho para sessões subsequentes de exercícios e exerce um efeito protetor contra a dor muscular de início tardio induzida pelo exercício físico (FENGHAO et al., 2020). Em adição, tem sido demonstrado que a corrida em declive pode induzir aumento de massa muscular esquelética, sem produzir estresse excessivo que possa causar danos às fibras musculares, e sem produzir alterações anormais como necrose e infiltrado inflamatório (TSUMIYAMA et

al., 2014). Vale mencionar, que a corrida em declive é caracterizada por exercer menos estresse na função cardiovascular e nas estruturas articulares (POLLOK e t al., 2000; TSUMIYAMA et al., 2014). Ademais, Martins et al. (2018) demonstraram significativa redução da concentração da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  e uma melhora na recuperação musculoesquelética de camundongos submetidos à lesão neuropática, seguindo um protocolo de corrida em declive (14 m/min, declive de 16°, 5 dias por semana, por 8 semanas).

Perante o exposto, é possível formular a hipótese de que o TE atenua as alterações morfológicas do músculo esquelético induzidas pela SMF.

## **2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

Pouco se sabe sobre as alterações morfológicas e moleculares envolvidas nas disfunções musculares ocasionadas pela SMF, como a fibrose muscular e a redução da massa muscular. Nessa perspectiva, a melhor compreensão das alterações morfológicas e moleculares do músculo esquelético de camundongo modelo da SMF e o estudo do efeito do TE sobre essas alterações contribuirão para o melhor conhecimento desta síndrome e poderão servir de base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes para o tratamento de pacientes com SMF.

## **3 OBJETIVO**

### **3.1 Objetivo geral**

Este projeto tem como objetivo geral contribuir para a melhor compreensão das alterações morfológicas e moleculares do músculo esquelético de camundongos modelo da SMF e investigar as respostas morfológicas e moleculares induzidas por um protocolo de treinamento excêntrico sobre o músculo esquelético desses animais.

### **3.2 Objetivos específicos**

#### **3.2.1 Objetivo específico 1**

Analisar aspectos macroscópicos, histológicos e moleculares dos músculos gastrocnêmio e plantar de camundongos portadores de mutação em *Fbn1* (SMF) em comparação a animais selvagens.

### 3.2.2 Objetivo específico 2

Identificar o efeito do treinamento excêntrico sobre aspectos macroscópicos, histológicos e moleculares dos músculos gastrocnêmio e plantar de camundongos portadores de mutação em *Fbn1* (SMF) e selvagens.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostra

O efeito do TE sobre o músculo esquelético foi avaliado em camundongos machos selvagens C57BL/6 e com mutação no gene *Fbn1* ( $SMF^{mg\Delta loxPneo}$ ). Foram utilizados 20 animais, sendo 5 em cada grupo amostral (favor verificar detalhes no item 4.2), com cinco meses de idade, período em que a SMF se estabelece (LIMA et al., 2010). Os camundongos provêm do biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICBUSP, local em que se formou uma colônia de animais com SMF a partir de casais doados pela Profa. Dra. Lygia V. Pereira do Instituto de Biociências da USP. Os animais foram mantidos no biotério supracitado e acondicionados em condições padrão: gaiolas coletivas (Beira Mar Ltda, São Paulo, Brasil), temperatura ambiente entre 22° e 25° C e ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. O presente estudo atende aos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, do ICB/USP, protocolos nº 4887250119 e nº 7549191022).

### 4.2. Grupos experimentais

Os camundongos utilizados neste estudo foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: **Controle** – animais selvagens, ( $n=5$ ) e com SMF ( $n=5$ ) não submetidos ao protocolo de treinamento excêntrico; e **Treinado** – animais selvagens ( $n=5$ ) e com SMF ( $n=5$ ) submetidos ao protocolo de treinamento excêntrico.

### 4.3 Animais modelo de SMF

A SMF constitui uma doença autossômica dominante caracterizada por disfunção do tecido conjuntivo, causado por mutações no gene que codifica a FBN1. A fim de melhor estudar/caracterizar esta doença, foi criado na década de 90 um modelo murino MFS-mg $\Delta$  que pudesse mimetizar o efeito negativo dominante das mutações da *Fbn1* manifestadas em pacientes com SMF (PEREIRA et al., 1997). Especificamente, 6kb do gene que codifica a FBN1 envolvendo os exons 19-24 foram substituídos por um cassete de expressão resistente à

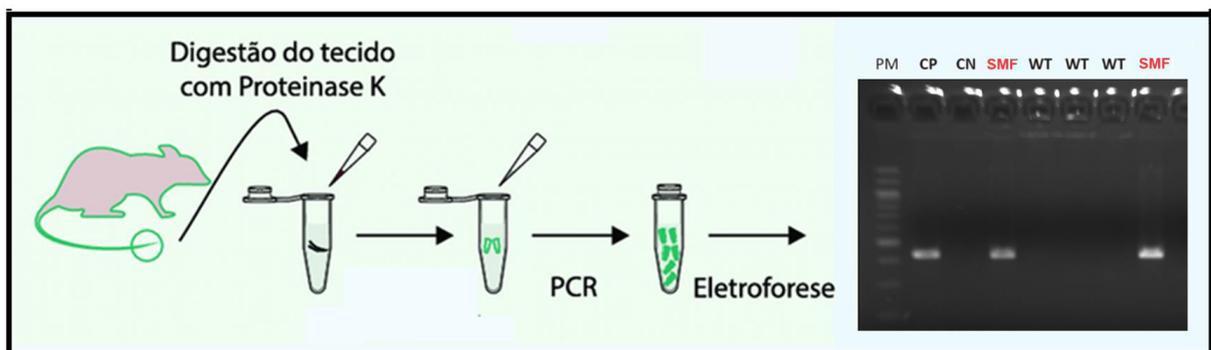
neomicina (neoR), resultando em um monômero proteico com ausência de 272 resíduos. No entanto, as análises de expressão gênica demonstraram que o alelo  $mg\Delta$  possuía um menor nível de transcrição (90%) quando comparado ao alelo *Fbn1* normal. Nessa perspectiva, uma nova variante do modelo de camundongo  $mg\Delta$  foi criada. Neste novo modelo o alelo *Fbn1* foi preservado, porém o cassete neoR foi flanqueado por sequências lox-P ( $mg\Delta^{loxPneo}$ ) (LIMA et al., 2010), o que permitiu a deleção do cassete de resistência mediada pela recombinase CRE (SUNAGA et al., 1997). Assim como no modelo  $mg\Delta$ , o alelo mutante  $mg\Delta^{loxPneo}$  resulta em transcritos FBN1 com uma deleção *in frame* dos exons 19 a 24 (LIMA et al., 2010). Porém, neste novo modelo foi evidenciado um maior nível de expressão do alelo mutante (47%) versus o modelo  $mg\Delta$ , o que pode explicar, de acordo com o efeito negativo dominante da MFS, as manifestações clínicas da doença em animais heterozigotos  $mg\Delta^{loxPneo}$  (LIMA et al., 2010). Desta maneira, este novo modelo recapitula a heterogeneidade clínica da SMF em humanos: cifose, enfisema pulmonar, deterioração progressiva da parede da aorta e deposição defeituosa de microfibrilas na matriz extracelular (LIMA et al., 2010). Animais  $mg\Delta^{loxPneo}$  apresentam fenótipo semelhante ao C1039G, modelo mais comum de mutações em humanos em que uma cisteína é substituída por uma glicina no resíduo 1039 no EGF da FBN1 (JUDGE et al., 2004, NG et al., 2004). Entretanto, neste novo modelo foi evidenciado um processo inflamatório crônico no pulmão (LIMA et al., 2010). Sendo assim, este o modelo SMF  $mg\Delta^{loxPneo}$  permite a identificação tanto de modificadores genéticos quanto epigenéticos associados ao fenótipo da SMF, o que possibilita melhor entendimento da heterogeneidade da doença, bem como da fisiologia do sistema cardiovascular, pulmonar, esquelético e muscular (LIMA et al., 2010).

#### 4.4 Genotipagem

A genotipagem foi realizada a fim de identificar os animais com a mutação no gene *Fbn1*. O procedimento experimental consistiu em extração do DNA genômico isolado da cauda (1 - 2 cm) dos camundongos utilizando 720 ml de solução tampão STE (*Sodium Chloride-Tris-EDTA*) e 30 ml de Proteinase K (estoque de 10 mg/ml). Em seguida, a cauda foi imersa nesta solução e incubada a 55 °C durante 3 h e agitada no Vórtex a cada 1 h. Após esse período, a solução contendo a cauda homogeneizada, por ação química, foi submetida ao aquecimento por 5 min a 70 °C para inativar a proteinase K. A solução contendo material genômico foi, então, centrifugada a 13000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 720 ml de isopropanol. Após agitação manualmente por 5 minutos o tubo contendo o DNA em suspensão, o pellet de DNA foi formado e precipitou no fundo do tubo.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com álcool 70% sob agitação manual e, em seguida, centrifugado a 8000 rpm por 5 min. Após essa etapa, o sobrenadante foi removido e o pellet, que se encontra no fundo do tubo, foi seco ao ar livre por 1-2 min. Em seguida, 100-200 ml (dependendo do tamanho do pellet) de água ultrapura foi adicionado a fim de ressuspender o DNA genômico, o qual foi incubado por 1 h a 55 °C para facilitar a dissolução do DNA (Figura 1).

Após a etapa de extração do DNA supracitada, cada amostra foi submetida a duas reações em cadeia da polimerase (PCRs) a fim de identificar a presença do alelo mutante *Fbn1*<sup>mgΔloxPneo</sup> e do alelo selvagem, sendo este último utilizado como controle interno da reação. As sequências de primers para *Fbn1*<sup>mgΔloxPneo</sup> utilizadas foram: **Forward** 5' – GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT – 3' e **Reverse** 5' – CTC TTC GTC CAG ATC ATC CT – 3'. Para os animais selvagens, usamos as seguintes sequências de primers alélicos: **Forward** 5' – AAA CCA TCA AGG GCA CTT GC – 3' e **Reverse** 5' – CAC ATT GCG TGC CTT TAA TTC – 3'. As condições de ciclagem foram 94 °C por 2,5 min, em seguida 94 °C, 57 °C, 72°C por 1 min por 30 ciclos em um volume de 10 µl de solução contendo a amostra (2 µl), a enzima transcriptase (0,2 µl), 10 µM de primers *forward* e *reverse* (0,8 µl), água ultra pura (13,08 µl), 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (0,8 µl), 5 mM de dNTPs (0,32 µl) e 10x PCR -MgCl<sub>2</sub> (solução tampão, 2 µl). Na etapa seguinte, quantidades iguais de DNA (4 µl) foram transferidas para novos tubos contendo 3 µl de *loading*. Em seguida, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (6 µl para um gel contendo 24 poços). Ao finalizar a eletroforese, o gel foi exposto à luz UV (ultra-violeta) em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Collegien, France). A presença de bandas (de 433 pares de bases, pb) identifica o animal mutante (Figura 1).



Adaptado de CALIÓ; BERTONCINI (2018).

**Figura 1. Genotipagem.**

A extração do DNA genômico da cauda dos camundongos foi realizado por meio da proteinase K (ZANGALA, 2007). Em seguida, as amostras contendo DNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR), a

fim de identificar a presença do alelo mutante *Fbn1* (433 pb) (LIMA et al., 2010). PM: marcador de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo.

#### 4.5 Protocolo de Treinamento Excêntrico

Os camundongos do grupo treinado foram submetidos a um protocolo de corrida em declive realizado em esteira ergométrica (AVS Projetos, São Paulo). Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de familiarização de uma semana. A esteira foi ajustada para uma inclinação de  $-16^\circ$  e o tempo total de corrida foi de 15 min. A velocidade da esteira foi aumentada gradualmente a cada 5 min, iniciando a corrida com 8 m/min, passando para 11 m/min e finalizando com 14 m/min (Figura 2). Após o período de familiarização, os camundongos iniciaram o protocolo de TE: corrida em esteira ergométrica a  $-16^\circ$  de inclinação por 30 min a uma velocidade constante de 14 m/min. O TE (corrida) foi realizado cinco vezes por semana, por um período de oito semanas (MARTINS et al., 2018) (Figura 2). Após 48 h da última sessão de TE, amostras musculares foram coletadas e armazenadas para posterior análises morfológicas e moleculares. Esse modelo de TE é considerado de intensidade moderada a alta (AGUIAR et al., 2007; AGUIAR et al., 2008), bem como representa um menor custo metabólico quando comparado ao TC realizado nos mesmos parâmetros de velocidade e duração (MARTINS et al., 2018).



**Figura 2. Protocolo de corrida em declive.**

Os camundongos WT e SMF do grupo treinado foram submetidos a uma semana de familiarização em corrida realizada em esteira ergométrica a  $-16^\circ$  de inclinação de acordo como os seguintes parâmetros: 15 min de duração, com velocidade de corrida aumentada gradualmente a cada 5 min (8, 11 e 14 m/min). Em seguida, os camundongos realizaram o protocolo de corrida em declive como segue: 30 min a uma velocidade constante de 14 m/min, realizados 5 vezes por semana, por 8 semanas (Martins et al., 2018).

#### 4.6 Eutanásia e coleta de amostras musculoesqueléticas

Quarenta e oito horas após a última sessão de TE, os camundongos foram pesados e, em seguida, apropriadamente eutanasiados. Os músculos gastrocnêmios medial e lateral e plantar (GP) esquerdos foram dissecados, pesados e longitudinalmente seccionados em duas partes. Uma parte foi destinada às análises de transcriptoma e RT-PCR e a outra parte foi

destinada ao *Western Blotting*. Os músculos GP direitos foram dissecados e destinados aos ensaios histoquímicos e imunohistoquímicos. As amostras musculares a serem utilizadas em experimentos histológicos foram previamente congeladas em isopentano por 10 s e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras destinadas ao *Western Blotting* e RT-PCR foram congeladas diretamente em nitrogênio líquido. Ao final, todas as amostras musculares foram armazenadas em freezer -80°C até serem utilizadas nas análises experimentais citadas (Pereira et al., 2014).

#### **4.7 Histologia - análises morfológicas e morfométricas**

Os fragmentos musculares reservados às análises histológicas foram transversalmente seccionados em criostato (IEC Minotome), a uma espessura de 10 µm. Para as análises morfológicas e determinação da área de secção transversal das fibras musculares, os cortes histológicos foram fixados com paraformaldeído (PFA) 4% e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As fibras arredondadas foram quantificadas nas imagens de cortes transversais musculares corados com H&E. Em seguida, o número de fibras arredondadas foi expresso por área total do músculo em mm<sup>2</sup>. Um microscópio óptico foi utilizado para as análises morfológicas (Nikon) e o *software* Image Pro-plus (Media Cybernetic; Silver Spring, MD, USA) foi utilizado para as análises morfométricas (MIYABARA et al., 2006).

Como previamente descrito (COURTOY et al., 2020), para as análises de densidade de área do tecido conjuntivo, cortes transversais musculares foram corados com *picrosirius red*. Das imagens desses cortes, obtidas em microscópio óptico (Nikon), foi feita a extração de pixels vermelhos por meio da filtragem vermelho, verde e azul (RGB), utilizando-se o *software* Image J (Fiji *is just ImageJ*: <http://pacific.mpi-cbg.de/>). O valor proporcional à área de tecido conjuntivo consistiu em uma medida morfométrica da densidade do sinal, a qual foi usada para a quantificação do percentual de tecido conjuntivo nos cortes transversais de músculo esquelético. Os valores foram expressos em porcentagem de tecido conjuntivo corado com *picrosirius red* por campo de secção transversal do músculo GP.

#### **4.8 Análise do transcriptoma**

O isolamento do RNA total das amostras ( $n=5$  por grupo) foi realizado utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen®) e as razões 260/280 e 260/230 nm foram determinadas por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nano Vue (GE Healthcare). A integridade do RNA total foi mensurada por meio do Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies). Foram utilizadas para análise do RNAseq somente as amostras com RNA *integrity number* (RIN)  $\geq$

8.0. As bibliotecas foram geradas usando o *TruSeq protocol for RNA libraries* (Illumina Technologies). Depois de realizadas as ligações dos adaptadores, passos *end-repair*, e a síntese do cDNA, as bibliotecas de cDNA foram purificadas e validadas por meio do Bioanalyzer. Para o sequenciamento em larga escala, foi utilizada a plataforma Illumina HiSeq 2500 (NGS Soluções Genômicas de Piracicaba, SP). Posteriormente, a RT-PCR foi utilizada para validar os dados da análise do transcriptoma.

A análise de bioinformática foi realizada pelo colaborador Dr. Andrei Rozanski. Para o controle de qualidade do sequenciamento foram realizadas análises de qualidade, filtragem de baixa qualidade, remoção de adaptadores – por meio do *software* FASTQC (acessível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e o pacote BBMap (acessível em: <http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>). Em seguida, foi realizado o mapeamento das leituras do sequenciamento – efetuado contra o genoma do organismo de interesse, via programa STAR (DOBIN et al., 2013). Esse mesmo programa foi utilizado para efetuar a contagem das leituras por gene – procedimento realizado simultaneamente ao mapeamento. A identificação de genes diferencialmente expressos foi realizada por meio do programa edgeR (ROBINSON et al., 2010). A anotação funcional foi realizada via programa DAVID (HUANG et al., 2009).

## **4.9 Expressão gênica**

### **4.9.1 Isolamento do RNA**

O isolamento do RNA total das amostras foi realizado com o reagente TRIZOL (Invitrogen®) e a qualidade e concentração das amostras foram avaliadas por meio da relação 260/280 nm, determinada em espectrofotômetro (Eppendorf®; Eppendorf, São Paulo, Brasil). Apenas foram utilizadas amostras que atingiram o valor de 1,6 a 2,0. A qualidade do RNA total também foi avaliada por meio da análise da integridade das amostras, verificada em gel de agarose 1% denaturante, corado com brometo de etídeo, em que foram detectadas as bandas ribossômicas mais abundantes 28s e 18s.

### **4.9.2 RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)**

A transcrição reversa (RT) foi realizada de acordo com Silva et al., (2014): 1 µg do RNA total foi usado na reação contendo oligo-dT (500 µg/ml), dNTP a uma concentração 10 mM para cada uma, 5x *first-strand buffer*, 0,1 M DTT e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript II; Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada a 70 °C durante 10

min, seguida de 42 °C durante 60 min e 95 °C por 10 min em termociclador (Perkin Elmer GeneAMP PCR System 2400, Norwalk CT).

#### 4.9.3 Detecção da expressão gênica em tempo real

Diferentes concentrações de cDNA foram utilizadas na amplificação em cadeia por polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) no equipamento Rotor-Gene® Q (Qiagen, São Paulo, Brasil). Neste equipamento é determinado o início da fase de amplificação exponencial (CT, *cycle threshold*) que foi utilizado para a análise da expressão gênica. A reação foi realizada utilizando quantidades variadas de cDNA; *primers* (iniciadores) específicos para os genes de interesse e o TFIID, que foi utilizado como normalizador da reação de PCR em tempo real (Tabela 1); Taq polimerase; dNTPs; tampão fornecido pelo fabricante da Taq polimerase; e Syber Green (substância fluorescente que se liga ao DNA de forma intercalante). As amostras foram submetidas a 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos. Os valores de  $\Delta CT$  de cada gene de interesse foram calculados como segue: CT (do gene de interesse) – CT (do gene normalizador). A mudança relativa no nível de expressão de cada gene de interesse ( $\Delta\Delta CT$ ) foi calculada subtraindo o  $\Delta CT$  da condição controle dos correspondentes  $\Delta CT$ s dos grupos experimentais. Os valores de expressão gênica foram determinados como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  com  $\Delta\Delta CT \pm DP$  (sendo DP o desvio padrão da média dos valores  $\Delta\Delta CT$ ; manual do usuário nº 2; Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) (AOKI et al., 2009; SANTOS et al., 2015). Os valores finais de expressão gênica dos grupos experimentais são apresentados como a diferença (em vezes) em relação ao valor do grupo controle (calculado como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), sendo o valor do grupo controle expresso arbitrariamente como 1.

**Tabela 1. Primers para reação em cadeia da polimerase em tempo real:**

Gene	Forward	Reverse
<b>TFIID</b>	5'TTAGGCCTGGAAAGGTGTTACG3'	5'CCTCCAAACAGATGGAACATTCT3'
<b>S100A8</b>	5'AAATCACCATGCCCTCTACAAG3'	5'CCCACCTTTTATCACCATCGCAA3'
<b>S100A9</b>	5'GCACAGTTGGCAACCTTTATG3'	5'TGATTGTCCTGGTTTGTGTCC3'
<b>MyoD</b>	5'CGACACCGCCTACTACAGTG3'	5'TTCTGTGTCGCTTAGGGATG3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5'CTCTTCTCATTCCCGCTCGT3'	5'GGGAGCCCATTTGGGAACTT3'
<b>IL-10</b>	5'ATTTGAATTCCCTGGGTGAGAAG3'	5'CACAGGGGAGAAATCGATGACA3'
<b>IL-6</b>	5'CACGGCCCTTCCCTACTTCAC3'	5'GGTCTGTTGGGAGTGGTATC3'

#### 4.10 Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica das secções transversais dos músculos GP foi realizada de acordo com estudo prévio (Pereira et al., 2014). Tais secções foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% em 0,2 M de PB (*phosphate buffer*) por 10 minutos, bloqueadas com 0,1 M de glicina em PBS (*phosphate buffer saline*) por 5 minutos e permeabilizadas por 10 minutos em 0,2% de triton X-100 em PBS. As secções foram incubadas em solução contendo o anticorpo primário, 3 % de *normal goat serum* e 0,3% de triton X-100/0,1 M PB *overnight* em um recipiente úmido a 4° C. Após 3 lavagens com 0,1 M PB (10 minutos cada), as secções foram incubadas em solução contendo o anticorpo secundário e 0,3% de triton X-100/0,1 M PB por 2 horas em recipiente escuro. Posteriormente, as secções foram novamente lavadas por 3 vezes com 0,1 M PB e em seguida, as lâminas foram cobertas com as lamínulas usando resina *Vectashield* contendo *DAPI* (*4',6-diamidino-2-phenylindole*, H-1200, Vector Labs).

Para a realização das reações imunohistoquímicas, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: *rabbit monoclonal anti-CD11b* (1:100, Novus Biologicals) e *rat monoclonal anti-Ly6G* (1:50, Biorbyt). Os anticorpos secundários utilizados foram: *Rhodamine Goat anti-rabbit* (1:250, Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Baltimore, PA, EUA); *Alexa Fluor 647 Goat anti-rat* (1:250, Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Baltimore, PA, EUA); *Laminin anti-rabbit* (1:250, Abcam, Cambridge, MA, EUA); *Laminin anti-rat* (1:100, Abcam, Cambridge, MA, EUA).

Um microscópio de fluorescência (Observer D1, Zeiss, Jena, Germany) foi utilizado nas análises imunohistoquímicas, enquanto o *software* ZEN 2012 (*Blue Edition*) foi utilizado para quantificar células CD11b+ (marcador de macrófago) e Ly6G+ (marcador de neutrófilo).

#### 4.11 Western Blot

De acordo com estudo prévio (Pereira et al., 2014a) as amostras de tecido muscular esquelético foram homogeneizadas por 10 s em tampão de lise contendo 3 mM de  $MgCl^{2+}$ , 5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, EDTA), 1 mM ditioneitol (*dithiothreitol*, DTT), 90 mM de KCl, 10 mM de HEPES (*4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid*), 1% de glicerol, inibidor de protease e coquetel inibidor de fosfatase (1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 0,04% dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), utilizando um homogeneizador do tipo Polytron em máxima velocidade. Em seguida, os extratos celulares foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração total de proteínas foi determinada pela técnica de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), tendo a albumina de soro bovino como referência (NASCIMENTO et al., 2018). Na etapa seguinte, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCl 240 mM, SDS 0,8%, beta-mercaptoetanol 200 mM, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%) na proporção de 1:1 (LAEMMLI, 1970). Quantidade iguais de proteínas (50 µg de cada amostra) foram separadas em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) via eletroforese e transferidas à uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). Para confirmar as quantidades iguais de proteínas, as membranas foram coradas com Ponceau S e, em seguida, incubadas em solução contendo anticorpo primário overnight a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução basal TBS-Tween (Tween Tris-Buffered Saline: 0,5M NaCl; 50 nM Tris-HCl em pH 7,4 e 0,1% de Tween 20) por 30 minutos e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase em temperatura ambiente, em seguida, foi adicionada a solução de ECL (*Enhanced Chemiluminescence*; Amersham), e conseqüentemente ocorreu a reação de quimioluminescência, que foi detectada em fotodocumentador (Vilber Lourmat, Collegien, France).

Os anticorpos primários utilizados foram: P70S6K *anti-rabbit* (1:1000, Cell Signaling Technology); *Phospho-P70S6K* (Ser371) *anti-rabbit* (1:1000, Cell Signaling Technology); *Phospho-P70S6K* (Thr389) *anti-rabbit* (1:1000, Cell Signaling Technology); 4EBP1 *anti-rabbit* (1:1000, Cell Signaling Technology); *Phospho-4EBP1* (Thr37/46) *anti-rabbit* (1:1000,

Cell Signaling Technology); *Phospho-4EBP1 (Thr70) anti-rabbit* (1:1000. Cell Signaling Technology); *GAPDH rabbit IgG* (1:5000. Cell Signaling Technology). O anticorpo secundário utilizado foi a *Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit* (1:5000, Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Baltimore, PA, EUA).

#### 4.12 Análise estatística

Em um primeiro momento, os dados obtidos foram submetidos aos testes de Homogeneidade e Normalidade - *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Em seguida, foi utilizado o teste *T-student*, para comparação entre dois grupos, e a análise de variância - ANOVA, seguida do teste de *Tukey* (paramétrico) para comparação múltipla entre mais de 2 grupos. Um teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para comparar as distribuições de frequência das áreas de secção transversal (AST) das fibras musculares esqueléticas dos grupos. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão. O nível de significância mínimo estabelecido foi de  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 O TE não afeta o peso corporal, a massa muscular e o tamanho das fibras musculares

Não houve diferenças significativas no peso corporal entre os grupos (Gráfico 1A). No entanto, o peso úmido do músculo GP e o peso úmido normalizado para o peso corporal total foram significativamente menores nos grupos SMF quando comparados aos seus respectivos grupos controle (grupos SMF controle: 31% e 39%, respectivamente; e grupos SMF treinados: 25% e 22%, respectivamente, Gráficos 1B e C).

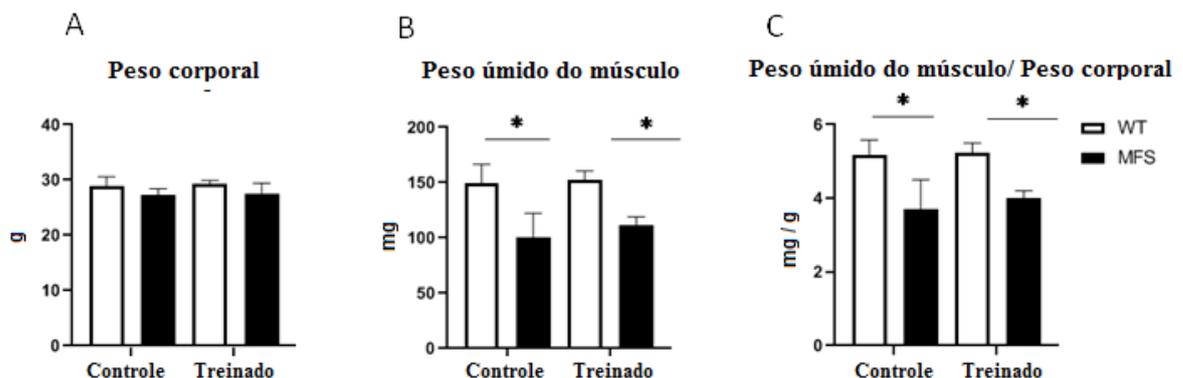
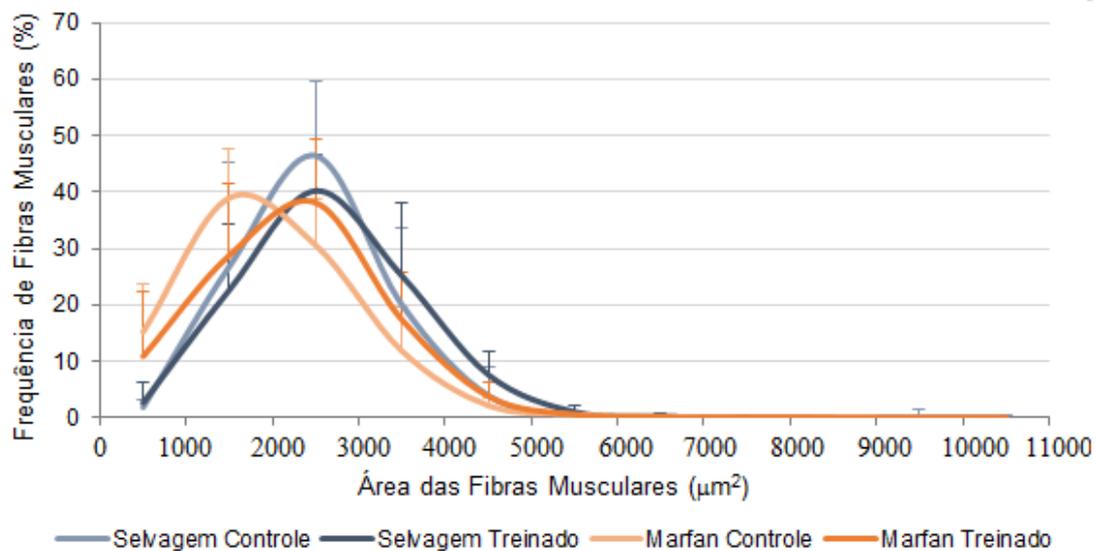


Gráfico 1. Peso corporal e Peso úmido muscular

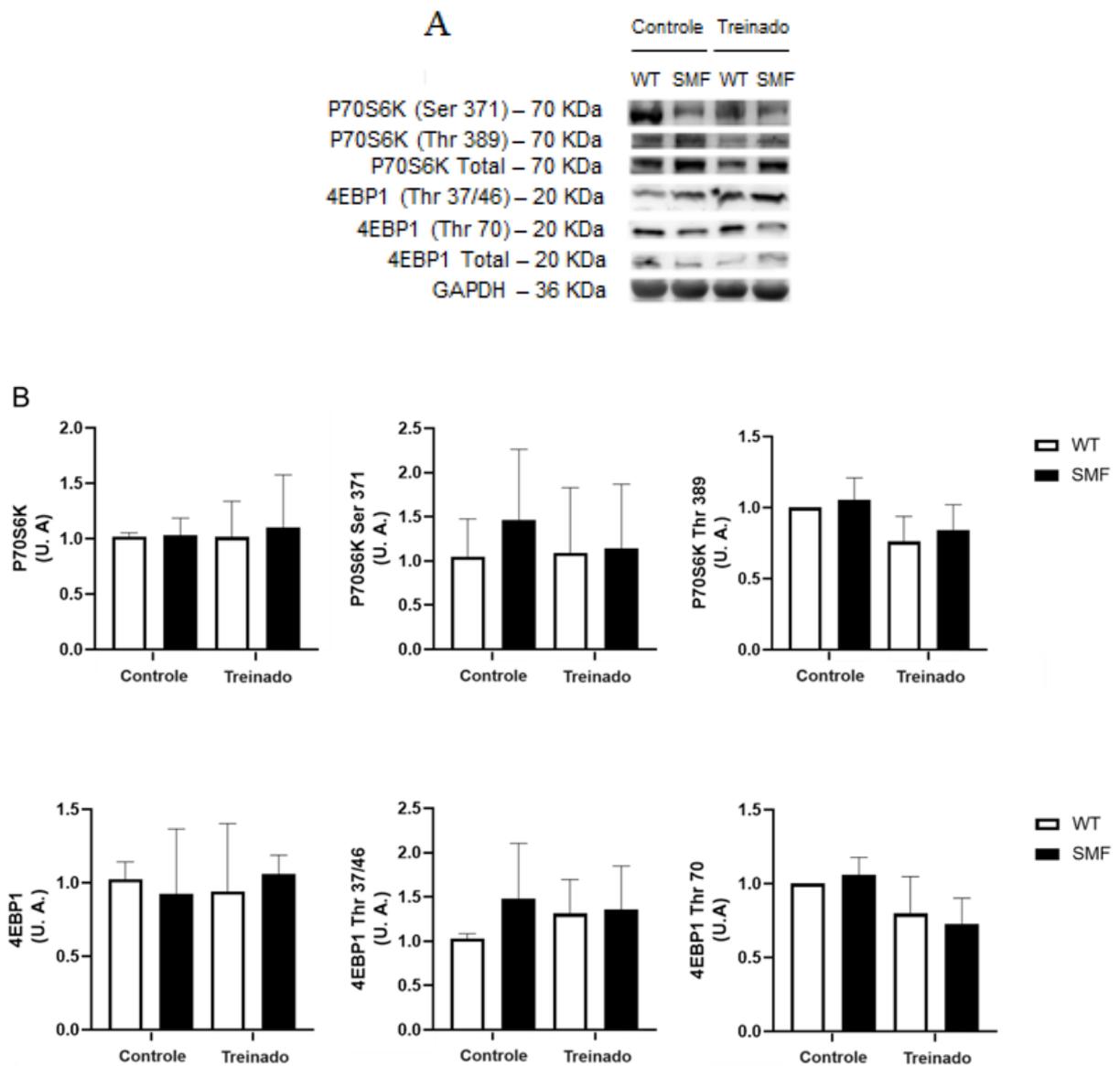
(A – C) *Peso corporal (g), peso úmido do músculo GP (mg) e peso úmido do músculo GP normalizado para peso corporal (mg/g) de camundongos treinados e controle com e sem SMF. Os dados estão em média ± desvio padrão (n=4-5). \*p≤0,05 (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.*

O número de fibras musculares com área de secção transversal menor que 1000  $\mu\text{m}^2$  foi maior nos grupos SMF controle e treinado do que em respectivos controles (8,0 e 5,7 vezes nos grupos controle e treinado, respectivamente, Gráfico 2). O TE não afetou os níveis de expressão de P70S6K e 4EBP1 totais e fosforilados, efetores a jusante da sinalização mTORC1 (Figuras 3 A e B). Além disso, não houve diferenças significativas entre os grupos nos níveis de RNAm de MyoD (Gráfico 3), um fator de transcrição altamente expresso na ativação e proliferação de células satélite (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013). Em geral, esses resultados sugerem que o protocolo de TE utilizado no presente estudo não reverte à diminuição da massa muscular do GP induzida pela SMF.



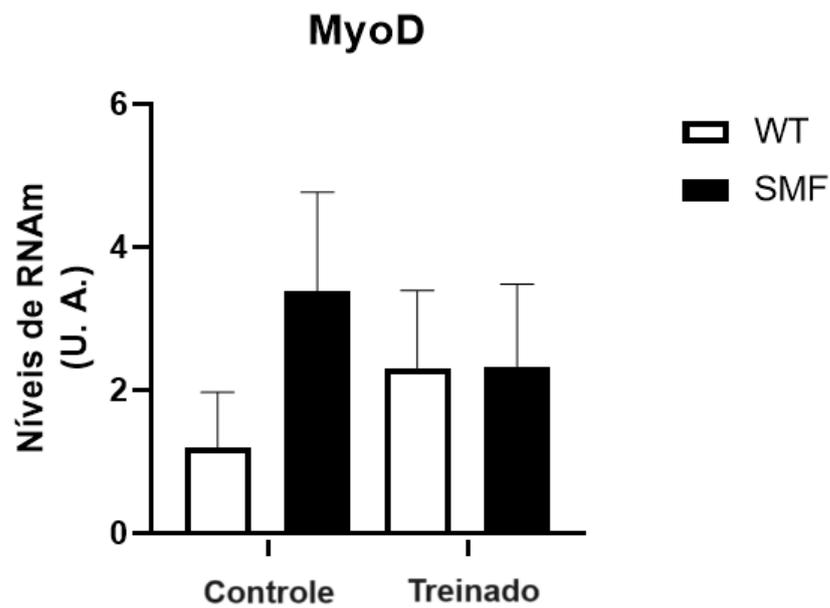
**Gráfico 2. Percentual de área das fibras musculares.**

*Porcentagem da área de secção transversal das fibras musculares (AST) dos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF (n=5). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar diferenças entre os grupos. Os dados estão em média ± desvio padrão. \*p≤0,05 (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.*



**Figura 3. Expressão proteica de P70S6K e 4EBP1.**

(A, B) Análise representativa de Western blot e análise densitométrica da expressão proteica de P70S6k (total) ( $n=4$ ), p-P70S6k Ser 371 ( $n=5$ ), p-P70S6k Thr 389 ( $n=3$ ), 4EBP-1 (total) ( $n=4$ ), p-4EBP-1 Thr 37/46 ( $n=5$ ) e p-4EBP1 Thr 70 ( $n=3$ ) nos músculos GP dos grupos de estudo. Os dados estão em médias  $\pm$  desvios padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

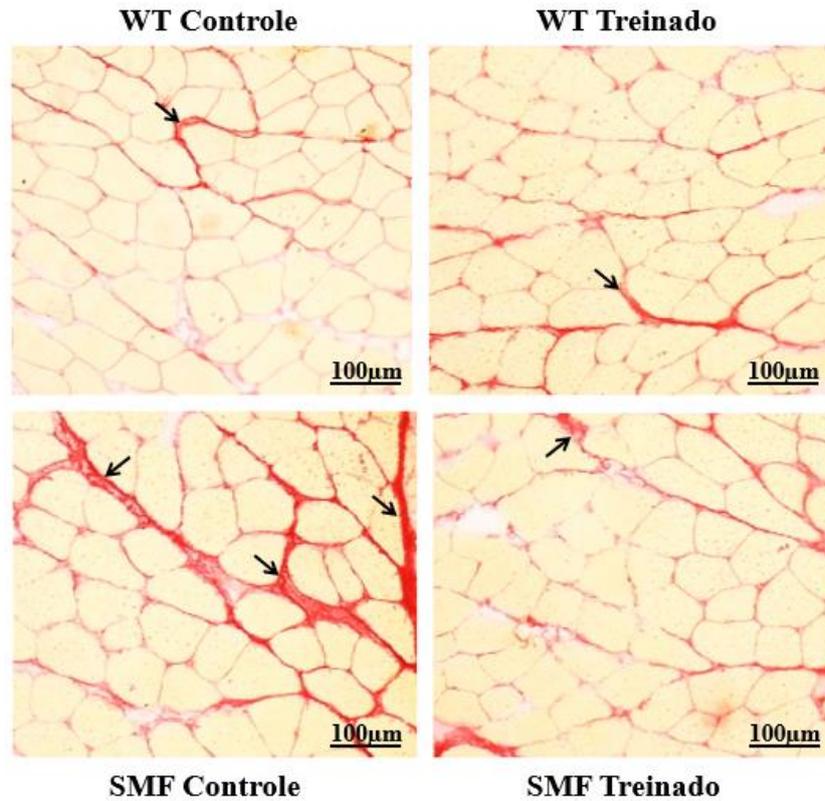


**Gráfico 3. Expressão gênica de MyoD.**

Níveis de RNAm de MyoD nos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. (n=4-5). Os dados estão em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

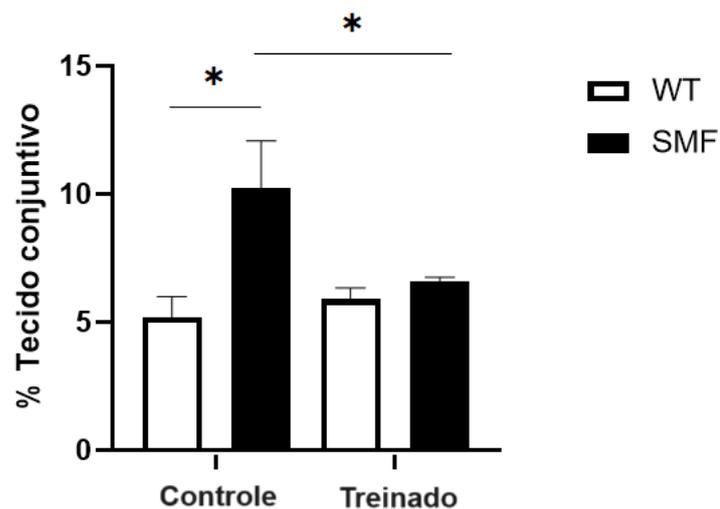
## 5.2 O TE diminui a porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular e melhora a morfologia muscular na SMF

Considerando que as desordens do tecido conjuntivo são o principal contribuinte para a disfunção muscular esquelética na SMF (BEHAN et al., 2003), foi determinada a porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular corado com *picrosirius red* por campo de secção transversal muscular. A porcentagem de tecido conjuntivo foi maior no grupo controle com SMF (97%) do que no grupo controle WT (Figura e Gráfico 4). No entanto, não houve diferença no grupo treinado (Figura e Gráfico 4), sugerindo que o TE diminui a fibrose muscular em animais com SMF. Ademais, foi mensurada a expressão de *WISP-1* (*Inducible signaling pathway protein 1*) e *IL-33* (*Interleucina 33*), moléculas secretadas por FAPs (*fibro-adipogenic progenitors*) (JOE et al. 2010; LEMOS et al. 2012; MOZZETTA et al. 2013; FIORE et al. 2016; KUSWANTO et al. 2016; SCHIAFFINO et al., 2016; LUKJANENKO et al. 2019; KASTENSCHMIDT et al., 2021). Houve redução dos níveis de RNAm de WISP-1 no grupo SMF treinado em comparação ao grupo WT controle (43% , Gráfico 5A). Além disso, a expressão gênica de IL-33 aumentou no grupo SMF treinado versus o grupo WT controle (126%, Gráfico 5B).



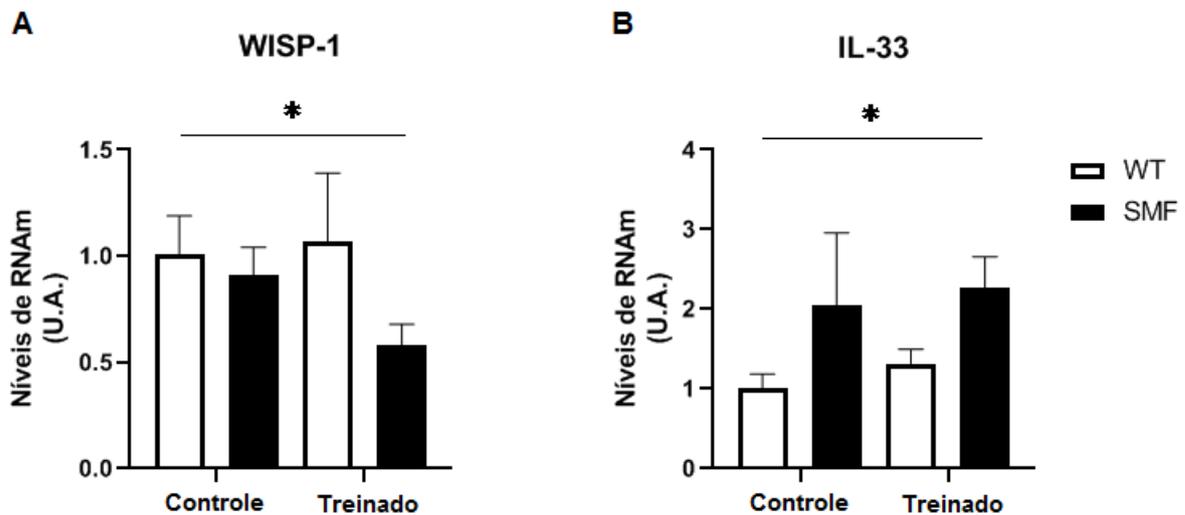
**Figura 4. Fibrose muscular esquelética.**

Secções transversais representativas de músculos GP, demonstrando o tecido conjuntivo corado com picrosirius red (coloração avermelhada indicada por setas pretas) de camundongos WT e SMF controle e treinados. Barra: 100 µm.



**Grafico 4. Porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular.**

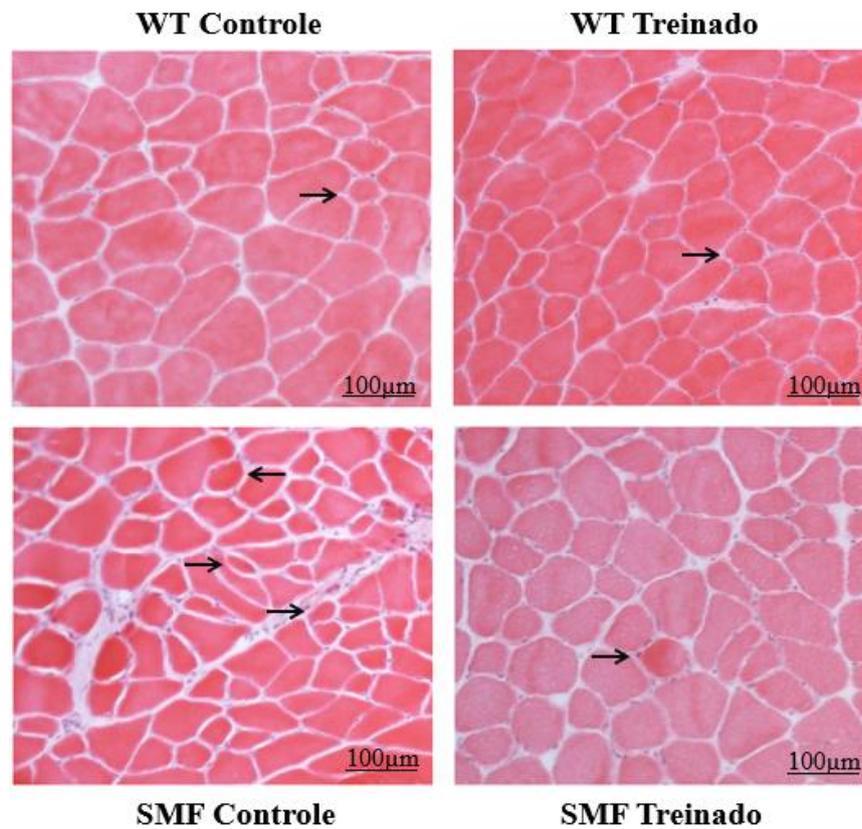
Percentual de tecido conjuntivo corado com picrosirius red por campo de secção transversal (média de 3.2 campos aleatórios por músculo) de músculo GP (n=3). Os dados estão em média ± desvio padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.



**Gráfico 5 . Expressão gênica de WISP-1 e IL-33.**

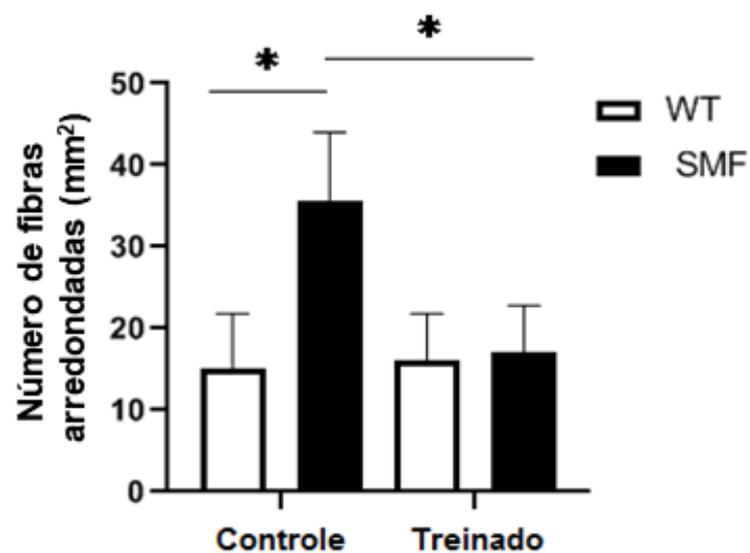
(A, B) Níveis de RNAm de WISP-1 (n=4) e IL-33 (n=3-4) nos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. Os dados estão expressos como médias  $\pm$  desvios padrão.  $*p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

Além disso, a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) mostrou que o número de fibras musculares arredondadas (de formato não poligonal) foi significativamente maior no grupo controle com SMF do que no grupo controle WT (aumento de 2,4 vezes, Figura 5 e Gráfico 6). Não houve diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos treinados (Figura 5 e Gráfico 6), sugerindo que o TE restaura a forma das fibras musculares através da remodelação da MEC.



**Figura 5. Fibras musculares arredondadas (sem o formato poligonal).**

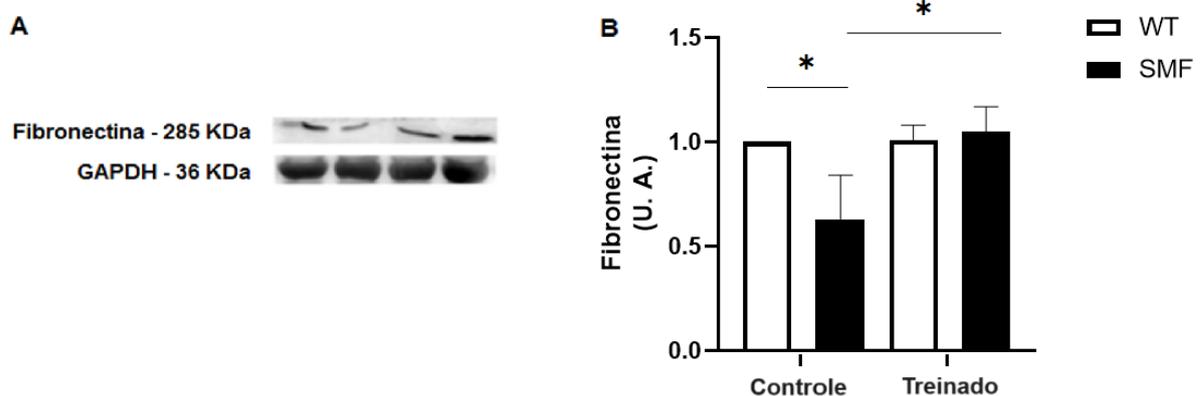
Secções transversais dos músculos GP corados com hematoxilina-eosina dos grupos WT e SMF. As setas indicam fibras musculares arredondadas (não poligonais). Barra: 100 µm.



**Gráfico 6. Número de fibras musculares arredondadas (sem o formato poligonal).**

Número de fibras musculares arredondadas por mm<sup>2</sup> de músculo (n=4). Os dados estão em média ± desvio padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

Considerando que a má fixação da membrana basal muscular à MEC contribui para a disfunção musculoesquelética na SMF (PYERITZ, 2000), foi avaliada a expressão proteica da fibronectina, uma glicoproteína que constitui a MEC. A expressão de fibronectina foi significativamente menor no grupo controle SMF do que no grupo controle WT (35%, Figura 6A e B). No entanto, não houve diferenças na expressão proteica dos grupos treinados (Figura 6A e B). Estes dados sugerem que o TE diminui a fibrose muscular e melhora a morfologia muscular em camundongos com SMF.



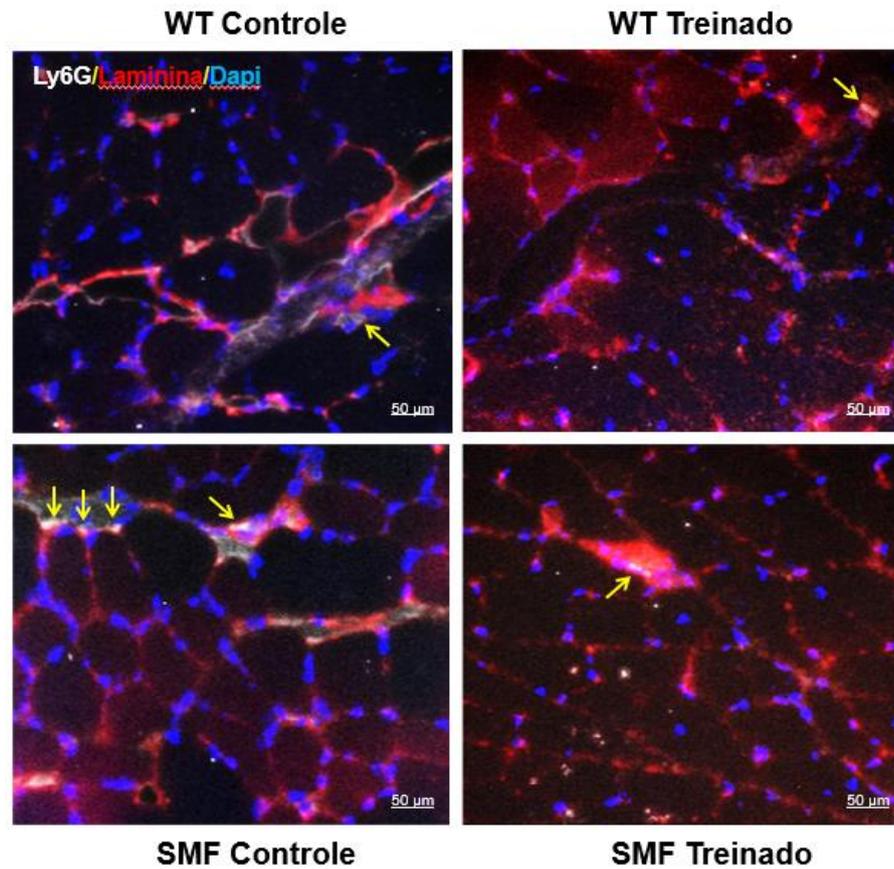
**Figura 6. Expressão proteica de Fibronectina**

(A, B) Análises de Western blot e de densitometria de bandas para a expressão da proteína fibronectina nos músculos GP dos grupos de estudo ( $n=3$ ). Os dados estão em média  $\pm$  desvio padrão.  $*p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

### 5.3 O TE reduz a expressão de marcadores de inflamação nos músculos SMF

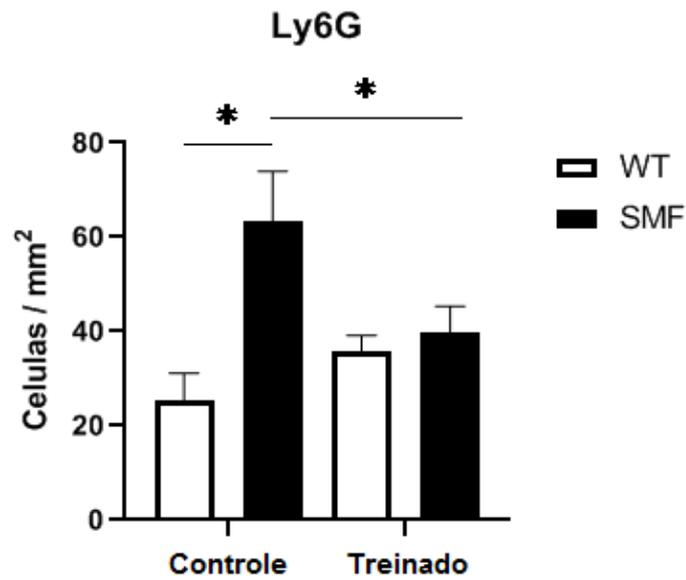
Exploramos potenciais mecanismos pelos quais o TE poderia regular a fibrose muscular na SMF. Considerando que a presença de um elevado número de células inflamatórias em um tecido contribui para o desenvolvimento de fibrose (LECH; ANDERS, 2013; WYNN; VANNELLA, 2016), e doença grave em pacientes com SMF, incluindo dilatação da raiz aórtica, luxação da lente intraocular e a maioria das características esqueléticas (RADONIC et al., 2012), foi determinado o número de neutrófilos e macrófagos imunomarcados em secções transversais de músculos GP de camundongos com SMF. O número de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> e macrófagos CD11b<sup>+</sup> foi significativamente maior nos músculos GP do grupo controle SMF do que do grupo controle WT (aumento de 148,1% e

91,4%, respectivamente, Figuras e Gráficos 7 e 8). Por outro lado, não houve diferença neste parâmetro nos grupos treinados (Figuras e Gráficos 7 e 8).



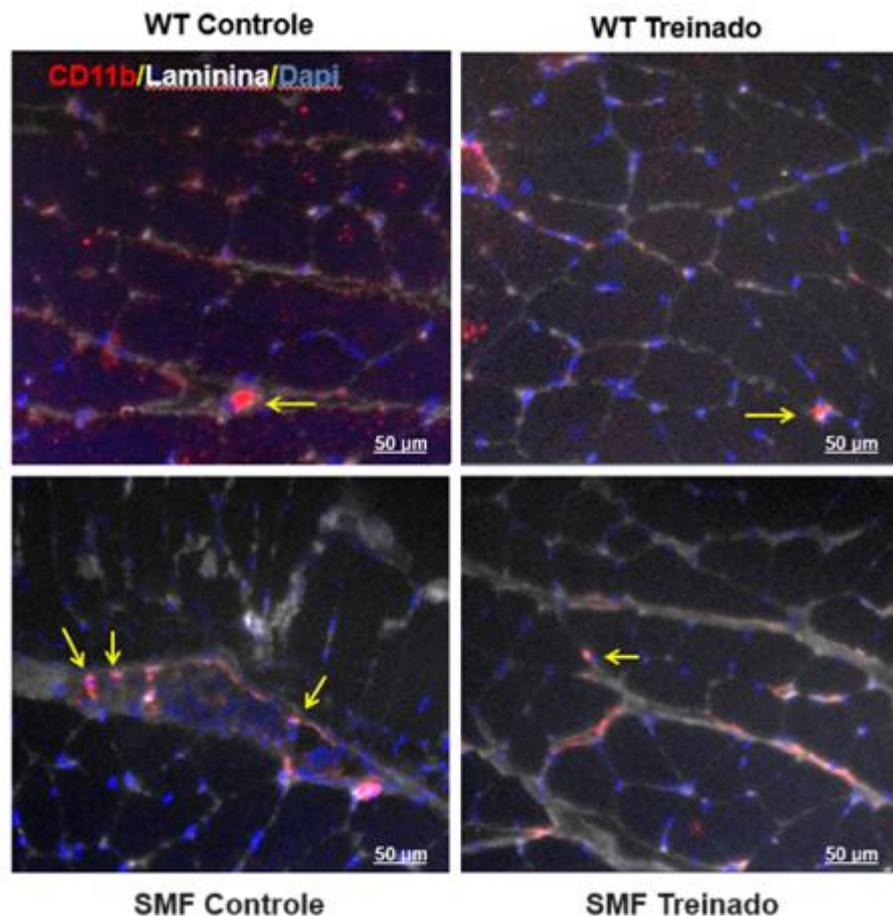
**Figura 7. Imunomarcção representativa de Ly6G+.**

*Imunomarcção representativa de Ly6G em secções transversais dos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. As setas indicam as células Ly6G+. Barra de escala: 50 µm. Os neutrófilos nas secções transversais do músculo foram imunomarcados com Ly6G (branco), a lâmina basal com laminina (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul).*



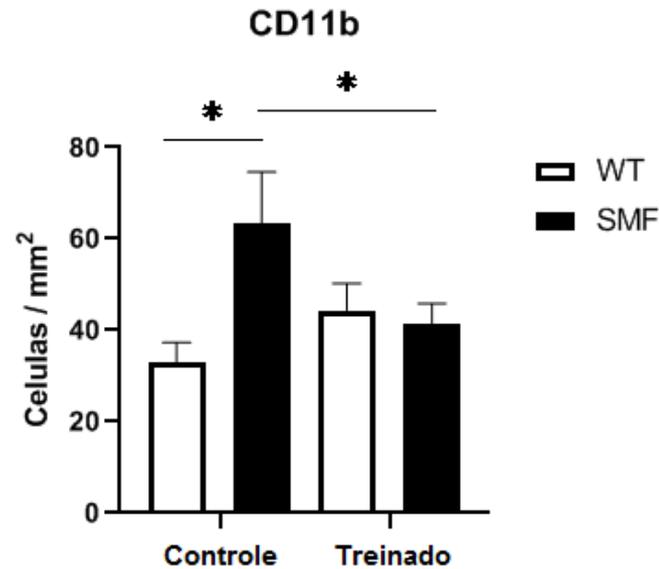
**Gráfico 7. Número de células Ly6G+ por mm<sup>2</sup>.**

Número de células imunopositivas para Ly6G por mm<sup>2</sup> em secções transversais dos músculos gastrocnêmio e plantar de camundongos treinados e controle com e sem SMF. (n=3). Os dados são médias  $\pm$  desvios padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.



**Figura 8. Imunomarcção representativa de CD11b+.**

Imunomarcção representativa de CD11b em secções transversais dos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. As setas indicam as células CD11b+. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Os macrófagos nas secções transversais do músculo foram imunomarcadas com CD11b (vermelho), a lâmina basal com laminina (branco) e os núcleos com DAPI (azul).



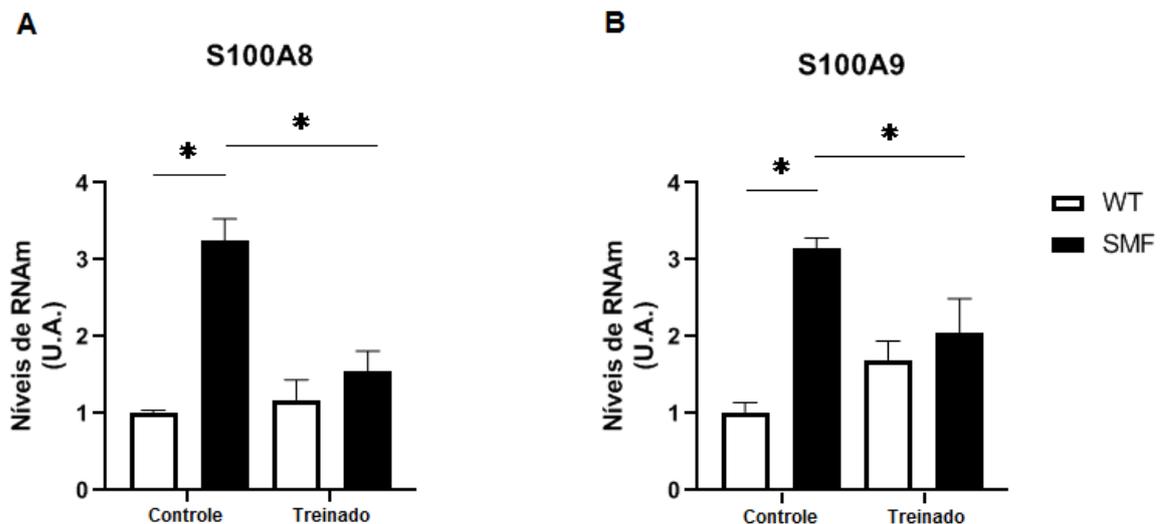
**Gráfico 8. Número de células CD11b+ por mm<sup>2</sup>.**

Número de células imunopositivas para CD11b por mm<sup>2</sup> em secções transversais dos músculos gastrocnêmio e plantar de camundongos treinados e controle com e sem SMF. (n=3). Os dados são médias  $\pm$  desvios padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

As análises de RNAseq (Quadro 2) com validação subsequente por qPCR revelaram que os níveis de RNAm de *S100A8* e *S100A9*, biomarcadores inflamatórios secretados por neutrófilos e macrófagos (OPPENHEIM; YANG, 2005; SHABANI et al., 2018), foram robustamente maiores nos músculos do grupo controle SMF do que no grupo controle WT (aumento de 224% e 210%, respectivamente, Gráficos 9A e B).

**Tabela 2. Análise do transcriptoma. Alterações na expressão gênica nos músculos GP de camundongos WT e com SMF dos grupos treinado e controle:**

	<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>	<i>Símbolo (gene)</i>	<i>Descrição</i>
Ensembl ID	<b>SMF controle vs. WT controle</b>	<b>SMF Treinado vs. SMF controle</b>		
ENSMUSG00000056071.13	3,8	-4,0	S100A9	<i>S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1338947</i>
ENSMUSG00000056054.10	4,0	-3,9	S100A8	<i>S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88244].</i>



**Gráfico 9. Expressão gênica de S100A8 e S100A9.**

(A, B) Níveis de RNAm de S100A8 (A) e S100A9 (B) nos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. (n=3). Os dados são médias ± desvios padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

Em contraste, não houve diferença significativa na expressão de *S100A8* entre os grupos treinados e o grupo WT controle (Gráfico 9A). Além disso, a expressão de *S100A9* foi significativamente menor no grupo SMF treinado do que no grupo controle SMF (35%, Gráfico 9B). Considerando que os transcritos *S100A8* e *S100A9* estimulam a liberação de citocinas inflamatórias (NUKUI et al., 2008; MARELLI et al., 2017), foi avaliada a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias *TNF- $\alpha$*  e *IL-6* e da citocina antiinflamatória *IL-10*. Os níveis de RNAm de *TNF- $\alpha$* , *IL-6* e *IL-10* foram 222%, 91% e 516% maiores no grupo controle com SMF do que no grupo controle WT (Gráficos 10A e B e Gráfico 11). No entanto, não houve diferença na expressão desses genes nos grupos treinados (Gráficos 10A e B e Gráfico 11). Em conjunto, estes dados sugerem que o TE reduziu a inflamação muscular em camundongos com SMF.

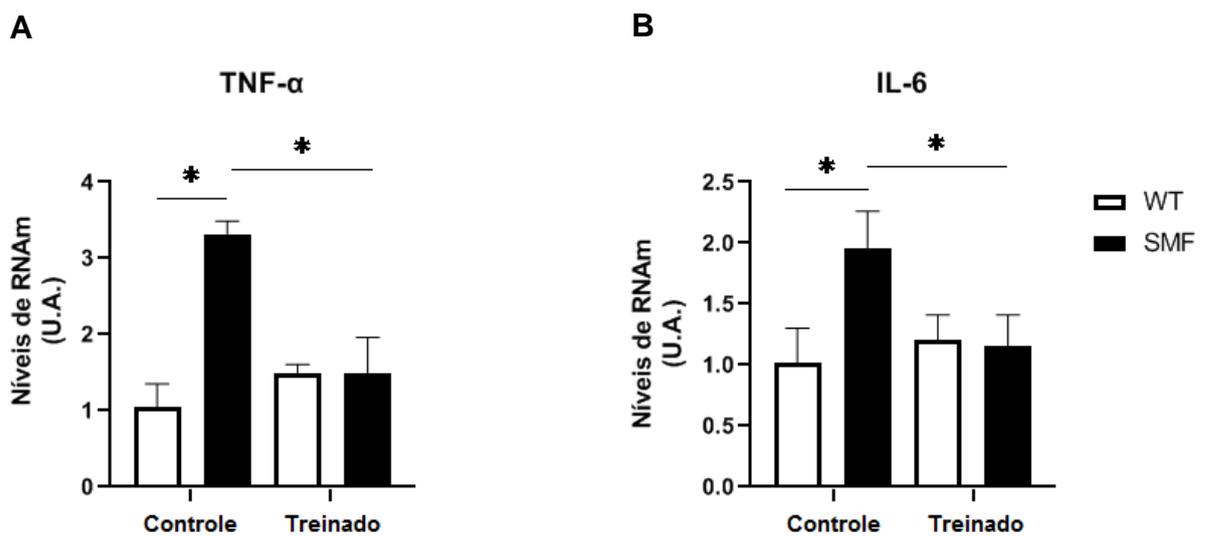
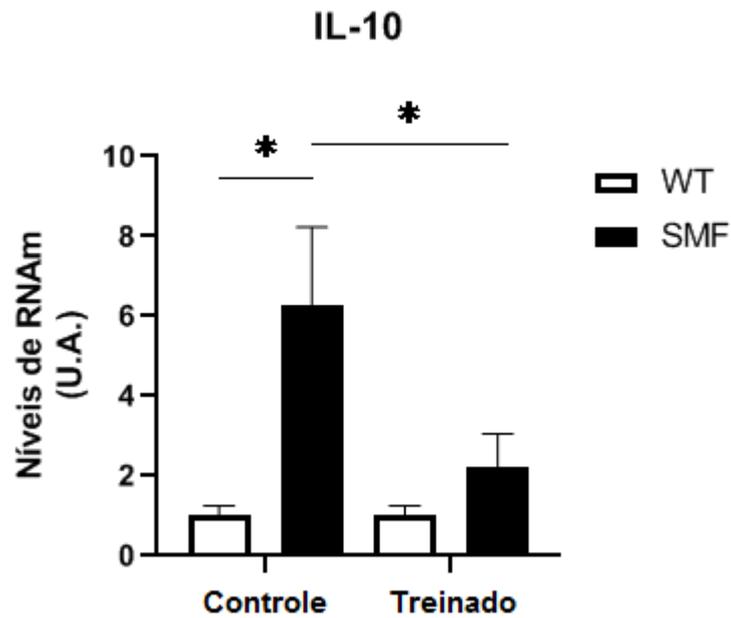


Gráfico 10. Expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  e *IL-6*.

(A, B) Níveis de RNAm de *TNF- $\alpha$*  e *IL-6* nos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. ( $n=3$ ). Os dados são médias  $\pm$  desvios padrão.  $*p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). GP, gastrocnêmio e plantar; SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.



**Gráfico 11 . Expressão gênica de IL-10.**

Níveis de RNAm de IL-10 nos músculos GP de camundongos treinados e controle com e sem SMF. (n=3). Os dados estão expressos como médias  $\pm$  desvios padrão. \* $p \leq 0,05$  (análise de variância seguida de teste post hoc de Tukey). SMF, síndrome de Marfan; WT, selvagem.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo sugere que o TE de intensidade moderada a alta (corrida em declive) induz benefícios em aspectos morfológicos e moleculares do músculo esquelético acometido pela SMF.

Na SMF, os distúrbios relacionados aos sistemas ocular, respiratório, esquelético e cardiovascular têm sido melhor caracterizados (PYERITZ, 2000; JUDGE; DIETZ, 2005). No entanto, ainda pouco se sabe sobre a disfunção muscular esquelética nesta doença. De modo geral, pacientes com SMF apresentam reduzida massa muscular (PERCHERON et al., 2007; HAINE et al., 2015; TOMAZ DA SILVA et al., 2023), a qual se intensifica desde a infância até a idade adulta (HAINE et al., 2015). No entanto, esta queda da massa muscular não parece influenciar o peso corporal, uma vez que não foi observada diferença significativa entre humanos e animais com e sem SMF (PERCHERON et al., 2007; TOMAZ DA SILVA et al., 2023). De acordo com estudo prévio (TOMAZ DA SILVA et al., 2023), o presente estudo não observou diferença no peso corporal entre os camundongos SMF e WT de ambos os grupos. Entretanto, a massa muscular foi significativamente menor em camundongos SMF treinados e não treinados.

Foi previamente identificada uma reduzida AST de fibras musculares em animais modelo de SMF (C1039G) (COHN et al. 2007). Apesar de não termos observado alteração da média da AST das fibras dos músculos GP dos animais SMF (dado não apresentado), houve maior número de fibras de menor calibre ( $500 \mu\text{m}^2$ ) nos camundongos SMF. Esse resultado corrobora estudo prévio em que foi observado o mesmo fenótipo no músculo tibial anterior de animais SMF<sup>mg $\Delta$ LoxPneo</sup> (TOMAZ DA SILVA et al., 2023). Este resultado sugere que alterações na FBN1, causada por mutações no gene que a codifica, comprometem o desenvolvimento de fibras de maior calibre na condição SMF. No entanto, o TE (corrida em declive) de moderada a alta intensidade utilizado neste estudo não foi capaz de reverter esse resultado. De fato, estudos prévios demonstraram que o treinamento aeróbio é menos efetivo na indução de hipertrofia muscular (IZQUIERDO et al., 2004; AHTIAINEN et al., 2009; MIKKOLA et al., 2012; GRGIC et al., 2019).

Em relação às alterações moleculares, a patogênese da SMF envolve mutações no gene que codifica a FBN1 (ERENTUĞ et al., 2005), a qual causa anormalidades estruturais em seu transcrito proteico (CAÑADAS et al., 2010). Contudo, as alterações moleculares em vias que controlam o trofismo muscular não foram exploradas na condição SMF. Tendo em vista, que TE configura como um potencial estímulo para a ativação de vias moleculares anabólicas (ENOKA, 1996; FRANCHI et al., 2014; TSENG et al., 2020), foi avaliada a modulação da mTORC1, considerada uma das principais vias promotoras do crescimento muscular esquelético. A mTORC1 ativa a p70S6K e inibe 4EBP1 (THOMAS; HALL, 1997; LEE et al., 2007), culminando na síntese de proteínas musculares, o que contribui para o aumento da massa muscular esquelética (YOON, 2017; YOU et al., 2019). Para avaliar a ativação da via mTORC1, foi mensurada a expressão proteica da P70S6K e 4EBP1. Embora a supressão de 4EBP1 não pareça ser influenciada pelo TE (FRANCHI et al., 2014), tem sido demonstrado que a expressão proteica de P70S6K aumenta significativamente com o TE (ELIASSON, et al., 2006; OCHI; NAKAZATO; ISHII, 2010). Contudo, no presente estudo, não foi observada alteração na expressão proteica de 4EBP1 e P70S6K nos grupos avaliados. Previamente foi demonstrado que alterações na fosforilação de 4EBP1 e P70S6K ocorrem de maneira dose resposta. Sendo observada fosforilação aumentada dessas moléculas com intensidades de exercício de moderada a alta (KUMAR et al., 2009). Nessa perspectiva, nossos resultados sugerem que o protocolo de TE não representou um estímulo suficiente para ativar a via mTORC1, ou que os componentes *downstream* desta via tenham sido modulados em um período anterior às 8 semanas de TE, ou seja em fase aguda. Vale mencionar que o

efeito repetido da sobrecarga (NOSAKA et al. 2001; MACKEY et al., 2011; HYLDAHL et al., 2015), também pode ter contribuído para a inalteração da expressão de 4EBP1 e P70S6K durante o período de TE. O que explicaria, ao menos em parte, a ausência de alteração na AST das fibras musculares de animais treinados, conforme foi supramencionado.

Desarranjos na ultraestrutura (sarcômeros) da fibra muscular, induzidos pelo TE, têm sido relacionados à maior resposta anabólica muscular esquelética (SCHOENFELD, 2012). Entre os mecanismos envolvidos nessa resposta, está a ativação das células satélite, as quais exercem importante ação sobre o remodelamento muscular esquelético (YABLONKA-REUVENI, 2011). Desarranjos nos sarcômeros desencadeiam processo inflamatório capaz de estimular a ativação e proliferação de células satélite, as quais são atraídas ao local da microlesão em ação mediada por citocinas pro-inflamatórias (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; CHAZAUD et al., 2003). Fatores de transcrição (como Myf5 e MyoD) e vias de sinalização intracelular (como Notch e Wnt) contribuem para a regulação da ativação/proliferação das células satélite, o que leva ao aumento do número de domínios mionucleares e da síntese proteica, com consequente, aumento da AST de fibras musculares (CHARGE; RUDNICKI, 2004; CAROSIO et al., 2011). Como esperado, a SMF (TOMAS DA SILVA et al., 2023) e o TE não alteraram a expressão de MyoD, um fator de transcrição altamente expresso em células satélite ativadas e em proliferação (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013), nos músculos. Considerando que a ativação de células satélite, avaliada pela expressão MyoD, ocorre em aproximadamente 24 horas após uma única sessão de exercício resistido (NEDERVEEN et al., 2017), é possível levantar a hipótese de que a expressão do gene MyoD em animais SMF e WT retornou aos níveis basais antes do final do protocolo TE. Além disso, sessões repetidas de exercícios diminuem a taxa de dano muscular (MCHUGH, 2013), especialmente em indivíduos treinados (VINCENT; VINCENT, 1997; PIZZA et al., 1996; PIZZA et al. 2001). Essa adaptação poderia contribuir para a ausência de alteração na expressão de MyoD.

A MEC é fundamental para a transmissão, manutenção e recuperação das forças das fibras musculares, bem como contribui para o seu remodelamento (GILLIES; LIEBER 2011; WANG; TANG 2016; KITIKAKI et al., 2021). Em contraste, disfunções nos componentes da MEC acarretam anormalidade no remodelamento muscular (LUKJANENKO et al., 2016). Tendo em vista que a má ancoragem da fibra muscular à MEC é um dos fatores envolvidos nas disfunções musculares observadas na SMF (PYERITZ, 2000), de fato observamos maior quantidade de fibras musculares que perderam o seu formato poligonal no grupo SMF controle, o que está em conformidade com o fenótipo muscular encontrado no músculo tibial

anterior de animais modelo para a SMF (C1039G): grande quantidade de fibras musculares fragmentadas e atroficas e fibrose endomisial (COHN et al., 2007). Mutações no gene da FBN1 alteram a estrutura e função de seu transcrito (CAÑADAS et al., 2010), prejudicando, por exemplo, a ancoragem da membrana basal da fibra muscular na MEC (PYERITZ, 2000). Nessa perspectiva, é possível sugerir que TE reverteu o número de fibras sem formato poligonal nos camundongos SMF treinados para uma quantidade similar à do grupo WT controle. Este efeito pode ter sido promovido pela manutenção de elementos da MEC em níveis normais, tal como a fibronectina (COSTA et al., 2009), contribuindo assim, para um adequado remodelamento do músculo esquelético de camundongos SMF (LUKJANENKO et al., 2016).

A fibronectina é uma glicoproteína pertencente à MEC, sendo utilizada como substrato de adesão das células satélite à MEC (KRITIKAKI et al., 2021). As propriedades adesivas da fibronectina são essenciais ao bom funcionamento das células satélite, proporcionando apropriado reparo e regeneração muscular (KRITIKAKI et al., 2021). Em adição, foi demonstrado que a superexpressão de fibronectina induz o rejuvenescimento muscular esquelético (LUKJANENKO et al., 2016). Além disso, tem sido evidenciado que a fibronectina previne a inibição da proliferação de mioblastos mediada pela miostatina – molécula envolvida em processos de degradação proteica (MIURA et al., 2006; MIURA et al., 2010). Por outro lado, a ausência da fibronectina induz anormalidades na MEC, e consequente, disfunção muscular esquelética (SUMMERS et al., 2005; KNOBLAUCH et al., 2007). Além do mais, foi demonstrado que a perda de fibronectina no nicho das células satélite reduziu a capacidade regenerativa musculoesquelética em camundongos idosos (LUKJANENKO et al., 2016). Na ausência do seu substrato de adesão (fibronectina), as células satélite morrem por anoikis, indicando que a composição normal da MEC promove a adequada remodelação tecidual (LUKJANENKO et al., 2016). Neste sentido, a reduzida expressão proteica de fibronectina em músculos acometidos com SMF pode ter comprometido a adesão das fibras musculares à MEC, bem como a integridade do sarcolema, contribuindo assim para a perda do formato poligonal das fibras musculares.

Estudos prévios tem relatado aumento da expressão de fibronectina em jovens saudáveis após treinamento físico (NORHEIM et al., 2011; TIMMON et al., 2010; VALDIVIESO et al., 2017). No entanto, o efeito do treinamento físico sobre a expressão de fibronectina em condições sarcopênicas não é conhecido (KRITIKAKI et al., 2021). Nossos dados demonstram que o TE preveniu a queda na expressão de fibronectina nos camundongos

SMF, os quais corroboram estudo prévio que associa a manutenção da expressão proteica de fibronectina, em condições histológicas normais após TE, com a preservação da integridade do sarcolema (COSTA et al., 2009), o que potencialmente pode ter contribuído para a manutenção do formato poligonal das fibras musculares em camundongos SMF treinados.

Mutações no gene que codifica a FBN1 mostraram uma ligação causal relevante com os sintomas musculares observados na SMF (SAKAI et al., 1986; ZHANG et al., 1995), em que o distúrbio do tecido conjuntivo foi identificado como a causa mais relevante de anormalidades funcionais do músculo esquelético, em vez de alterações nas fibras musculares (BEHAN et al., 2003). Fenotipicamente, o modelo animal de SMF adotado em nosso estudo apresenta fibrose muscular (TOMAZ DA SILVA ET AL., 2023). Nessa perspectiva, foi avaliado no presente estudo se o TE é capaz de reduzir o percentual de tecido conjuntivo intramuscular em camundongos afetados pela SMF. Uma porcentagem aumentada de tecido conjuntivo intramuscular foi observada nos camundongos SMF. Em contraste, o TE manteve a porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular em camundongos SMF semelhante à dos camundongos WT. Este resultado sugere que o TE é capaz de reduzir o nicho fibrótico, causado por mutações na FBN1. Além disso, é possível que este efeito seja mediado pela redução nos níveis de biomarcadores da inflamação (NOURA et al., 2020; LOMIWES et al., 2023) observados na condição SMF (LIMA et al., 2010).

Antes de detalharmos os fatores inflamatórios possivelmente associados à fibrose na condição SMF, é importante entendermos as características gerais da fibrose. Caracterizada como um acúmulo excessivo de componentes da MEC, a fibrose decorre de uma produção ou uma degradação exacerbada de MEC, ou mesmo a associação de ambos os fatores mencionados (ALAMEDDINE; MORGAN 2016; GILLIES; LIEBER 2011). Comumente observada em condições distróficas, pós-lesão muscular e no envelhecimento, a fibrose compromete a estrutura e função muscular esquelética (SERRANO; MUÑOZ-CÁNOVES 2017; WANG; TANG 2016; DELANEY et al. 2017; JÄRVINEN et al., 2002).

Em condições distróficas, como no caso da distrofia muscular de Duchenne, os músculos exibem o acúmulo de fatores profibróticos, tais como TGF- $\beta$  e CTGF (*Connective tissue growth factor*) e citocinas (CICILIOT; SCHIAFFINO 2010; SERRANO; MUÑOZ-CÁNOVES 2017; MORALES et al. 2018; SMITH; BARTON 2018). No músculo idoso, a fibrose decorre de alterações no microambiente muscular: alterações na população e na sinalização celular e na regulação de fatores de crescimento (SERRANO et al. 2011; ZHOU

et al. 2017). Além de redução da capacidade miogênica das células satélite, devido ao aumento dos níveis de IL-6, e maior tendência à conversão das células satélite a uma linhagem fibrogênica (FORCINA et al. 2018; BRACK et al., 2007; CICILIOT; SCHIAFFINO 2010; VON MALTZAHN et al., 2012). Ademais, a fibrose muscular tem sido associada ao processo inflamatório. Em condições de lesão muscular, por exemplo, células capazes de fagocitar debris celulares são recrutadas para o local da lesão e, então, auxiliam no processo de regeneração (BERSINI et al. 2018; TIDBALL 2005; TIDBALL; WELC 2015). Estas células são denominadas neutrófilos, um tipo de leucócitos que defende o organismo de infecções e da inflamação (LEHMAN et al., 2020). Os neutrófilos secretam citocinas quimioatrativas, as quais estimulam a infiltração de macrófagos (SOEHNLEIN et al. 2009; MANN et al., 2011; SACLIER et al., 2013; SERRANO et al., 2011).

Há dois fenótipos de macrófagos que atuam no processo de fibrose muscular: M1 e M2. Macrófagos M1 secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como a TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alpha*) e a IL-6 (interleucina 6), as quais estimulam a proliferação fibroblástica (OGLE et al., 2016; SACLIER et al., 2013; WANG et al., 2018; BERSINI et al. 2018; PEDERSEN et al., 2001). Por outro lado, macrófagos M2 produzem TGF- $\beta$ 1 e fibronectina (SACLIER et al. 2013, WANG et al. 2018). O desequilíbrio de ativação entre macrófagos M1 e M2 é decorrente da superexpressão de TGF- $\beta$ 1 e, conseqüente, ativação de fibroblastos que inibem a apoptose das células progenitoras fibroadipogênicas (FAPs), promovendo a sua diferenciação em uma linhagem fibrogênica, o que induz excessiva deposição de MEC e, conseqüentemente, o desenvolvimento da fibrose (ARNOLD et al., 2007; PERANDINI et al., 2018; LEMOS et al. 2015). Os músculos acometidos com SMF não apresentaram alteração da expressão de *WISP-1* e *IL33*, os quais são secretados por FAPs, o que está de acordo com trabalho prévio que demonstrou ausência de alteração da quantidade dessas células imunomarcadas em tecido muscular de animais SMF (TOMAZ DA SILVA et al., 2023). Considerando que o TE modulou a expressão de *WISP-1* e *IL-33* em músculos de camundongos com SMF em comparação àqueles do grupo WT, estudos sistemáticos seriam necessários para a melhor compreensão do efeito do TE sobre a função das FAPs em músculos afetados pela SMF. A inflamação contribui para o desenvolvimento de várias características da SMF, tais como luxação do cristalino, escoliose, contratura do cotovelo, crescimento excessivo das costelas e dilatação da raiz da aorta (RADONIC et al., 2012). Além do mais, fatores inflamatórios associados a fatores genéticos predisõem as disfunções teciduais observadas na condição SMF (RADONIC et al., 2012; BLACK et al., 2017; SOTO

et al., 2018). Previamente foi evidenciado um número aumentado de células CD68+, CD4+ e CD8+ (marcadores de macrófagos, células T auxiliares e células T citotóxicas, respectivamente) em pacientes SMF com dilatação da raiz da aorta (SOTO et al., 2018). De maneira similar, nós evidenciamos aumento da imunoexpressão de Ly6G+ (marcador de neutrófilo) e CD11b+ (marcador de macrófago) no músculo esquelético de camundongos SMF. Esse resultado sugere o desenvolvimento de condição inflamatória crônica em músculo esquelético afetado pela SMF, como foi previamente demonstrado nos pulmões de animais modelo da SMF (SMF<sup>Fmg $\Delta$ LoxPneo</sup>) (LIMA et al., 2010). Considerando que a inflamação agrava as alterações cardiovasculares, oftálmicas e esqueléticas em pacientes SMF (RADONIC et al., 2012), é possível que a persistência da expressão de biomarcadores celulares inflamatórios, observada em camundongos SMF, possa agravar as disfunções musculoesquelética da doença, tendo em vista que quantidades elevadas de células inflamatórias contribuem, por exemplo, para o desenvolvimento de fibrose (LECH; ANDERS, 2013). Além do mais, quantidades aumentadas de células Ly6G+ e CD11b+ em células pulmonares de camundongos foram positivamente correlacionadas ao aumento dos níveis séricos de S100A8/A9 em camundongos induzidos à tuberculose crônica, uma doença inflamatória (SCOTT et al., 2020).

Secretados por macrófagos e neutrófilos, os níveis séricos dos transcritos de S100A8/A9 estão elevados em doenças inflamatórias, tais como doenças intestinais, artrite reumatoide, fibrose cística, doença autoimune e vários tipos de câncer (SHABANI et al., 2018). Sendo assim, as S100A8/A9 são consideradas biomarcadores de processo inflamatório (OPPENHEIM et al., 2005; ZHANG et al., 2008; SHABANI et al., 2018). No presente estudo, a expressão gênica de S100A8/A9 aumentou robustamente em músculos acometidos com SMF. Esse resultado sugere uma predisposição inflamatória associada à disfunção muscular esquelética na SMF, pois as S100A8/A9 atuam de maneira semelhante à citocinas desencadeando uma série de sinalizações intracelulares envolvidas na resposta inflamatória (SHABANI et al., 2018). Além do mais, as S100A8/A9 estimulam a liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e metaloproteases de matriz (NUKUI et al., 2008; MUNN, 2017; MARELLI et al., 2017). Especificamente, a ligação das S100A8/A9 aos receptores RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) e TLR4 (*Toll-like receptor 4*) pode ativar o TLR (*Toll-like receptor*), culminando, por exemplo, em aumento da expressão gênica e proteica de TNF- $\alpha$  e IL-6 (NUKUI et al., 2008). No presente estudo, a expressão gênica destas citocinas proinflamatórias foi elevada em músculos afetados com SMF.

Citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, podem ativar macrófagos e neutrófilos, estabelecendo um mecanismo de *feedback* positivo que intensifica a inflamação (SIMS et al., 2010; XIA et al., 2018; WU et al., 2022).

Nossos dados sugerem que o TE reduziu a inflamação de músculos acometidos com SMF, pois houve diminuição do número de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> e macrófagos CD11b<sup>+</sup> no tecido muscular mediado pela redução dos níveis de expressão de *S100A8/9*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6* e *IL-10*. Em consonância com esses resultados, foi demonstrado que o TE diminui o número de células e mediadores inflamatórios, incluindo monócitos e citocinas (NOURA et al., 2020; LOMIWES et al., 2023). É possível que os reduzidos níveis de fatores inflamatórios nos músculos acometidos com SMF exercitados tenham sido modulados pelas sRAGE, uma forma solúvel dos receptores RAGE para as S100A8/A9. A sRAGE atua inibindo ou ativando esses receptores. Como previamente observado por Drosatos et al. (2021) em seus estudos com o treinamento físico convencional de 4 semanas executado por indivíduos saudáveis e em seus estudos *in vitro*, estima-se que o TE reduz os níveis de sRAGE e, conseqüentemente, os níveis de RAGE, inviabilizando, assim, a ação das S100A8/A9. Outra possibilidade é que a concentração de sRAGE obtida após o TE tenha sido capaz de inibir ou atenuar a interação entre as S100A8/A9 e o seu receptor de membrana RAGE, inviabilizando assim o mecanismo de *feedback* positivo mediado por citocinas inflamatórias, neutrófilos e macrófagos. Essa possível adaptação ao TE pode ter contribuído para a redução do nicho fibrótico muscular nos camundongos SMF treinados. Além disso, foi previamente demonstrado que o protocolo de TE utilizado no presente estudo diminui os níveis proteicos de TNF- $\alpha$  em músculos de camundongos submetidos à lesão por esmagamento do nervo ciático (MARTINS et al., 2018). Esses resultados sugerem que o TE reduz a inflamação muscular em camundongos com SMF sendo uma potencial estratégia de tratamento antiinflamatório para reduzir a gravidade da SMF.

Em relação às limitações do estudo, a principal consiste da reduzida quantidade de animais disponíveis para a realização dos experimentos. Estima-se que um N amostral maior possa superar a heterogeneidade associada à SMF (LIMA et al., 2010). Além disso, a taxa de natalidade desses animais é muito baixa, mesmo não sendo identificados problemas reprodutivos (LIMA et al., 2010). Soma-se a isso um baixo índice de animais mutantes MFS<sup>mgAloxPneo</sup> por prole identificados nos testes de genotipagem. Em adição, as complicações cardiovasculares (não tratadas) intrínsecas à SMF, podem ter contribuído para a taxa de mortalidade elevada e precoce. Vale mencionar, que a ausência de alterações na massa

muscular em camundongos SMF submetidos ao TE pode estar associada à heterogeneidade fenotípica da doença.

## **7 CONCLUSÃO**

O presente estudo sugere que o TE (corrida em declive) melhora a morfologia das fibras musculares, atenua a fibrose e a inflamação de músculos afetados pela SMF. Além disso, nossos dados sugerem que estes efeitos benéficos do TE são mediados pela recuperação da expressão de fibronectina e redução da expressão de *S100A8* e *S100A9*. Sendo assim, o TE pode ser considerado uma estratégia terapêutica para o tratamento de disfunções musculares em animais modelo da SMF e futuros estudos deveriam investigar se o TE melhora a função muscular, bem como a qualidade de vida de pacientes com SMF.

## 8 REFERÊNCIAS\*

- AGUIAR JR, A. S. *et al.* Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training. **Neuroscience Letters**, v.426, n. 3, p.171–174, 2007.
- AGUIAR JR, A. S. *et al.* Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. **Journal of Neural Transmission**, v.115, n. 9, p.1251–1255, 2008.
- AHTIAINEN, J. P. *et al.* Strength, endurance or combined training elicit diverse skeletal muscle myosin heavy chain isoform proportion but unaltered androgen receptor concentration in older men. **International Journal of Sports Medicine**, v. 30, n. 12, p. 879–887, 2009.
- ALAMEDDINE, H.S.; MORGAN, J.E. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in inflammation and fibrosis of skeletal muscles. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 3, n. 4, p. 455–473, 2016.
- AOKI, M. S. *et al.* Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle and Nerve**, v. 40, n. 6, p. 992-9, 2009.
- ARNOLD L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, n. 5, p.1 057–1069, 2007.
- BARCELLOS-HOFF, M. H. Latency and activation in the control of TGF-beta. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, n. 4, p. 353-363, 1996.
- BARRISON, I. G.; ISENBERG, D. A.; KANE, S. P. Arachnodactyly with unusual neuromyopathic and skeletal abnormalities. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 73, n. 1, p. 64-68, 1979.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 19-37, 2006.
- BEHAN, W. M. *et al.* Muscle fibrillin deficiency in Marfan's syndrome myopathy. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 74, n. 5, p. 633–638, 2003.
- BENKE, K. *et al.* The effects of acute and elective cardiac surgery on the anxiety traits of patients with Marfan syndrome. **BioMed Central Psychiatry**, v. 17, n.1, p. 253, 2017.
- BENKE, K. *et al.* The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome, **Cardiology Journal**, v. 20, n. 3, p. 227–234, 2013.
- BERSINI S. *et al.* Tackling muscle fibrosis: from molecular mechanisms to next generation engineered models to predict drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.129, p.64–77, 2018.

---

\* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 74 p.

- BESSION D. *et al.* Eccentric training in chronic heart failure: Feasibility and functional effects. Results of a comparative. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 56, n.1, p. 30–40, 2013.
- BIERNACKA, A.; DOBACZEWSKI, M.; FRANGOIANNIS, N. G. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. **Growth Factors**, v. 29, n. 5, p. 196–202, 2011.
- BITTERMAN, A. D.; SPONSELLER, P. D. Marfan Syndrome: A Clinical Update. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 25, n. 9, p. 603-609, 2017.
- BLACK, R. L. *et al.* Abstract 249: Potential Tissue-specific Interactions Between Inflammation and Canonical TGF- $\beta$  Signaling in Marfan Syndrome. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.37, A249, 2017.
- BRACK, A. S. *et al.* Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. **Science**, v. 317, n 5839, p.807–810, 2007.
- BOLLERO, P. *et al.* Marfan Syndrome: oral implication and management. **ORAL and Implantology**, v. 10, n. 2, p. 87-96, 2017.
- BOWEN, T. S.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Skeletal Muscle Wasting in Cachexia and Sarcopenia: Molecular Pathophysiology and Impact of Exercise Training. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, n. 3, p. 197-207, 2015.
- BRAGA, M. *et al.* Testosterone inhibits transforming growth factor- $\beta$  signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: potential role of follistatin in mediating testosterone action. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 350, n. 1, p. 39–52, 2012.
- BRANTON, M. H.; KOPP, J. B. TGF- $\beta$  and fibrosis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 15, p. 1349-1365, 1999.
- BROWN, O. R. *et al.* Aortic root dilatation and mitral valve prolapse in Marfan's syndrome: an ECHOCARDIO graphic study. **Circulation**, v. 52, n. 4, p. 651-657, 1975.
- BURKS, T. N.; COHN, R. D. Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 19, 2011.
- CALIÓ E BERTONCINI. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. 2ª Ed. Capítulo 25. Ateneu. 2018.
- CALL, J. A. *et al.* Adaptive strength gains in dystrophic muscle exposed to repeated bouts of eccentric contraction. **Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 6, p. 1768-1777, 2011.
- CAÑADAS, V. *et al.* Marfan syndrome. Part 1: pathophysiology and diagnosis. **Nature reviews. Cardiology**, v. 7, n. 5, p. 256-265, 2010.
- CAROSIO, S. *et al.* Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing Research Reviews**, v.10, n. 1, p. 35–42, 2011.
- CESARI, M. *et al.* Skeletal muscle and mortality results from the InCHIANTI Study. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 3, p. 377–384, 2009.

- CICILIOT, S., SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 8, p. 906–914, 2010.
- CHAABENE, H. *et al.* Change of direction speed: toward a strength training approach with accentuated eccentric muscle actions. **Sports Medicine**, v. 48, n. 8, p. 773–779, 2018.
- CHAZAUD, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.
- CHAZAUD, B. *et al.* Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 5, p. 1133-1143, 2003.
- CHIU, H. H. *et al.* Epidemiological Profile of Marfan Syndrome in a General Population: A National Database Study. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n.1, p. 34-42, 2014.
- CHUNG, A. W. *et al.* Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. **Circulation Research**. v. 101, n. 5, p. 512–522, 2007.
- CLARK, D. J.; PATTEN, C. Eccentric versus concentric resistance training to enhance neuromuscular activation and walking speed following stroke **Neurorehabil. Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 27, n. 4, p. 335–344, 2013.
- COHN, R. D. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. **Nature Medicine**, v. 13, n. 2, p. 204-210, 2007.
- COHN, R.; DIETZ, H. C. Molecular pathogenesis of skeletal muscle abnormalities in marfan syndrome. **In Muscle**, v. 2, p. 995-1001, 2012.
- COSTA, A. *et al.* Impact of repeated bouts of eccentric exercise on sarcolemma disruption in human skeletal muscle. **Acta Physiologica Hungarica**, v.96, n. 2, p. 189-202, 2009.
- COURTOY, G. E. *et al.* Digital Image Analysis of Picrosirius Red Staining: A Robust Method for Multi-Organ Fibrosis Quantification and Characterization. **Biomolecules**. v.10, n.11, p.1585, 2020.
- CROISIER, J. L. *et al.* An isokinetic eccentric programme for the management of chronic lateral epicondylar tendinopathy. **Br. J. British journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 269–275, 2007.
- CROISIER, J. L. *et al.* Strength imbalances and prevention of hamstring injury in professional soccer players: a prospective study. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 8, p. 469–475, 2008.
- DA ROCHA, A. L. *et al.* Treadmill Slope Modulates Inflammation, Fiber Type Composition, Androgen, and Glucocorticoid Receptors in the Skeletal Muscle of Overtrained Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1378, 2017.
- DE BIE, S. *et al.* Marfan syndrome in Europe. A questionnaire Study on Patients Perceptions. **Community Genetics**. v. 7, n. 4, p. 216-225, 2004.

- DE COSTER, P. J.; MARTENS, L. C.; DE PAEPE, A. Orofacial manifestations of congenital fibrillin deficiency: pathogenesis and clinical diagnostics. **Pediatric Dentistry**, v. 26, n. 6, p. 535-537, 2004.
- DELANEY, K. *et al.* The role of TGF- $\beta$ 1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biology International**, v. 41, n.7, p.706–715, 2017.
- DE PAEPE, A. *et al.* Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 62, n. 4, p. 417–426, 1996.
- DIETZ, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. **Nature**, v. 352, n. 6333, p. 337-339, 1991.
- DIETZ, H. C. Marfan syndrome: From molecules to medicines. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 662-7, 2007.
- DOBIN, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2013.
- DOUGLAS, J. *et al.* Chronic Adaptations to Eccentric Training: A Systematic Review. **Sports Medicine**, v. 47, n. 5, p. 917–941, 2017.
- DROSATOS, I. A. *et al.* Differential Regulation of Circulating Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGEs) and Its Ligands S100A8/A9 Four Weeks Post an Exercise Intervention in a Cohort of Young Army Recruit. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, 2021.
- ELIASSON, J. *et al.* Maximal lengthening contractions increase p70 S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 6, p. 1197-205, 2006.
- ENGARDT, M. *et al.* Dynamic muscle strength training in stroke patients: effects on knee extension torque, electromyographic activity, and motor function. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 76, n. 5, p. 419–425, 1995.
- ENOKA, R. M. Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, n. 6, p. 2339-2346, 1996.
- ESTON, R. G.; Mickleborough, J.; Baltzopoulos, V. Eccentric activation and muscle damage: biomechanical and physiological considerations during downhill running. **British Journal of Sports Medicine**. v. 29, n. 2, p. 89–94, 1995.
- ERENTUĞ, V. *et al.* Cardiovascular manifestations and treatment in Marfan syndrome. **Anadolu Kardiyoloji Dergisi: AKD = The Anatolian Journal of Cardiology**, v. 5, n. 1, p. 46-52, 2005.
- FAIVRE, L. *et al.* Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 454-466, 2007.
- FANG, Y. *et al.* Distinct brain activation patterns for human maximal voluntary eccentric and concentric muscle actions. **Brain Research**, v. 1023, n. 2, p. 200–212, 2004.
- FENGHAO, M. *et al.* The effectiveness of low intensity exercise and blood flow restriction without exercise on exercise induced muscle damage: A systematic review. **Physical therapy**

**in sport: official journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v.46, p.77-88, 2020.

FIORE, D. *et al.* Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 161-169, 2016.

FORCINA, L.; MIANO, C.; MUSARO, A. The physiopathologic interplay between stem cells and tissue niche in muscle regeneration and the role of IL-6 on muscle homeostasis and diseases. **Cytokine and growth factor reviews**, v. 41, p.1-9, 2018.

FORTHOMME, B. *et al.* Shoulder pain among high-level volleyball players and preseason features. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 10, p. 1852-60, 2013.

FRANCHI, M. V. *et al.* Architectural, functional and molecular responses to concentric and eccentric loading in human skeletal muscle. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 3, p. 642-54, 2014.

FRANCHI, M. V. *et al.* Skeletal muscle remodeling in response to eccentric vs. concentric loading: morphological, molecular, and metabolic adaptations. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 447, 2017.

FRANKEN, R. *et al.* Marfan syndrome: progress report. **Progress in Pediatric Cardiology**, v. 34, p. 9-14, 2012.

FRANKEN, R. *et al.* Mulder, Circulating transforming growth factor-beta as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 3, p. 2441-2446, 2013.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p.183-95, 2015.

FUTCHER, P. Arachnodactyly and its medical complications. **Archives Internal Medicine**, v. 61, n. 5, p. 693-703, 1938.

GAULT, M. L.; WILLEMS, M. E. Aging, functional capacity and eccentric exercise training. **Aging and Disease**, v. 4, n. 6, p. 351-363, 2013.

GENTRY, B. A. *et al.* Hindlimb skeletal muscle function in myostatin deficient mice. **Muscle and Nerve**, v. 43, n. 1, p. 49-57, 2011.

GERBER, J. P. *et al.* Safety, feasibility, and efficacy of negative work exercise via eccentric muscle activity following anterior cruciate ligament reconstruction. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 37, n. 1, p. 10-8, 2007.

GERBER, J. P. *et al.* Effects of early progressive eccentric exercise on muscle size and function after anterior cruciate ligament reconstruction: a 1-year follow-up study of a randomized clinical trial. **Physical Therapy**, v. 89, n. 1, p. 51-59, 2009.

GIANNI, B. Protein metabolism and requirements. **Nutrition in Intensive Care Medicine: Beyond Physiology**, v. 105, p. 12-20, 2013.

GILLIES, A. R. *et al.* High resolution three-dimensional reconstruction of fibrotic skeletal muscle extracellular matrix. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 4, p. 1159-1171, 2017.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318–331, 2011.

GISKE, L. *et al.* Pulmonary function, working capacity and strength in young adults with Marfan syndrome. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 35, n. 5, p. 221–228, 2003.

GOEBEL, H. H.; MULLER, J.; DEMYER, W. Myopathy associated with Marfan's syndrome. Fine structural and histochemical observations. **Neurology**, v. 23, n. 12, p. 1257–1268, 1973.

GREFTE, S. *et al.* Skeletal muscle: Development and regeneration. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 5, p. 857-868, 2007.

GRGIC, J. *et al.* Does Aerobic Training Promote the Same Skeletal Muscle Hypertrophy as Resistance Training? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine**, v. 49, n. 2, p. 233-254, 2019.

GUILHEM, G.; CORNU, C.; GUEVEL, A. Neuromuscular and muscle-tendon system adaptations to isotonic and isokinetic eccentric exercise. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 53, n. 5, p. 319–341, 2010.

HA, H. I. *et al.* Imaging of Marfan syndrome: multisystemic manifestations. **Radiographics**, v. 27, n. 4, p. 989-1004, 2007.

HAINÉ, E. *et al.* Muscle and Bone Impairment in Children With Marfan Syndrome: Correlation With Age and FBN1. Genotype Journal of bone and mineral research : **The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 8, p. 1369-1376, 2015.

HANELINE, M.; LEWKOVICH, G. N. A narrative review of pathophysiological mechanisms associated with cervical artery dissection. **The Journal of the Canadian Chiropractic Association**, v. 51, n. 3, p.146-157, 2007.

HASAN A.; POLONIECKI J.; CHILD A. Aging in Marfan syndrome. **International Journal of Clinical Practice**, v. 6, n. 8, p. 1308-1320, 2007.

HIGBIE, E. J. *et al.* Effects of concentric and eccentric training on muscle strength, cross-sectional area, and neural activation. **J. Journal of Applied Physiology**, v. 81, n. 5, p. 2173–2181, 1996.

HOPPELER, H.; HERZOG, W. Eccentric exercise: many questions unanswered. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 11, p. 405–406, 2014.

HOPPELER, H. Eccentric Exercise: Physiology and Application in Sport and Rehabilitation. Aug 2014.

HONDA, Y. *et al.* A case of Marfan's syndrome phenotype associated with neurogenic muscle atrophy. **The Kurume Medical Journal**, v. 38, n. 4, p. 275–279, 1991.

HORTOBAGYI, T.; LAMBERT, N. J.; HILL, J. P. Greater cross education following training with muscle lengthening than shortening. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 29, n. 1, p. 107–112, 1997.

- HUANG DA, W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.
- HYLDAHL, R. D.; HUBAL, M. J. Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. **Muscle and Nerve**, v. 49, n. 2, p. 155-170, 2014.
- HYLDAHL, R. D. *et al.* Extracellular matrix remodeling and its contribution to protective adaptation following lengthening contractions in human muscle. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 29, n. 7, p. 2894–2904, 2015.
- ISNER-HOROBETI, M. E. *et al.* Eccentric Exercise training: modalities, applications and perspectives. **Sports Medicine**, v. 43, n. 6, p. 483-512, 2013.
- IZQUIERDO, M. *et al.* Once weekly combined resistance and cardiovascular training in healthy older men. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 36, n. 3, p. 435–443, 2004.
- JADRO-SANTEL, D. *et al.* Centronuclear myopathy with type I fibre hypotrophy and “fingerprint” inclusions associated with Marfan’s syndrome. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 45, n. 1, p. 43–56, 1980.
- JANSSEN, I. *et al.* Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 1, p. 81-8, 2000.
- JÄRVINEN, T. A. *et al.* Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 23, n. 3, p. 245–254, 2002.
- JOE, A. W. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. **Nature cell biology**, v.12, n. 2, p.153–163, 2010.
- JONES, D.; ROUND, J.; DE HAAN, A. Skeletal Muscle: from molecules to movement. Edinburgh, 2004.
- JONES, J. A.; IKONOMIDIS, J. S. The pathogenesis of aortopathy in Marfan syndrome and related diseases. **Current Cardiology Reports**, v. 12, p. 99-107, 2010.
- JUDGE, DIETZ R. E. The Marfan syndrome. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 481-510, 2000.
- JUDGE, D. P. *et al.* Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 172-181, 2004.
- JUDGE, D. P.; DIETZ, H. C. Marfan’s syndrome. **Lancet**, v.366, n. 9501, p. 1965-76, 2005.
- Junqueira, L.; Carneiro J. Histologia Básica. 11° Ed. Guanabara Koogan, 2008
- KAINULAINEN, K. *et al.* Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 14, p. 935-959, 1990.

KARAGOUNIS, G.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle: Increasing the size of the locomotor cell. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 9, p. 1376-1379, 2010.

KASTENSCHMIDT, J. M. *et al.* A stromal progenitor and ILC2 niche promote muscle eosinophilia and fibrosis-associated gene expression. **Cell Reports**. v.35, n.2, p. 108997, 2021.

KIM, K. K.; SHEPPARD, D.; CHAPMAN, H. A. TGF- $\beta$ 1 Signaling and Tissue Fibrosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, 2018.

KJAER, M.; HEINEMEIER, K. M. Eccentric exercise: acute and chronic effects on healthy and diseased tendons. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 11, p. 1435–1438, 2014.

KITIKAKI, E. *et al.* Exercise Training-Induced Extracellular Matrix Protein Adaptation in Locomotor Muscles: A Systematic Review. **Cells**, v.10, p.1022, 2021.

KNOBLAUCH, A. *et al.* The binding of Mss4 to alpha-integrin subunits regulates matrix metalloproteinase activation and fibronectin remodeling. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 2, p. 497-510, 2007.

KONOW, N.; ROBERTS, T. J. The series elastic shock absorber: tendon elasticity modulates energy dissipation by muscle during burst deceleration. **Proceedings Biological Sciences**, v. 282, n. 1804, p. 20142800, 2015.

KUMAR, V. *et al.* Age-related differences in the dose–response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. **The Journal of physiology**, v. 587, n.1, p. 211-217, 2009.

KUMAR, P.; GUPTA, D.; SAGAR, R. K. A rare combination of Marfan’s syndrome, rheumatic heart disease and muscular dystrophy – a case report. **Indian Heart Journal**, v. 46, n. 6, p. 351-352, 1994.

KUSWANTO, W. *et al.* Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. **Immunity**, v. 44, n. 2, p. 355-367, 2016.

LASTAYO, P. *et al.* Eccentric exercise in rehabilitation: safety, feasibility, and application. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 11, p. 1426–1434, 2014.

LASTAYO, P. C. *et al.* The positive effects of negative work: increased muscle strength and decreased fall risk in a frail elderly population. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 58, n. 5, p. M419–424, 2003a.

LASTAYO, P. C. *et al.* Chronic eccentric exercise: improvements in muscle strength can occur with little demand for oxygen. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 2, p. R611–615, 1999.

LASTAYO, P. C. *et al.* Eccentric muscle contractions: their contribution to injury, prevention, rehabilitation, and sport. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 33, n. 10, p. 557–71, 2003b.

- LAURENTINO, G. C. *et al.* Strength training with blood flow restriction diminishes myostatin gene expression. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 3, p. 406-412, 2012.
- LAZARRIN, M. C. *et al.* Duchenne muscular dystrophy progression induced by downhill running is accompanied by increased endomysial fibrosis and oxidative damage DNA in muscle of mdx mice. *Journal of molecular histology*, v.54, n.1, p. 41-54, 2023.
- LECH, M.; ANDERS, H. J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, p. 989-997, 2013.
- LEE, C. H.; INOKI, K.; GUAN, K. L. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 443-467, 2007.
- LEGÅRD, G. E.; PEDERSEN, B. K. Muscle and Exercise Physiology. In. Chapter 13 - Muscle as an Endocrine Organ. Academic Press, 2019. 285-307p.
- LEHMAN, H. K.; SEGAL, B. H. The role of neutrophils in host defense and disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 145, n. 6, p. 1535-1544, 2020.
- LEMOS, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, p.786–794, 2015.
- LEMOS, D. R. *et al.* Functionally convergent white adipogenic progenitors of different lineages participate in a diffused system supporting tissue regeneration. **Stem Cells**, v. 30, n. 6, p. 1152-62, 2012.
- LI, Y. *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle-A key event in muscle fibrogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 3, p. 1007-1019, 2004.
- Lieber, R. L. Skeletal muscle structure, function and plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Lippincott Williams and Wilkins, 3<sup>rd</sup> Ed. The Point, 2002. 369p.
- Lima, B. L. *et al.* A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. **PLoS One**, v. 5, n.11, p. e14136, 2010.
- LINDSTEDT, S. L.; LASTAYO, P. C.; REICH, T. E. When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. **News in Physiological Sciences**, v. 16, p. 256–261, 2001.
- LINDSTEDT, S. L. *et al.* Do muscles function as adaptable locomotor springs? **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. Pt 15, p. 2211–2216, 2002.
- LOMBARDI, V.; PIAZZESI, G. The contractile response during steady lengthening of stimulated frog muscle fibres. **The Journal of Physiology**, v. 431, p. 141-171, 1990.
- LOMIWES, D. *et al.* Characterising the Cytokine and Circulating Immune Cell Response After a Single Bout of Eccentric Stepping Exercise in Healthy Untrained Males. **Journal of Science in Sport and Exercise**, p. 1-13, 2023.

- LUKJANENKO, L. *et al.* Loss of fibronectin from the aged stem cell niche affects the regenerative capacity of skeletal muscle in mice. **Nature Medicine**, v.22, n. 8, p. 897-905, 2016.
- LUKJANENKO, L. *et al.* Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 3, p. 433-446.e437, 2019.
- MA, C. *et al.* Irisin: A New Code Uncover the Relationship of Skeletal Muscle and Cardiovascular Health During Exercise. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 620608, 2021
- MACKEY, A. L. *et al.* Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 25, n. 6, p. 1943–1959, 2011.
- MAHDY, M. A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell and tissue research*. v. 375, n.3, p. 575-588, 2019.
- MAEO, S. *et al.* Neuromuscular Adaptations to Work-matched Maximal Eccentric versus Concentric Training. **American College of Sports Medicine**, v. 50, n. 8, p. 1629–1640, 2018.
- MANN, C. J. *et al.* Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, v.1, n.1, p. 21, 2021.
- MASSAGUÉ, J.; SEOANE, J.; WOTTON, D. Smad transcription factors. **Genes and Development**, v.19, n. 23, p. 2783–810, 2005.
- MASSAGUÉ, J. TGF- $\beta$  signalling in context. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 616-630, 2012.
- MARON, B. J. *et al.* Impact of laboratory molecular diagnosis on ontemporary diagnostic criteria for genetically transmitted cardiovascular diseases: hypertrophic cardiomyopathy, long QT syndrome and Marfan syndrome. **Circulation**, v. 98, n. 14, p. 1460-1471, 1998.
- MARTINS, D. F. *et al.* Long-Term Regular Eccentric Exercise Decreases Neuropathic Pain-like Behavior and Improves Motor Functional Recovery in an Axonotmesis Mouse Model: the Role of Insulin-like Growth Factor-1. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 6155-6168, 2018.
- MATHIEUM, O. *et al.* Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. **Journal of Microscopy**, v. 121, n. 1, p. 75-88, 1981.
- MATT, P. *et al.* Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. **Circulation**, v. 120, n. 6, p. 526-532, 2009.
- MARELLI, G. *et al.* Inflammation as target in cancer therapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 35, p. 57-65, 2017.
- MARUYAMA, K.; WADA, Y.; YANAGISAWA, N. A probable case of adult type cerebral leukodystrophy with Marfanoid symptom presenting cerebellar ataxia and mental detardation. **Clinical Neurology (Tokyo)**, v. 27, 1987.

- MENDIAS, C. L. *et al.* Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogin-1 and scleraxis. **Muscle and Nerve**, v. 45, n. 1, p. 55–59, 2012.
- MENG, X. M.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H. Y. TGF-  $\beta$ : The master regulator of fibrosis. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 12, n. 6, p. 325–338, 2016.
- MIURA, T. *et al.* Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 340, n. 2, p. 675-680, 2006.
- MIURA, T. *et al.* Interaction between myostatin and extracellular matrix components. **Animal science journal**. v. 8, n. 1, p. 102-107, 2010.
- MCHUGH, M. P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. **Scandinavian journal of medicine and science in sports**, v.13, n. 2, p.88-97, 2003.
- MIKKOLA, J. *et al.* Neuromuscular and cardiovascular adaptations during concurrent strength and endurance training in untrained men. **International journal of sports medicine**, v. 33, n. 9, p. 702–710, 2012.
- MIYABARA, E. H. *et al.* Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **American Journal of Physiology. Cell physiology**, v. 290, n. 4, p. 1128-1138, 2006.
- MCKUSICK, V. A. The Marfan syndrome. In: Heritable disorders of connective tissues, 3rd Ed. St Louis: Mosby Kimpton, 1966. 52p.
- MORALES, M. G. *et al.* The pro-fibrotic connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) correlates with the number of necrotic-regenerative foci in dystrophic muscle. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 12, n.1, p. 413–421, 2018.
- MORSE, R. P. *et al.* Diagnosis and management of infantile marfan syndrome. **Pediatrics**, v. 86, n. 6, p. 888-895, 1990.
- MOZZETTA, C. *et al.* Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 4, p. 626-639, 2013.
- MUNN, L. L. Cancer and inflammation. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 9, n. 2, 2017.
- NASCIMENTO, T. L.; SILVA, M. T.; MIYABARA, E. H. BGP-15 improves contractile function of regenerating soleus muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 39, n. 1-2 , p. 25-34, 2018.
- NEDERVEEN, J. P. *et al.* Altered muscle satellite cell activation following 16 wk of resistance training in young men. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 1, p. R85-R92, 2017.
- NELKE, C. *et al.* Skeletal muscle as potential central link between sarcopenia and immune senescence. **EBioMedicine**, v. 49, p. 381-388, 2019.

- NG, C. M. *et al.* TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, n. 11, p. 1586-1592, 2004.
- NORHEIM, F. *et al.* Proteomic identification of secreted proteins from human skeletal muscle cells and expression in response to strength training. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 5, p. e1013-21, 2011.
- NOSAKA, K. *et al.* How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 9, p. 1490–1495, 2001.
- NOURA, M. *et al.* The effect of running on positive and negative slopes on TNF - $\alpha$  and INF- $\gamma$  gene expression in the muscle tissue of rats with Alzheimer's disease. **Journal of Basic Research in Medical Sciences**, v.7, n. 1, p. 35-42, 2020.
- NUKUI, T. *et al.* S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v.104, n. 2, p.453-464, 2008.
- OCHI, E.; NAKAZATO, K.; ISHII, N. Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle. **Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association**, v. 25, n. 8, p. 2283-2292, 2011.
- OGLE, M. E. *et al.* Monocytes and macrophages in tissue repair: implications for immunoregenerative biomaterial design. **Experimental biology and medicine / Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 10, p.1084–1097, 2016.
- OKAMOTO, T.; MASUHARA, M.; IKUTA, K. Effects of eccentric and concentric resistance training on arterial stiffness. **Journal of Human Hypertension**, v. 20, n. 5, p. 348–354, 2006.
- OKI, K. *et al.* Androgen receptors in muscle fibers induce rapid loss of force but not mass: implications for spinal bulbar muscular atrophy. **Muscle and Nerve**, v. 47, n. 6, p. 823-834, 2013.
- OPPENHEIM, J. J.; YANG, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 359-365, 2005.
- OSTROVIDOV, S. *et al.* Skeletal Muscle Tissue Engineering: Methods to Form Skeletal Myotubes and Their Applications. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 5, p. 403–436, 2014.
- PEDERSEN B. K.; STEENSBERG, A.; SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **The Journal of Physiology**, v. 536, n. 2, p. 329–337, 2001.
- PERCHERON, G. *et al.* Muscle strength and body composition in adult women with Marfan syndrome. **Rheumatology**, v. 46, n. 6, p. 957-962, 2007.
- PERANDINI, L. A. *et al.* Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche? **The FEBS Journal**, v. 285, n.11, p.1973–1984, 2018.

- PEREIRA, L. *et al.* Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. **Nature Genetics**, v. 17, n. 2, p. 218-22, 1997.
- PEREIRA, M. G. *et al.* Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85283, 2014a.
- PITCHER, A. *et al.* Design and rationale of a prospective, collaborative meta-analysis of all randomized controlled trials of angiotensin receptor antagonists in Marfan syndrome, based on individual patient data: A report from the Marfan Treatment Trialists' Collaboration. **American Heart Journal**, v. 169, n. 5, p. 605–612, 2015.
- PIZZA, F. X. *et al.* Adaptation to eccentric exercise: effect on CD64 and CD11b/CD18 expression. **Journal of applied physiology**, v. 80, n. 1, p. 47-55, 1996.
- PIZZA, F. X.; Baylies, H.; Mitchell, J. B. Adaptation to eccentric exercise: neutrophils and E-selectin during early recovery. **Canadian journal of applied physiology**, v. 26, n. 3, p. 245-53, 2001.
- PRATESI, A.; TARANTINI, F.; DI BARI, M. Skeletal muscle: an endocrine organ. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism : The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 11-4, 2013.
- PYERITZ, R. E. The Marfan syndrome. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 481-510, 2000.
- PYERITZ, R. E. Recent progress in understanding the natural and clinical histories of the Marfan syndrome. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, n. 5, p. 423-428, 2016.
- PYERITZ, R. E. Etiology and pathogenesis of the Marfan syndrome: current understanding. **Annals of Cardiothoracic Surgery**, v. 6, n. 6, p. 595-598, 2017.
- PYERITZ, R. E.; MCKUSICK, V. A. The Marfan syndrome: diagnosis and management. **The New England Journal of Medicine**, v. 300, n. 14, p. 772-7, 1979.
- POLLOK, M. L. *et al.* AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. **Circulation**, v. 101; n. 7, p. 828-833, 2000.
- RADONIC, T. *et al.* Inflammation aggravates disease severity in Marfan syndrome patients. **PLoS One**, v. 7, n. 3, e32963, 2012.
- RAHIMI, R. A.; LEOF, E. B. TGF-beta signaling: a tale of two responses. **Journal of cellular biochemistry**, v. 102, n. 3, p. 593-608, 2007.
- RAND-HENDRIKSEN, S. *et al.* Health-related quality of life with Marfan syndrome: a cross-sectional study of Short Form 36 in 84 adults with verified diagnosis. **Genetics in Medicine - Nature**, v. 12, n. 8, p. 517-524, 2010.
- RASMUSSEN, B. B.; PHILLIPS, S. M. Contractile and Nutritional Regulation of Human Muscle Growth. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 31, n. 3, p.127-31, 2003.

- REEVES, N. D. *et al.* Differential adaptations to eccentric versus conventional resistance training in older humans. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 7, p. 825–833, 2009.
- RIDGLEY, J. A. *et al.* The physiological effects of IGF-1 (class 1: Ea transgene) over-expression on exercise-induced damage and adaptation in dystrophic muscles of mdx mice. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 457, n. 5, p. 1121–1132, 2009.
- RIMOIN, D. L.; CONNOR, J. M.; PYERITZ, R. E. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics – 3<sup>rd</sup> Ed, Churchill Livingstone: New York, 1997.
- ROBINSON, P. N.; GODFREY, M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. **Journal of Medical Genetics**, v. 37. n. 1, p. 9-25, 2000.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.
- ROIG, M. *et al.* The effects of eccentric versus concentric resistance training on muscle strength and mass in healthy adults: a systematic review with meta-analysis. **British Association of Sport and Medicine**, v. 43, n. 8, p. 556-68, 2009.
- ROGERI, P. S. *et al.* Crosstalk Between Skeletal Muscle and Immune System: Which Roles Do IL-6 and Glutamine Play? **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 582258, 2020.
- SACLIER M. *et al.* Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 17, p. 4118–4130, 2013.
- SANTOS, A. R. *et al.* Different resistance-training regimens evoked a similar increase in myostatin inhibitors expression. **International Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 9, p. 761-768, 2015.
- SAKAI, L. Y. *et al.* Fibrillin, a new 350-KD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 6 pt 1, p. 2499-2509, 1986.
- SAKAI, L. Y. *et al.* Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14763-14770, 1991.
- SCHIAFFINO, S. *et al.* Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 4, p. 517-524, 2017.
- SAYER A. A. *et al.* Is grip strength associated with health-related quality of life? Findings from the Hertfordshire Cohort Study. **Age and Ageing**, v.35, n. 4, p. 409–415, 2006.
- SERRANO, A. L. *et al.* Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 96, p. 167–201, 2011.
- SERRANO, A. L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: mechanisms and translational implications. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 64, p. 181–190, 2017.

- SILVA, M. T. *et al.* Impaired Structural And Functional Regeneration Of Skeletal Muscles From B 2-Adrenoceptor Knockout Mice. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 211, n. 4, p. 617–633, 2014.
- SMITH, L. R.; BARTON, E. R. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 69, p. 602–615, 2018.
- SIMS, G. P. *et al.* HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. **Annual Review of Immunology**, v.28, p. 367-388, 2010.
- SHABANI, F. *et al.* Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and Cancer. **Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society**, v. 67, n. 10, p. 801-12, 2018.
- SHERRATT M. J. *et al.* Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 32, n. 2, p. 185-200, 2001.
- SCHOENFELD, B. J. Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy? **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 26, n. 5, p. 1441-1453, 2012.
- SCOTT, N. R. *et al.* S100A8/A9 regulates CD11b expression and neutrophil recruitment during chronic tuberculosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 6, p. 3098-3112, 2020.
- STENGL, R. *et al.* Optimising the mutation screening strategy in Marfan syndrome and identifying genotypes with more severe aortic involvement. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, p. 290, 2020.
- SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L.; WEBER, C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. **Blood**, v. 114, n. 21, p. 4613–4623, 2009.
- SOTO, M. E. *et al.* Participation of Arachidonic Acid Metabolism in the Aortic Aneurysm Formation in Patients with Marfan Syndrome. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 77, 2018.
- SUMMERS, K. M. *et al.* Histopathology and fibrillin-1 distribution in severe early onset Marfan syndrome. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 139, n. 1, p. 2-8, 2005.
- SUNAGA, S. *et al.* Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-targeted locus by transient expression of Cre recombinase in fertilized eggs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 2, p. 109-113, 1997.
- SYDDALL, H. *et al.* Is grip strength a useful single marker of frailty? **Age and Ageing**, v. 32, n. 6, p. 650–656, 2003.
- TEN BROEK, RW.; GREFTE, S.; VON DEN HOFF, J. W. Regulatory factors and cells population are involved in skeletal muscle regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 1, p. 7-16, 2010.
- THOMAS, G.; HALL, M. N. TOR signalling and control of cell growth. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 782-787, 1997.

- TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* v. 288, n. 2, R345–R353, 2005.
- TIDBALL, J. G.; WELC, S. S. Macrophage-derived IGF-1 is a potent coordinator of myogenesis and inflammation in regenerating muscle. *Molecular therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, v23, n. 7, p. 1134–1135, 2015.
- TIMMONS, J. A. *et al.* Using molecular classification to predict gains in maximal aerobic capacity following endurance exercise training in humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, v. 108, n. 6, p. 1487-1496, 2010.
- TOMAZ DA SILVA, M. *et al.* The fibrotic niche impairs satellite cell function and muscle regeneration in mouse models of Marfan syndrome. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, v. 237, n. 1, p. e13889, 2023.
- TROMBETTI, A. *et al.* Age-associated declines in muscle mass, strength, power, and physical performance: impact on fear of falling and quality of life. *Osteoporosis International*, v. 27, n. 2, p. 463-471, 2016.
- TSIPOURAS, P.; SILVERMAN, D. I. The genetic basis of aortic disease. Marfan syndrome and beyond. *Cardiology Clinics*, v. 17, n. 4, p. 683-696, 1999.
- TSENG, W. C. *et al.* Contralateral Effects by Unilateral Eccentric versus Concentric Resistance Training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 52, n. 2, p. 474-483, 2020.
- TSUMIYAMA, W. *et al.* 2014. Induction of Muscle Hypertrophy in Rats through Low Intensity Eccentric Contraction. *Journal of Physical Therapy Science*, v. 26, p. 1623-1625, 2014.
- VALDIVIESO, P. *et al.* T/T homozygosity of the tenascin-C gene polymorphism rs2104772 negatively influences exercise-induced angiogenesis. *PLoS One*, v. 12, n. 4, p. e0174864, 2017.
- VANEM, T. T. *et al.* Survival, causes of death, and cardiovascular events in patients with Marfan syndrome. *Molecular genetics and genomic medicine*, v. 6, n. 6, p.1114–1123, 2018.
- VINCENT, H. K.; VINCENT, K. R. The effect of training status on the serum creatine kinase response, soreness and muscle function following resistance exercise. *International Journal of Sports Medicine*, v.18, n. 6, p. 431-437, 1997.
- VISSER M. *et al.* Type and intensity of activity and risk of mobility limitation: the mediating role of muscle parameters. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 53, n. 5, p. 762–770, 2005.
- VOLTARELLI, V. A. *et al.* Lack of beta2-adrenoceptors aggravates heart failure-induced skeletal muscle myopathy in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 18, n. 6, p. 1087-1097, 2014.
- VON MALTZAHN, J. *et al.* Wnt signaling in myogenesis. *Trends in Cell Biology*, v. 22, n. 11, p. 602–609, 2012.

- WANG Z, Composition and function of extracellular matrix in development of skeletal muscle. In: Travascio F (ed) Composition and function of the extracellular matrix in the human body. InTech, Rijeka, 2016. 25–43p.
- WANG, X. *et al.* Infiltrating macrophages are broadly activated at the early stage to support acute skeletal muscle injury repair. **Journal of neuroimmunology**, v. 317, p. 55–66, 2018.
- WANG, J. *et al.*, Engineered skeletal muscles for disease modeling and drug discovery. **Biomaterials**, v. 221, p. 119416, 2019.
- WYNN, T. A.; Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.
- WU, Y.Y. *et al.* Role of the S100 protein family in rheumatoid arthritis. **Arthritis research and therapy**, v. 24, p. n. 1, p. 35, 2022.
- XIA, C. *et al.* S100 proteins as an important regulator of macrophage inflammation. **Front Immunol**, v.8, p. 1908, 2018.
- YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 59, n. 12, p. 1041-1059, 2011.
- YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 23-67, 2013.
- YOON, M. S. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 788, 2017.
- YOU, J. S. *et al.* The role of raptor in the mechanical load-induced regulation of mTOR signaling, protein synthesis, and skeletal muscle hypertrophy. **FASEB Journal**, v. 33, n. 3, p. 4021-4034, 2019.
- YUAN, S. M.; JING, H. Marfan's syndrome: an overview. **São Paulo Medical Journal**, v. 128, n. 6, p. 360-366, 2010.
- ZANGALA, T. Isolation of genomic DNA from mouse tails. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 6, p. 246, 2007.
- ZHANG, H.; HU, W.; RAMIREZ, F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 4, p. 1165–1176, 1995.
- ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **The Journal of Pathology**. v. 214, n. 2, p.161–178, 2008.
- ZHOU, Y. *et al.* The impact of age on skeletal muscle progenitor cell survival and fate after injury. **Tissue engineering. Part C, Methods** v. 23, n. 12, p.1012–1021, 2017
- ZHU, X. *et al.* Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. **Cytokine**, v. 26, n. 6, p. 262-272, 2004.