

DISTROFIA MUSCULAR LIGADA AO CROMOSSOMO X: AVALIAÇÃO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM CÃES

*MIYAZATO, L.G.¹; MORAES, J.R.E.¹; BERETTA, D.C.¹

Resumo

A distrofia muscular de cães Golden retriever (DMGR) é uma miopatia degenerativa, sendo o cão DMGR o melhor modelo devido as proximidades das manifestações genotípicas e fenotípicas com a Distrofia Muscular de Duchenne em humanos. Este estudo objetivou estudar por análises histoquímica e morfométrica miofibras dos tipos I (FTI) e II (FTII) em cães com distrofia muscular em diferentes idades. Para isto utilizou-se a reação de mATPase com pré-incubação alcalina (pH 9,4). Foram examinados dezessete cães machos, quatro não distróficos com idade entre 3 e 10 meses e quatorze distróficos entre 4 e 51 meses. Os distróficos foram divididos segundo a idade: até cinco meses (grupo 1), entre sete e treze meses (grupo 2) e acima de 15 meses (grupo 3). Observou-se inversão nas proporções FTI para FTII nos músculos semitendinoso (acima de 7 meses), diafragma e tríceps braquial (acima dos 15 meses). Verificou-se atrofia de miofibras distróficas no masseter (todos), bíceps femoral (grupos 1 e 3) e semitendinoso (grupos 2 e 3) em relação as não distróficas. Contrariamente, miofibras distróficas do bíceps braquial (todos), sartório (grupo 1), semimembranoso (grupo 1) e diafragma (todos) mostraram hipertrofia. Alternância entre atrofia e hipertrofia foi observada no tríceps braquial. Nossas observações apontam para um processo degenerativo progressivo, havendo períodos de repouso que permitem recuperação parcial das miofibras. Tais períodos parecem ser influenciados pelo nível de atividade de contração muscular.

Palavras-chave: cão, Distrofia Muscular, Golden retriever, histoquímica, morfometria, músculo, predomínio

Introdução

A distrofia muscular de cães Golden retriever (DMGR) é uma miopatia degenerativa geneticamente homóloga a Distrofia Muscular de Duchenne do homem (DMD) (NYGUYEN et al., 2002). Ambas são hereditárias, ligadas ao cromossomo X e caracterizadas pela ausência da distrofina, uma proteína citoesquelética, importante na manutenção da integridade estrutural do músculo durante o processo de contração (COLLINS & MORGAN, 2003; HOFFMAN et al., 1987; SHELTON et al., 2001). Elevadas taxas de mutações são observadas no esqueleto do gene DMD (2,4 MB) permitindo a existência de casos isolados (COLLINS & MORGAN, 2003; HOFFMAN et al., 1987; SHELTON et al., 2001).

O modelo animal mais usado para DMD é o camundongo MDX C57Bl/10ScSn (BULFIELD et al., 1984), apesar das diferenças morfofuncionais dos músculos dos acometidos em relação aos humanos (COLLINS & MORGAN, 2003). Outros modelos experimentais utilizados são cães, gatos, peixes e invertebrados. No entanto o cão Golden retriever distrófico é o modelo melhor caracterizado da DMD, pois as manifestações genotípicas e fenotípicas são as que mais se aproximam da doença em humanos (COLLINS & MORGAN, 2003; COOPER et al., 1988).

As primeiras descrições da DMD referiam hipertrofia dos músculos da panturrilha como uma das características mais salientes (DUCHENNE, 1868;

¹ Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n - CEP:14884-900

GOWERS, 1879). Similarmente cães adultos distróficos Golden retriever apresentam hipertrofia dos músculos dos membros torácicos, língua, diafragma, sartório e esôfago e atrofia dos demais músculos esqueléticos (KORNEGAY et al., 1988; KORNEGAY et al., 2003; VALENTINE et al., 1990). Nos neonatos há intenso acometimento da musculatura flexora em decorrência da sua grande utilização durante esta fase da vida (VALENTINE & COOPER, 1991). Então os efeitos da deficiência de distrofina variam entre espécies e dentro da mesma espécie (EDWARDS et al., 1984). Razões para a variação fenotípica entre os músculos com ausência de distrofina são pouco compreendidas (HOFFMAN & GOROSPE, 1991).

O método histoquímico mais utilizado para a classificação das fibras em tipo I (FTI) e tipo II (FTII), e nos subtipos IIA, IIB e IIC, é o da atividade mATPase. Em geral músculos contêm mistura de todos os tipos de fibras, formando o padrão mosaico, com predomínio de um tipo de miofibra sobre outro (JOHNSON et al., 1973). A técnica histoquímica da miosina ATPase (mATPase) caracteriza fibras de contração rápida (FTII) e lenta (FTI) pelas alterações de coloração observadas em microscopia de luz. Assim, as FTI apresentam coloração clara e FTII coloração escura na escala do cinza ao preto (DUBOWITZ, 1985).

Cães distróficos adultos não apresentam alterações da proporção entre diferentes tipos de miofibras em alguns músculos dos membros posteriores e anteriores. Entretanto, sua distribuição é alterada formando grupos de miofibras de mesmo tipo descaracterizando o padrão mosaico. Há ainda aumento nos diâmetros médios dos músculos tríceps braquial e vasto lateral (KORNEGAY et al., 1988).

Os tipos de fibras que irão compor a musculatura esquelética são controlados pela atividade nervosa através de trajetos específicos de sinalização. A via da calcineurina (Cn) – NFAT é principal sinalizadora e responsável pela manutenção da atividade de genes produtores de fibras de contração de lenta em músculos adultos. A indução dessa atividade também ocorre na regeneração de músculos de contração lenta (SCHIAFFINO et al., 2007). Linhagens de camundongos distróficos *mdx* expressando atividade mutante da via Cn, apresentam a doença mais atenuada e maior resistência na injúria nos processos de contração (CHAKKALAKAL et al., 2004; STUPKA et al., 2006).

Desta forma, as descrições do comportamento funcional e histoquímico da musculatura na DMGR ainda são escassos quanto à sistemática e as proporções das alterações morfológicas das fibras musculares e suas manifestações de hipertrofia e atrofia nos diferentes períodos de vida do animal.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi preencher as lacunas do conhecimento existente por meio de análises histoquímica e morfométrica caracterizando o padrão de distribuição dos tipos I e II de fibras musculares em cães com distrofia muscular em diferentes idades.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Um total de dezessete cães machos, quatro não distróficos e livres de alterações neuromusculares com idade entre 3 e 10 meses e quatorze distróficos com idade entre 4 e 51 meses foram examinados no presente estudo. Do total, sete distróficos e um não distrófico eram de Golden retriever (GR) puros, oriundos da colônia DMGR no Brasil pertencente à Universidade de São Paulo (USP). Os demais distróficos eram produto híbrido resultante do cruzamento de GR com

Labrador retriever (GLR) pertencentes à colônia da Associação Brasileira de Amigos da Distrofia Muscular de Ribeirão Preto, SP.

Os animais foram classificados em não distróficos e distróficos baseados em dois critérios simultâneos e complementares quais sejam a análise genotípica e níveis séricos de creatinaquinase (CK).

Os distróficos foram divididos segundo a idade sendo no grupo 1 animais com até cinco meses; no grupo 2 entre sete meses e treze meses e no grupo 3 acima de 15 meses. O grupo 4 foi constituído por animais não distróficos com idade entre 3 e 10 meses.

Concentração sérica de creatinaquinase (CK)

Amostras de soro foram obtidas de todos os animais (três não distróficos e oito distróficos) por venopunção, nos cães GR e GLR logo após o nascimento e mensalmente até a morte do animal, sendo utilizada neste estudo a última análise realizada antes do óbito. Para os cães não distróficos as amostras foram colhidas momentos antes do óbito. A determinação da catálise de CK foi realizada por meio de kit enzimático (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA).

Análise do DNA genômico

A análise do DNA genômico foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP – São Paulo). Para proceder as análises foram extraídos DNA de amostras de sangue colhidas de cães recém nascidos GR e GLR com kit comercial (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit – Amersham Pharmacia). Os genótipos dos cães distróficos e não distróficos foram determinados de acordo com Sharp et al. (1992) e Honeyman et al. (1999).

Colheita e processamento das amostras de músculos

As amostras de músculos não distróficos e distróficos foram colhidas logo após o óbito natural ou eutanásia dos animais. Neste último caso foram sacrificados somente os animais que apresentavam envolvimento clínico severo da doença. Para tanto se utilizou anestesia barbitúrica endovenosa (tiopental[®] – Cristália, Itapira, SP, BR), conforme recomendado pelo código de ética para o uso em animais de pesquisa científica (AVMA, 2001) e cloreto de potássio (KCl).

Fragmentos foram colhidos da porção mediana do masseter, parte costal diafragmática, bíceps braquial, cabeça longa do tríceps braquial, semitendinoso, semimembranoso, cabeça superficial do bíceps femoral e ventre cranial do sartório. A seguir foram preparados e pré-congelados com n-hexano, congelados e armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram cortados a 8µm em criostato à -20°C, em secções seriadas transversais e fixados em lâminas de vidro com poly-lysina.

Análise enzimoistoquímica e morfométrica

A reação de mATPase (adenosine 5'-triphosphate) com pré-incubação alcalina (pH 9,4) foi realizada em cortes congelados para avaliar o padrão de distribuição e morfometria dos tipos de fibras musculares. As análises foram realizadas em sistema analisador de imagens (KS 100 version 3.0 – Kontron – Carls Zeiss), onde foi estudado o predomínio (%) de FTI e FTII e o diâmetro mínimo (µ) das miofibras nos grupos não distrófico e distrófico.

O total de 200 miofibras foi medido aleatoriamente para cada amostra muscular dos animais do grupo distrófico e estabelecida a média dos diâmetros mínimos. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo não distrófico.

RESULTADOS

Os resultados da avaliação da CK e a seleção entre cães não distróficos e distróficos estão discriminados na tabela 1.

Table 1. Idade, valores de CK e raça de animais distróficos e não distróficos.

Animal	Classification	Age	Breed †	CK (U/L) ‡
1	affected	51 months	GR	27064,0
2	affected	20 months	GR	12862,0
3	affected	15 months	GR	1980,0
4	affected	13 months	GR	9072,0
5	affected	12 months	GR	8290,0
6	affected	11 months	GRL	6581,0
7	affected	11 months	GRL	7200,0
8	affected	11 months	GRL	8250,0
9	affected	10 months	GRL	2431,0
10	affected	9 months	GRL	1747,0
11	affected	8 months	GR	8548,0
12	affected	7 months	GRL	1654,0
13	affected	5 months	GRL	12100,0
14	affected	4 months	GR	2130,0
15	healthy	10 months	GRL	67,0
16	healthy	8 months	GRL	86,0
17	healthy	3 months	GR	31,0

† Breed: GR = Golden retriever, GRL = Golden Labrador retriever

‡ CK = creatine kinase (values of reference to dogs: 40 – 254 U/L) (Meyer and Harvey, 1998)

Proporção de tipos de fibras musculares

As alterações mais expressivas nos músculos de cães distróficos foram verificadas acima de 7 meses de idade (grupos 2 e 3) no músculo semitendinoso. Neste pode-se observar a inversão da proporção de FTI para FTII. Músculos como diafragma e tríceps braquial apresentaram o mesmo tipo de inversão, porém esta somente se manifestou a partir de 15 meses de idade (grupo 3).

O músculo satóreo dos animais distróficos mostrou inversão na proporção de fibras musculares duas vezes durante o período de vida estudado. A primeira inversão foi verificada no grupo 2 (7 aos 13 meses de idade) onde as FTI foram substituídas por FTII e a segunda no grupo 3 (15 aos 51 meses de idade) onde as FTII foram substituídas por FTI.

Não foram observadas alterações na porcentagem de FTI e FTII nos músculos masseter, semimembranoso, bíceps femoral e braquial de cães distróficos durante o período de vida estudado.

Outro fenômeno observado nos músculos de cães distróficos a partir dos quatro meses de idade foi a formação de type-grouping de FTI e de FTII que continham em média 10 miofibras ou mais.

Análise histomorfométrica

O estudo das características estruturais das fibras musculares evidenciou perda de sua forma poliédrica e da uniformidade de tamanho. As fibras musculares mostraram tamanhos variados e bordos extremamente irregulares.

O diâmetro médio das miofibras do músculo masseter de todos os cães distróficos (grupos 1, 2 e 3) estava diminuído em relação ao do cães controle (grupo controle) ($p < 0.01$) (Tabela 2). Contrariamente, os músculos bíceps braquial e diafragma mostraram aumento do diâmetro médio de suas miofibras nos diferentes grupos analisados em relação aos não distróficos (grupo 1, 2 e 3) ($p < 0.01$).

A musculatura do tríceps braquial apresentou alternância entre fenômenos de atrofia e hipertrofia de suas miofibras sendo $p < 0.01$ nos grupos 1 e 3 e $p < 0.05$ no grupo 2.

O músculo bíceps femoral apresentou atrofia significativa de suas miofibras em dois grupos (1 e 3; $p < 0.01$) e o semitendinoso nos grupos 2 e 3 ($p < 0.01$). Por fim, músculos como o sartório e semimembranoso apresentaram fenômenos de hipertrofia significativos somente no grupo 1 ($p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente).

Table 2. Dados morfométricos (média e DP) referentes ao diâmetro mínimo de fibras musculares de animais controles e afetados para distrofia muscular.

Músculo	Grupo controle (meses; n) (3-10; 3)	Grupo distrófico (meses; n)		
		Grupo I (4-5; 2)	Grupo II (7-13; 9)	Grupo III (15-51; 3)
masseter	34,5396 ± 10,7169	18,8326 ± 4,4522	28,6685 ± 9,1854	30,2872 ± 9,4703
diafragma	22,3458 ± 6,9710	28,6704 ± 10,7548	28,2579 ± 11,2489	33,9782 ± 12,1627
bíceps braquial	32,2936 ± 8,1795	43,2320 ± 9,3185	36,8754 ± 15,3228	40,8210 ± 13,9496
tríceps braquial	34,9038 ± 9,2187	27,6996 ± 14,3841	109,5199 ± 311,6063	39,2324 ± 14,4414
bíceps femoral	32,8204 ± 9,2682	29,2108 ± 20,4077	33,0929 ± 11,3656	30,5294 ± 12,2070
sartório	38,3120 ± 12,2706	40,2593 ± 11,3325	37,4773 ± 14,4056	37,7874 ± 15,4685
semimembranoso	30,7193 ± 9,0122	36,7655 ± 7,5855	32,2892 ± 13,0579	32,5202 ± 13,1443
semitendinoso	40,3213 ± 11,9147	40,1931 ± 14,6725	30,9126 ± 13,6579	34,9869 ± 13,9303

CONCLUSÃO

No presente trabalho os cães distróficos apresentaram alterações na proporção dos tipos de miofibras com o avanço da idade em diferentes músculos esqueléticos. Essas mudanças foram mais expressivas a partir de sete meses para o músculo semitendinoso e a partir dos quinze meses para tríceps braquial, diafragma e sartório. Nestes as fibras de contração lenta foram substituídas pelas de contração rápida comprovando não só a ação do tempo na transição das miofibras, mas também as modificações metabólicas proporcionadas pela falta da proteína distrofina.

As observações do presente estudo apontam de modo similar ao observado na DMD, em que o processo degenerativo é progressivo, havendo alguns períodos de repouso que permitem recuperação parcial da miofibras. Tais períodos de latência parecem, pelo menos em parte, influenciados pelo nível de atividade de contração.

REFERÊNCIAS

1. Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:1189-1099, 1984
2. Chakkalakal JV, Harrison MA, Carbonetto S, Chin ER, Michel RN, Jasmin BJ. Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in mdx mice. *Hum Mol Genet* **13**:379-388, 2004
3. Collins CA, Morgan JE: Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol* **84**:165-172, 2003
4. Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ: The homologue of the

- Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* **334**:154-156, 1988
5. Dubowitz V: Normal muscle. In: *Muscle Biopsy – A Practical Approach*, ed. Dubowitz V, 2nd ed., pp 41-81. Bailliere Tindall, London, 1985
 6. Duchenne GB. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclerosique. *Archives Generales de Médecine* **11**:5, 179, 305, 421, 552, 1868
 7. Edwards RHT, Jones DA, Newham DJ, CHAPMAN SJ. Role of mechanical damage in the pathogenesis of proximal myopathy in man. *Lancet* **1**:548-552, 1984
 8. Gowers WR. Clinical lectures on pseudohypertrophic muscular paralysis. *Lancet* **2**:1, 37, 73, 113, 1879
 9. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**:928-929, 1987
 10. Hoffman EP, Gorospe JRM. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: Windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. *Curr Top Membr* **38**:113-154, 1991
 11. Honeyman K, Carville KS, Howell JM, Fletcher S, Wilton SD: Development of a snapback method of single-strand conformation polymorphism analysis for genotyping Golden Retrievers for the X-linked muscular dystrophy allele. *AJVR* **60**:734-737, 1999
 12. Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D: Data on the distribution of fiber types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sc* **18**:111-129, 1973
 13. Kornegay JN, Cundiff DD, Bogan DJ, Bogan JR, Okamura CS. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with gondel retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **13**:493-500, 2003
 14. Kornegay JN, Tuler SM, Miller DM, Levesque DC: Muscular dystrophy in a litter of golden Retriever dogs. *Muscle Nerve* **11**:1056-1064, 1988
 15. Meyer DJ, Harvey JW: *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis*, 2nd ed., pp. 346. WB Saunders Company, Philadelphia, 1998
 16. Nguyen F, Cherel Y, Guigand L, Goubault-Ieroux I, Wyers M: Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. *Comp Pathol* **126**:100-108, 2002
 17. Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-Dependent Signaling Pathways Controlling Muscle Diversity and Plasticity. *Physiology* **22**:269-278, 2007
 18. Sharp NJH, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, Bartlett RJ: An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* **13**:115-121, 1992
 19. Shelton GD, Liu LA, Guo LT, Smith GK, Christiansen JS, Thomas WB, Smith MO, Kline KL, March PA, Flegel T, Engvall E: Muscular dystrophy in female dogs. *J Vet Intern Med* **15**:240-244, 2001
 20. Stupka N, Plant DR, Schertzer JD, Emerson TM, Bassel-Duby R, Olson EN, Lynch GS. Activated calcineurin ameliorates contraction-induced injury to skeletal muscles of mdx dystrophic mice. *J Physiol* **575**:645-656, 2006
 21. Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, de Lahunta A: Canine X-Linked Muscular Dystrophy: Morphologic Lesions. *Neurol Sci* **97**:1-23, 1990
 22. Valentine BA, Cooper BJ: Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscles in neonatal dogs. *Neuromuscul Disord* **1**:31-38, 1991