

Análise Histomorfométrica de Fibras Musculares Ditróficas de Cães Golden Retriever.

Ana Paula Kaimoti, Julieta Rodini Engrácia de Moraes, Camila Carvalho Colli, Lígia Gomes Myiazato, Ingo Aron de Souza. - Medicina Veterinária - Departamento de Patologia Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma desordem recessiva ligada ao cromossomo X e está associada à deficiência de distrofina nos músculos humanos. A distrofina é uma proteína citoesquelética subsarcolêmica com 427 kDa que, junto com outros componentes do Complexo Distrofina-Glicoproteína (CDG), fornece suporte para a membrana muscular durante a contração. Este grande multicomponente complexo tem ação como estabilizador mecânico e papel sinalizador nas interações imediatas entre o citoesqueleto, membrana e matriz extracelular (KAREN, 2004). A deficiência de distrofina enfraquece o sarcolema permitindo o influxo de líquido extracelular rico em cálcio que ativa as proteases intracelulares e o complemento tendo como consequência a necrose da fibra. Desta forma, a distrofina normal é necessária à reunião e integridade do CDG aparentemente normais ao nascimento (BAROHN, 2001).

A DMD foi relatada em algumas raças de cães e é melhor caracterizada no Golden Retriever, sendo conhecida como distrofia muscular do Golden Retriever (DMGR) que se apresenta fenotípica e genotipicamente análoga à DMD, proporcionando modelo experimental para a doença humana.

Animais afetados (n=6) e controles (n=4) da Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD) de idades variadas (sete a treze meses) que vieram a óbito natural, foram submetidos à necropsia para a colheita de amostras musculares. Estas foram colhidas em até 12 horas após os óbitos. A seguir foram pulverizados com talco, congelados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer à 80°C negativos. Posteriormente foram cortados a 8µm no criostato à 20°C, em secções seriadas transversais e fixadas em lâminas de vidro com poly-L-lysina diluída a 10%. Nove músculos eleitos (masseter, diafragma, intercostal, bíceps braquial e femoral, semitendinoso, tríceps braquial, sartório e semimembranoso) foram colhidos para avaliação histoquímica e histomorfométrica pela reação de miosina ATPase (mATPase) em pH 9,4 com o auxílio do sistema analisador de imagens, KS 100 versão 3.0 – Kontron – Carls Zeiss, com objetiva de aumento 12,5 vezes, analisando 100 miofibras de cada tipo (fibras musculares do tipo I – FTI e fibras musculares do tipo II – FTII). Neste pH as FTII apresentam intensa reação e desenvolvem coloração enegrecida, enquanto que as FTI mostram coloração pálida por desenvolverem reação fraca (MELLO DE OLIVEIRA, 1992).

Neste trabalho foram avaliados o predomínio (%), área e diâmetro mínimo de FTI (miofibras oxidativas e de contração lenta) e FTII (miofibras glicolíticas e de contração rápida).

Quanto à análise estatística, inicialmente foi realizada análise descritiva da variável relativa ao diâmetro mínimo e área. Calculou-se a média e o desvio padrão para cada tipo de fibra (FTI e FTII) dos grupos afetado e controle (Tabelas 1 e 2). Em seguida, as medidas do diâmetro mínimo (μ) e área (μ^2) foram submetidas à prova de ajuste à curva Normal de Kolmogorov-Smirnov (BISQUERRA, SARRIERE, MARTÍNEZ, 2004). A diferença das medidas observadas foi inferida através da prova U de Mann-Whitney ao nível de 1% de significância para o grupo afetado e controle.

Finalmente, utilizou-se o coeficiente de correlação dos postos de Spearman para verificar a associação entre idade dos animais afetados e a média do diâmetro mínimo e áreas das FTI e FTII, ao nível de 5% de significância. A interpretação utilizada está descrita na tabela 3.

Tabela 1. Valores médios do diâmetro mínimo (μ), área (μ^2) e desvio padrão (DP) de fibras do tipo I (FTI) dos cães afetados e controles para Distrofia Muscular no Golden Retriever (GRMD) – Jaboticabal – SP, 2006.

Músculo	Área(μ^2)				Diâmetro mínimo (μ)			
	Afetado		Controle		Afetado		Controle	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Masseter	1168,54	691,21	1430,27	776,49	31,88	9,58	34,55	9,06
Diafragma	1423,66	872,82	851,92	517,48	34,62	10,53	27,71	8,83
Intercostal	2601,78	1957,74	1983,65	1458,54	45,42	17,34	41,47	16,41
Semitendinoso	2289,94	1443,52	2178,05	1287,58	43,64	14,75	43,49	13,15
Tríceps braquial	1572,73	1045,74	1953,86	1060,95	36,66	11,97	41,42	11,38
Bíceps femoral	1507,26	989,82	1300,25	604,98	35,36	12,01	34,48	8,49
Sartório	2514,95	1684,07	2032,96	1261,71	46,03	15,34	42,22	13,67
Bíceps braquial	2513,92	1552,99	1410,45	751,91	46,33	15,32	35,42	9,61
Semimembranoso	1749,01	934,94	1657,4	883,77	43,64	14,75	43,49	13,15

Tabela 2. Valores médios do diâmetro mínimo (μ), área (μ^2) e desvio padrão (DP) de fibras do tipo II (FTII) dos cães afetados e controles para Distrofia Muscular no Golden Retriever (GRMD) – Jaboticabal – SP, 2006.

Músculo	Área(μ^2)				Diâmetro mínimo (μ)			
	Afetado		Controle		Afetado		Controle	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Masseter	845,92	493,51	1219,78	453,9	26,97	8,08	32,43	6,91
Diafragma	890,46	611,07	789,51	652,63	26,97	9,8	25,78	9,68
Intercostal	1115,85	639,52	1717,5	1300,52	30,54	8,92	36,87	14,7
Semitendinoso	1362,54	1023,22	1747,13	884,09	32,76	12,89	39,23	10,54
Tríceps braquial	1131,14	887,15	1820,77	1043,83	30,03	11,51	40,09	11,64
Bíceps femoral	844,47	532,64	1309,89	648,93	26,88	8,96	33,68	8,91
Sartório	1617,77	1306,76	1991,63	1302,34	35,85	13,86	40,57	14,2
Bíceps braquial	1561,62	99,83	1274,01	544,06	35,87	13,28	32,49	7,64
Semimembranoso	921,32	690,67	1334,24	716,09	28,72	10,44	33,89	9,88

Tabela 3. Interpretação dos coeficientes de correlação (r) utilizados no teste de postos de Spearman – Jaboticabal – SP, 2006.

Coefficiente	Interpretação
$r = 1,0$	Correlação perfeita
$0,8 < r \leq 1,0$	Muito alta
$0,6 < r \leq 0,8$	Alta
$0,4 < r \leq 0,6$	Moderada
$0,2 < r \leq 0,4$	Baixa
$0,0 < r \leq 0,2$	Muito baixa
$r = 0,0$	Nula

Quando o coeficiente de correlação (r) dos postos é inferior ao valor crítico (vc), a correlação não é significativa (LEVIN & FOX, 2004).

Os cálculos e as análises foram realizados com o uso do pacote estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences – versão 12.0 – LEAD Technologies, Inc. – 2003).

No quadro 1, observam-se os valores dos coeficientes do teste de Mann-Whitney para diâmetro mínimo e área de FTI e FTII.

Quadro 1. Valores dos coeficientes do teste U de Mann-Whitney para diâmetro mínimo (μ) de FTI e FTII nos músculos de cães afetados e controles para Distrofia Muscular no Golden Retriever (GRMD) – Jaboticabal – SP, 2006.

Músculo	Diâmetro mínimo		Área	
	FTI	FTII	FTI	FTII
Masseter	0,00	0,00	0,00	0,00
Diafragma	0,00	0,01	0,00	0,00
Intercostal	0,00	0,00	0,00	0,00
Semitendinoso	0,81*	0,00	0,42*	0,00
Tríceps braquial	0,00	0,00	0,00	0,00
Bíceps femoral	0,98*	1,08*	0,13*	0,00
Sartório	0,00	0,00	0,00	0,00
Bíceps braquial	0,00	0,00	0,00	0,00
Semimembranoso	0,04*	0,00	0,13*	0,00

*não significativo a 1% de probabilidade

No quadro 2, observam-se os valores calculados dos coeficientes de correlação (r) dos postos de Spearman e do valor crítico (vc) para as médias dos diâmetros mínimos e áreas das FTI e FTII, ao nível de 5% de significância.

Quadro 2. Valores dos coeficientes de correlação r dos postos de Spearman para os parâmetros diâmetro mínimo, área e idade de FTI e FTII de animais afetados para a Distrofia Muscular no Golden Retriever (GRMD) – Jaboticabal – SP, 2006.

Músculo		Diâmetro mínimo		Área	
		FTI	FTII	FTI	FTII
Masseter	r	-0,029	-0,600	-0,142	-0,600
	vc	0,957*	0,208	0,787	0,208
Diafragma	r	0,400	-0,800	0,400	-0,800
	vc	0,600	0,200	0,600	0,200
Intercostal	r	0,257	-0,086	0,142	-0,085
	vc	0,623	0,872	0,787	0,871
Semitendinoso	r	0,600	0,200	0,600	0,200
	vc	0,280	0,704	0,280	0,704
Tríceps braquial	r	0,400	0,400	0,300	0,400
	vc	0,505	0,505	0,623	0,504
Bíceps femoral	r	0,086	-0,543	0,028	-0,542
	vc	0,872	0,266	0,957	0,265
Sartório	r	0,400	-0,800	0,400	0,400
	vc	0,600	0,200	0,600	0,600
Bíceps braquial	r	0,143	-0,029	0,028	-0,028
	vc	0,787	0,957*	0,957*	0,957*
Semimembranoso	r	0,400	0,200	0,700	0,500
	vc	0,505	0,747	0,188	0,391

r = coeficiente de correlação de postos de Spearman

vc = valor crítico

*correlação significativa ao nível de 5%

A análise morfométrica do músculo semitendinoso, em cães afetados dos sete aos 13 meses de idade, demonstrou que o diâmetro das FTI aumentou (hipertrofia) com a idade. Com relação aos diâmetros das FTII, observou-se hipertrofia dos músculos masseter, diafragma, bíceps femoral e sartório (Quadro 2).

Para medidas morfométricas relativas a área, as FTI dos músculos semitendinoso e semimembranoso mostraram hipertrofia com o avançar da idade também para os mesmos animais. Para as FTII dos músculos masseter, diafragma e bíceps femoral observou-se atrofia das miofibras (Quadro 2).

A análise estatística entre os grupos afetado e controle, tanto para a área quanto para o diâmetro mínimo, revelou diferença estatística para seis músculos analisados, reforçando que a doença causa grandes alterações no calibre das miofibras. Essas alterações proporcionam alterações na redução ou no aumento destas. Assim, FTI do músculo semitendinoso sofreram hipertrofia enquanto que no masseter, diafragma, bíceps femoral e sartório houve atrofia das mesmas.

Para as FTII, os músculos semitendinoso e semimembranoso mostraram hipertrofia; processo inverso (atrofia) ocorre para masseter, diafragma e bíceps femoral.

Observou-se que não houve diferença estatística tanto para FTI quanto para FTII para o músculo intercostal, tríceps braquial e também para as FTI do semimembranoso. Os fenômenos observados nas miofibras de cães com DMGR sugerem que a hipertrofia bem como a atrofia estão relacionadas ao seu processo de desenvolvimento natural e aos mecanismos adaptativos desencadeados pela doença.

Quanto ao predomínio das fibras foram realizadas comparações entre afetados e controles. Deste modo, constatou-se predomínio de FTII nos músculos masseter, diafragmático, semitendinoso, tríceps braquial, bíceps femoral, sartório e semimembranoso.

A comparação dos predomínios dos grupos afetado e controle dos animais entre sete e 13 meses de idades, houve inversão destes para os músculos intercostal (Figura 1). Este dado indica que neste músculo as fibras oxidativas de contração lenta FTI foram substituídas por fibras glicolíticas de contração rápida (FTII). Situação inversa ocorreu para o músculo bíceps braquial no qual FTI substituíram FTII (Fig. 1).

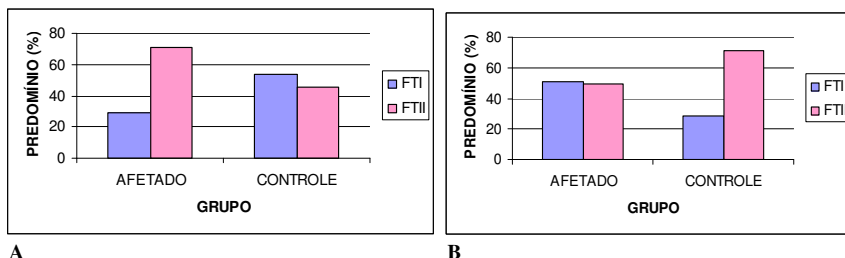


Figura 1. Predomínio (%) de fibras do tipo I (FTI) e do tipo II (FTII) pela reação de mATPase (pH 9.4) nos músculos esqueléticos de cães afetados ou não para Distrofia Muscular no Golden Retriever (DMGR) entre 7 e 13 meses de idade. (A) Músculo intercostal; (B) Músculo bíceps braquial.

Ainda que os resultados apresentados aqui tenham contribuição para a literatura, fica a necessidade do estudo de maior número de casos da doença que possam enriquecer as informações sobre essa enfermidade, já que há aumento, dia após dia, pela busca por melhores condições de vida para pacientes distróficos. Quando for possível compreender o mecanismo de regeneração das fibras musculares nessa miopatia poderemos planejar tratamentos que auxiliem na amenização, e talvez quem sabe, na cura da doença.

Bolsa: FAPESP (processo nº: 05/52745-3)

Referências:

BAROHN, R.J. *Distrofias musculares*. In: Goldman & Bennett: cecil - tratado de medicina interna. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 2458-2462.
 BISQUERRA, R.; SARRIERA, J.C.; MARTÍNEZ, F. *Introdução à Estatística – enfoque informático com o pacote estatístico SPSS*. 1 ed. Porto Alegre: ARTMED Editora, 2004. p.255.

KAREN, A.L.; KAKKAR, R.; McNALLY, E. M. The Dystrophin Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *American Heart Association, Inc.* 2004.

LEVI, J. ; FOX, J.A.. In : LEVIN, J. ; FOX, J.A. *Estatística para Ciências Humanas*. 9 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004. p. 495.

MELLO DE OLIVEIRA, J.A. Histoquímica de enzimas : métodos e usos em histopatologia. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.25, n. 2, p. 226-238, 1992.