

# **MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA DISTROFIA MUSCULAR ASSOCIADA À AUSÊNCIA DE DISTROFINA. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO EM CÃES GOLDEN RETRIEVER.**

Camila Carvalho Colli; Julieta Rodini Engrácia de Moraes; Lígia Gomes Miyazato; Ana Paula Kaimoti; Ingo Aron Sousa Mello. – Medicina Veterinária – Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

O cão Golden retriever é utilizado como modelo no estudo da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), pois a Distrofia Muscular no Golden retriever (DMGR) é fenotipicamente e genotipicamente análoga a esta. Esta raça acometida apresenta alterações musculares semelhantes à patogenia no humano, sendo, portanto modelo experimental mais adequado (COOPER et al., 1988).

Quanto às alterações encontradas na necropsia de cães com DMGR destacam-se: aumento dos músculos dos membros torácicos, língua, diafragma e da musculatura do esôfago. Todos os músculos esqueléticos apresentam cor e consistência normais (KORNEGAY et al., 1988).

Assim como na DMD, a DMGR também apresenta lesões miocárdicas, incluindo necrose muscular contínua, fibrose, deposição de gordura e mineralização, conduzindo à disfunção miocárdica progressiva e falha cardíaca (CHETBOUL, 2004). No estágio inicial da doença, fibras necróticas e em regeneração tendem a ocorrer em grupos pequenos, junto a fibras escuras hialinizadas, grandes e dispersas que se encontram contraídas e, acredita-se que precedem à necrose da fibra. Esse estado de marcada hipercontração é causado pela elevação da concentração de cálcio no citoplasma (VELENTINE et al., 1986; 1990). Por fim, os macrófagos invadem as fibras necróticas com função de eliminar os resíduos (HAYS & ARMBRUSTMACHER, 2002).

O objetivo deste estudo foi caracterizar as lesões histopatológicas presentes na musculatura de cães da raça Golden retriever com distrofia muscular nas diferentes fases da manifestação clínica da doença.

Foram utilizados 19 cães, sendo 14 machos e afetados para DMGR e 05 cães, machos e fêmeas hígidos e negativos para a doença. A confirmação da doença fez-se pela análise do DNA da papa de leucócitos (reação em Cadeia da Polimerase-PCR) e determinação da atividade sérica da enzima creatinaquinase (CK).

Após óbito foram realizadas as necropsias dos animais distróficos para obter os achados de necropsia. Foram descritas as alterações macroscópicas dos diferentes órgãos e tecidos. Foram eleitos e removidos 09 músculos (semitendinoso, tríceps braquial, masseter, intercostal, diafragma, bíceps femoral, sartório, bíceps braquial e semimembranoso) com a obtenção de uma amostra da porção mediana do músculo. Dois cortes, no mínimo, foram montados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Gomori modificado (TGM). Foi feita avaliação histopatológica dos músculos que foram submetidos a dois métodos de análise qualitativa para a caracterização das lesões: o primeiro, baseou-se na intensidade de lesão e o segundo utilizou-se os critérios estabelecidos por NGUYEN et al. (2002) que leva em consideração a porcentagem de miofibras alteradas em relação à banda muscular.

Os músculos foram agrupados e avaliados em três classes funcionais: mastigatórios, respiratórios e locomotores.

Verificou-se que todos os animais apresentaram aumento significativo da musculatura do diafragma e língua (2 a 4 vezes). O espessamento do diafragma ocorreu nas porções musculares laterais (pilares). Mais centralmente, este se encontrava atrofiado permitindo a formação de hérnia diafragmática em 27% dos animais.

No coração identificou-se aumento da silhueta cardíaca. O ventrículo esquerdo encontrava-se hipertrofiado e sua espessura mostrava-se duas a três vezes maior que a do septo cardíaco. A região miocárdica de um animal (5,26%) mostrou perda de sua coloração avermelhada, indicando a presença de degeneração muscular cardíaca.

A cavidade torácica de 64% dos animais estava repleta de líquido serosanguinolento.

Alterações pulmonares foram identificadas em todos os animais. O volume permaneceu inalterado, mas com a presença de áreas de crepitação (enfisema pulmonar). Estes órgãos apresentavam superfície avermelhada (congestão pulmonar), com a presença de secreção mucosa ou purulenta na árvore brônquica (edema pulmonar).

O fígado apresentou-se congesto, com áreas de coloração amarelada, bordos arredondados, a vesícula biliar dilatada (três vezes o tamanho normal) e preenchida com conteúdo espesso (lama biliar) em todos animais.

O estômago apresentava-se com a superfície e mucosas pálidas e perda das pregas estomacais. Era comum a presença de pontos hemorrágicos, sendo que em dois foram constatadas úlceras na mucosa de 18% dos animais. O esôfago apresentava-se espessado (2 a 3 vezes).

As alças intestinais, em toda sua extensão, mostraram-se dilatadas, hiperêmicas e repletas de fezes, indicando diminuição do trânsito intestinal. A consistência das fezes era pastosa. Demais órgãos, como pâncreas, baço e rins não apresentaram alterações dignas de relato.

A análise histopatológica dos músculos revelou alterações de intensidades variadas no diâmetro das fibras, necrose, fibrose, inflamação, hialinização, calcificação e regeneração.

Foram constatadas alterações, com intensidades variadas, no diâmetro das miofibras. Necrose e regeneração mostraram-se individualizadas ou agrupadas. Hialinização e fagocitose foram figuras identificadas. Células inflamatórias, principalmente mononucleares, estavam presentes. Calcificação foi observada como lesão focal e em alguns músculos.

Na coloração de TGM, o tecido conectivo perimisial e endomisial era exuberante e em alguns músculos havia infiltração de tecido adiposo. Algumas fibras apresentavam-se de coloração avermelhada. Esta coloração era subsarcolemal ou estava difusa dentro do sarcoplasma evidenciando processos de necrose das miofibras.

No primeiro método de avaliação qualitativo foram observados alterações nos parâmetros morfológicos avaliados. Nos casos em que os padrões morfológicos resposta inflamatória, hialinização e calcificação apresentaram frequências iguais, eles tiveram intensidades diferentes.

Todos os músculos avaliados exibiram intensa alteração no diâmetro das miofibras que se mostravam entremeadas com abundante tecido conectivo caracterizando fibrose. Nos músculos masseter, intercostal, tríceps braquial e sartório a necrose foi moderada, enquanto que nos demais músculos foi abundante.

O músculo sartório mostrou maior capacidade regenerativa entre todos os músculos avaliados. Os músculos semimembranoso, diafragma, bíceps femoral, bíceps e tríceps braquial apresentaram as maiores intensidades para resposta inflamatória, enquanto que nos demais esta foi moderada.

Os músculos sartório e semitendinoso exibiram calcificação em grandes quantidades e os músculos masseter e bíceps braquial apresentaram-se em pequenas quantidades. Demais músculos essa quantidade foi moderada.

A hialinização foi moderada nos músculos masseter, diafragma e semitendinoso e intensa nos demais.

Ao realizar o segundo método, analisamos os graus de acometimento dos músculos dos cães afetados e observamos que as maiores frequências foram para o grau 3 (54,5%), grau de

maior acometimento, e grau 2 (28,1%) e as menores para o grau 1 (14%) e grau 0 (3,3%), grau de menos acometimento.

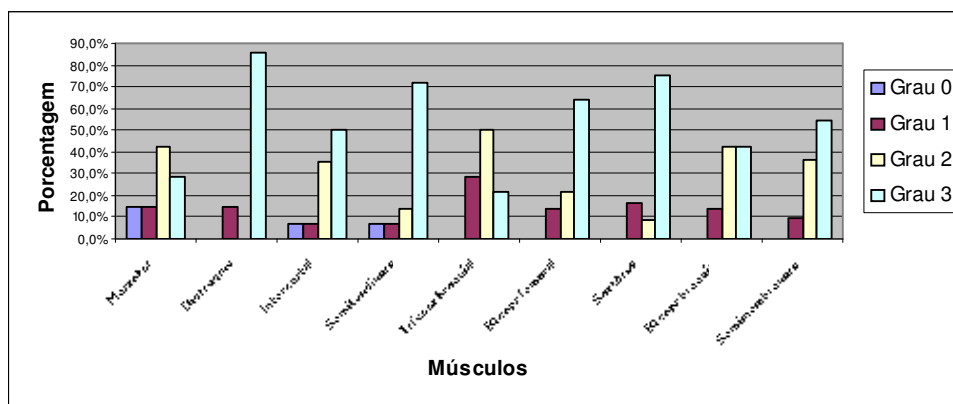
O músculo mastigatório (masseter) apresentou maior frequência para o grau 2 (42,8%), enquanto que os respiratórios para o grau 3 (67,8%) (Tabela 1 e Figura 2 e 3).

Nos músculos locomotores do membro torácico, foram verificadas maiores frequências para o grau 2 (46,4%) enquanto que nos músculos locomotores do membro pélvico, contatou-se elevado grau de acometimento, sendo o grau 3 (66,3%) o mais freqüente (Figura 3).

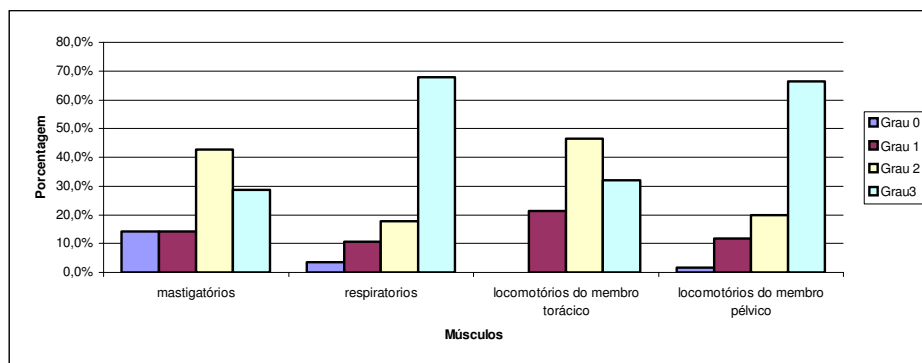
**Tabela 1.** Frequência (%) dos graus de acometimento dos músculos dos cães afetados com DMGR - Jaboticabal - SP - 2006

Músculos	Graus de lesão (%)			
	0	1	2	3
Masseter	14,3	14,3	42,8	28,6
Diafragma	-	14,3	-	85,7
Intercostal	7,1	7,1	35,7	50,0
Semitendinoso	7,1	7,1	14,2	71,4
Tríceps braquial	-	28,6	50,0	21,4
Bíceps femoral	-	14,2	21,4	64,3
Sartório	-	16,7	8,3	75,0
Bíceps braquial	-	14,2	42,8	42,8
Semimembranoso	-	9,1	36,4	54,5
TOTAL	3,3	14,0	28,1	54,5

**Figura 2.** Frequência (%) dos graus de acometimento dos músculos dos cães afetados com DMGR – Jaboticabal – SP – 2006.



**Figura 3:** Freqüência (%) dos graus de lesão em relação às classes funcionais dos músculos avaliados.



Em ordem decrescente, avaliando-se os grupos musculares conjuntamente, todos demonstraram elevado grau de acometimento na seguinte ordem: músculos respiratórios, músculos locomotores do membro pélvico, músculos locomotores do membro torácico e músculos mastigatórios.

A musculatura respiratória foi a mais acometida dentre as classes funcionais avaliadas, os músculos diafragma, sartório, semitendinoso, bíceps femoral e semimembranoso isoladamente foram os que apresentaram os graus mais elevados de lesões. Os músculos masseter e o tríceps braquial isoladamente demonstraram menor acometimento pela doença, os músculos locomotórios do membro torácico e mastigatórios foram os menos acometidos dentre as classes funcionais analisadas. Houve comprometimento significativo da musculatura esquelética das três classes funcionais (mastigatória, respiratória e locomotória), em cães DMGR.

### Referências bibliográficas:

CHETBOUL, V.; ESCRIOIR, C.; TESSIER, D.; RICHARD, V.; POUCHELON, J.L.; THIBAUT, H.; LALLEMAND, F.; THUILLEZ, C.; BLOT, S.; DERUMEAUX, G. Tissue Doppler imaging detects early asymptomatic myocardial abnormalities in a dog model of Duchenne's cardiomyopathy Preclinical research, doi:10.1016/j.ehj.2004.08.013, 2004.

COOPER, B.J.; WINAND, N.J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B.A.; HOFFMAN, E.P.; KUNKEL, L.M.; SCOTT, M.O.; FISCHBECK, K.H.; KORNEGAY, J.N.; AVERY, R.J. et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, London, v.334, n. 6178, p.154-156, 1988.

HAYS, A.R.; ARMBRUSTMACHER, V.W. In: Rubin, E.; Farber, J.L.: **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 27, p.1363-1389.

KORNEGAY, J.N.; TULER, S.M.; MILLER, D.M.; LEVESQUE, D.C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle and Nerve**, New York, v.11, n.10, p.1056-1064, 1988.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, p.100-8, 2002.

VALENTINE, B.A.; COOPER, B.J.; CUMMINGS, J.F.; deLAHUNTA, A. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v.97, p.1-23, 1990.

Bolsa: **CNPq/PIBIC**