

THAÍS PEIXOTO GAIAD MACHADO

**Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo
morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne**

São Paulo

2009

THAÍS PEIXOTO GAIAD MACHADO

**Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo
morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2187
FMVZ

Machado, Thaís Peixoto Gaiad

Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne / Thaís Peixoto Gaiad Machado. – 2009.

104 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Análise de marcha. 2. Biomecânica. 3. Colágeno muscular. 4. Distrofia muscular. 5. Modelo GRMD. I. Título.

ERRATA

MACHADO, T. P. G. **Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne.** 2009. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Folha de Avaliação	2	1	GAIAD, Thais Peixoto	MACHADO, Thais Peixoto Gaiad
Resumo	2	1	GAIAD, T. P.	MACHADO, T. P. G.
Abstract	2	1	GAIAD, T. P.	MACHADO, T. P. G.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

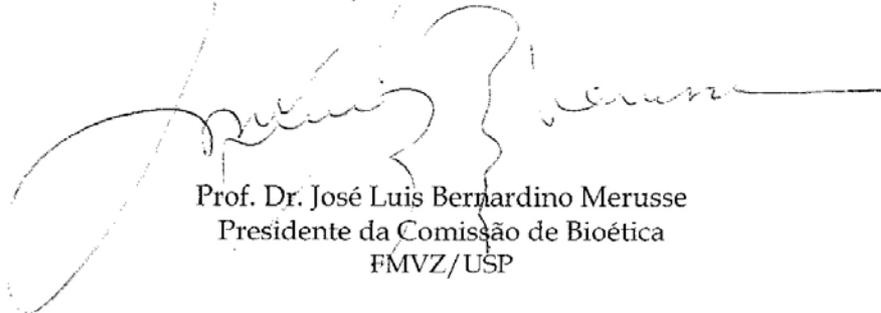
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) como modelo morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne", protocolado sob o nº1031/2006, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio (Pós-Doutorado-VCI), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 07/02/07".

(We certify that the Research "Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) as experimental model from tissue repair of Duchenne Muscular Dystrophy", protocol number 1031/2006, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 02/07/2007).

São Paulo, 08 de fevereiro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GAIAD, Thais Peixoto

Título: Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo morfofuncional da
reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne

Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Data: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Dedico esta pesquisa à minha família...
Por todos os inesquecíveis momentos de luta e alegria,
Pela união que transforma os sonhos e
Pelo amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador de mestrado e doutorado, Carlos Eduardo Ambrósio, pelos ensinamentos sobre a pesquisa e ciência. Muito obrigada por sua compreensão e incentivo em tantos momentos vividos nesses cinco anos... (Nunca me esquecerei dos “papers”! aqueles a organizar, os submetidos, os rejeitados, os resubmetidos e, finalmente, os aceitos...)

À Profa. Maria Angélica Miglino por todo o apoio desde nossa chegada ao Departamento. Seu exemplo de determinação e luta foram ensinamentos valiosos na minha formação como profissional e pessoa.

Ao Prof. Júlio Cerca Serrão, agradeço sua recepção no laboratório de Biomecânica da Escola de Educação Física e Esportes da USP desta pesquisa com os cães e todas as explicações em uma área completamente nova para mim. Obrigada pela paciência!

À querida Profa. Fátima Aparecida Caromano, sempre pronta para uma conversa sobre a pesquisa, a Fisioterapia, ou o que quer que fosse... Obrigada pelos direcionamentos da pesquisa, desde a escrita do projeto até os últimos ajustes.

Ao Prof. Davi Feder, foi um grande prazer e aprendizado discutir com o senhor sobre as pesquisas em distrofias musculares. Seus conhecimentos enriqueceram minha visão sobre a situação das mesmas e os anseios das famílias e pacientes.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de ensino superior – CAPES, pela bolsa do período sanduíche.

À Karla Patricia Cardoso de Araújo, colega de departamento e em seguida de “Canil GRMD”. Impossível descrever aqui as situações, desde escrita de projeto, nascimento de cães, ajuda no transporte dos cães ao laboratório de biomecânica para as coletas, até os congressos internacionais. Foram muitos momentos que se transformaram numa querida amizade!

À Juzinha Passos, Marina Britto, Cristiane Wenceslau, Flavio Ribeiro Alves, Matheus Tjara, Marina Brólio, Leandro Fadel e Lorena, obrigada pelo companheirismo nesses anos e por todas as risadas... Só alegria!!!

Ao querido Augusto, cuidador dos cães e nosso protetor! Obrigada por todos esses anos de dedicação e luta ao nosso lado. Você é especial, que Deus o abençoe sempre.

À Jaqueline, do laboratório de biomecânica, agradeço sua paciência desde as minhas primeiras visitas ao lab. Sua presença em todas as coletas foi imprescindível para o sucesso desta pesquisa.

Ao colega Thiago Macedo Guimarães por todas as suas explicações e presença nas coletas. Obrigada também pela atenção nos tantas conversas e e-mails de dúvidas, seja de perto ou de longe!

Aos funcionários, Ronaldo Agostinho e Sandra Freiberg, pelos momentos de laboratório cheios de processamento de material, colorações, soluções e mais do que isso, por todas as conversas e sorrisos!

Ao Maicon e Jaque, queridos e prestativos desde os primeiros dias do mestrado e depois no período do doutorado! Obrigada pelo carinho e atenção.

À Profa. Paula de Carvalho Papa pela oportunidade de participar do projeto Probral / Programa Brasil – Alemanha. E assim, aprender com os alemães...

À Profa. Christiane Pfarrer pelo período de doutorado sanduíche na Alemanha. Obrigada pela sua atenção e pela recepção de seus alunos, Nina e Ian.

Aos queridos Marc e Leoni, pela atenção na chegada à Alemanha, aos primeiros dias e a todos os conselhos... Danke schon!

Aos amigos Rosemberg e Cintia... agradeço pela amizade de anos fortalecida pelos nossos encontros e longos papos! Mil vezes obrigada pelas portas abertas no cantinho da Pompéia na nossa volta da Alemanha. Saravá!

Aos queridos tio Jorge e tia Maria Helena, nossa família paulistana! Que nos receberam na chegada do Paraná em 2005 e se tornaram grandes companheiros dos dias de São Paulo...

À Cris, que desde os tempos de Presidente Prudente está presente! E ao Eduardo, seu companheiro e eterno “arbeitsloss”... Viva a beleza dos encontros!

À especial tia Inez, que esteve tão presente nos nossos dias de doutorado! Muito obrigada pelo carinho....

Aos meus queridos pais, José Roberto e Maria Luiza, obrigada pelo exemplo de casal e de carinho que são em minha vida e por toda a força que nos dão!

Aos meus lindos irmãos, Felipe, Beatriz e Natália, pelos nossos encontros sempre alegres em Piracicaba ou em outros lugares !!! Amo vocês...

Ao meu “segundo pai e segunda mãe”, João Sete e Marli! Jovens eternos que muito nos ensinam...

Enfim, ao meu companheiro Alex, sempre guerreiro ao lado de suas duas meninas (agora três...). Obrigada pelos incentivos nos momentos mais difíceis, pela paciência e carinho!

E à meiga Flora, minha linda flor e “melhor” companheira em muitos momentos sozinhas e inesquecíveis em São Paulo. Sua coragem desde pequena faz de você uma pessoa muito especial.

*“Há homens que lutam um dia e são bons,
Há outros que lutam um ano e são melhores,
Há os que lutam muitos anos e são muito bons,
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis”.*

(Bertold Brecht)

*“Seus poucos anos de vida
Valem mais do que cem anos...”*

(Ruy Guerra)

RESUMO

GAIAD, T. P. **Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne.** [Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) as morphofunctional model of the tissue repair on Duchenne Muscular Dystrophy]. 2009. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A fisioterapia motora vem sendo empregada como terapia de suporte para as distrofias musculares, porém, seu efeito no músculo distrófico e na função motora global precisa ser melhor compreendida para direcionar os tratamentos. Esta pesquisa objetiva elucidar o papel da fisioterapia motora na deposição de colágeno muscular, bem como em alguns parâmetros cinemáticos e dinâmicos da marcha do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). Fragmentos do músculo *biceps femoralis* foram coletados por biópsia de cinco animais GRMD de mesma idade para análises por microscopia de luz e imuno-histoquímica. A marcha dos animais foi registrada por câmeras de vídeo e as Forças de Reação do Solo (FRS) nos sentidos vertical (F_y), craniocaudal (F_x) e mediolateral (F_z) coletadas utilizando uma plataforma de força Kistler AG (9287A/100Hz) com os valores normalizados pelo peso corporal. Dois animais (tratados: TD) participaram do protocolo de fisioterapia que consistiu de atividade de marcha com velocidade controlada em área de 288 metros, 3 vezes/semana durante 12 semanas. Os animais controles (CD) mantiveram sua rotina de atividades diárias. A coleta I foi considerada como tempo zero (t_0) com $n=5$ e o tempo após a fisioterapia (t_1) como coleta II. As análises estatísticas consideraram $p<.01$. Foi realizada Imuno-histoquímica anti-colágenos tipo I, III (Calbiochem®) e IV (Bioreagents®). As características histopatológicas foram observadas no t_0 . Os CD apresentaram fibras hipercontraídas no t_1 , não observadas nos TD. Os colágenos do tipo I e III foram os mais presentes e aumentados. No t_1 , feixes espessos de colágeno do tipo I foram observados no endomísio dos TD, comparado ao t_0 . Os animais GRMD apresentaram velocidade lenta de marcha no t_0 ($0.64 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) com diminuição da mesma no t_1 para os TD ($0.45 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). No t_1 , os TD apresentaram diminuição da ADM do quadril ($p<.0001$), bem como do ombro ($p<.05$). O joelho e carpo dos animais foram as articulações com maiores ADM durante a marcha. Houve aumento da força vertical (F_y) dos membros torácicos e pélvicos dos TD e CD no t_1 comparada ao t_0 . Os CD mostraram aumento do tempo de suporte dos membros torácicos no t_1 . A força propulsiva (F_x) dos animais GRMD estava diminuída no t_0 , não mostrando sofrer influência da

fisioterapia. A força medial (Fz^+) do membro torácico dos TD mostrou aumento no t1 quando comparada aos CD ($p < .0001$). Os animais tratados apresentam diminuição da flexibilidade e menor regeneração do tecido muscular em comparação aos animais não tratados. Funcionalmente, a fraqueza muscular dos animais distróficos reflete em uma marcha lenta, com característica de sobrecarga e dificuldade de avançar com o corpo. Além destas características, os TD apresentam menor amplitude de movimento articular proximal quando comparado ao t0. A fisioterapia motora aplicada acelera as alterações morfológicas no músculo distrófico sem interferir na progressão das disfunções de marcha no modelo canino da distrofia muscular.

Palavras – chave: Distrofia muscular. Modelo GRMD. Colágeno muscular. Análise de marcha. Biomecânica.

ABSTRACT

GAIAD, T. P. **Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) as morphofunctional model of the tissue repair in Duchenne Muscular Dystrophy.** [Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) como modelo morfofuncional da reparação tecidual na Distrofia Muscular de Duchenne]. 2009. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Physiotherapy has been widely used as support treatment for muscular dystrophies. Its effect on dystrophic muscle and global function should be better understood to guide treatments. This study aims to understand the role of motor physical therapy on muscular collagen deposition and some kinematics and dynamical parameters of gait of the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) model. Five GRMD dogs with the same age had fragments of *biceps femoralis* collected by biopsy for light microscopy and Immunohistochemistry analysis. Gait of the dogs were video recording for kinematics analysis and Ground Reaction Forces (GRF) in vertical (F_y), craniocaudal (F_x) and mediolateral (F_z) direction were collect using a Force Plate Kistler AG (9287A/100Hz) and normalized for body weight. Two animals (therapy dogs: TD) underwent a protocol which consisted of velocity controlled walking activity in an area of 288 meters total length, 3 times/week per 12 weeks. Control dogs (CD) maintained their daily routine. Zero time (t_0) is considered at collect I (n=5) and time after therapy (t_1) - collect II. Statistical analysis considered $p < .01$. Immunohistochemistry anti-collagen types I, III (Calbiochem®) and IV (Bioreagents®) were performed. Histopathology features were observed at t_0 . CD presented hypercontracted fibers that were not observed on TD at t_1 . Collagen types I and III were the most increased ones. At t_1 , thicker tracts of collagen type I were observed at the endomysium of TD compared to t_0 . GRMD dogs presented slow velocity of gait ($0.64 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) at t_0 and there were a decrease of this velocity of TD at t_1 ($0.45 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Hip ROM was decrease at t_1 ($p < .0001$), as well as the shoulder ROM ($p < .05$) for TD. Stifle and Carpal ROM presented the highest active ROM during gait of dystrophic dogs. F_y of thoracic and pelvic limbs at t_1 of TD and CD was higher than t_0 . CD presented increase of support time of thoracic limbs at t_1 (49 to 53%). Propulsive force (F_x^-) of GRMD dogs were decrease at t_0 , with no effect of physical therapy. Medial force (F_z^+) of TD thoracic limbs were higher at t_1 when compared to CD ($p < .0001$). TD presents less muscular flexibility and regeneration when compared to CD. Functionally, the muscular

weakness of dystrophic dogs reflects a gait with slow velocity, overloaded and difficulty to goes forward. Moreover, TD presented lower range of motion of the proximal joints when compared to t0. The applied motor physical therapy accelerates the morphological alterations on dystrophic muscle without stop the gait disorders of the canine model of Duchenne muscular dystrophy.

Key-words: Muscular dystrophy. GRMD model. Muscular collagen. Gait analysis. Biomechanics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Blotting ninhadas Kyra x Ringo e Bianca x Lucky para diagnóstico da distrofia muscular com ausência da distrofina. Centro de Estudos do Genoma Humano – IB / USP.....	38
Figura 2 -	Canil GRMD Brasil – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Animais em pátio aberto durante o dia. Baias cobertas de 3m ² utilizadas no período noturno...	39
Figura 3 -	A: Área de 36 x 5 metros organizada para o treino da marcha dos animais. B: Animais k4 e k6 (tratados) em adaptação na pista de fisioterapia. Local: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.....	42
Figura 4 -	Animais k4 e k6 com coleiras do tipo peitoral no Canil GRMD, FMVZ-USP em adaptação para coleta e protocolo de fisioterapia....	43
Figura 5 -	Pontos anatômicos no hemitorço direito para coleta da cinemática sincronizada com a FRS do animal K4.....	44
Figura 6 -	Coleta de fragmento muscular por biópsia aberta do músculo bíceps femoral. Membro posicionado em posição neutra para evitar coleta com músculo em encurtamento ou alongamento.....	45
Figura 7 -	Valores da massa corporal individual dos cinco animais distróficos do 2º ao 10º mês de vida.....	49
Figura 8 -	Média de tempo em segundos para completar cada um dos percursos dos animais k4 e k6 durante as doze semanas de treino.....	50
Figura 9 -	Fotomicrografias do músculo bíceps femoral dos animais distróficos corados com Hematoxilina e Eosina	52
Figura 10 -	Fotomicrografias do músculo bíceps femoral dos animais distróficos corados com <i>Picrossírius red</i>	54
Figura 11 -	Fotomicrografias do músculo bíceps femoral, Imuno-histoquímica, anti-colágeno I	56
Figura 12 -	Fotomicrografias do músculo bíceps femoral, Imuno-histoquímica, anti-colágeno III	57
Figura 13 -	Fotomicrografias do músculo bíceps femoral, Imuno-histoquímica, anti-colágeno IV	58
Figura 14 -	Trecho percorrido pelos animais distróficos durante coleta da FRS e	

	cinemática no Laboratório de Biomecânica da EEFÉ-USP. Animal k4, t0.....	59
Figura 15 -	Gráfico típico das FRS em cães saudáveis representando a força de reação dos dois membros (torácicos e pélvicos) do mesmo hemicorpo do animal no trote	59
Figura 16 -	Ângulos articulares de interesse analisados utilizando o sistema Peak Motus.....	60
Figura 17 -	Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações coxofemoral, joelho e tornozelo dos animais distróficos no t0.....	61
Figura 18 -	Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações coxofemoral, joelho e tornozelo dos animais distróficos no t1.....	61
Figura 19 -	Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações do carpo, cotovelo e ombro dos animais distróficos no t0.....	62
Figura 20 -	Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações do carpo, cotovelo e ombro dos animais distróficos no t1.....	62
Figura 21 -	Média da velocidade de coleta no t0 (n=5) e t1 (separados em tratados e controles) em $m.s^{-1}$	64
Figura 22 -	Relação do tempo de apoio dos membros torácicos e pélvicos com a velocidade de marcha. LH: membro pélvico esquerdo; LF: membro torácico esquerdo; RH: membro pélvico direito e RF: membro torácico direito.....	64
Figura 23 -	Média e desvio padrão da Força de Reação do Solo vertical (F_y) dos cinco animais no t0 (n=5) e t1 (separados em tratados e controles) normalizado pelo peso corporal (PC).....	65
Figura 24 -	Média e desvio padrão da Força de Reação do Solo ânteroposterior (F_x) dos cinco animais no t0 (n=5) e t1 (separados em tratados e controles) normalizado pelo peso corporal (PC), bem como as componentes de propulsão (F_x^+) e frenagem (F_x^-).....	66
Figura 25 -	Média e desvio padrão da Força de Reação do Solo médiolateral (F_z) dos cinco animais no t0 (n=5) e t1 (separados em tratados e controles) normalizada pelo peso corporal (PC), bem como as componentes lateral (F_z^+) e medial (F_z^-).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros biométricos dos animais controles e tratados nos momentos t0 e t1	40
Tabela 2 -	Alterações histopatológicas observadas no músculo distrófico.....	51
Tabela 3 -	Média da Amplitude de movimento articular (ADM) ativa das articulações do membro torácico dos animais controles e tratados.....	63
Tabela 4 -	Média da Amplitude de movimento articular (ADM) ativa das articulações do membro pélvico dos animais controles e tratados.....	63
Tabela 5 -	Média dos valores de pico da Força vertical (Fy) de cada um dos animais para o membro torácico e pélvico no t0 e t1 normalizados pelo peso corporal	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	MODELO DE ESTUDO	24
2.2	AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA	26
2.3	REPARAÇÃO TECIDUAL	29
2.4	INTERVENÇÃO	30
3	HIPÓTESES	34
4	OBJETIVOS	36
5	MATERIAL E MÉTODO	38
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.2	PROTOCOLO DE ATIVIDADES	41
5.3	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	42
5.3.1	Avaliação biomecânica	43
5.3.2	Biópsia muscular	45
5.3.3	Protocolo histológico	46
5.3.4	Protocolo de imunohistoquímica (IHC)	46
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6	RESULTADOS	49
6.1	PROTOCOLO DE ATIVIDADES	49
6.2	MORFOLOGIA	50
6.2.1	Microscopia de luz	50
6.2.2	Imunohistoquímica (IHC)	55
6.3	AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA	58
6.3.1	Cinemática	59
6.3.1.1	Velocidade	64
6.3.2	Força de reação do solo	65
6.3.2.1	Força de reação do solo x Velocidade	68
7	DISCUSSÃO	70
8	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é a principal estrutura acometida na Distrofia Muscular de Duchenne, uma vez que a distrofina, proteína ausente nesta doença, é encontrada em grandes proporções na musculatura esquelética e, em menores quantidades, no músculo cardíaco e liso. Esta proteína possui funções específicas no sarcolema, cruciais para garantir a sobrevivência da fibra muscular.

As pessoas com este tipo de distrofia apresentam, como sinais clínicos, a diminuição progressiva de massa e força muscular, seguida de diminuição dos movimentos, perda da deambulação e óbito por parada cardíaca e/ou respiratória em torno dos 25 a 30 anos. Como permanece sem cura, desde seus primeiros relatos em 1852 e ainda, mais recentemente, com a identificação da mutação / deleção genética da DMD, terapias coadjuvantes são responsáveis por manter as funções do organismo e de vida diária afetando o tempo e a qualidade de vida, sendo caracterizadas como terapias de manutenção da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

A fisioterapia motora é empregada com objetivo de retardar a perda da massa e da força muscular e a incidência de encurtamentos, prolongando desta forma o tempo de deambulação e retardando a dependência da cadeira de rodas. Apesar de ser um dos poucos tratamentos para a maioria da população e oferecer benefícios para a função motora dos pacientes, o efeito da fisioterapia na morfologia muscular e adaptação tecidual na ausência da proteína distrofina, permanece em discussão. Poucos estudos abordam as modalidades de exercício empregadas pela fisioterapia motora no tratamento da DMD e os existentes têm levantado dúvidas dos efeitos em longo prazo e da relação entre ganho de função e lesão muscular.

O modelo canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) vem sendo estudado por diferentes grupos de pesquisa no mundo, substituindo o camundongo *mdx* que, apesar de ser de fácil manejo, apresenta evolução da doença diferente de humanos. A semelhança no peso, tamanho de massa muscular e características de sintomas progressivos encontrados no modelo GRMD e em humanos, vem tornando este modelo o mais indicado para estudos pré-clínicos de intervenções terapêuticas.

Este estudo busca responder, por meio da aplicação de uma modalidade da fisioterapia motora no modelo canino GRMD, os efeitos que a mesma provoca na função motora global e

nas alterações morfológicas da fibra muscular esquelética distrófica, com o principal objetivo de aprimorar a aplicação desta terapia e aperfeiçoar seus benefícios na clínica humana.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O termo *distrofia muscular* aborda um grupo heterogêneo de doenças genéticas e progressivas com característica de afetar, principalmente, a cintura pélvica e escapular, variando de formas graves com início na primeira década de vida até formas moderadas de início tardio e progressão lenta (BACH, 2004). Nos últimos 20 anos, diversas proteínas musculares e seus respectivos genes, cujas mutações acarretam diferentes formas de distrofias, foram identificadas (CHAKKALAKAL et al., 2005).

A distrofina participa, juntamente com outras proteínas, do complexo distrofina - glicoproteínas (DGC), o qual possui função mecânica e estrutural, protegendo as fibras musculares de lesões produzidas por contrações ao longo de tempo (MARQUES, 2004). Outros estudos sugerem seu envolvimento na permeabilidade da membrana e apoptose celular (HACK; GROH; MCNALLY, 2000). Sua ausência resulta na Distrofia Muscular de Duchenne, caracterizada por progressão clínica rápida e severa, afetando meninos numa proporção de 1: 3.500 nascidos vivos (STROBER, 2006).

A DMD é causada por uma mutação no gene da distrofina no locus Xp21. Ainda que o ponto de mutação gênica dos portadores de DMD seja o mesmo, fenotipicamente as características são variáveis. Estudos investigam a relação entre fenótipo com o tipo e local de mutação/deleção genética. Gillard et al. (1989) e Koenig et al. (1989) encontraram que deleções genéticas do tipo *frameshift* resultam em um fenótipo mais severo do que o observado em deleções do tipo *in-frame*. Outro estudo, analisando a população japonesa, não encontrou relação direta entre fenótipo e deleção genética nos 102 pacientes estudados (NISHIYAMA et al., 2007).

Nicholson et al. (1993) investigaram o efeito da deleção gênica na expressão da proteína distrofina em pacientes com fenótipos definidos. Eles analisaram dados clínicos, genéticos, imuno-histoquímicos e histopatológicos de 100 pacientes e relatam que o fator que exerce maior influência no fenótipo é o ponto da deleção do tipo *open reading frame*.

Em animais do modelo GRMD, Schatzberg et al. (1998) relatam que a variabilidade fenotípica depende da quantidade de proteína distrofina no complexo glicoproteína-distrofina (CDG) e do local da deleção do gene.

Em 2009, Desguerre et al. publicaram um estudo que investigou a heterogeneidade clínica de 75 pacientes com DMD. Essa característica motivou a pesquisa, uma vez que é vista como um dos maiores entraves para a interpretação de novas terapias para estes

pacientes. Os autores classificaram os pacientes estudados em 4 subfenótipos de acordo com a severidade da disfunção muscular e mental. Essa classificação auxilia na identificação do prognóstico dentro de cada grupo, assim como na avaliação de terapias.

Apesar de ter sido descrita pela primeira vez em 1852 pelo inglês Meryon, posteriormente por Duchenne na França em 1868 (BACH, 2004), e seu gene ter sido descrito há pelo menos 20 anos, a distrofia muscular de Duchenne permanece sem cura até os dias atuais.

2.1 MODELO DE ESTUDO

Dentre os modelos animais para pesquisas farmacológicas, celulares, morfofisiológicas, gênicas e fisioterapêutica da Distrofia Muscular de Duchenne, o camundongo *mdx* e o canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) são, atualmente, os mais estudados.

O *mdx* é o modelo de laboratório mais comum, apresentando homologia genética e bioquímica, porém, seu fenótipo é pouco próximo do apresentado por humanos com a mesma doença (VAINZOF et al., 2008). A patologia é considerada moderada e a função mecânica da musculatura esquelética é pouco comprometida nos camundongos, resultando em um tempo de vida próximo ao normal. Esse achado traz evidências de que, a ausência da proteína distrofina é menos crítica para o *mdx* mouse do que para os humanos (COLLINS; MORGAN, 2003), limitando assim a extrapolação de novos achados neste modelo para os humanos com DMD (ZHOU et al., 2006).

Segundo McClorey et al. (2006), devido à progressão lenta e quadro clínico considerado normal para o *mdx* mouse, o modelo canino GRMD deve ser considerado relevante para o estudo da DMD, uma vez que, além da homologia genética e bioquímica, existem semelhanças no tamanho dos animais e na progressão da doença nas espécies canina e humana.

As alterações histopatológicas, encontradas nestes modelos de estudo, na ausência da distrofina podem ser divididas em fase I e II. A fase I é observada em todas as espécies com deficiência da distrofina já relatados (humanos, camundongos, cães, gatos) e consiste em cinco achados principais: hialinização, hipertrofia das miofibrilas, acúmulo de sais de cálcio, necrose e consequente regeneração das miofibrilas. As alterações correspondentes à fase II, fibrose endomisial e atrofia da miofibrila, são lesões facultativas, encontradas a partir dos dois meses de idade e observadas apenas em humanos com DMD, cães GRMD e no músculo diafragma do *mdx* mouse (HOFFMAN; GOROSPE, 1991 *apud* NGUYEN et al., 2002, p.107).

Nguyen et al. (2002), em um estudo com neonatos GRMD, encontraram que estes animais desenvolvem as alterações da fase I logo nos primeiros dias de vida e também as da fase II antes mesmo dos dois meses de vida, sugerindo que este modelo apresenta alterações musculares comparáveis às de humanos com DMD.

Segundo Zhou et al. (2006) o GRMD é um modelo que vem sendo utilizado principalmente para estudos patofisiológicos comparados entre as duas espécies, humana e canina, além de avaliação de terapias que já tiveram sucesso no modelo *mdx*.

Nesse contexto, Childers et al. (2005) investigaram a força muscular na ausência da distrofina pós-indução de contração excêntrica no modelo canino. Eles sugerem um déficit de força muscular pós-intervenção, tanto em músculos distróficos como em saudáveis.

Outro estudo relata o comportamento de enzimas séricas, entre elas, a CK (creatinoquinase) pós-exercício de intensidade moderada (VALENTINE; BLUE; COOPER, 1989). A microvascularização do músculo esquelético do modelo GRMD foi investigada por meio de análise de imagem, uma vez que é vista como importante via de terapia gênica e celular para DMD (NGUYEN et al., 2005).

Os autores relatam alterações na microvascularização muscular, entre elas, aumento do diâmetro capilar e maior área total vascular nos animais distróficos estudados, em relação aos cães saudáveis. Além disso, nos animais entre 7 e 10 meses, foi observado fibrose, que esteve associada à diminuição da densidade microvascular, aumento da distância intracapilares, porém, proporção normal de capilares por fibra muscular, bem como em relação à área total.

A atrofia e hipertrofia de alguns músculos do membro pélvico, do modelo GRMD, foram investigados por Kornegay et al. (2003). Os resultados apontam uma hipertrofia do músculo sartório cranial em animais jovens (4 a 10 meses) que, ao longo do tempo, sofre atrofia. De acordo com seus achados, os autores sugerem que o encurtamento deste músculo nos animais desempenha papel análogo ao da banda iliotibial em humanos com DMD.

Liu et al. (2004) estudaram o efeito da administração diária de prednisona em animais GRMD. Eles observaram melhora na força muscular dos animais tratados em relação à controles GRMD. Porém, a melhora da força muscular foi acompanhada de alterações histopatológicas. Os autores relatam que, apesar dos dados funcionais mostrarem benefícios do emprego da droga, a histopatologia muscular aponta para efeitos deletérios do emprego da mesma.

A eficácia do Tissue Doppler foi atestada como sensível para o diagnóstico precoce de anormalidade cardíaca no modelo canino, por Chetboul et al. (2004). A terapia gênica *in vitro*, em músculo distrófico do modelo GRMD, foi investigada por McClorey et al. (2006). O uso de phosphorodiamidate morpholino oligomers peptid-like (PMO-pep) foi capaz de induzir a altos níveis de expressão de distrofina, sem efeitos adversos às células.

Mais recentemente, Sampaio et al. (2006) estudaram o transplante de células tronco de mesoangioblastos em cachorros distróficos e encontraram uma importante reconstituição

das miofibrilas expressando distrofina, além de melhora na contração muscular e, em alguns casos, preservação da habilidade de caminhar nos animais estudados.

Em 2008, nosso grupo de pesquisa relatou os resultados da eficácia da injeção via sistêmica de células tronco de polpa dentária humana em cães do modelo GRMD, em detrimento da via local (KERKIS et al., 2008).

Mercuri et al. (2008) publicaram os resultados de um consenso entre diferentes pesquisadores do mundo, que se reuniram em três diferentes eventos sobre Disfunções Neuromusculares na Europa. O artigo discute, basicamente, a avaliação de terapias em pacientes portadores de DMD e Amiotrofia-espinal (AMS) e a avaliação de estudos pré-clínicos (drogas, terapias celulares e gênicas) em modelos animais para DMD. Os autores avaliam que muita experiência já foi gerada com os estudos pré-clínicos até agora desenvolvidos nos modelos animais mdx e caninos, GRMD e Beagle. Eles concordam que cada um dos modelos possui suas vantagens e limitações e, que até o momento, nenhum estudo de modelo pré-clínico favorável conseguiu gerar uma aplicação bem sucedida em humanos com doenças neuromusculares.

Dessa forma, novos achados neste modelo animal são necessários para contribuir e embasar futuros estudos para terapia da DMD humana.

2.2 AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA

A Biomecânica é a ciência que se ocupa de análises físicas do movimento. A biomecânica do movimento procura explicar como as formas de movimento acontecem a partir de indicadores cinemáticos e dinâmicos. A organização da estrutura biológica do corpo humano permite a produção de força, a partir das contrações musculares, que faz com que o corpo seja um sistema autônomo e independente (AMADIO; SERRÃO, 2007).

A avaliação qualitativa da marcha em humanos e animais foi utilizada por muitos anos. Porém a habilidade humana em detectar os detalhes da marcha durante um único ciclo de marcha é limitado (GILLETTE; ANGLE, 2008). Esses autores realizaram uma revisão dos estudos sobre a locomoção canina e afirmam que as análises cinemática e cinética estão validadas como ferramentas de grande utilidade na medicina veterinária.

Avaliações quantitativas, da função de marcha de animais, têm sido relatadas na literatura, em relação à Dinamometria, para investigações das forças de reação do solo e, em

menor frequência, em relação à Cinemática, para estudo dos movimentos angulares em animais normais e com alterações ortopédicas.

Estudos no modelo GRMD focam principalmente funções morfológicas e moleculares do músculo distrófico. As avaliações de contração muscular têm sido realizadas utilizando medidas de estimulação nervosa em músculos isolados (DANGAIN; VRBOVA, 1989; CHILDERS et al. 2002; LIU, et al., 2004). Porém, os parâmetros cinemáticos e dinâmicos da marcha destes animais ainda não foram estudados.

A Cinemetria é um ramo da biomecânica que busca medir os parâmetros cinemáticos do movimento, ou seja, investigar a posição, deslocamento, velocidade e aceleração de um ou diferentes segmentos de interesse (AMADIO et al., 1999). Consiste no registro de imagens e reconstrução de pontos marcados, conforme um modelo antropométrico, que estima a localização dos eixos anatômicos do sujeito (AMADIO; SERRÃO, 2007).

Em relação à marcha canina, esta ferramenta pode oferecer informação à respeito da estrutura do sistema músculoesquelético, claudicações e avaliação de intervenções médicas ou cirúrgicas (GILLETTE; ANGLE, 2008).

De acordo com estes mesmos autores as informações podem ser coletadas por sistemas two-dimensional (2D) ou three-dimensional (3D). O sistema 3D fornece informações mais precisas e compreensíveis, porém, possui alto custo, estando limitada a poucos laboratórios. O sistema 2D possui menor custo, porém, não oferece dados sobre os movimentos de rotação e circundação dos membros.

Kim et al. (2008) compararam os dados cinemáticos do membro pélvico adquiridos por avaliação 2D e 3D de cães. Seus resultados indicam que a análise cinemática com um sistema de vídeo 2D fornece dados precisos e repetíveis do movimento angular sagital dos membros pélvicos caninos durante a marcha.

Em um estudo com cães da raça Golden Retriever, isentos de afecções músculoesqueléticas, Silva (2006) utilizou a cinemática para analisar a marcha de cães saudáveis desta raça, a fim de auxiliar no diagnóstico e tratamento de afecções. Neste estudo, foram mensuradas as variáveis: comprimento do passo e da passada, além dos picos de flexoextensão das articulações dos membros torácicos e pélvicos.

Outro estudo, com 10 Labradores Retrievers saudáveis, atestou a validade da avaliação em 2D da marcha e do movimento de sentar-levantar intra e interobservadores. A avaliação cinemática em 2D intraobservador apresentou altos coeficientes de correlação e a avaliação interobservador mostrou-se aceitável (FEENEY et al., 2007).

A Dinamometria aborda as medidas de força externa entre o corpo e o ambiente. O conceito de força só pode ser interpretado a partir do efeito de sua ação. A interpretação dos componentes ortogonais desta força permite o entendimento das condições do movimento estudado, que respondem por funções de transferência de forças às estruturas do aparelho locomotor, técnicas de estabilidade do apoio, entre outras (AMADIO; SERRÃO, 2007). Seu instrumento básico é a Plataforma de Força, a qual fornece as forças de reação do solo na fase de apoio, bem como o ponto de aplicação desta força durante o movimento (AMADIO et al. 1999).

Estudos de biomecânica animal, em geral procuram relacionar as diferenças qualitativas observadas entre as raças e as variáveis de força de reação do solo. Bockstahler et al. (2007) estudaram a confiabilidade das medidas de plataforma de força em cães de diferentes raças em dias diferentes. Eles utilizaram um sistema de pista (*treadmill system*) formado por quatro plataformas. Os autores encontraram diferenças de medidas entre os cães, porém, não entre os dias e as tentativas de cada um deles, o que mostra que a medida de Força de Reação do Solo na Plataforma de Força oferece medidas reprodutíveis para análise.

Bertram et al. (2000) analisaram o trote de duas raças diferentes: Labradores Retriever, raça característica de caça e Greyhounds, cães de corrida, usando os parâmetros de *Força de Reação ao Solo (FRS)* dos membros pélvicos e torácicos. Os pesquisadores avaliaram *Força Vertical, Ânteroposterior e Médiolateral*. Além disso, foram coletados dados cinemáticos de *Velocidade, Comprimento e Altura do Passo*. Os autores sugerem que diferenças no tamanho de cada uma das raças estudadas têm efeitos importantes na função dos mesmos durante a locomoção.

Ainda pouco utilizada no mundo, principalmente devido às dificuldades de coleta e adaptação do animal ao ambiente, a avaliação biomecânica animal contribui de maneira objetiva no esclarecimento das alterações observadas ou não durante uma avaliação qualitativa da marcha. A avaliação quantitativa pode ser empregada como parâmetro pré e pós-intervenção de diferentes patologias, ou mesmo no entendimento da repercussão de uma patologia muscular, como é o caso da DMD, nas adaptações do movimento.

2.3 REPARAÇÃO TECIDUAL

Durante a evolução das *distrofias musculares* as fibras, que atingem o estágio de degeneração, são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo fibroso e adiposo (VALENTINE et al., 1990).

Na ausência de patologias musculares, as fibras de tecido conjuntivo ao redor do músculo são compostas por diferentes tipos de proteínas colágenas e não colágenas, necessárias para a transmissão de força, bem como para conferir suporte estrutural ao tecido (KOVANEN, 2002).

Os colágenos do tipo I e III são intersticiais e encontrados em proporções diferentes, de acordo com a função do tecido, adaptações ao treino ou patologias. O tipo I responde pelas propriedades de tensão, conferindo propriedades de restrição ao tecido, ao contrário do tipo III, que é encontrado em tecidos mais flexíveis. O colágeno do tipo IV é encontrado na membrana basal e apresenta, principalmente, função estrutural (BANKS, 1992).

Mackey et al. (2005) sugerem que as propriedades mecânicas dos tecidos são parcialmente determinadas pela quantidade e estrutura do colágeno adjacente. De acordo com estes autores, um aumento na quantidade de colágeno do tipo IV, em indivíduos saudáveis, sugere lesão da fibra muscular.

Alguns autores quantificaram por estudo imuno-histoquímico os tipos de colágenos encontrados no tecido conjuntivo do perímísio e endomísio de portadores de distrofias musculares. Hantai et al. (1995) encontraram na DMD e na distrofia muscular congênita, predominância de fibras colágenas do tipo I e III; Rampoldi et al. (1986) encontraram predominância de colágeno do tipo IV em dez meninos estudados e, em outro estudo, Stephens et al. (1982) encontraram, principalmente, colágeno do tipo III no tecido conjuntivo de meninos DMD.

Duance et al. (1980) relacionaram as doenças musculares com a presença anormal do colágeno do tipo IV no tecido muscular e, mais especificamente, a vasta proliferação de colágeno do tipo III com a Distrofia Muscular de Duchenne.

Em outro estudo, relacionando o colágeno muscular tipo I e III com a idade em camundongos *mdx* e normais, Goldspink et al. (1994) observaram maior deposição desses dois tipos, principalmente no diafragma dos animais distróficos. Os autores sugerem que essa expressão aumentada se deve a grande atividade deste músculo quando comparado com os dos membros do *mdx*.

Outros autores, Cozzi et al. (2001) verificaram que aos 15 dias de vida a quantidade de colágeno está aumentada nos animais GRMD em relação aos animais saudáveis, porém, a partir desta idade os valores são iguais aos de animais adultos.

Estudos sobre a presença e proporção das fibras colágenas nas distrofias musculares têm encontrado variações nestes dois aspectos, em relação aos tipos I, III e IV (DUANCE et al., 1980; STEPHENS et al., 1982; RAMPOLDI et al., 1986; HANTAI et al., 1995; PASSERINI et al., 2002). Ainda que os achados de cada autor, em relação ao tipo de colágeno alterado na DMD sejam variáveis, existe um consenso de que os tipos I, III e IV, dentre todos os outros já descritos merecem atenção no estudo da fibrose e adaptação tecidual.

Uma vez que a fibrose é característica deste modelo, bem como de humanos DMD, o estudo da localização e progressão da deposição destes tipos de fibras colágenas, ao longo do tempo, pode elucidar o papel da intervenção fisioterapêutica no músculo distrófico.

2.4 INTERVENÇÃO

As possibilidades terapêuticas atualmente disponíveis para pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne, como a fisioterapia, psicologia, terapia ocupacional, suplementação nutricional e corticoterapia, são considerados tratamentos de manutenção e suporte da evolução da doença (STROBER, 2006). Apesar de não promoverem a cura, pesquisas nestas áreas promovem o avanço nas técnicas específicas, prolongam a sobrevida e melhoram a qualidade de vida de pacientes com DMD (PARKER et al., 2005).

Publicações, sobre as recomendações do exercício físico terapêutico em pacientes com DMD, sugerem que alguma forma de atividade deva ser adotada, uma vez que o sedentarismo, nas pessoas com distrofias musculares, gera atrofia decorrente do desuso, somada à perda de massa muscular resultante da própria evolução da doença (MCDONALD, 2002).

De acordo com Grange e Call (2007) os mesmos exercícios usados para aumentar a força e a resistência muscular em indivíduos com ausência de patologias podem exacerbar o dano no músculo distrófico. Estes autores sugerem que um limite precisa ser definido para guiar a prescrição apropriada de exercícios para pacientes DMD.

Caromano (1999) em uma revisão de diferentes estudos sobre a doença sugere que a caminhada simples, diária, associada a exercícios específicos de alongamento, pode trazer benefícios para a criança que se encontra na fase de deambulação.

Eagle (2002) organizou resultados de um encontro, no Reino Unido, para discutir a fisioterapia nas desordens neuromusculares com profissionais da área da Reabilitação. Os principais objetivos definidos pelo grupo foram: manutenção ou melhora do alongamento muscular, ganho de habilidade funcional pelo exercício e uso de órteses noturnas para minimizar o desenvolvimento de contraturas. O programa de exercícios, recomendado para a Distrofia Muscular de Duchenne, foi de alongamento diário dos músculos sóleo e gastrocnêmio, flexores de quadril e íliotibiais, estímulo da atividade voluntária, por meio de natação e hidroterapia e promoção da simetria postural.

Apesar de alguns autores sugerirem o alongamento como benéfico para a fisioterapia de portadores da DMD (PARKER et al., 2005), Gomes et al. (2007), em um estudo com camundongos, sugerem que esta ferramenta terapêutica pode gerar lesões musculares em músculos saudáveis, principalmente em desuso. Dessa forma, deve ser cautelosamente empregada em músculos distróficos.

A literatura científica, ainda que escassa, recomenda atividades de intensidade leve a moderada, evitando a fadiga e trabalho muscular excêntrico para as distrofias musculares, principalmente para indivíduos com alterações mínimas da função muscular (DEMOS, 1983; RIDEAU, 1985; VIGNOS et al., 1996; ANSVED, 2003; LOVERING et al., 2005).

Ansved (2001), em uma revisão sobre treinamento muscular e distrofias musculares, questiona se protocolos que promovem um aumento na força muscular, necessariamente, estarão melhorando o desempenho funcional para o paciente. No caso das distrofias musculares é possível que não, porém, o autor sugere que novos estudos, focando força muscular e desempenho funcional, possam esclarecer a questão.

Escalas para medir a eficácia das terapias, sejam elas de suporte ou de cura da DMD, vêm sendo estudadas por diferentes grupos de pesquisa. Mercuri et al. (2008) estudaram, por meio de questionários enviados para especialistas, a aplicabilidade das escalas: Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (HFMS), Modified HFMS, Motor Function Measure (MFM), Gross Motor Function Measure (GMFM), The Hammersmith Scale for Assessment of Motor Ability (HAMA), North Star Ambulatory Assessment (NSAA) e Egan Klassification scale (EK).

A partir dos questionários, uma lista de vantagens e desvantagens de cada uma das escalas foi listada. As escalas HAMA, NSAA e EK foram as mais utilizadas em caso de DMD, sendo que as duas primeiras mostraram-se específicas para pacientes ambulantes e a EK para não ambulantes. Os autores relatam que o 'Teste de 6 minutos de marcha' vem sendo explorado por diferentes grupos por apresentar importante significado clínico.

Atualmente, novos estudos têm focado nas diferentes modalidades de exercício recomendado para Distrofia Muscular de Duchenne utilizando modelos animais.

Visando elucidar a influência do exercício no músculo distrófico, Kumar e Boriek (2005) estudaram o efeito do stress mecânico, resultado do alongamento, e a presença do fator NF-KappaB, sinalizador de inflamação no músculo distrófico de camundongos *mdx*. Foi verificado que o fator sinalizador de inflamação já estava presente nos primeiros cinco minutos do alongamento, sugerindo que, o stress mecânico no músculo esquelético com ausência da distrofina, precisa ser esclarecido para não provocar lesões em decorrência de terapêutica inadequada.

Gaiad et al. (2009) empregaram a fisioterapia motora em cães do modelo GRMD e observaram um ganho de amplitude de movimento articular no tarso (tornozelo) dos animais tratados, associado com aumento da área de fibrose endomisial e perimisial no músculo esquelético do membro pélvico destes mesmos animais. Os autores afirmam que a relação entre movimento e a deposição da fibrose muscular precisa ser melhor esclarecida, com o objetivo de influenciar positivamente a função muscular sem gerar danos ao músculo distrófico.

A contração excêntrica muscular, utilizada principalmente durante as atividades de descer escadas ou rampas, e também na movimentação voluntária em menor grau, foi contraindicado por Childers et al. (2002). Os autores estudaram os efeitos desta modalidade de contração no músculo distrófico de cães GRMD e relatam que o maior recrutamento de unidades motora no sentido do alongamento, como ocorre na contração excêntrica, parece aumentar o número de miofibrilas lesadas.

Em um relato de caso de paciente portador da Distrofia muscular e spina bifida, Kimura et al. (2006) observaram que a imobilidade reduziu as alterações histopatológicas e, principalmente, a necrose da fibra muscular nos músculos distróficos dos membros inferiores.

Esses achados, relacionando a modalidade de exercício e os efeitos no músculo distrófico nos modelos animais, sugerem que a mesma atividade benéfica para a manutenção da massa muscular e utilizada durante as sessões de fisioterapia motora, trazem adaptações e consequências morfológicas importantes, pouco conhecidas e nem sempre positivas para a fibra muscular.

3 Hipóteses

3 HIPÓTESES

- A fisioterapia motora provoca modificações morfológicas na reparação tecidual do músculo distrófico devido às exigências mecânicas do movimento.

- A fisioterapia motora prolonga as características cinemáticas e dinâmicas da marcha, nos animais distróficos.

- O emprego de atividade ativo-livre de intensidade leve a moderada gera deposição de fibrose muscular importante ao mesmo tempo em que mantém a função de marcha. Estas alterações morfológicas associadas ao ganho em atividades funcionais como a marcha, devem ser encaradas como adaptação estrutural.

4 Objetivos

4 OBJETIVOS

- Investigar o efeito da fisioterapia motora na reparação tecidual do músculo distrófico e função de marcha dos animais do modelo GRMD.

- Analisar as variáveis cinemáticas e dinâmicas da marcha de animais distróficos.

- Investigar as mesmas variáveis nos animais submetidos a uma modalidade de fisioterapia motora e nos controles distróficos.

- Analisar o comportamento da fibrose muscular, mais especificamente, os colágenos do tipo I, III e IV no músculo esquelético de animais submetidos ou não ao programa de fisioterapia motora.

- Relacionar os achados funcionais da marcha e a deposição de fibrose muscular nos mesmos animais, bem como entre os grupos tratados e não tratados pela modalidade de fisioterapia estudada.

5 Materiais e Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais estudados foram selecionados do Canil GRMD – Brasil, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia – Setor de Anatomia. Na data da realização desta pesquisa, o Canil possuía dezoito animais portadores de distrofia muscular homóloga à Distrofia Muscular de Duchenne encontrada em humanos, entre sete e trinta e nove meses de idade, destinados à terapia medicamentosa e celular para a Distrofia Muscular. Além de oito fêmeas portadoras, com idades entre dezoito e quarenta e cinco meses, destinadas à reprodução.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº1030/2006).

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A confirmação da patologia foi realizada por genotipagem pela análise de DNA do sangue, pelo Centro de Estudos do Genoma Humano – IB / USP (Figura 1).

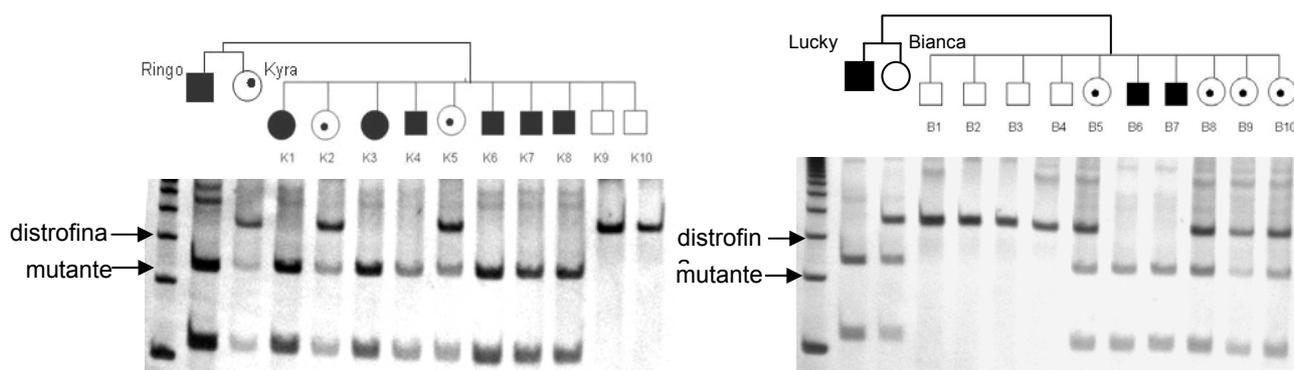


Figura 1 - Blotting ninhadas Kyra x Ringo e Bianca x Lucky para diagnóstico da distrofia muscular com ausência da distrofina. Centro de Estudos do Genoma Humano – IB / USP

Destes vinte filhotes alguns foram a óbito após o primeiro mês de vida e os distróficos vivos foram separados por experimentos, uma vez que no Canil GRMD Brasil acontecem pesquisas diferentes ao mesmo tempo. Dessa forma, foram disponibilizados para o estudo 05 animais distróficos. Sendo dois experimentais (k4 e k6) e os outros três (k1, k3 e b7) controles comuns para mais de um experimento.

Os cinco animais distróficos foram aceitos para participar do experimento, uma vez que cumpriram os critérios de inclusão estabelecidos: idade mínima de três meses, ausência de patologias associadas, não fazer uso de medicações de uso contínuo e apresentar parâmetros clínicos estáveis durante o período do estudo.

Os animais (k1, k3, k4, k6 e b7) foram separados em: *1. tratados*, animais k4 e k6, participantes do programa terapêutico de atividade ativo-livre (marcha) em terreno cercado e elaborado para a pesquisa; e *2. controles*, animais k1, k3 e b7, os quais mantiveram sua rotina normal junto ao grupo do Canil GRMD/USP.

A rotina dos animais distróficos do Canil inclui permanência no pátio ao ar livre onde são realizadas as atividades de vida diária, como alimentação, ingestão de água e ambulatório para avaliação clínica regular, com restrição noturna em baia coberta de 3m² (Figura 2).



Figura 2 – Canil GRMD Brasil – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Animais em pátio aberto durante o dia. Baias cobertas, de 3m², utilizadas no período noturno

Os parâmetros biométricos de peso e altura dos cinco animais distróficos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros biométricos dos animais controles e tratados nos momentos t0 e t1

		t0		t1	
		Altura (cm)	Peso (Kg)	Altura (cm)	Peso (Kg)
<i>controles</i>	k1	43	11.8	48	14.6
	k3	44	15.0	51	21
	b7	42	11.4	50	15.7
<i>tratados</i>	k4	44	13.3	51.5	17.6
	k6	42	10.8	52	17.14

Os animais tiveram os dados coletados para o tempo zero (t0) referente aos cinco meses e tempo um (t1) referente aos 09 meses de vida. O primeiro momento de avaliação foi definido respeitando-se os 03 primeiros meses de vida, a fim de que o mesmo estivesse imunologicamente protegido e pudesse sair do ambiente do Canil para as coletas. Entre os 03 e 05 meses, os dois animais tratados (k4 e k6) foram levados ao local onde seria realizada a fisioterapia e ao laboratório, onde os dados biomecânicos seriam posteriormente coletados, com coleiras do tipo peitoral e brinquedos para ambientação. O segundo momento (t1) respeitou a progressão da distrofia que impossibilitou a continuidade da fisioterapia em um dos animais tratados (k4).

Foi realizada biópsia muscular e coletado fragmento do músculo bíceps femoral esquerdo, para os estudos de morfologia e imuno-histoquímica (IHC); e avaliação no Laboratório de Biomecânica da EEFÉ – USP dos dados de Força de Reação do Solo (FRS) e Cinemática dos animais, para o estudo da função de marcha nos momentos t0 e t1.

No intervalo entre os dois momentos de avaliação, os animais k4 e k6 foram submetidos ao protocolo de fisioterapia, descrito no item 5.2. durante 12 semanas.

Para a análise dos parâmetros, os cinco animais foram aleatoriamente numerados para evitar parcialidades nos resultados das avaliações (estudo cego).

5.2 PROTOCOLO DE ATIVIDADES

O grupo *tratado* participou do programa de fisioterapia com início em 02/04/2008 e término em 25/06/2008. Antes do início da aplicação do protocolo, foram realizadas 03 sessões (semana de 24 a 28/março) consideradas ‘*Piloto*’, onde foram estabelecidas as velocidades de passeio individuais e adaptação dos cães ao local.

A velocidade de passeio foi calculada para os dois animais (k4 e k6), individualmente, a fim de evitar que a velocidade do treino fosse igual à do passeio e, conseqüentemente, insuficiente para desencadear a função terapêutica da atividade. Os animais realizaram o treino em uma velocidade mínima de 10% acima da velocidade de passeio, a fim de gerar uma atividade terapêutica de intensidade leve a moderada. Os valores de treino, de cada um dos animais, foram convertidos para unidades de tempo para que pudessem ser controlados durante cada uma das sessões, por cronômetro.

Os parâmetros de frequência, duração e modalidade do exercício terapêutico foram selecionados e adaptados para o modelo canino, levando-se em consideração o que vem sendo preconizado para o tratamento fisioterápico de pacientes DMD, após levantamento bibliográfico (DEMOS, 1983; RIDEAU, 1985; LEITÃO; DURO; PENQUE, 1995; CHILDERS et al., 2002; EAGLE, 2002; ANSVED, 2003) e pesquisa de campo na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM).

As sessões de Fisioterapia tiveram frequência de três vezes semanais, com duração média de 40,2 minutos ($40.2 \pm 3,5$) durante doze semanas, totalizando 36 sessões. Inicialmente, a proposta foi de que o protocolo de atividades tivesse duração de dezesseis semanas. Porém, nas últimas sessões o animal k6 apresentou dificuldade em completar ao menos 50% dos circuitos, o que inviabilizou o treino. O animal k4 foi a óbito 15 dias após a coleta do T1, tendo como causa *mortis* choque e endotoxemia. Dessa forma, ao completar 12 semanas, foram coletados os parâmetros do momento T1 e o treino interrompido.

Para a realização da atividade, uma área de 36 metros de comprimento por 5 metros de largura foi organizada para que os animais percorressem o espaço pelo tempo de duração da sessão (Figura 3).



Figura 3 – **A:** Área de 36 x 5 m organizada para o treino da marcha dos animais. **B:** Animais k4 e k6 (tratados) em adaptação na pista de fisioterapia. Local: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

Cada sessão de Fisioterapia motora teve início no Ponto Zero com os animais realizando treino de marcha ativa, acima da velocidade mínima estabelecida. Foi considerado UM PERCURSO, a saída do ponto zero e o percorrer os 36m. Cada percurso foi cronometrado do ponto zero ao final da pista, para cada um dos animais separadamente. Os animais percorreram 08 tentativas (288m totais/sessão), as quais foram consideradas válidas se o animal percorresse na velocidade mínima estabelecida.

O tempo total de cada sessão foi considerado desde a saída do pátio do Canil até a volta dos animais ao mesmo. Os animais foram estimulados por comando verbal a se dirigirem até a pista de treinos, caminhando livremente. Após a chegada à pista, a cada tentativa válida, foi permitido aos animais o descanso de 01'. Após 04 tentativas válidas era concedida uma pausa de 05', seguida de mais 04 tentativas. A sessão finalizava após 08 tentativas válidas e o tempo considerado até a volta ao pátio do Canil.

5.3 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

No t0 e t1 a marcha dos animais foi avaliada utilizando como ferramentas a Plataforma de Força e filmagem de vídeo para aquisição dos dados cinemáticos. A morfologia foi investigada a partir da coleta de biópsia muscular e o material processado para Imuno-histoquímica e Microscopia de luz.

5.3.1 Avaliação biomecânica

Os dados referentes à biomecânica da marcha foram coletados no Laboratório de Biomecânica da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE) da Universidade de São Paulo. Foram realizadas as filmagens de vídeos e coleta da Força de Reação do Solo, sincronizadamente, de cada um dos animais distróficos no t0 e t1.

A fim de que os animais respondessem positivamente à coleta dos dados biomecânicos e estivessem adaptados ao ambiente, semanas após o nascimento, os mesmos iniciaram um programa de treinamento. Primeiramente eles foram treinados a caminhar com coleira do tipo peitoral pelo espaço do Canil GRMD – Brasil / USP (Figura 4). A partir dos 03 meses, momento em que se completou o esquema de vacinação, eles foram levados, três vezes por semana, ao ambiente de coleta para adaptação ao espaço até o dia de coleta.



Figura 4 – Animais k4 e k6 com coleiras do tipo peitoral no Canil GRMD, FMVZ-USP em adaptação para coleta e protocolo de fisioterapia

Para avaliação da cinemática da marcha, uma câmera digital (Panasonic, modelo PV-GS50S), com capacidade de aquisição de 60 Hz fixa a um tripé, foi colocada no plano transversal no sentido crânio-caudal do lado direito de cada animal, com uma distância de 4 metros.

O Sistema *Peak Motus* (Peak Performance Technologies, Inc) foi usado para registrar o posicionamento e deslocamento dos segmentos corporais durante a marcha, a partir da marcação dos pontos articulares de interesse, e também para controle da aquisição, leitura, digitalização, tratamento, armazenamento dos parâmetros cinemáticos e sincronização de dados com a Plataforma de Força.

A análise cinemática foi sincronizada com a coleta na Plataforma de Força, através de um trigger sonoro e visual disparado no início da marcha. Para a coleta da Força de Reação do

Solo (FRS) foi utilizada uma plataforma composta de transdutores de força, do tipo piezoelétrico da empresa KISTLER AG, tipo 9287 A, com superfície de medição de 600 x 900 mm, com amplificador de sinais tipo 9865 B.

Tarjas reflexivas adesivas 3M foram posicionadas nos seguintes pontos anatômicos do hemicorpo analisado na filmagem: 1.espinha da escápula/acrômio; 2.tubérculo maior do úmero; 3.epicôndilo lateral do úmero; 4.processo estilóide da ulna; 5.cabeça do quinto metacarpo; 6.crista ilíaca; 7.trocânter maior do fêmur; 8.côndilo femoral; 9.maléolo lateral e 10.cabeça do quinto metatarso. Outros três pontos foram marcados para servirem de referência durante a digitalização dos dados: 11. crista do occipital e 12.cabeça do segundo metatarso contralateral e 13.cabeça do segundo metacarpo contralateral (Figura 5).

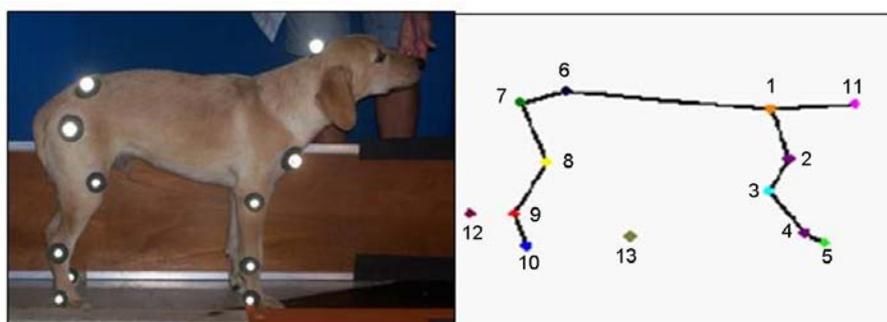


Figura 5 - Pontos anatômicos no hemicorpo direito para coleta da cinemática sincronizada com a FRS do animal k4

O espaço da coleta foi calibrado com a filmagem de quatro tarjas reflexivas fixas, em um quadro medindo (1m x 1m) para reconhecimento das coordenadas (X, Y). Foram coletadas 06 tentativas válidas de cada animal avaliado.

Os dados de FRS foram normalizados pelo peso corporal individual. Com os dados obtidos, a partir dos dois instrumentos de medição, foi possível determinar as seguintes variáveis: a. força vertical máxima (F_y); b. força de propulsão máxima (F_x^+); c. força de frenagem máxima (F_x^-); d. tempo de apoio do membro torácico (Δt_T) e do membro pélvico (Δt_P); e. deslocamento angular; f. amplitude de movimento ativa (ADM ativa) e g. velocidade linear. As forças estão expressas em N/kg de peso corporal.

5.3.2 Biópsia muscular

Os fragmentos musculares foram coletados do ventre do músculo bíceps femoral do membro pélvico esquerdo de cada um dos cães. A coleta do tempo zero (t0) foi realizada aos três meses de idade do animal. A segunda coleta foi realizada após aplicação do protocolo de atividade (t1), aos 10 meses de vida.

Foi realizada biópsia do tipo aberta e retirado um fragmento de 1x1 cm² (Figura 6). Após canulação venosa e fluidoterapia de manutenção os animais foram submetidos ao seguinte protocolo anestésico: associação Maleato de Acepromazina¹ + Cloridrato de Tramadol² (0,05 mg/kg e 2mg/kg, respectivamente) via intramuscular. Anestesia local infiltrativa à base de Cloridrato de Lidocaina 2%³ sem vasoconstrictor (7mg/Kg) para incisão de pele, divulsão de tecido subcutâneo e fascia muscular. No momento da coleta do fragmento muscular foi administrado Propofol⁴ (2,5 mg/Kg) via intravenosa. No pós-operatório imediato foi utilizada Dipirona⁵ (25mg/Kg) e Carprofeno⁶ (2,2mg/Kg), ambos via intravenosa. A analgesia mediata e de manutenção foi conduzida a partir da utilização dos mesmos fármacos administrados por via oral durante 3 a 5 dias. Foi utilizada antibioticoterapia à base de Cefalexina⁷ (20mg/Kg) BID, por 07 dias.



Figura 6 – Coleta de fragmento muscular por biópsia aberta do músculo bíceps femoral. Membro posicionado em posição neutra para evitar coleta com músculo em encurtamento ou alongamento

Os fragmentos referentes às duas coletas (t0 e t1) foram processados para microscopia de luz, bem como para Imuno-histoquímica para localização dos colágenos do tipo I, III e IV.

¹ Acepran. Lab Univet S/A. Rua Climaco Barbosa, 700, São Paulo - SP.

² Tramal. Lab Pfizer Ltda. Av. Monteiro Lobato, 2270, Guarulhos – SP.

³ Lidol 2%. Hipolabor Farm. Ltda. Rod. BR262, Km12, Sabará – MG.

⁴ Propofol. Lab. Eurofarma. Av. V. José Diniz, 346, Campo Belo – SP.

⁵ D-500. Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Rua Luiz F. Rodrigues, 1701, Campinas – SP.

⁶ Rimadyl. Lab Pfizer Ltda. Av. Monteiro Lobato, 2270, Guarulhos – SP.

⁷ Keflex R. Antibióticos do Brasil Ltda. Av. Morumbi, 8264, Brooklin, São Paulo – SP.

Os fragmentos dos dois momentos foram processados simultaneamente, para evitar diferenças no processamento do material e favorecer a análise dos dados.

5.3.3 Protocolo Histológico

Os fragmentos coletados foram fixados em solução de formol a 10%, tratados em séries crescentes de etanol (70 a 100%) para desidratação e xilóis para diafanização, utilizando-se procedimento convencional, para inclusão em Paraplast® (Leica/Germany), confeccionando-se blocos retangulares com base de 3x4 cm.

Os blocos foram cortados em micrótomo, na espessura de 5 µm, para confecção de lâminas histológicas com 3 cortes seriados cada uma. Cada lâmina foi seca em estufa a 60° C, na posição horizontal, para melhor aderência dos cortes nas mesmas. Após protocolo de desparafinização, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina e *Picrossírius red* para identificação das alterações histopatológicas e das fibras colágenas no músculo distrófico, respectivamente.

Depois de coradas, as lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60, acoplado à câmera Axio CAM HRc, e capturadas, utilizando-se o software Zeiss® KS 400.

5.3.4 Protocolo de Imuno-histoquímica (IHC)

Os anticorpos primários anticolágeno tipo I e III mouse (Calbiochem®) e anticolágeno tipo IV goat (Bioreagents®) foram aplicados nos cortes separadamente. As diluições estabelecidas a partir de testes foram: tipo I – 1:500; tipo III – 1:1000 e tipo IV – 1:250.

A reação de imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 5µm de espessura, dispostos em lâminas previamente tratadas com poli-D-lisina.

Foi feita a desparafinização em xilol, seguida da hidratação em álcool etílico e lavagem com água destilada. Após o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 3%, por 20 minutos, os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0.01M, pH 6.0 (Tampão Citrato) e submetidos à temperatura de 121°C em ambiente de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após 20 minutos de descanso, incubou-se o Ac primário (cada um na sua diluição descrita acima) por 20 horas a 4°C em

câmara úmida. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada (PBS), foram adicionados os reagentes secundário (Biotinilado/DAKO®) e terciário (Streptavidina-HRF/DAKO®) incubando-os por 45 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB (Sigma Co., S. Louis, EUA) por 2 a 3 minutos.

Como controle negativo, omitiu-se o anticorpo (Ac) primário, não sendo evidenciada nenhuma marcação nos casos avaliados. Foram realizadas fotomicrografias em microscópio óptico Axioscopy Zess® e câmera Olympus BX 60.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das curvas médias e pico das Forças estudadas foram calculados com base nas 06 tentativas válidas de cada animal. As análises comparando as variáveis no t0 e t1 para os animais controles e tratados foram realizadas utilizando o *teste de Wald* para análise de medidas repetidas, não-paramétrico (BRUNNER; LANGER, 2000) e consideradas significantes as diferenças menores que 1% ($p < .01$).

A correlação entre a velocidade linear e as Forças de Reação do Solo foi analisada com a *Correlação de Sperman* e considerada significativa para $p < .01$.

6 Resultados

6 RESULTADOS

Antes da realização das coletas do t0 todos os animais foram avaliados para descartar alterações clínicas e ortopédicas. Os cinco animais distróficos selecionados mostraram-se saudáveis e tiveram seu peso corporal acompanhados desde o nascimento. Os valores do 3º ao 10º mês de vida estão ilustrados na figura 7.

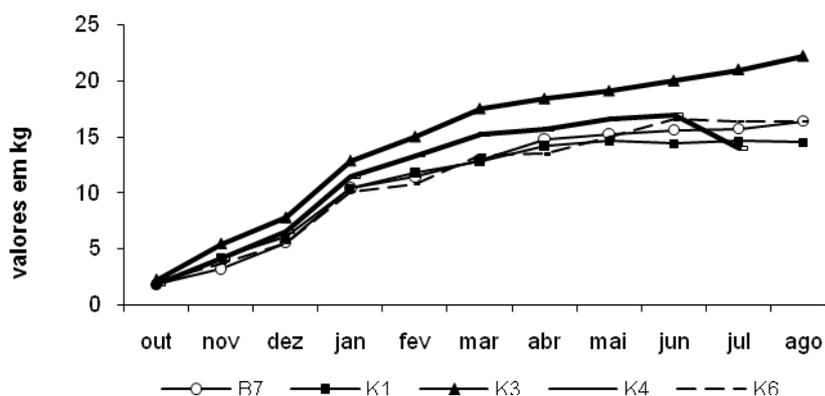


Figura 7 – Valores da massa corporal individual dos cinco animais distróficos do 2º ao 10º mês de vida

O valor da massa corporal do animal k4 apresentou comportamento diferente dos outros animais do estudo a partir do mês de junho. Enquanto os outros cães mantiveram ou ganharam massa, o mesmo apresentou diminuição da mesma. A perda de massa nesses animais tem se mostrado um importante indicativo de alerta em relação à saúde geral (dados ainda não publicados pelo grupo). Nesse momento, o protocolo de fisioterapia foi interrompido e a coleta de biomecânica do t1 realizada. No mês de julho o animal k4 foi a óbito.

6.1 PROTOCOLO DE ATIVIDADES

Na figura 8 está ilustrado o tempo médio de todas as sessões para o animal k4 e k6. Os dois animais apresentaram tempo significativamente diferente durante o percurso do circuito ($p < .001$).

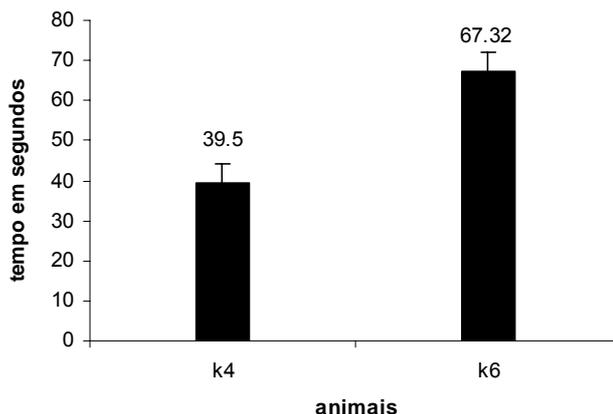


Figura 8 – Média de tempo, em segundos, para completar cada um dos percursos dos animais k4 e k6 durante as doze semanas de treino ($p < .001$)

Os animais foram estimulados a realizar o treino de marcha através de brinquedos sonoros e estímulo verbal. O animal k6, que apresentou maior tempo para completar o percurso, precisou de auxílio para se levantar da posição de decúbito lateral após os períodos de intervalo entre um percurso e outro.

Os resultados referentes às avaliações morfológicas e biomecânicas estão descritos separadamente.

6.2. MORFOLOGIA

A morfologia do músculo distrófico foi investigada por Microscopia de Luz, com as colorações de Hematoxilina-Eosina e *Picrossirius red*. Para estudo da fibrose no músculo distrófico, utilizamos a técnica de Imuno-histoquímica, com as reações anticólageno I, III e IV.

6.2.1 Microscopia de Luz

Os fragmentos musculares coletados no t0 e t1 foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e *Picrossirius*, para identificação das alterações nos cinco animais e nos dois momentos estudados. As lâminas, coradas com HE, foram avaliadas qualitativamente de acordo com os achados característicos do músculo distrófico no t0 e t1, resumidos na tabela 2.

As alterações histopatológicas já foram observadas no t0, onde os animais apresentavam 03 meses de vida. Os principais achados nesse momento foram: variação no tamanho das fibras, infiltrado inflamatório difuso e fibras hipertróficas. No t1, animais com 09 meses, a presença de infiltrado inflamatório foi menos freqüente; persistindo a variação no tamanho das fibras e a hipertrofia. Além disso, observou-se, neste segundo tempo de avaliação, algumas fibras com núcleo central, o que não foi observado no t0 (Figura 9A-J).

Tabela 2 – Alterações histopatológicas observadas no músculo distrófico

	t0					t1				
	b7	k1	k3	k4*	k6*	b7	k1	k3	k4*	k6*
Varição das fibras	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++
Infiltrado inflamatório	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
Hipertrofia		++	++		+	+	+	++		
Núcleo central						+	+	++	++	+

* cães distróficos do grupo tratado / +: alteração discreta; ++ alteração evidente.

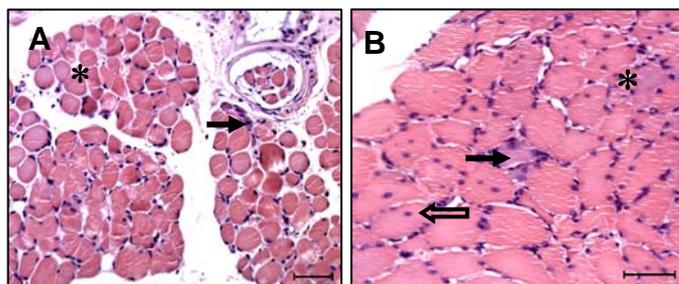


Figura 9A – animal k4 (tratado) no t0. Variação no tamanho das miofibrilas (*) e infiltrado inflamatório (→). Figura 9B – animal k4 no t1, pós-treino. Tamanho variado de miofibrilas, infiltrado discreto e núcleo central em algumas fibras. HE, barra = 50µm

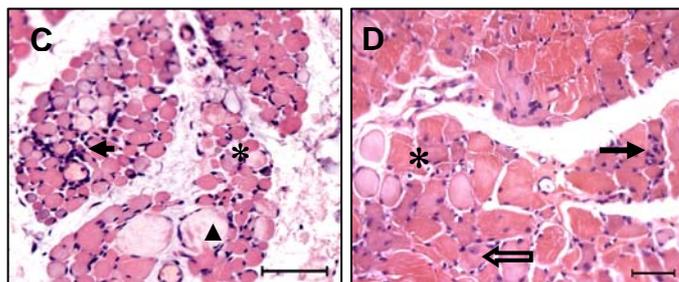


Figura 9C – animal k6 (tratado) no t0. Variação no tamanho das fibras (*), infiltrado inflamatório (→) e hipertrofia (▶). Figura 9D – animal k6 no t1, pós treino. Tamanho variado de miofibrilas, infiltrado discreto e núcleo central em algumas fibras. HE, barra = 50µm

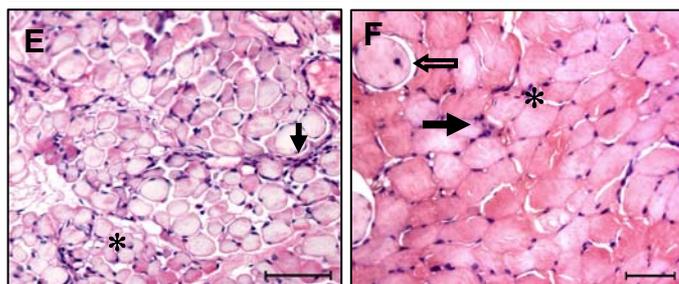


Figura 9E – animal b7 (controle) no t0. Variação no tamanho das fibras (*) e infiltrado inflamatório (→). Figura 9F – animal b7 no t1. Tamanho variado de miofibrilas, infiltrado discreto, hipertrofia (▶) e núcleo central em poucas fibras (⇐). HE, barra = 50µm

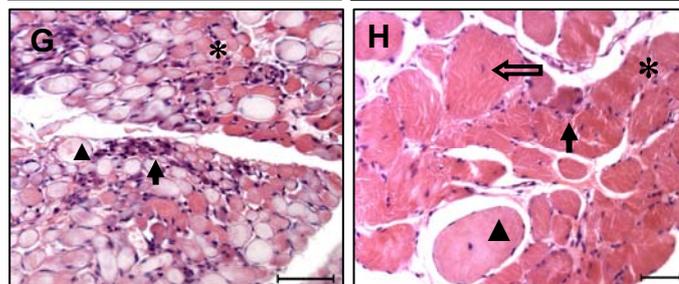


Figura 9G – animal k3 (controle) no t0. Variação no tamanho das fibras (*), infiltrado inflamatório (→) e hipertrofia (▶). Figura 9H – animal k3 no t1. Variação no tamanho das fibras (*), infiltrado inflamatório (→) discreto, hipertrofia (▶) e núcleo central em poucas fibras (⇐). HE, barra = 50µm

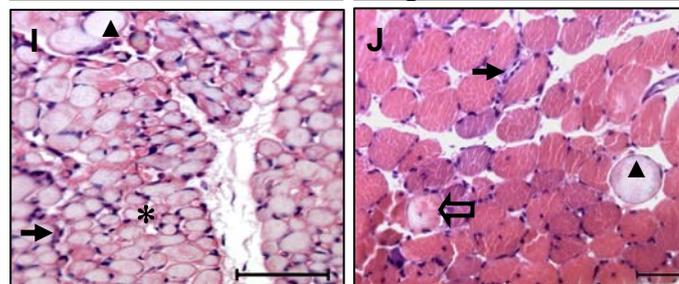


Figura 9I – animal k1 (controle) no t0. Variação no tamanho das fibras (*), infiltrado inflamatório (→) e hipertrofia (▶). Figura 9J – animal k1 no t1. Variação no tamanho das fibras (*), infiltrado inflamatório (→) discreto, hipertrofia (▶) e núcleo central em poucas fibras (⇐). HE, barra = 50µm

Nestes mesmos cortes, corados com *Picrosirius*, observa-se deposição aumentada de fibras colágenas quando comparada com cortes com mesma coloração de animal saudável já no t0. Essa característica se mantém nas imagens do t1 tanto no endomísio como no perimísio (Figura 10A-J). Um dos animais (k1) parece ter preservado a arquitetura muscular mais do que os outros, apresentando fibras musculares mais homogêneas e menor deposição de colágeno entre as miofibrilas, principalmente no endomísio (Figura 10B e D).

O animal controle k1 apresentou rotação medial de patela bilateral aos 07 meses de idade. O quadro evoluiu com perda progressiva da postura quadrúpede e marcha, sendo necessário o uso de cadeira de posicionamento, para manutenção da postura quadrúpede, duas vezes ao dia. Dessa forma, o estudo da morfologia muscular foi possível no t1, porém, os dados da avaliação biomecânica não foram coletados neste momento para este animal.

Essa situação possibilitou a observação da ausência de movimento ativo nos membros pélvicos e sua relação com a morfologia do músculo distrófico e deve ser levada em conta nas análises de morfologia e adaptação muscular no t1.

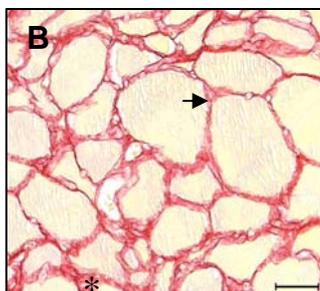
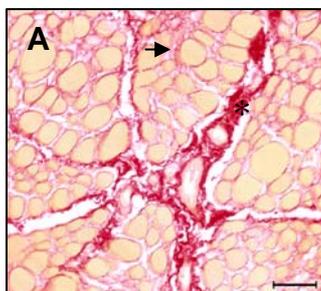


Figura 10A – animal k4 (tratado) no t0. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→) e perimísio (*). Figura 10B – animal k4 no t1. Deposição importante de fibras colágenas em endomísio (→). Picrosirius, barra = 40µm

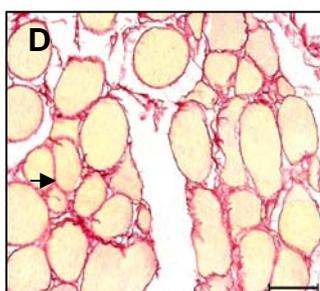
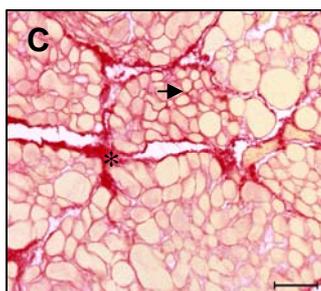


Figura 10C – animal k6 (tratado) no t0. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→) e perimísio (*). Figura 10D – animal k6 no t1. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→). Picrosirius, barra = 40µm

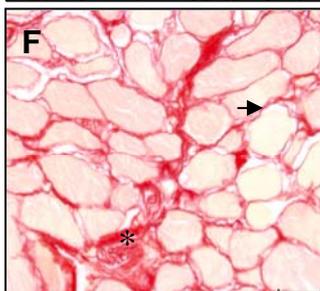
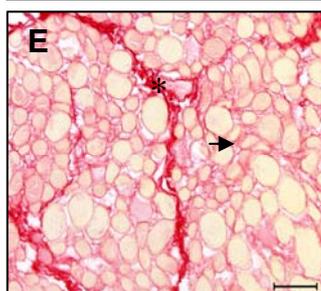


Figura 10E – animal b7 (controle) no t0. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→) e perimísio (*). Figura 10F – animal b7 no t1. Discreta deposição de fibras colágenas em endomísio (→). Picrosirius, barra = 40µm

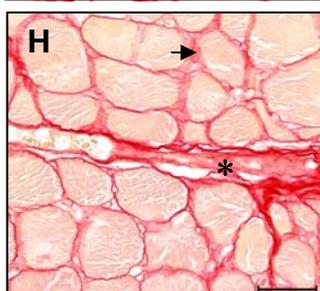
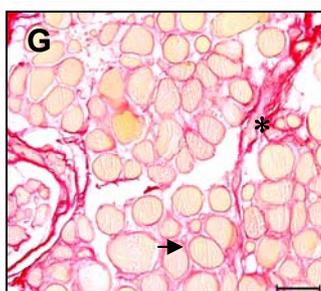


Figura 10G – animal k3 (controle) no t0. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→) e perimísio (*). Figura 10H – animal k3 no t1. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→) e perimísio (*). Picrosirius, barra = 40µm

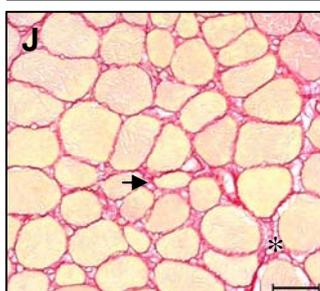
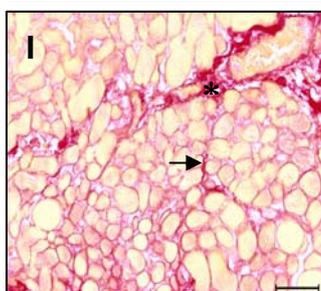


Figura 10I – animal k1 (controle) no t0. Deposição de fibras colágenas em endomísio (→) e perimísio (*). Figura 10J – animal k1 no t1. Discreta deposição de fibras colágenas em endomísio (→). Picrosirius, barra = 40µm

6.2.2 Imuno-histoquímica (IHC)

Cada um dos tipos de colágeno estudados apresentou localização própria e diferentes proporções no mesmo músculo. Observa-se que os colágenos do tipo I e III foram os mais presentes, principalmente no perimísio e, em menor proporção, no endomísio.

Em animais saudáveis, o colágeno I constitui feixes delgados no perimísio muscular. Não se observa esse tipo de colágeno em endomísio (Figura 11A). Nos animais distróficos, o colágeno I constituiu feixes espessos no perimísio, não sendo observado no endomísio dos cinco animais no t0 (Figura 11C e E). No t1, observamos feixes espessos de colágeno no perimísio nos animais tratados e controle. Nos cortes dos animais tratados observa-se que o colágeno I constituiu também feixes delgados no endomísio (Figura 11D), o que não foi observado nos cortes de animais distróficos controle (Figura 11F).

O colágeno III, nos cortes dos animais saudáveis constituiu feixes no perimísio, pouco mais espessos que o colágeno I (Figura 12A). Nos animais distróficos nota-se que o colágeno III constitui feixes espessos de perimísio no t0 (Figura 12C e E). No tempo t1, esse mesmo colágeno constituiu o perimísio e também feixes delgados de endomísio, tanto nos cortes de animais controle como tratados (Figura 12D e F).

O colágeno do tipo IV foi proporcionalmente, o menos presente de todos e ainda assim, mostrando-se somente no sarcolema das miofibrilas de forma delgada, característica verificada no aumento de 1000x na fotomicrografia (Figura 13A-D) e não observado no perimísio, como os outros dois tipos.

Dessa forma, o tipo I mostra ser o tipo de colágeno que sofreu a influência da fisioterapia, uma vez que está localizado no endomísio dos animais tratados no t1. O tipo III está relacionado à evolução da distrofia, não parecendo sofrer o efeito da fisioterapia.

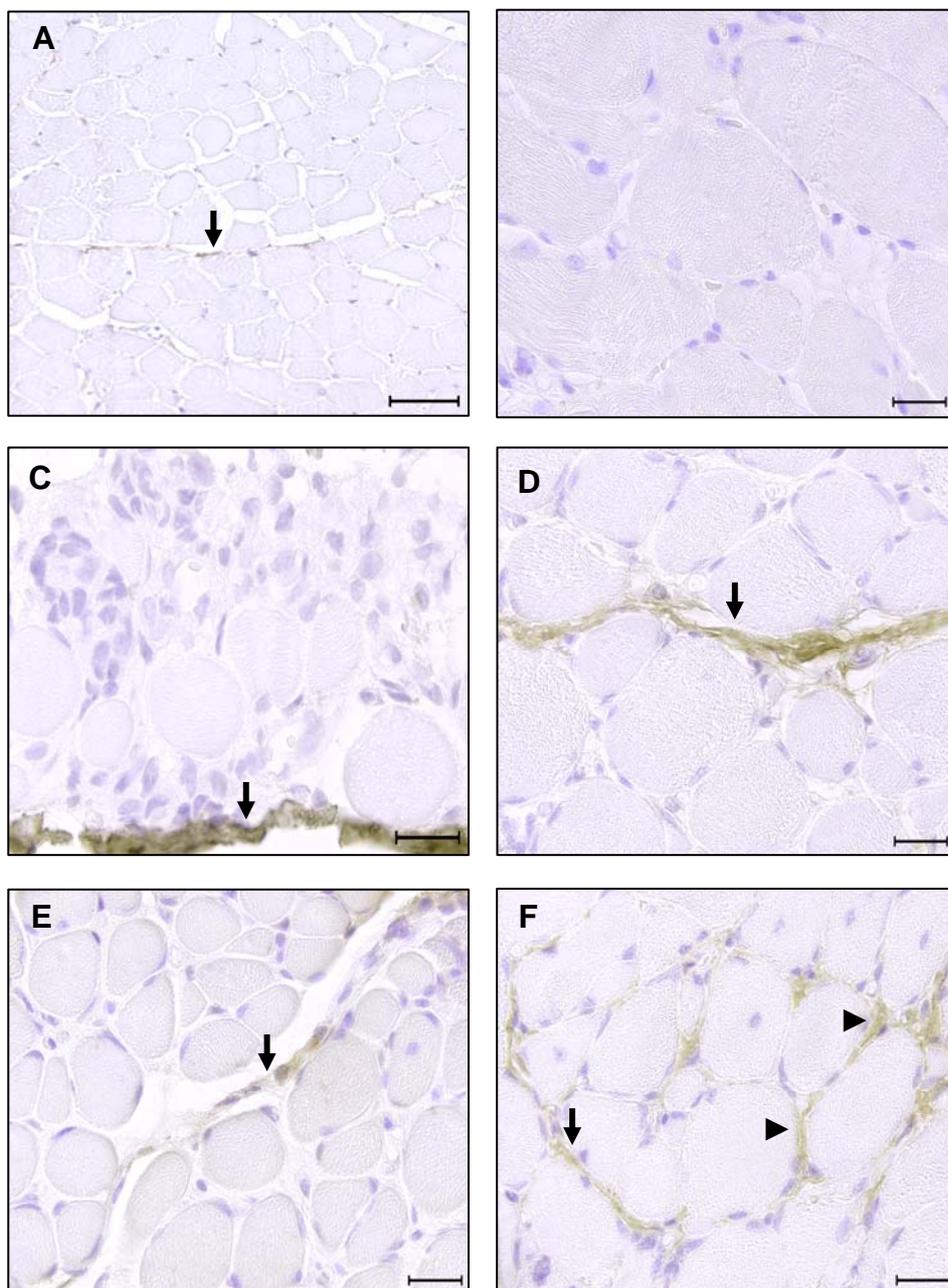


Figura 11 – Fotomicrografia do músculo bíceps femoral, IHC colágeno I. A: Músculo de cão SRD, barra = 50µm. B: Controle negativo, barra = 20µm. C e D: músculo distrófico de cão controle nos momentos t0 e t1, respectivamente, barra = 20µm. E e F: músculo distrófico de cão tratado nos momentos t0 e t1, respectivamente, barra = 20µm. (→ colágeno I em perímio; ► colágeno I em endomísio)

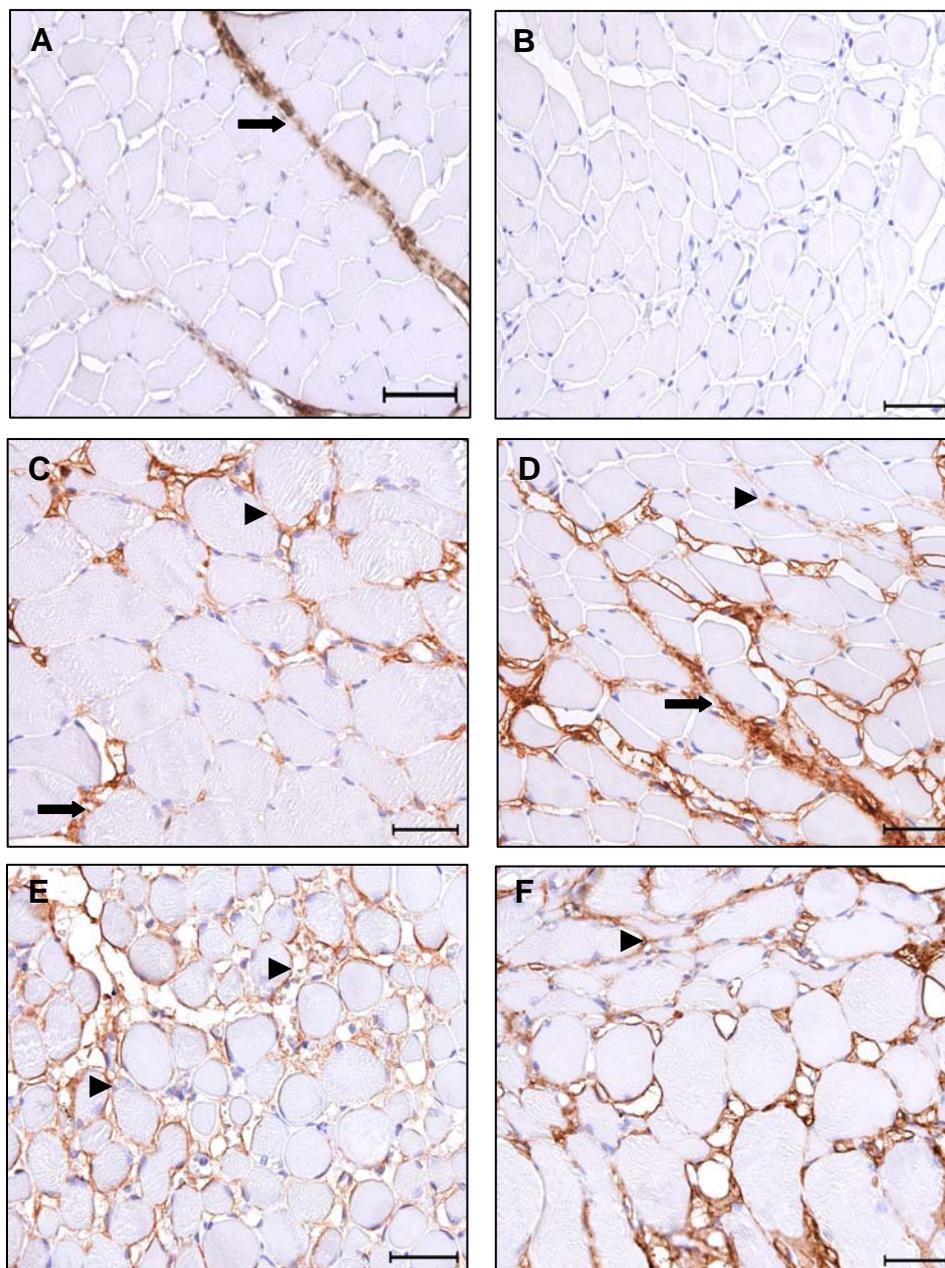


Figura 12 – Fotomicrografia do músculo bíceps femoral, IHC colágeno III. A: Músculo de cão SRD, barra = 50 μ m. B: Controle negativo, barra = 40 μ m. C e D: músculo distrófico de cão controle nos momentos t0 e t1, barra = 40 μ m. E e F: músculo distrófico de cão tratado no momento t0 e t1, barra = 40 μ m. (→ colágeno III em perimísio; ► colágeno III em endomísio)

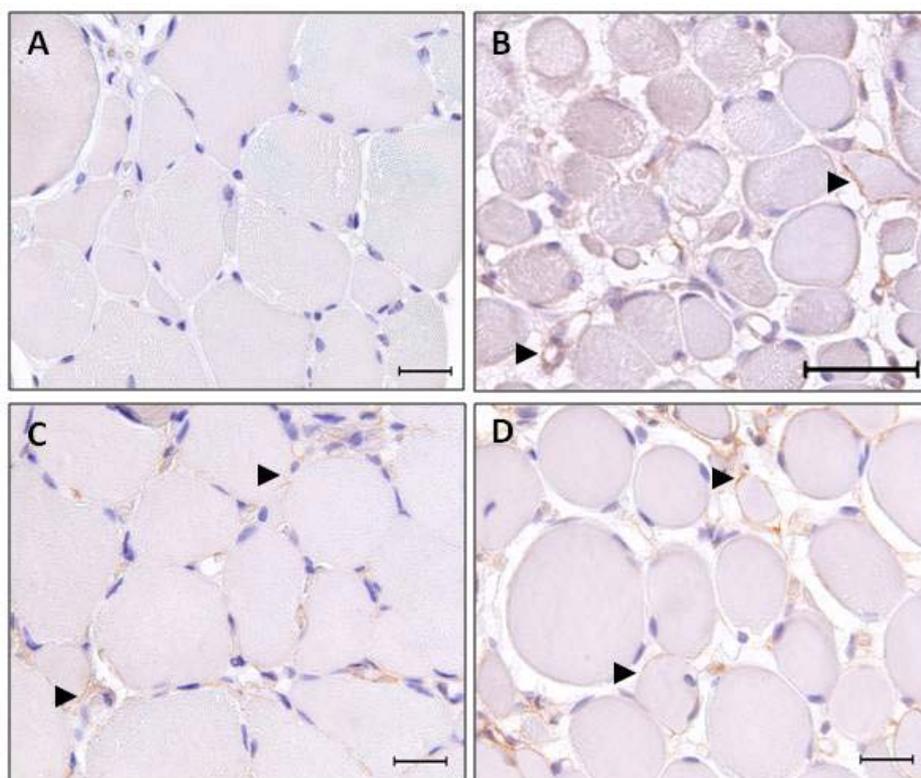


Figura 13 – Fotomicrografia do músculo bíceps femoral, IHC colágeno IV. Barras = 20 μ m. A: Controle negativo; B: músculo distrófico no momento t0; C: músculo distrófico de animal controle no momento t1; D: músculo distrófico de animal tratado no momento t1. (► colágeno IV no sarcolema das miofibrilas).

6.3 Avaliação Biomecânica

A coleta dos dados cinemáticos e de Força de reação do Solo (FRS) foi realizada com os animais aos 05 meses de vida. Foram realizadas 06 coletas válidas de cada animal, em cada momento (t0 e t1). Foi considerada válida a tentativa em que o animal caminhava pelo percurso estabelecido e realizava apoio na Plataforma de Força, com apenas o hemicorpo direito. O animal precisava realizar, ainda, o apoio com o membro torácico seguido do apoio do membro pélvico do mesmo lado, sem que o hemicorpo esquerdo tocasse a plataforma. Os dados de cinemática foram processados e tratados considerando somente o período entre toque dos dedos do membro torácico, até a saída dos dedos do membro pélvico do mesmo lado (Figura 14).



Figura 14 – Trecho percorrido pelos animais distróficos durante coleta da FRS e cinemática no Laboratório de Biomecânica da EEFÉ-USP. Animal k4, t0

O comportamento das FRS vertical e horizontais (crânio-caudal e médio-lateral) em cães saudáveis já está estabelecido. A figura 15 ilustra o comportamento das três forças de acordo com Gillette e Angle (2008).

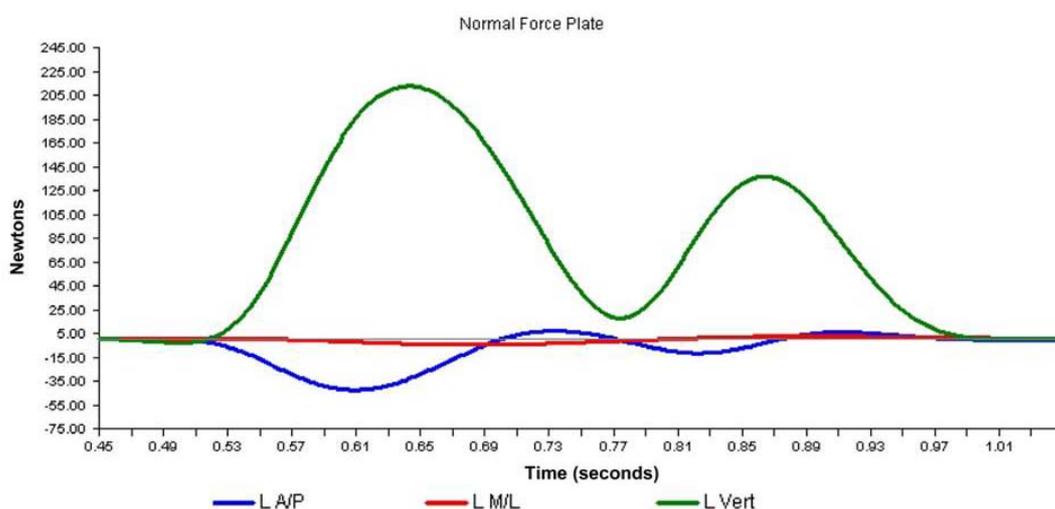


Figura 15 – Gráfico típico das FRS em cães saudáveis representando a força de reação dos dois membros (torácicos e pélvicos) do mesmo hemisfério do animal no trote. **L A/P**: linha da força antero-posterior; **L M/L**: linha da força médio-lateral; **L Vert**: linha da força vertical. O primeiro pico da L Vert se refere à força de reação do membro torácico e a segunda ao membro pélvico. Os valores negativos da L A/P (azul) estão relacionados à força de frenagem e os positivos, relacionados à força de propulsão do membro (Gillette e Angle, 2008).

6.3.1 Cinemática

Sincronizado com a coleta da Força de Reação do Solo foram coletados seis vídeos de marcha para análise do deslocamento angular durante a fase de apoio do membro torácico e

pélvico. Seis articulações de interesse foram descritas: tornozelo, joelho, coxofemoral, ombro, cotovelo e carpo (Figura 16).

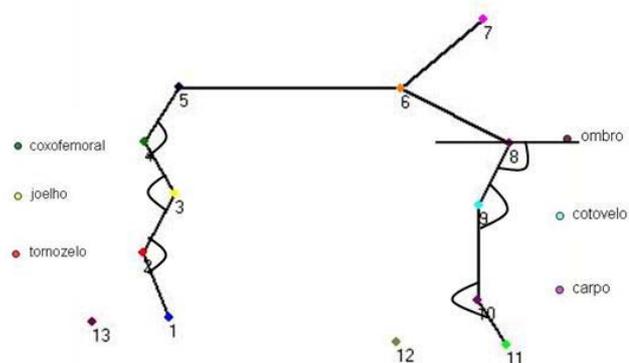


Figura 16 – Ângulos articulares de interesse analisados utilizando o sistema Peak Motus

Os animais foram incentivados a caminhar por meio de comando verbal, sem o uso de guias, a fim de não alterar a maneira individual de deambulação dos animais.

A diminuição do ângulo articular foi considerada como flexão e o aumento do mesmo ângulo, extensão. Nas imagens (Figuras 17 a 20), a curva descendente caracteriza uma diminuição do ângulo e uma curva ascendente, a extensão angular.

Os resultados da dinâmica articular foram descritos por articulação. Além disso, estão ilustrados abaixo os picos máximos de flexão e extensão de cada articulação durante a fase de apoio.

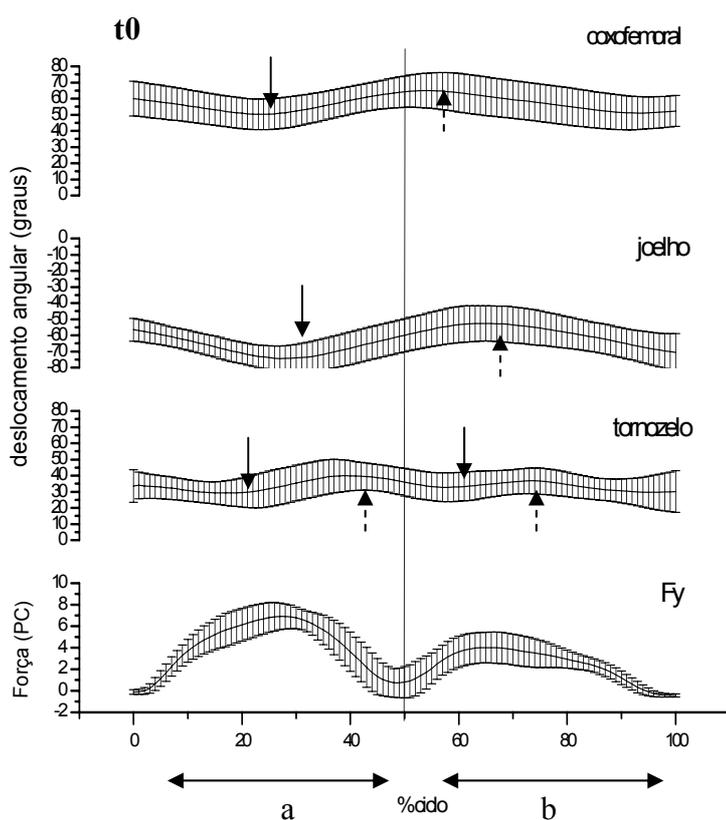


Figura 17 – Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações coxofemoral, joelho e tornozelo dos animais distróficos no t_0 . Força de Reação do Solo Vertical (F_y) ao apoio do membro torácico (a) e pélvico (b) normalizada pelo peso corporal. Pico da flexão (\rightarrow) Pico da extensão articular ($- \rightarrow$)

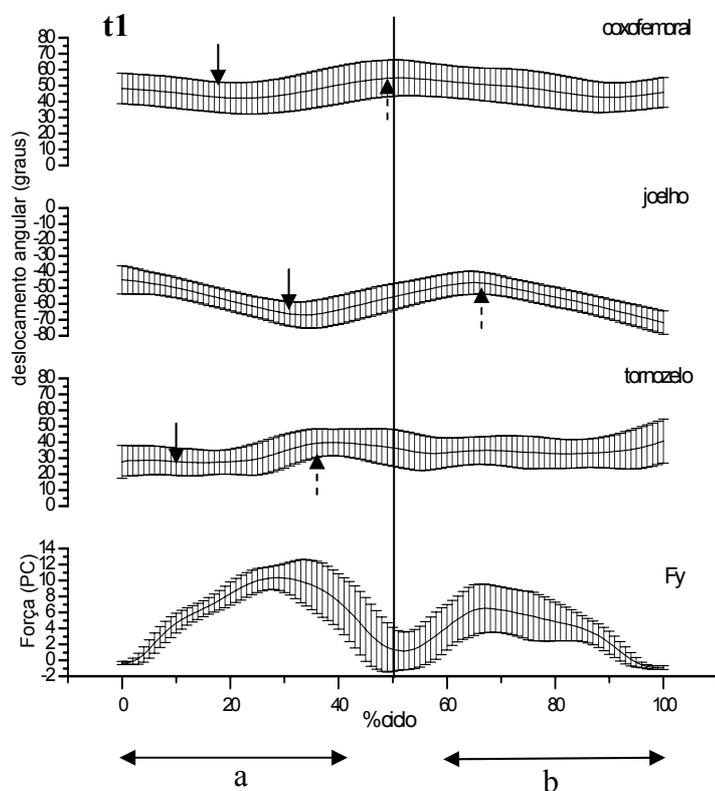


Figura 18 – Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações coxofemoral, joelho e tornozelo dos animais distróficos no t_1 . Força de Reação do Solo Vertical (F_y) ao apoio do membro torácico (a) e pélvico (b) normalizada pelo peso corporal. Pico da flexão (\rightarrow) Pico da extensão articular ($- \rightarrow$)

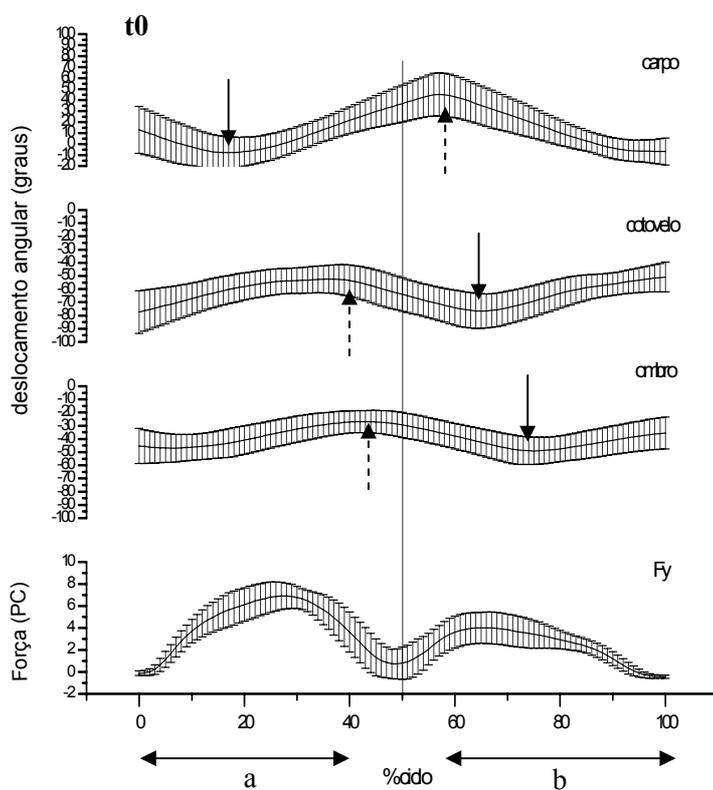


Figura 19 – Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações do carpo, cotovelo e ombro dos animais distróficos no **t0**. Força de Reação do Solo Vertical (F_y) ao apoio do membro torácico (a) e pélvico (b) normalizada pelo peso corporal. Pico da flexão (→) e pico da extensão articular (←)

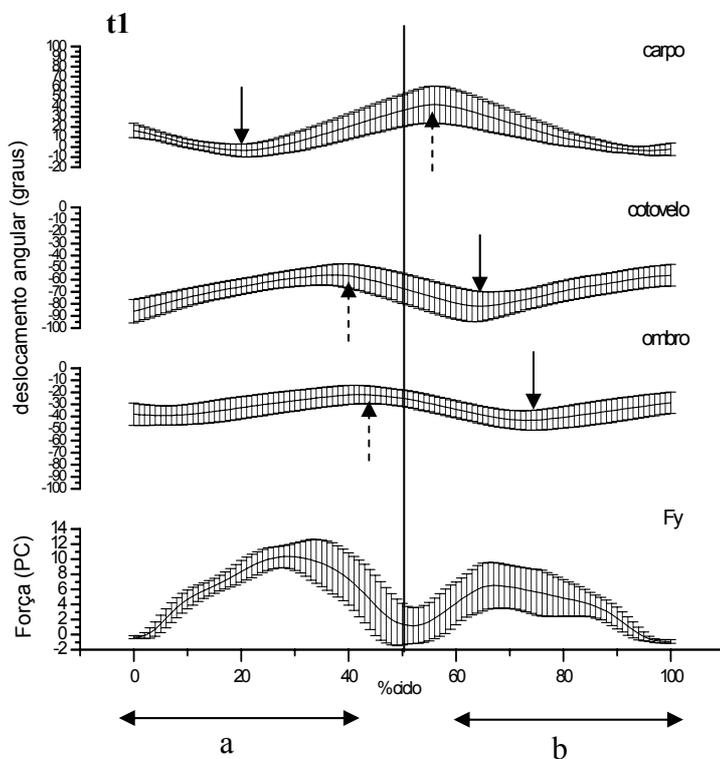


Figura 20 – Média e desvio padrão do deslocamento angular das articulações do carpo, cotovelo e ombro dos animais distróficos no **t1**. Força de Reação do Solo Vertical (F_y) ao apoio do membro torácico (a) e pélvico (b) normalizada pelo peso corporal. Pico da flexão (→) e pico da extensão articular (←)

A média das amplitudes de movimento articular de cada uma das articulações estudadas está descrita nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3– Média da Amplitude de movimento articular (ADM) ativa das articulações do membro torácico dos animais controles e treinados

	t0			t1		
	Ombro	Cotovelo	Carpo	Ombro	Cotovelo	Carpo
b7 (c)	15.89	28.34	33.75	30.14	38.75	75.94
k1 (c)	19.39	41.17	48.44	---	---	
k3 (c)	23.04	22.19	64.69	22.28	36.68	47.17
	19.44±3.57	30.56±9.68	48.96±15.47	26.21±5.56	37.71±1.46	61.55±20.34
k4 (t)	29.99	23.49	55.05	21.386	28.56	41.03
k6 (t)	31.77	37.37	80.19	14.428	31.12	25.365
	30.88±1.26	30.43±9.81	67.62±17.78	17.91±4.92	29.84±1.81	33.19±11.07

c: animais controles; t: animais tratados; *teste de Wald comparando a média do grupo tratado com o controle para cada articulação no t0 e t1; † teste de Wald para comparação da média do t0 e t1 da mesma articulação, considerando $p < .01$.

Nas articulações do membro torácico nota-se que, a que apresentou maior amplitude tanto no t0 como no t1, foi o Carpo. Não houve diferença significativa entre os animais tratados e controles no t1 para as três articulações do membro torácico. Analisando as amplitudes do t1 em relação ao t0, encontramos diminuição significativa ($p = 0.035$) na ADM ativa do ombro dos animais tratados.

Tabela 4 – Média da Amplitude de movimento articular (ADM) ativa das articulações do membro pélvico dos animais controles e treinados

	t0			t1		
	Coxofemoral	Joelho	Tornozelo	Coxofemor	Joelho	Tornozelo
b7 (c)	11.11	19.81	9.31	18.91	20.5	25.79
k1 (c)	14.6	28.02	11.91	--	--	--
k3 (c)	16.46	27.63	19.94	12.18	41.09	28.17
	14.05±2.71	25.15±4.63	13.72±5.54†	15.45±4.75*	30.79±14.55	26.98±1.68
k4 (t)	16.11	24.4	13.85	18.15	22.19	19.58
k6 (t)	20.74	23.58	21.88	6.01	26.74	16.27
	18.42±3.27†	23.99±0.57†	17.86±5.67	12.08±8.58*†	24.26±3.21†	17.92±2.34

c: animais controles; t: animais tratados; *teste de Wald comparando a média do grupo tratado com o controle para cada articulação no t0 e t1; † teste de Wald para comparação da média do t0 e t1 da mesma articulação, considerando $p < .01$.

O joelho foi a articulação com maior amplitude ativa no membro pélvico durante a marcha. No t1, a ADM ativa da articulação coxofemoral ($p < .0001$) foi significativamente diferente entre os animais tratados e controles (ver Figuras 17 e 18). Houve diminuição significativa da ADM ativa da articulação coxofemoral nos animais tratados comparando o t0 com o t1 ($p < .0001$). O tarso (ou tornozelo) manteve os valores do t0 para o t1 nos animais tratados e controles, com uma tendência ao aumento da ADM ativa nos animais controles.

6.3.1.1 Velocidade

Analisando a velocidade dos dois pontos reflexivos localizados próximos ao tronco (ombro e coxofemoral), observamos que o “ombro” – ponto numero 8 – foi o que apresentou menor variação. Dessa forma, os valores deste ponto foram selecionados para os cálculos de velocidade linear de cada animal no t0 e t1.

A velocidade média no t0 (n=5) foi de $0.64 \text{ m.s}^{-1} \pm 0.47$. No t1, a velocidade média dos animais controles (b7 e k3) foi $0.64 \text{ m.s}^{-1} \pm 0.32$ e dos animais tratados (k4 e k6) foi $0.45 \text{ m.s}^{-1} \pm 0.21$ (Figura 21).

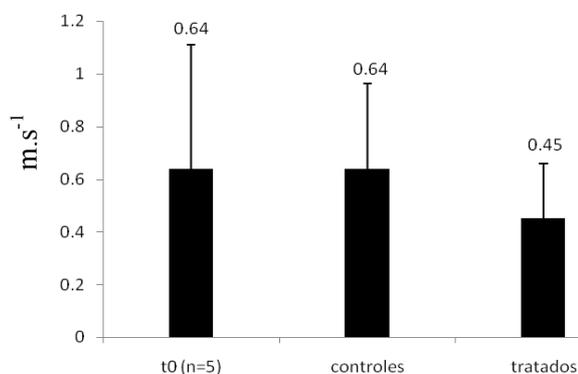


Figura 21 – Média da velocidade de coleta no t0 (n=5) e t1 (animais separados em tratados e controles) em m.s^{-1} .

A velocidade da marcha dos cães influencia no tempo de apoio dos membros durante o ciclo de marcha (MCLAUGHLIN; ROUSH, 1994; MCLAUGHLIN; ROUSH, 1995; GRIFFIN et al., 2004). A figura 22 ilustra duas velocidades de marcha e as respectivas porcentagens do tempo de apoio dos membros pélvicos e torácicos.

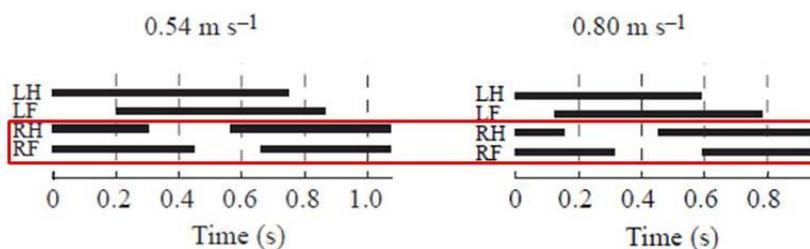


Figura 22 – Relação do tempo de apoio dos membros torácicos e pélvicos com a velocidade de marcha. LH: membro pélvico esquerdo; LF: membro torácico esquerdo; RH: membro pélvico direito e RF: membro torácico direito (GRIFFIN et al., 2004)

As coletas válidas consideraram os ciclos de marcha que tiveram início com o apoio do membro torácico direito (RF) seguido do apoio do membro pélvico direito (RH). Os animais estudados tiveram os valores de velocidade variando de 0.45 a 0.64 m.s⁻¹.

Dessa forma, nos gráficos das FRS vertical e horizontais, os primeiros 50% do ciclo representam o apoio do membro torácico e os últimos 50%, o apoio do membro pélvico.

6.3.2 Força de Reação do Solo

As coletas válidas dos animais serão expressas em média e desvio padrão nos momentos t0 e t1. Nos cinco animais estudados, a Força Vertical (Fy) para o membro torácico foi maior que a do membro pélvico no t0 e t1. A média da Fy no t1 para os cinco animais distróficos foi significativamente maior que no t0 ($p < 0.001$) (Figura 23). Os animais controle apresentaram aumento do seu tempo de apoio dos membros torácicos no t1, de 49 para 53% do ciclo de marcha (Figura 23).

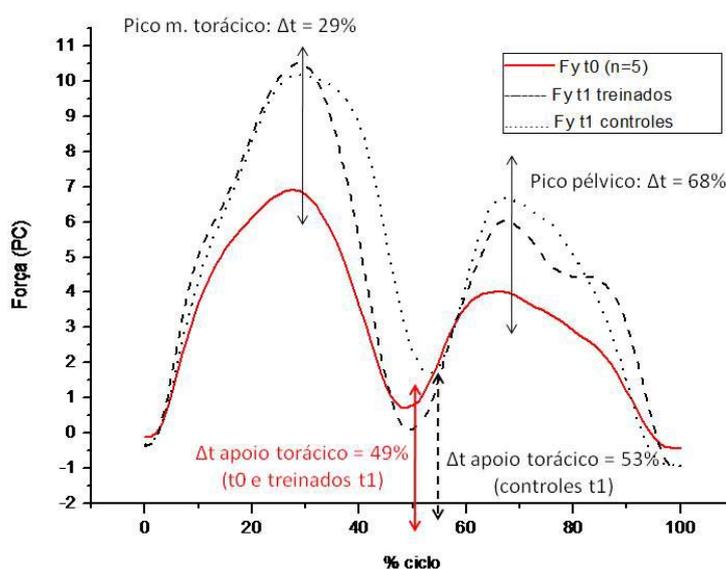


Figura 23 – Média e desvio padrão da Força de Reação do Solo Vertical (Fy) dos cinco animais no t0 (n=5) e t1 (separados em tratados e controles) normalizado pelo peso corporal (PC)

Os picos verticais da Fy, do membro torácico e pélvico, estão descritos na tabela 5. Os valores no t1 foram significativamente maiores que os de t0 para o membro torácico e pélvico.

Tabela 5 – Média dos valores de pico da Força vertical (F_y) de cada um dos animais para o membro torácico e pélvico no t0 e t1 normalizado pelo peso corporal

		t0		t1	
		torácico	pélvico	torácico	pélvico
Controles	b7	5.87	3.08	9.62	3.61
	k3	6.94	5.57	10.93	9.82
	k1	6.81	3.28	----	----
	mean \pm SD			10.19 \pm 0.92[†]	6.68 \pm 4.40[†]
Tratados	k4	7.96	5.17	11.82	6.72
	k6	7.53	3.59	9.24	6.10
	mean \pm SD	6.91 \pm 2.14[†]	4.01 \pm 1.47[†]	10.50 \pm 1.82[†]	6.05 \pm 0.45[†]

* teste de Wald comparando grupo tratado e controle no t1 considerando $p < .01$, sem diferença significativa entre os grupos nesse tempo. [†] teste de Wald comparado o t1 com t0, diferença significativa para os membros torácicos e pélvicos para $p < .01$.

A Força Ântero-posterior (F_x) está ilustrada na figura 24 e os seus componentes F_x^+ (propulsão) e F_x^- (frenagem) detalhados.

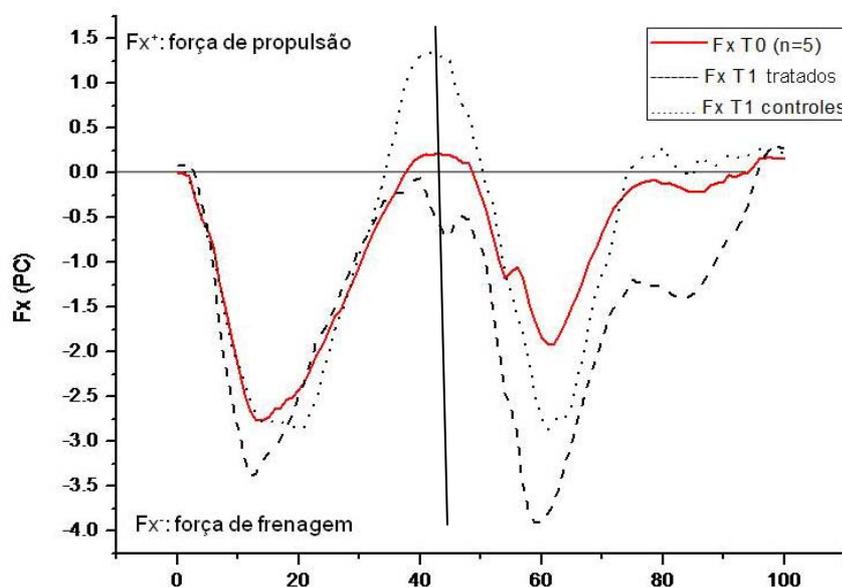


Figura 24 – Média e desvio padrão da Força de Reação do Solo Ântero-posterior (F_x) dos cinco animais no t0 ($n=5$) e t1 (separados em tratados e controles) normalizado pelo peso corporal (PC), bem como as componentes de propulsão (F_x^+) e frenagem (F_x^-)

No t0, os cinco animais distróficos estudados mostraram força de propulsão (F_x^+) próxima de zero. O gráfico aponta uma tendência dos animais tratados para uma diminuição

desta FRS (Fx^+) e aumento da força de frenagem (Fx^-) no t1 em relação ao t0, principalmente em relação ao membro pélvico, porém, a mesma não foi significativa ($p=0.72$).

A força médio-lateral (Fz) está ilustrada na figura 25 e os seus componentes Fz^+ (lateral) e Fz^- (medial) detalhados.

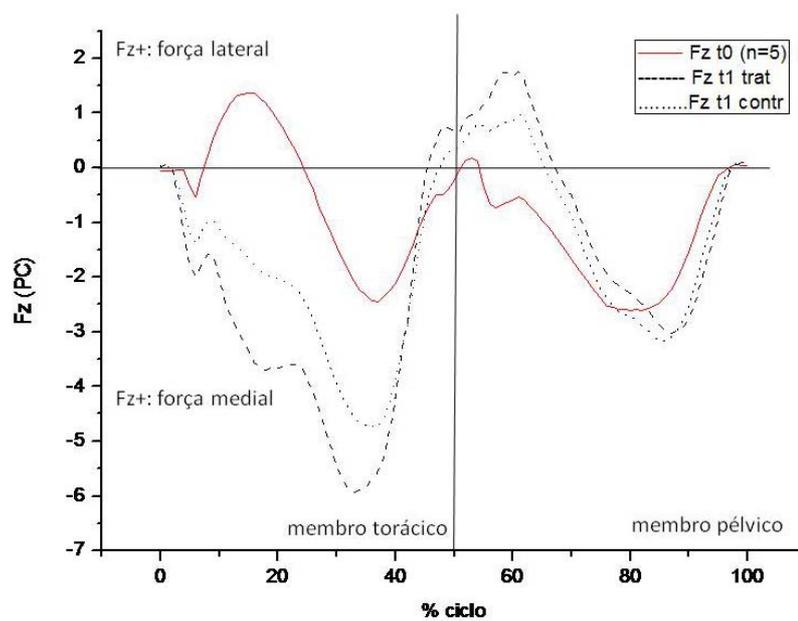


Figura 25 - Média e desvio padrão da Força de Reação do Solo Médio-lateral (Fz) dos cinco animais no t0 ($n=5$) e t1 (separados em tratados e controles) normalizada pelo peso corporal (PC), bem como os componentes lateral (Fz^+) e medial (Fz^-)

No t0, os animais iniciaram o contato do membro torácico com a borda lateral do carpo, direcionando a Fz para o sentido medial. Em seguida, a força é direcionada para o sentido lateral (apoio na borda medial do carpo) voltando para medial no final do contato dos membros torácicos (Figura 25). A Fz atinge valores de aproximadamente 1.37 vezes o peso corporal dos animais no sentido lateral (Fz^+) e 2.45 vezes no sentido medial (Fz^-) para o membro torácico no t0.

Com a evolução da distrofia muscular, os membros torácicos direcionam a Fz durante todo o apoio do membro torácico para o sentido medial. Essa força mostra valores significativamente maiores no membro torácico dos animais tratados, em relação aos controles ($p<0.0001$), atingindo valores de até 5.93 vezes o peso corporal para a Fz^- .

Ao contrário do comportamento dos membros torácicos, os membros pélvicos no t0 e também no t1 dos animais tratados e controles iniciam o contato com a borda medial do tarso, direcionando a força para o sentido lateral. Em seguida, a Fz é direcionada para o sentido

medial. Os valores da Fz^+ do membro pélvico atingem 1.77 vezes o peso corporal dos animais e os valores da Fz^- , 3.02 vezes o peso corporal.

6.3.2.1 Força de Reação do Solo x Velocidade

Observamos correlação positiva e significativa da FRS ânteroposterior com a velocidade linear, maior no t1 tanto na marcha dos animais tratados ($r = 0.575$), como dos controles ($r = 0.524$).

A FRS vertical não mostrou correlação com a velocidade no t0 ou t1 e a FRS médiolateral apresentou correlação negativa e significativa, porém, fraca no t0 ($r = -0.334$) e t1 (-0.217 para os controles e -0.359 para os tratados).

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

As pesquisas mais recentes na área de Distrofia Muscular de Duchenne, em geral, abordam terapias medicamentosas, celulares e genéticas e suas repercussões em nível molecular.

A inexistência de um tratamento definitivo para esta doença tem incentivado estudos com modelos animais, principalmente o camundongo mdx, por diferentes grupos de pesquisa do mundo. O modelo canino, indicado para os estudos pré-clínicos da DMD devido às similaridades com a DMD humana (NAGARAJU et al., 2009), apresenta como principal limitação a variabilidade fenotípica e o alto custo de manutenção (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008). Ainda assim, vem sendo utilizado principalmente em estudos de terapias que se mostraram promissoras no modelo mdx (WANG et al., 2009).

Enquanto isso se observa, ao longo dos anos e principalmente em países com melhor infraestrutura na área da saúde, um crescimento da população adulta com DMD devido ao acesso à tecnologia e cuidados domiciliares (GIBSON et al., 2007; MANZUR; KINALI; MUNTONI, 2008). Segundo esses autores, os principais avanços nos cuidados foram em relação ao tratamento com corticosteróides, suporte ventilatório não-invasivo e manejo adequado das cardiomiopatias e da escoliose.

Dessa forma, o número de pacientes DMD ambulantes e não ambulantes vem crescendo nos últimos anos. Enquanto diversos tratamentos estão em fase de pré-clínica, esta população recebe tratamento de suporte e preventivo, ou seja, acompanhamento das funções cardiopulmonares e das contraturas e escoliose (STROBER, 2006).

Em artigo recente, McLoon (2008) discute que a inexistência da cura para a distrofia muscular deve estimular investigações de terapias complementares e de suporte da doença, que aumentem a qualidade de vida dos pacientes.

Entretanto, poucas pesquisas discutem especificamente sobre estas terapias disponíveis para os pacientes com DMD. Os resultados aqui apresentados pretendem contribuir, cientificamente, com a área de fisioterapia motora, utilizada como terapia de suporte e preventiva em pacientes DMD.

Os achados desta pesquisa confirmam a sua primeira hipótese, isto é, de que a fisioterapia motora aqui aplicada modifica a morfologia muscular do músculo distrófico, devido às exigências mecânicas do movimento. Por outro lado, a segunda hipótese, de que a

fisioterapia motora mantém as características cinemáticas e dinâmicas da marcha nos animais distróficos, foi rejeitada.

Discutiremos as principais adaptações teciduais e funcionais descritas e provocadas pela fisioterapia motora empregada nesta pesquisa, com o modelo canino de estudo da DMD.

Além dos resultados gerados com o delineamento experimental, um dos animais controles estudados (k1) evoluiu, inesperadamente, para uma rotação medial de patela bilateral. Essa alteração gerou perda da mobilidade associada com contraturas em adução bilateral dos membros pélvicos.

Analisando a morfologia do músculo desse animal no t1, nota-se que o tecido distrófico apresentou menor heterogeneidade das fibras, poucos núcleos centrais e deposição discreta de fibras colágenas em endomísio, quando comparado com o músculo dos outros animais controles ou tratados.

A imobilidade na DMD havia sido apontada por Kimura et al. (2006) como fator de proteção da deterioração da morfologia muscular. A preservação da morfologia muscular neste animal da pesquisa foi evidente, porém, à custa de uma perda de função importante antes do primeiro ano de vida. Dessa forma, a situação de extrema imobilidade, apesar de benéfica para a morfologia muscular, não é compatível com a função motora.

No outro extremo, alguns autores relatam situações onde a mobilidade, empregada por meio de protocolos de atividades, provoca dano muscular em camundongos saudáveis.

Gomes et al. (2007) submetem o músculo sóleo de camundongos sadios ao alongamento passivo pós imobilização. Eles utilizaram como protocolo, alongamento mantido, passivo, três vezes por semana, durante 40 minutos. Analisando o tipo de fibras e a morfologia muscular, os autores relatam que o alongamento, ao invés de proteger o músculo imobilizado, causou danos não observados no grupo alongado apenas uma vez por semana. Eles concluem que o alongamento é uma ferramenta terapêutica que precisa ser utilizada, na prática, com cautela.

Essas evidências precisam ser levadas em consideração no estabelecimento de protocolos de fisioterapia, uma vez que, atividades concebidas como benéficas, podem causar alterações morfológicas ainda a esclarecer. Em músculos distróficos, as modalidades terapêuticas e também a frequência ideal ainda precisa ser investigada com cuidado. Ao mesmo tempo em que a imobilidade é benéfica para preservar a morfologia, sabe-se que ela impossibilita a funcionalidade. E o movimento, sensivelmente acima do limiar permitido, pode gerar danos irreparáveis nesta musculatura.

De acordo com Grange e Call (2007) os mesmos exercícios, empregados para o ganho de força e resistência muscular em indivíduos saudáveis, podem exacerbar o dano muscular em músculos distróficos. Esses autores sugerem que um limiar precisa ser definido para guiar a prescrição de exercícios para a DMD. E ainda, que investigações no modelo canino GRMD podem elucidar pontos importantes de exercícios em humanos DMD.

Aos 03 meses de idade, os animais apresentam as alterações histopatológicas características da distrofia muscular, principalmente infiltrado inflamatório e heterogeneidade das fibras musculares. O infiltrado inflamatório é característico de fibras em início de regeneração (SEGAWA et al., 2008), o que revela que nesta fase os animais ainda apresentam a capacidade de regeneração muscular.

Lieber (2002) descreve que as principais características, ao exame microscópico de músculos distróficos, são a importante variação no tamanho das fibras e o núcleo central, sugerindo repetidos ciclos de regeneração e degeneração muscular. No caso da DMD, a regeneração não é capaz de compensar a degeneração, o que leva a uma progressiva perda de fibras musculares funcionais.

A ausência de núcleos centrais no músculo esquelético de camundongos *mdx*, submetidos a treino de resistência, foi apontado por Landisch et al. (2008) como indicativo de adaptação muscular positiva ao exercício.

No t1 do exame morfológico dessa pesquisa, nota-se o aparecimento dos núcleos centrais, o que não havia sido observado no t0. Essa característica histopatológica revela que o músculo dos animais nesta idade já havia sido submetido a pelo menos um ciclo de degeneração-regeneração (PASTORET; SEBILLE, 1995). A intensidade de fisioterapia motora aqui utilizada parece não influenciar na presença de núcleos centrais e heterogeneidade das fibras.

As fibras hipercontraídas (ou hipertróficas) foram muito evidentes nos cortes dos animais controles no t1, porém, não nos animais tratados. Fibras hipercontraídas sugerem uma resposta de regeneração do tecido, associado ao processo inflamatório (ROTH et al., 2000; LIEBER, 2002). A presença deste tipo de fibra, no músculo dos animais controles e não no dos tratados, sugere que a fisioterapia aplicada pode ter acelerado o processo de degeneração.

Somada a esta evidência histológica, a deposição de fibrose muscular aqui estudada na microscopia e imuno-histoquímica, aponta para um maior dano muscular nos animais submetidos à fisioterapia.

Segawa et al. (2008) estudaram a regeneração muscular incompleta por meio da supressão parcial dos macrófagos no tecido e afirmam que neste caso, a regeneração é lenta,

severamente prejudicada e causa fibrose. Lieber (2002) afirma que, em paralelo com as mudanças histopatológicas na musculatura distrófica, ocorre uma proliferação de tecido conjuntivo e adiposo a ponto do músculo se tornar não funcional.

A reação inflamatória e consequente fibrose muscular na DMD é pouco compreendida, porém, acredita-se que a fibrose seja uma seqüela do infiltrado inflamatório decorrente da lesão muscular (MCLOON, 2008). Em nossos animais observa-se que, na idade de 3 meses (t0) os cinco animais distróficos apresentam deposição de fibrose muscular aumentada em relação à músculos saudáveis, observada pela presença de fibras colágenas tanto no endomísio como no perimísio.

Cozzi et al. (2001) quantificaram as características histopatológicas do músculo do modelo GRMD e afirmam que a fibrose muscular já está presente aos 15 dias de idade, porém, não aumenta com a idade. Nguyen et al. (2002) acompanharam as alterações histopatológicas de animais GRMD desde o nascimento e relatam que, a partir dos 2 meses de idade, a fibrose é uma característica presente nos cortes de músculos distróficos.

A fibrose endomisial é considerada como alteração histopatológica secundária e merece destaque no estudo da lesão muscular, uma vez que é observada apenas nos músculos esqueléticos humanos, do modelo GRMD e no diafragma do modelo *mdx* (NGUYEN et al., 2002). Essa característica faz do modelo canino GRMD uma importante fonte de entendimento da evolução da doença a partir da fibrose.

Os achados no modelo GRMD destes dois autores confirmam a presença da fibrose em idades precoces nestes animais (COZZI et al., 2001; NGUYEN et al., 2002). A fim de melhor entender a localização da fibrose no músculo distrófico e as adaptações teciduais na presença da fisioterapia, utilizamos a análise imuno-histoquímica dos colágenos do tipo I, III e IV, uma vez que são apontados por diferentes estudos como quantitativamente aumentados na DMD (DUANCE et al., 1980; HANTAI et al., 1995; HUEBNER et al., 2008).

Tanto o colágeno do tipo I como o do tipo III estão aumentados no músculo dos animais aos 3 meses de idade (t0), porém, o colágeno IV manteve-se somente no sarcolema durante todo o período do estudo, como em animais saudáveis.

Apesar do colágeno do tipo IV ser descrito como aumentado nos músculos distróficos de humanos com DMD (DUANCE et al., 1980; RAMPOLDI et al., 1986), pesquisas mais recentes, com drogas inibidoras da fibrinogênese no modelo *mdx*, têm focado nos tipos I e III (HUEBNER et al., 2008; HUANG et al., 2009).

Ainda, um desses estudos citados, de Rampoldi et al. (1986) analisou a biópsia de humanos DMD em cultura de células, e não in vivo. Além do colágeno IV, os autores

investigaram o colágeno III, laminina e fibronectina, porém, não encontraram alterações significantes em comparação com culturas de músculos controle, exceto para o colágeno IV. As particularidades de um estudo *in vitro* (facilidade de diferenciação de um tipo celular, seleção de anticorpos específicos, difícil mimetização de todos os fatores envolvidos, entre outros) pode ser um dos motivos para a diferença nos resultados encontrados.

Em estudo de 2002, Porter et al. investigaram, por meio da expressão gênica, a resposta inflamatória de músculos distróficos do modelo mdx. Dos 26 tipos de colágenos estudados, eles encontraram apenas 8 com elevada expressão gênica nos músculos do membro pélvico dos camundongos, destacando-se os tipos I e III.

Dessa forma, esses dois tipos de colágeno (I e III) estão mais fortemente relacionados à resposta inflamatória e secundária deposição da fibrose intersticial nos músculos distróficos humanos e dos modelos mdx e canino GRMD.

O colágeno muscular do tipo I está aumentado em relação ao observado nos músculos de animais sadios e localizado no perimísio dos cinco animais no t0. No t1, este colágeno está também localizado no endomísio do músculo dos animais tratados. Diferente dos outros dois tipos de colágenos estudados, a localização muscular do colágeno do tipo I foi influenciada por esta intensidade de fisioterapia aplicada.

Desguerre et al. (2009) estudaram diferentes características histopatológicas do músculo de pacientes DMD e relacionaram com 13 características clínicas relevantes. A fibrose endomisial, quantificada por histomorfometria, foi a única característica histopatológica estudada que se relacionou com a perda da função motora, traduzida por força muscular do quadríceps, teste muscular manual dos membros superiores e inferiores e perda da deambulação.

A fibrose endomisial, observada em nosso estudo, foi característica dos animais submetidos à fisioterapia, o que sugere uma perda funcional destes músculos. Outro ponto que colabora com esta evidência é que o colágeno encontrado no endomísio é o do tipo I, notavelmente presente em tecidos pouco flexíveis, como tendões ou nas junções musculotendíneas.

De acordo com Mackey et al. (2005) os colágenos do tipo I e III coexistem no mesmo tecido e suas proporções relativas definem as propriedades funcionais deste tecido. Na predominância do colágeno do tipo I, o tecido apresenta uma alta resistência à tensão. Já tecidos com maiores proporções de colágeno do tipo III possuem grande flexibilidade.

A relação da expressão do colágeno muscular e a miogênese foi investigada por Alexakis et al. (2007) no músculo do modelo mdx. De acordo com seus resultados, o

colágeno tipo I mostrou-se envolvido na regulação da diferenciação das células musculares, uma vez que, a presença deste tipo de colágeno nas culturas celulares, inibiu a diferenciação. Ainda, diferente do músculo dos camundongos saudáveis, o músculo do mdx continua a produzir colágeno do tipo III na idade adulta. Os autores (ALEXAKIS et al., 2007) sugerem que o colágeno do tipo I na distrofia muscular, além de inibir a regeneração muscular favorece a produção do colágeno muscular, gerando um mecanismo com grande repercussão nas estratégias de tratamento.

Assim, ainda que a causa da fibrose não esteja completamente estabelecida, sabe-se que sua presença no tecido muscular está associada à perda de função, devido à consequente perda da flexibilidade (característica do tecido muscular), dificuldade de vascularização ocasionada por sua presença no tecido (NGUYEN et al., 2005), entre os outros fatores como apontado por Alexakis et al. (2007), o que dificulta a regeneração muscular.

Associado ao colágeno do tipo I, o colágeno do tipo III está intimamente relacionado à formação cicatricial (VAN DEN BOGAERDT et al., 2009). Ainda que confira a característica de flexibilidade aos tecidos, segundo Huang et al. (2009) nas distrofias musculares sua presença está fortemente envolvida na fibrose secundária ao dano muscular.

Passerini et al. (2002) avaliaram o nível de RNAm e a distribuição do TGF β -1 (transforming growth factor-beta1), fator de crescimento do tecido conjuntivo e colágenos no músculo de animais do modelo GRMD em diferentes idades. Eles afirmam que citocinas estão envolvidas na fibrose deste modelo, assim como em humanos DMD, o que sustenta a utilidade do GRMD para investigar novas abordagens terapêuticas para a distrofia muscular.

Da mesma forma, em um estudo dos achados histopatológicos e histoquímicos de músculos de animais GRMD desde o nascimento, Nguyen et al. (2002) concluem que este modelo de estudo é o único que apresenta, precocemente, as mesmas características secundárias da doença (fibrose endomisial e importante atrofia das fibras musculares) observadas em humanos DMD.

O estudo da fibrose na DMD e em seus modelos experimentais vem sendo cada vez mais explorado, seja em relação aos seus fatores e eventos causais, à expressão gênica dos tipos colágenos envolvidos, à sua localização e adaptação frente às novas terapias de suporte ou tratamentos.

O aumento da fibrose no tecido muscular, em quantidade e localização, reflete prejuízos funcionais. Em contrapartida, drogas ou terapias capazes de diminuir a fibrose (MCLOON, 2008) ao mesmo tempo em que melhoram a força de preensão dos membros pélvicos (HUANG et al., 2009) ou a funções vitais, como a cardíaca e respiratória dos animais

(HUEBNER et al., 2008), mostram-se extremamente promissoras para os pacientes com DMD.

De maneira geral, observa-se que o desafio nas terapias com pacientes DMD implica em inibir a progressão das alterações decorrentes da ausência da distrofina muscular e, simultaneamente, oferecer um incremento na função deste mesmo tecido, resultando em ganho de flexibilidade e aumento do tempo de ambulação dos pacientes.

Além dos resultados da localização e tipos de colágenos envolvidos na fibrose do músculo dos animais distróficos, esta pesquisa aborda as características das articulações e distribuição do peso corporal do animal durante sua ambulação, por meio da avaliação biomecânica da marcha, na presença da fisioterapia motora.

A avaliação biomecânica é uma ferramenta capaz de quantificar as variáveis da marcha em relação aos seus aspectos cinemáticos e dinâmicos. A estrutura tecnológica e o alto custo dos aparelhos, necessários para o emprego desta ferramenta de avaliação, faz com que esta ciência ainda apresente uso limitado em situações diretamente ligadas às terapias ou testes pré-clínicos (GILLETTE; ANGLE, 2008).

Desde 1975 o uso da avaliação biomecânica, para análise de marcha de pacientes, vem sendo indicada e sistematizada (LETTS et al., 1975). Porém, o uso desta ferramenta com pacientes DMD gerou poucas publicações até o momento. Em contrapartida, as poucas pesquisas, que abordam a marcha dos pacientes com distrofias musculares, contribuem de maneira significativa para se compreender as adaptações e estratégias utilizadas pelos mesmos para manter a deambulação funcional, com a progressiva fraqueza muscular causada pela doença.

Os primeiros textos publicados com pacientes DMD datam da década de 80 (KHODADADEH et al., 1986), com poucos sujeitos mas, utilizando a avaliação com câmeras de vídeo associadas à Plataforma de Força. Esses autores estudaram os momentos na articulação do joelho de pacientes DMD e seus achados sugerem que a marcha com o tornozelo em flexão plantar é necessária para a manutenção da força nas articulações proximais, entre elas o joelho. Seus resultados foram confirmados por estudos posteriores.

Em artigo recente, Graudealt et al. (2009) investigaram o efeito da contratura, em flexão plantar do tornozelo, na marcha de pacientes DMD. Seus achados, bem como resultados anteriores do mesmo grupo (GRAUDEALT et al., 2007) sugerem que esta contratura, avaliada pelo momento passivo da articulação, seja necessária para compensar a fraqueza muscular progressiva e manutenção da marcha nestes pacientes.

Esses resultados apontam que a contratura, em flexão plantar do tornozelo, é uma estratégia adotada que parece ser benéfica para a marcha dos pacientes DMD. De outro lado, muitos são os protocolos de tratamento que, ainda hoje, preconizam o alongamento dos músculos flexores plantares do tornozelo para pacientes deambulantes ou mesmo o uso de órteses noturnas para alongamento passivo dos mesmos músculos (EAGLE, 2002; PARKER et al., 2005). Nota-se, que com resultados diferentes do encontrado em avaliações qualitativas da marcha, a avaliação biomecânica pode contribuir para a tomada de decisões em fisioterapia desses pacientes.

Da mesma forma que nas avaliações com humanos, as publicações em avaliação biomecânica animal vêm crescendo e contribuem com informações que uma análise qualitativa não oferece. Quinn et al. (2007) realizaram um estudo comparando os resultados da avaliação da marcha com observação visual (escalas numéricas qualitativas) com os da avaliação quantitativa (biomecânica) de animais submetidos à osteotomia de tíbia, corrigidos por fixadores externos. Os resultados dos dois tipos de avaliação tiveram concordância somente quando o grau de claudicação era severo. A avaliação qualitativa não foi capaz de detectar claudicações de grau leve.

Outro artigo analisa a observação dos proprietários e os resultados fornecidos pela avaliação da Força de Reação do Solo de animais no pós-cirúrgico de descompressão da estenose lombosacral degenerativa (SUWANKONG et al., 2007). Os resultados obtidos com a plataforma de força mostram prejuízo da força propulsiva dos membros pélvicos dos animais, enquanto os proprietários os avaliam como tendo sua função totalmente reestabelecida.

Esses dois artigos mostram a sensibilidade da avaliação biomecânica, que além de fornecer dados quantitativos para comparação da progressão de uma doença degenerativa ou diferenças pré e pós-tratamento, também possibilita ao profissional entender as perdas de função e alterações decorrentes de terapias e/ou doenças.

Até o momento, um único artigo utilizando uma ferramenta biomecânica foi publicado com o modelo experimental canino da DMD. Isso porque, além da avaliação biomecânica animal ser recente em todo o mundo, devido às dificuldades encontradas na coleta dos dados, este modelo experimental canino também se encontra em fase de estudos. Este artigo, de Barthélémy et al. (2009), investiga a viabilidade do uso do acelerômetro como medida quantitativa da marcha de animais distróficos.

Esta ferramenta difere da utilizada em nossa pesquisa, uma vez que o acelerômetro é acoplado ao corpo do animal. A vantagem está em fornecer as variáveis de comprimento e

frequência do passo e 3 eixos de força do movimento estudado, medidos a partir de diferentes passos (KAVANAGH; MENZ, 2008).

Os dados apresentados pelo estudo de Barthélémy et al. (2009) fornecem, pela primeira vez, importantes características da marcha do animal distrófico, porém, possui a limitação de não detalhar os componentes da força horizontal (frenagem, propulsão, medial ou lateral), bem como não diferenciar o que corresponde ao membro torácico e pélvico, respectivamente.

Estudos da cinética da marcha, utilizando Plataforma de Força sincronizada à filmagem de vídeo, têm sua confiabilidade atestada com animais saudáveis ou portadores de diferentes patologias.

Apesar da limitação de avaliar um único passo, a Plataforma de Força permite o registro de mais de uma coleta por animal e o detalhamento dos componentes das FRS, além de ser acessível a um maior número de pesquisadores e clínicos, uma vez que o objetivo final da obtenção dos dados quantitativos é a padronização das ferramentas de avaliação (MERCURI et al., 2008), para que a mesma possa ser utilizada por diferentes grupos de pesquisa no mundo.

A coleta dos dados da pesquisa foi realizada no Laboratório de Biomecânica da Escola de Educação Física e Esportes da USP, equipado e organizado para a coleta de dados em humanos. Uma plataforma foi utilizada para coleta (modelo KISTLER AG 9287 A), sendo necessária a adaptação do espaço, para que o animal realizasse o apoio do membro torácico, seguido do apoio do pélvico de um único e mesmo hemisfério, sendo o esquerdo, o hemisfério de escolha. Essa mesma estratégia de coleta foi empregada por Suwankong et al. (2007) e Quinn et al. (2007). Ainda que esta dificuldade não impossibilitasse a coleta, ela aumentou o número de tentativas para que conseguíssemos ao menos, seis coletas válidas para cada um dos animais.

Além disso, os cinco animais avaliados passaram por um processo de adaptação ao espaço do laboratório antes da coleta. Essa adaptação foi realizada com o objetivo de os animais sentirem-se familiarizados ao ambiente de coleta e pudessem realizar a marcha, o mais próximo possível do usual, sem interferência no resultado final.

Para a análise dos resultados foram consideradas válidas apenas as tentativas onde os animais cumpriram os requisitos de passagem sobre a Plataforma de Força somente com o hemisfério esquerdo e os pontos reflexivos estivessem perfeitamente visíveis para digitalização e processamento dos mesmos. Um observador verificava cada uma das

passagens dos animais sobre a plataforma, para garantir que os mesmos haviam passado da maneira correta.

Pelos motivos citados no início da discussão deste trabalho, o animal k1 participou apenas da coleta do t0. Para o t1 foi possível apenas a coleta por biópsia de fragmento muscular para análise do músculo distrófico, porém, não foi realizada sua coleta biomecânica uma vez que o mesmo teve uma importante perda de função motora, entre elas a marcha.

À medida que a distrofia muscular progride, o animal apresenta alterações visíveis da marcha, que se tornam evidentes a partir dos 04 meses de vida (AMBROSIO et al., 2009). Collins e Morgan (2003) e Howell et al. (2007) descrevem de maneira subjetiva as características observadas na marcha dos animais GRMD. Entre as características, eles relatam perda da massa muscular, principalmente nos membros pélvicos, aumento da Amplitude de Movimento Articular (ADM) do carpo e tarso e diminuição da ADM do joelho durante a marcha.

Da mesma forma, Thibaud et al. (2007) comparam os achados do exame muscular, por ressonância magnética, com a observação motora dos animais utilizando uma escala de avaliação funcional. Tanto o aumento da ADM do carpo e tarso, como a diminuição da ADM do joelho durante a marcha foi um achado comum entre os animais distróficos avaliados.

Contrário ao observado visualmente nesses animais, e até então entendido como uma adaptação funcional à progressiva perda de força muscular (GAIAD et al., 2009), os animais distróficos, avaliados na cinemática, não apresentaram diminuição da ADM ativa do joelho durante a marcha, quando analisamos o t1 em relação ao t0.

Ainda que os valores da ADM ativa do joelho sejam significativamente maiores para os animais controles, que os dos tratados no t1, os valores iniciais encontrados no t0 foram mantidos nos dois grupos, não havendo diminuição quantitativa dessa ADM. Discordando, portanto, das avaliações qualitativas até então descritas na literatura para este modelo. Associado a esse resultado, se analisarmos as três articulações avaliadas do membro pélvico, a ADM do joelho foi a que apresentou maior amplitude tanto no t0 como no t1.

Em um estudo anterior, avaliamos a ADM passiva dos animais GRMD, por goniometria, e também não observamos diminuição significativa na articulação do joelho dos cães (GAIAD et al., 2009). Porém, apesar da avaliação da ADM passiva estar padronizada e com sua confiabilidade confirmada em cães (JAEGGER et al., 2002), a metodologia não possibilita a avaliação da ADM ativa, com o animal na posição quadrúpede e realizando as adaptações necessárias para manter a função de marcha, como na avaliação cinemática.

As duas articulações proximais estudadas (coxofemoral e ombro) apresentaram diminuição significativa na ADM ativa.

A articulação coxofemoral é pouco discutida em artigos de cinemática animal, porém, muito importante para o entendimento das alterações músculo-esqueléticas nos quadrúpedes, uma vez que 30% das doenças ortopédicas afetam os membros pélvicos (VAN DER WALT et al., 2008). Nos artigos que tratam das alterações músculoesqueléticas do modelo GRMD, não se discute sua progressão, possivelmente devido à dificuldade de avaliação visual durante o movimento e ausência de avaliações cinemáticas nestes animais.

Entretanto, a articulação coxofemoral foi influenciada pela progressão da doença e também pela fisioterapia. Os animais controles tiveram essa amplitude mantida do t0 para o t1, já os tratados apresentaram diminuição da ADM coxofemoral ativa. Contrário aos estudos anteriores que investigam qualitativamente as articulações distais dos membros torácicos e pélvicos (KORNEGAY et al., 1994; COLLINS; MORGAN, 2003; AMBROSIO et al., 2009), essa articulação merece atenção, pois sugere que as adaptações, decorrentes da fraqueza muscular neste modelo, devem estar acontecendo também em articulações proximais, com maior dificuldade de observação que as distais, como o tarso e o carpo.

Van Der Walt et al. (2008) investigaram a extensão máxima do quadril de animais saudáveis, por goniometria (ADM passiva) e análise cinemática (ADM ativa). Eles concluem que a ADM de extensão, necessária para a função da marcha, é menor que a ADM da extensão passiva. Seus valores de ADM de extensão ativa para os 30 animais avaliados foram de 119.9 graus, maiores que os observados em animais distróficos no t0 (50.29 graus) ou no t1 (42.11 graus).

Os resultados de Van Der Walt et al. (2008), com animais saudáveis, sugerem uma importante limitação da ADM ativa dos animais do modelo GRMD. Essa limitação foi significativamente maior nos animais tratados, o que indica que a fisioterapia empregada acelerou o aparecimento de novas adaptações e, possivelmente, a progressão da distrofia nesses animais. Novas avaliações, com um grupo maior de animais distróficos e acompanhamento em longo prazo, podem esclarecer a progressiva limitação da ADM da articulação coxofemoral em decorrência da distrofia.

Em um artigo investigando a marcha de dois pacientes DMD e dois com amiotrofia espinhal do tipo II, através da cinemática, cinética e eletromiografia, Armand et al. (2005) descrevem as estratégias encontradas pelos indivíduos para a marcha. Apesar da fraqueza progressiva em comum, as duas patologias utilizam estratégias diferentes e os indivíduos com DMD usam, basicamente, a flexão do quadril associada à flexão plantar para avançar com o

membro à frente. Em decorrência disso, as duas articulações têm recebido especial atenção na manutenção de sua mobilidade, em sessões de fisioterapia motora em humanos DMD.

Da mesma forma que em humanos DMD, é possível que a articulação do quadril desempenhe papel importante nas adaptações da marcha dos animais distróficos, até agora não explorada.

Possivelmente, pelos mesmos motivos da ausência de estudos na articulação coxofemoral no modelo GRMD, o ombro dos animais tratados sofreu diminuição da ADM ativa. Em geral, os artigos sugerem que os membros torácicos dos animais do modelo GRMD são comprometidos, posteriormente aos membros pélvicos (COLLINS; MORGAN, 2003; HOWELL et al., 2007).

Os resultados aqui apresentados, em relação à Força de Reação do Solo (FRS) vertical, mostram que os valores dos membros torácicos são significativamente maiores que os do membro pélvico, o que indica uma maior sustentação do peso do animal pelos torácicos.

Besancon et al. (2004) estudaram a sustentação de peso nos diferentes dígitos do membro torácico de duas raças caninas: Greyhounds e Labradores. Os autores encontraram diferenças no apoio entre as duas raças, porém, um achado importante é que em todos os seus animais, a FRS vertical dos membros torácicos foi maior que a dos pélvicos, em concordância com nossos resultados.

Uma vez que a marcha animal é quadrúpede, a diminuição na ADM ativa da articulação coxofemoral altera a distribuição do peso por todo o corpo. Além da diminuição da ADM ativa do ombro, analisada pela cinemática, mais a frente trataremos das alterações de força propulsiva observada nos membros pélvicos destes mesmos animais tratados e sua relação com a distribuição do peso nos quatro membros.

Por outro lado, a articulação do tarso (ou tornozelo) é descrita em diferentes artigos sobre o modelo GRMD. Nossos resultados apontam para uma tendência ao aumento desta amplitude ativa do t0 para o t1. Esta parece ser uma característica da progressão da distrofia, uma vez que a fisioterapia aplicada não provocou diferença significativa entre os dois grupos no t1.

Visualmente, esse aumento da amplitude foi descrita por Howell et al. em 2007 como hiperflexão do tarso. Ambrosio et al. (2009) relatam que, aos quatro meses de vida, já se observa essa mesma hiperflexão do tarso associada ao *genuvalgum* ou *genuvarum*. Essa característica da articulação do tarso confere à marcha animal a denominação de plantígrada (THIBAUD et al., 2007).

Kornegay et al. (1994) sugerem que ocorre uma diminuição progressiva da amplitude passiva do tarso, a partir dos 6 meses de vida. Nesta idade, os valores médios da ADM passiva do tarso, para os animais GRMD do seu estudo, foram de 117 ± 24.5 graus.

Porém, essas evidências anteriores (HOWELL et al., 1997; AMBROSIO et al., 2009) somadas a resultados prévios de medidas passivas da ADM (GAIAD et al., 2009) e aos achados desta pesquisa, indicam que o tarso sofre um aumento da ADM passiva e ativa, ao longo de tempo nesses animais.

A coexistência da diminuição da amplitude ativa na articulação coxofemoral nos animais tratados, com o aumento desta mesma amplitude no tarso, sugere uma estratégia utilizada pelos animais distróficos para manter a marcha na presença da fraqueza muscular progressiva.

A posição de semiflexão parece facilitar o avanço do membro pélvico à frente, uma vez que esta posição do tarso diminui a necessidade da tríplex flexão das três articulações do membro pélvico, para a retirada do membro do apoio.

Os resultados do deslocamento angular dessas seis articulações indicam um maior comprometimento no membro pélvico (coxofemoral e tarso) dos animais GRMD. Uma vez que os animais foram avaliados aos cinco meses, no t₀, momento em que as primeiras alterações visuais da marcha se tornam evidentes, a desordem primária parece ter início nos membros pélvicos, como afirmado nas avaliações qualitativas da marcha deste modelo.

Ainda que o membro torácico seja responsável pela sustentação de 60% do peso corporal em mamíferos quadrúpedes (LEE et al., 2004), nossos resultados sugerem que eles não são os primeiros a sofrer alterações. Nossos dados confirmam que as desordens músculo-esqueléticas têm início no membro pélvico do modelo GRMD e indicam que as alterações observadas no membro torácico são secundárias a estas.

Para a coleta dos dados não utilizamos coleiras ou guias para conduzir os animais a passar sobre a Plataforma de Força, para evitar alterar a velocidade normal dos animais, o que interferiria nos dados coletados. Devido à doença, os animais deste modelo são menos ativos e possuem velocidade de marcha mais lenta que animais saudáveis.

Os animais foram estimulados por comando verbal e recompensas durante as coletas, tornando a velocidade de coleta um dos parâmetros de avaliação. Após o processamento dos dados, a média individual e em seguida, a média e desvio padrão do grupo tratado e controle, foram calculados. A velocidade média do grupo, observada no t₀ ($0.64 \pm 0.47 \text{ m.s}^{-1}$), é considerada como uma marcha de velocidade lenta.

No estudo de Barthélémy et al. (2009) os animais GRMD também caminharam na sua velocidade de preferência, sendo esta considerada um dos parâmetros de avaliação. A velocidade média dos animais distróficos, deste estudo, foi de 0.72 m.s^{-1} , significativamente menor que a velocidade média dos animais controles saudáveis (3.97 m.s^{-1}).

McLaughlin e Roush (1995) investigaram o efeito do aumento da velocidade no tempo da FRS crânio-caudal de Greyhounds. Essa relação foi analisada em diferentes velocidades, a marcha considerada lenta variou entre 0.92 a 1.03 m.s^{-1} e a velocidade no trote lento variou de 1.5 a 1.8 m.s^{-1} .

Em outro estudo, onde a velocidade de animais com claudicação foi considerada um dos parâmetros de avaliação (QUINN et al., 2007), nota-se que os mesmos apresentaram velocidade média de $2.01 \pm 0.05 \text{ m.s}^{-1}$. Após cirurgia, estes mesmos animais mostraram aumento na velocidade com 4 ($2.20 \pm 0.04 \text{ m.s}^{-1}$) e 8 semanas ($2.28 \pm 0.03 \text{ m.s}^{-1}$), o que foi considerado positivo pelos autores. Já Suwankong et al. (2007) estabeleceram uma velocidade média de coleta das FRS de $1.1 \pm 0.2 \text{ m.s}^{-1}$ para avaliar a eficácia da cirurgia de descompressão da estenose lombosacral.

Em geral, as pesquisas da marcha canina não possuem uma velocidade média definida. Nota-se que a mesma pode ser padronizada, a fim de caracterizar uma avaliação de marcha ou do trote e também pode ser livre, quando a mesma é utilizada como um dos parâmetros de eficácia de um tratamento ou progressão de uma patologia.

Nossos animais apresentaram velocidade inferior às publicações consultadas sobre a marcha canina no t0 e, ao contrário dos animais controles que mantiveram a velocidade na coleta do t1, os animais tratados apresentaram diminuição da mesma (0.45 ± 0.21). Do ponto de vista de avaliação da progressão da doença, esses valores indicam que a marcha dos animais tratados no t1 está sendo realizada com mais dificuldade que a dos controles. É possível que o fator fadiga muscular esteja atuando para esta redução, porém, estudos direcionados para ativação muscular, com eletromiografia, seriam necessários para a conclusão deste ponto.

Sabe-se que a velocidade é um fator que altera o tempo de apoio das FRS vertical (MCLAUGHLIN; ROUSH, 1994) e de propulsão e frenagem (MCLAUGHLIN; ROUSH, 1995), porém, esses mesmos autores indicam que a correlação, entre o pico das FRS vertical e cranio-caudal e velocidade, não é tão forte como a correlação entre o pico da FRS Vertical (Fy) e o tempo de apoio.

Nossos resultados mostram um aumento significativo no pico da força vertical dos membros torácicos dos animais controle e tratados no t1, com aumento do tempo de contato somente dos animais controles.

Nossos dados de velocidade não mostraram correlação com a FRS vertical, porém, houve correlação positiva entre a velocidade e a FRS crânio-caudal, como observado por McLaughlin e Roush (1995).

Em animais saudáveis, a força vertical (F_y) é maior nos membros torácicos que nos membros pélvicos (BENSANCON et al., 2004; LEE et al., 2004; GILLETTE; ANGLE, 2008). O mesmo foi observado nos animais distróficos estudados durante todo o período, o que indica que os membros torácicos suportam mais peso que os pélvicos, também neste modelo de estudo da DMD.

Os valores da F_y do membro pélvico dos animais GRMD (4.01 ± 1.47), aos 05 meses de vida (t_0), foi próximo ao valor dos animais com doença musculoesquelética investigados por Suwankong et al. (2007) (3.89 ± 0.38) pré e pós cirurgia de descompressão da estenose lombo sacral. Em seu estudo, os valores da F_y se mantiveram durante todo o período, inclusive por um ano e meio após a primeira coleta, não sendo a força vertical afetada pela intervenção estudada.

Lee et al. (2004) analisaram o trote de cinco animais de diferentes raças e saudáveis em situações de carga (10% do peso corporal) e sem carga. Na situação sem carga, os valores da F_y foram de 1.04 N/massa corporal, inferiores aos nossos resultados, que geraram uma média da F_y no t_0 de 3.18 N/massa corporal.

A progressão da distrofia muscular no modelo estudado, provocou aumento significativo da F_y , tanto nos membros pélvicos como torácicos dos animais tratados e controles. A fisioterapia não influenciou no comportamento desta força, porém, a mesma parece interferir positivamente na manutenção do tempo de contato dos membros torácicos destes animais.

Assim, a fisioterapia parece manter a distribuição do suporte de peso entre os membros torácicos e pélvicos, à custa da diminuição da velocidade de marcha, que pode ou não estar envolvida com a fadiga muscular.

A análise do pico da força de propulsão e da relação desta mesma força para o membro pélvico / membro torácico foi sugerida por Suwankong et al. (2007) como sendo mais importante que as forças de frenagem ou vertical, para o entendimento da distribuição das forças em animais com lesão músculo-esqueléticas.

Nossos valores de Fx indicam que a propulsão (Fx^+) está praticamente ausente na marcha dos animais no t0. Na maioria dos mamíferos quadrúpedes, entre eles, gatos, cachorros, cavalos e macacos, os membros torácicos são responsáveis pela força de frenagem e os pélvicos pela força de propulsão durante a marcha (LEE et al., 1999).

Os animais distróficos apresentaram pico da Fx^+ para o membro pélvico de 0.17 no t0. Em condições pós-cirúrgicas ou dolorosas essa força está diminuída, voltando aos valores normais após a correção (SUWANKONG et al., 2007). A diminuição da força propulsiva nos membros pélvicos indica que os mesmos possuem menos força e em geral, está relacionada com a dor na articulação lombo sacra ou fraqueza neurogênica no membro pélvico (MEIJ et al., 2006).

Na distrofia muscular, a fraqueza progressiva e com início nos membros pélvicos torna a Fx^+ praticamente ausente aos 05 meses de vida desses animais. Seu comportamento foi mantido no decorrer deste estudo, sem sofrer influência da fisioterapia aplicada.

Em artigo de Lopez et al. (2006), a força médio-lateral (Fz) apresentou valores mais altos no membro pélvico dos cães em relação aos torácicos. Esses autores investigaram as características cinéticas de filhotes de diferentes raças, a fim de verificar se existe relação entre as FRS e a frouxidão ligamentar coxofemoral. A Fz não esteve alterada nestes animais e apresentou valores menores que 6% do peso corporal e direcionada no sentido lateral.

Valores aproximados, bem como o sentido da força foram descrito por Rumph et al. (1994) em artigo relatando as características das três FRS de 43 cães saudáveis.

Nossos animais distróficos apresentaram aumento do componente medial da Fz do membro torácico, principalmente nos animais tratados. O direcionamento da força no sentido medial, ou seja, o apoio com a borda lateral do carpo, parece ser uma característica da evolução da distrofia muscular aqui exacerbada pela fisioterapia aplicada.

Barthélémy et al. (2009) mostraram resultados semelhantes em relação à essa força. Porém, a ferramenta empregada por esses autores não fornece dados de cada um dos componentes, lateral ou medial. Eles encontraram aumento da força médiolateral nos animais GRMD, quando comparada com a mesma força nos animais saudáveis.

Os achados referentes à plataforma de força e deslocamento angular apontam características importantes da marcha dos animais distróficos, até então não relatadas na literatura científica. Analisando os resultados dos animais controles e tratados, concluímos que a hipótese de que a fisioterapia aplicada prolongaria as características observadas no t0 foi rejeitada.

O membro pélvico, ainda que não seja responsável pela sustentação da maior parte do peso corporal do animal, é mais afetado pela distrofia muscular que o torácico. As duas articulações mais comprometidas são a coxofemoral, até hoje não explorada nos artigos de avaliações músculo-esqueléticas referentes ao modelo GRMD, e o tarso. O comportamento dessas duas articulações sugere uma estratégia utilizada pelos animais, visando otimizar a marcha na presença da fraqueza muscular, de maneira similar aos humanos DMD. A articulação do joelho, que nas descrições qualitativas mostra-se comprometida desde o aparecimento das primeiras alterações da marcha nesses cães, apresentou a maior ADM ativa das três articulações avaliadas. A articulação com maior ADM ativa no membro torácico foi o carpo, confirmando as observações qualitativas já descritas desse modelo.

Associado a essas alterações cinemáticas, a distrofia muscular aumenta a sobrecarga tanto no membro torácico como pélvico, refletido pelo aumento da F_y (em até 10 e 6 vezes o peso corporal, respectivamente), diminui a força de propulsão (F_x^+) do membro pélvico e aumenta a força medial dos membros torácicos dos animais do modelo GRMD.

Na presença da modalidade de fisioterapia investigada, observam-se alterações morfológicas e funcionais. Apesar da ausência da proteína distrofina permitir lesões das fibras musculares, em decorrência dos movimentos, observamos na pesquisa que, a ausência desse mesmo movimento (como foi o caso do animal controle k1), gera perdas funcionais importantes e indesejáveis do ponto de vista terapêutico.

Em nosso estudo, as três sessões semanais de 40 minutos, ainda que com as pausas para evitar a fadiga, favoreceram a diminuição da ADM ativa da articulação coxofemoral, diminuiu a velocidade de marcha dos dois animais tratados e provocou a deposição do colágeno do tipo I no endomísio do músculo bíceps femoral.

Já os outros dois animais que mantiveram a rotina de atividades de vida diária, realizando mudanças de posturas independentes para alcançar comida, água e sombra e com mais horas de descanso, parecem ter chegado mais próximos de encontrar o equilíbrio entre movimento e mínimo de lesão.

A partir desta análise de dados e dos resultados de outras pesquisas que adaptaram modalidades fisioterapêuticas para a investigação animal (LUTHERT et al., 1980; KUMAR; BORIEK, 2003; GOMES et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; GAIAD et al., 2009), as modalidades de fisioterapia, bem como suas frequências, precisam ser melhor investigadas, a fim de que o profissional possa oferecer ao paciente um nível de atividade que seja capaz de gerar movimento com o mínimo possível de danos para o tecido muscular. Esse mesmo tema foi discutido anteriormente (GAIAD et al., 2009) com outras ferramentas metodológicas.

É notável o papel benéfico que a fisioterapia exerce do ponto de vista do bem-estar, da interação, convívio social e qualidade de vida dos pacientes. Porém, estudos em longo prazo das terapias atualmente empregadas são necessárias.

Sackley et al. (2009), investigaram no Reino Unido, os resultados, em longo prazo de intervenções em reabilitação da fraqueza ou contratura da articulação do tornozelo (foot drop) em diferentes tipos de distrofias musculares. Seus resultados não mostraram efeitos positivos de cirurgias corretivas precoces ou do treino de força em pacientes DMD. O uso da órtese noturna não teve efeito nos pacientes com Charcot-Marie-Tooth, mas, os mesmos se beneficiaram com o treino de força, melhorando sua pontuação no teste de 6 minutos de caminhada.

Muitos pontos, como por exemplo, o alongamento dos flexores plantares e de quadril, a movimentação ativo-livre em séries de exercícios nas sessões, subidas de rampas e escadas para a manutenção das amplitudes de movimentos e resistência muscular para a deambulação, precisam ser investigados e repensados pelos profissionais, visando uma terapia direcionada para o problema da ausência da distrofina.

O número de estudos em qualidade de vida do paciente DMD e sua família é crescente, em grande parte devido ao aumento da expectativa de vida dos mesmos (PARKER et al., 2005; FEDER; SEGTMAN, 2009). Em geral, essas pesquisas investigam pacientes, famílias e cuidadores, levando em consideração suas dificuldades e o que consideram como qualidade de vida frente à doença.

Kohler et al. (2005) relacionaram a pontuação do questionário “SF-36” de qualidade de vida com incapacidade física e dificuldade respiratória de pacientes adultos com DMD. Os pacientes, de diferentes idades e com fraqueza muscular avançada, pontuaram uma elevada qualidade de vida neste questionário, com valores similares a doenças agudas ou outras doenças neuromusculares menos severas. Os autores atribuem esses resultados ao caráter crônico da DMD, que coloca precocemente o paciente a enfrentar e adaptar-se a uma limitação progressiva.

Os estudos de qualidade de vida em geral apontam diferentes resultados, de acordo com a população, idade, característica da doença estudada, entre outros. Sua contribuição mais importante, todavia, é a atenção dispensada ao paciente e sua família, suas expectativas para com as terapias oferecidas e o que os mesmos consideram importante ou dispensável.

Concordando com os resultados de Kohler et al. (2005), Longo-Araujo de Melo e Moreno-Valdés (2007) pesquisaram o que representava qualidade de vida para crianças com DMD e seus cuidadores. Os principais pontos positivos percebidos, tanto pelas crianças como

pelos cuidadores, foram: função motora, família e diversão. Este último ponto se justifica pela idade dos sujeitos avaliados (em média 9,9 anos), idade em que o bem-estar está intimamente relacionado ao lúdico. Os pais apontaram ainda que viver o dia a dia, trocar informações com outros pais ou com os terapeutas e participar ativamente do processo de decisão, são pontos importantes para o bem-estar da família.

Esses artigos apontam os interesses e necessidades por parte dos pacientes e famílias, nem sempre abordados nos tratamentos. Tendo em vista o caráter progressivo da DMD e seu início precoce, a fisioterapia parece colaborar com a melhora da qualidade de vida, na medida em que oferece esclarecimentos e informações para os cuidadores e também associa o lúdico às sessões com as crianças.

Entretanto, a preocupação com os objetivos motores da fisioterapia parece ter norteado as condutas até o momento, ainda que a contradição movimento x função, na ausência da distrofina no músculo, ainda requeira investigações.

É certo que a fisioterapia como espaço lúdico, atividade regular que possibilita a saída da residência, encontro com outros pacientes para troca de informações e experiências e momento de se sentir cuidado, desempenha papel fundamental para a promoção do bem-estar na vida dos pacientes.

Em artigo recente com neonatos, White-Traut et al. (2009) analisaram os níveis de cortisol da saliva dos sujeitos em três diferentes situações: estímulo tátil, ausência de estímulos e na combinação de fontes diferentes de estimulação (tátil, visual, auditiva e vestibular). O nível mais alto de cortisol foi observado no grupo do estímulo tátil e o mais baixo, na situação dos múltiplos estímulos. A situação dos múltiplos estímulos foi encarada pelos bebês como estressante, reduzindo os níveis de cortisol. Os autores sugerem que as intervenções têm efeitos mínimos na presença de stress.

A adequação do ambiente de terapia às expectativas do paciente, visando a diminuição do stress gerado pela doença, favorece o sucesso da fisioterapia, bem como participa da melhora da qualidade de vida dos pacientes. Essa preocupação deve fazer parte, cada vez mais, da rotina do paciente, uma vez que o objetivo final de qualquer profissional da saúde é promover satisfação e melhora na qualidade de vida do indivíduo (GONÇALVES et al., 2008).

Os dois animais tratados da pesquisa também tinham sua atividade regular de fisioterapia, três vezes por semana, onde recebiam atenção especial, saíam do ambiente comum do Canil GRMD e exploravam um novo ambiente com estímulos táteis, auditivos, olfatórios, de maneira prazerosa. Os níveis de cortisol dos animais não foram avaliados nesta

pesquisa, porém, suas reações à presença ou somente ao som da voz do terapeuta expressavam alegria e satisfação, o que indica que a fisioterapia esteve associada a uma atividade que proporciona bem estar.

Uma vez que os animais não têm condições de transmitir suas emoções verbalmente, como humanos, as mesmas podem ser entendidas de duas maneiras, conforme apontam Prada et al. (2002). A primeira delas é o reconhecimento de *Sinais fisiológicos*, onde as sensações são somatizadas, ou seja, ainda que de maneira inconsciente e involuntária são impressas em seu corpo físico “marcas” de sua condição mental / emocional. A segunda maneira é a interpretação de um *Comportamento Sugestivo*. Sinais característicos representam a dor/sofrimento, por exemplo, os movimentos de flexão e extensão dos membros, ou mesmo o se afastar do estímulo doloroso.

Nossos resultados, somados ao que indica a literatura pesquisada, nos permite sugerir que o estímulo da realização independente das atividades de vida diária, favorecida por meio de adaptações ao ambiente e às limitações individuais da idade e progressão da distrofia é benéfico para o equilíbrio lesão muscular e movimento. A preocupação do profissional, voltada para os interesses e necessidades de cada paciente, bem como a troca de informações e esclarecimentos deve estar presente nas sessões, visando diminuir o stress gerado pela doença.

Enquanto as pesquisas, em medicamentos e terapias gênicas ou celulares, avançam em modelos pré-clínicos da DMD, uma grande população de pacientes e famílias aguarda ansiosa pela cura ou ao menos, pela desaceleração da distrofia muscular. No momento, cabe aos profissionais envolvidos nas terapias de suporte oferecer o que de melhor pode ser feito para estes pacientes e famílias. Ao fisioterapeuta parece caber a função de dosar o movimento possível, buscando o melhor equilíbrio entre o mínimo de lesão muscular e a preservação da função motora, mental e vital.

8 Conclusões

8 CONCLUSÕES

A fisioterapia motora acelera as alterações morfológicas no músculo distrófico sem interferir na progressão das disfunções de marcha no modelo canino da distrofia muscular. Os animais tratados apresentam diminuição da flexibilidade e menor regeneração do tecido muscular em comparação aos animais não tratados. Funcionalmente, a fraqueza muscular dos animais distróficos reflete em uma marcha lenta, com característica de sobrecarga e dificuldade de avançar com o corpo durante o ciclo de marcha. Além destas características, os animais tratados apresentam menor amplitude de movimento articular proximal. A modalidade de fisioterapia empregada favorece a manutenção do tempo de apoio dos membros torácicos, mantendo a distribuição de peso entre os membros torácicos e pélvicos. O presente trabalho contribui para o entendimento das adaptações músculoesqueléticas na ausência da distrofina no GRMD, bem como dispõe a utilização de parâmetros quantitativos para a avaliação do sucesso de novas terapias para a Distrofia muscular de Duchenne neste modelo.

Referências

REFERÊNCIAS

ALEXAKIS, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 293, p. 661–669, 2007.

AMADIO, A. C.; COSTA, P. H. L.; SACCO, I. C. N.; SERRÃO, J. C.; ARAUJO, R. C.; MOCHIZUKI, L.; DUARTE, M. Introdução à Biomecânica para análise do Movimento Humano - Descrição e Aplicação dos Métodos de Medição. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 3, n. 2, p. 41-54, 1999.

AMADIO, A. C.; SERRÃO, J. C. Contextualização da biomecânica para a investigação do movimento: fundamentos, métodos e aplicações para análise da técnica esportiva. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 21, p. 61-85, 2007.

AMBROSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAUJO, K. P. C.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L. T.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.

ANSVED, T. Muscle training in muscular dystrophies. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, p. 359-366, 2001.

ANSVED, T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, p. 435–439, 2003.

ARMAND, S.; MERCIER, M.; WATELAIN, E.; PATTE, K.; PELISSIER, J.; RIVIER, F. A comparison of gait in spinal muscular atrophy, type II and Duchenne muscular dystrophy. **Gait and Posture**, v. 21, p. 369–378, 2005.

BACH, J. R. **Guia de exame e tratamento das doenças neuromusculares**. 1. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 5–14; 61.

BANKS, G. B.; CHAMBERLAIN, J. S. The value of mammalian models for Duchenne Muscular Dystrophy in developing therapeutic strategies. In: KRAUSS, R. S. (Ed.). **Current Topics in Developmental Biology**. Burlington: Academic Press, 2008. v. 84, p. 431-453.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 87-123.

BARTHÉLÉMY, I.; BARREY, E.; THIBAUD, J-L.; URIARTE, A.; VOIT, T.; BLOT, S. Gait analysis using accelerometry in dystrophin-deficient dogs. **Neuromuscular Disorders**, [ahead of print], 2009.

BERTRAM, J. E.; LEE, D. V.; CASE, H. N.; TODHUNTER, R. J. Comparison of the trotting gaits of Labrador Retrievers and Greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 7, p. 832-388, 2000.

BESANCON, M.F.; CONZEMIUS, M.G.; EVANS, R.B.; RITTER, M.J. Distribution of vertical forces in the pads of Greyhounds and Labrador Retrievers during walking. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 11, p. 1497-1501, 2004.

BOCKSTAHLER, B. A.; SKALICKY, M.; PEHAM, C.; MÜLLER, M.; LORINSON, D. Reliability of ground reaction forces measured on a treadmill system in healthy dogs. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 373-378, 2007.

BRUNNER, E.; LANGER, F. Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. **Biometrical Journal**, v. 42, p. 663-675, 2000.

CAROMANO, F. A. C. Características do portador de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) – Revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 3, p. 211-218, 1999.

CARTER, G. T.; ABRESCH, R. T.; FOWLER, JR., W. M. Adaptations to exercise training and contraction-induced muscle injury in animal models of muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, p. 151-161, 2002. Supplement.

CHAKKALAKAL, J. V.; THOMPSON, J.; PARKS, R. J.; JASMIN, B. J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 880-895, 2005.

CHETBOUL, V.; ESCRIOU, 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. **European Heart Journal**, v. 25, n. 21, p. 1934-1939, 2004.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contraction injury in dystrophic canine muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, p. 1572-1578, 2002.

CHILDERS, M. K.; STALEY, J. T.; KORNEGAY, J. N.; MCDONALD, K. S. Skinned single fibers from normal and dystrophin-deficient dogs incur comparable stretch-induced force deficits. **Muscle Nerve**, v. 31, n. 6, p. 768-771, 2005.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's Muscular Dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165-172, 2003.

COZZI, F.; CERLETTI, M.; LUVONI, G. C.; LOMBARDO, R.; BRAMBILLA, P. G.; FAVERZANI, S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M. Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathologica**, v. 101, p. 469-478, 2001.

DANGAIN, J.; VRBOVA, G. Long term effect of low frequency chronic electrical stimulation on the fast hind limb muscles of dystrophic mice. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 52, p.1382-1389, 1989.

DEMOS, J. Results of the treatment of Duchenne de Boulogne myopathy by early physiotherapy: a comparative study with untreated subjects. **Archives Françaises de Pédiatrie**, v. 40, p. 609-613, 1983.

DESGUERRE, I.; CHRISTOV, C.; MAYER, M.; ZELLER, R.; BECANE, H-M.; BASTUJIGARIN, S.; LETURCQ, F.; CHIRON, C.; CHELLY, J.; GHERARDI, R. K. Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. **PloS One**, v. 4, n. 2, e4347, 2009.

DUANCE, V. C.; STEPHENS, H. R.; DUNN, M.; BAILEY, A. J.; DUBOWITZ, V. A role for collagen in the pathogenesis of muscular dystrophy? **Nature**, v. 284, p. 470-471, 1980.

EAGLE, M. Report on the muscular dystrophy campaign workshop: Exercise in neuromuscular diseases. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 975-983, 2002.

FEDER, D.; SEGTNAN, B. S. Parents vision on Duchenne muscular dystrophy (DMD) research. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 8-9, p.643, 2009.

FEENEY, L. C.; LIN, C. F.; MARCELLIN-LITTLE, D. J.; TATE, A. R.; QUEEN, R. M.; YU, B. Validation of two-dimensional kinematic analysis of walk and sit-to-stand motions in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 3, p. 277-282, 2007.

GAIAD, T. P.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M.; HAMLETT, W. C.; AMBROSIO, C. E. Effect of physical therapy on joint range of motion and muscular collagen deposition in the golden retriever muscular dystrophy (GRMD) model. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 13, n. 3, p. 244-251, 2009.

GAUDREAULT, N.; GRAVEL, D.; NADEAU, S. Evaluation of plantar flexion contracture contribution during the gait of children with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 19, n. 3, p. 180-186, 2009.

GAUDREAULT, N.; GRAVEL, D.; NADEAU, S.; DESJARDINS, P.; BRIÈRE, A. A method to evaluate contractures effects during the gait of children with Duchenne dystrophy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 456, p. 51-57, 2007.

GIBSON, B. E.; YOUNG, N. L.; UPSHUR, R. E.; MCKEEVER, P. Men on the margin: a Bourdieusian examination of living into adulthood with muscular dystrophy. **Social Science and Medicine**, v. 65, n. 3, p. 505-517, 2007.

GILLARD, E. F.; CHAMBERLAIN, J. S.; MURPHY, E. G.; DUFF, C. L.; SMITH, B.; BURGHESE, A. H. M.; THOMPSON, W.; SUTHERLAND, J.; OSS, I.; BODRUG, S. E.; KLAMUT, H. J.; RAY, P. N.; WORTON, R. G. Molecular and Phenotypic Analysis of Patients with Deletions within the Deletion-rich Region of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 45, p. 507-520, 1989.

GILLETTE, R. L.; ANGLE, T. C. Recent developments in canine locomotor analysis: a review. **The Veterinary Journal**, n. 178, p. 165-176, 2008.

GOLDSPINK, G.; FERNANDES, K.; WILLIAMS, P. E.; WELLS, D. J. Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 4, n. 3, p. 183-191, 1994.

GOMES, A. R.; CORNACHIONE, A.; SALVINI, T. F.; MATTIELLO-SVERZUTI, A. C. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **Journal of Anatomy**, v. 210, n. 3, p. 328-335, 2007.

GONÇALVES, M.; DYLEWSKI, V.; CHAVES, A. C. X. Qualidade de Vida: análise comparativa entre crianças com distrofia muscular de Duchenne e seus cuidadores. **Revista Neurociência**, v. 16, n. 4, p. 275-279, 2008.

GRANGE, R. W.; CALL, J. A. Recommendations to define exercise prescription for Duchenne muscular dystrophy. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 35, n. 1, p. 12-17, 2007.

GRIFFIN, T. M.; MAIN, R. P.; FARLEY, C. T. Biomechanics of quadrupedal walking: how do four-legged animals achieve inverted pendulum-like movements? **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 3545-3558, 2004.

HACK, A. A.; GROH, M. E.; MCNALLY, E. M. Sarcoglycans in muscular dystrophy. **Microscopy Research and Technique**, v. 48, n. 3-4, p. 167-180, 2000.

HANTAI, D.; LABAT-ROBERT, J.; GRIMAUD, J. A.; FARDEAU, M. Fibronectin, laminin, type I, III and IV collagens in Duchenne's muscular dystrophy, congenital muscular dystrophies and congenital myopathies: an immunocytochemical study. **Connective Tissue Research**, v. 13, n. 4, p. 273-281, 1985.

HUANG, P.; ZHAO, X. S.; FIELDS, M., RANSOHOFF, R. M.; ZHOU, L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. **FASEB Journal**, v. 23, n. 8, p. 2539-2548, 2009.

HUEBNER, K. D.; JASSAL, D. S.; HALEVY, O.; PINES, M.; ANDERSON, J. E. Functional resolution of fibrosis in *mdx* mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone. **American journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, p. 1550-1561, 2008.

JAEGGER, G.; MARCELLIN-LITTLE, D. J.; LEVINE, D. Reliability of goniometry in Labrador Retrievers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 979-986, 2002.

KAVANAGH, J. J.; MENZ, H. B. Accelerometry: a technique for quantifying movement patterns during walking. **Gait and Posture**, v. 28, p. 1-15, 2008.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A. S.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, C. M. C.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. 35, 2008.

KIM, J.; RIETDYK, S.; BREUR, G. J. Comparison of two-dimensional and three-dimensional systems for kinematic analysis of the sagittal motion of canine hind limbs during walking. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 9, p. 1116-1122, 2008.

KIMURA, S.; IKESAWA, M.; NOMURA, K.; OZASA, S.; UENO, H.; YOSHIOKA, K.; YANO, S.; YAMASHITA, T.; MATUSKURA, M.; MIIKE, T. Immobility reduces muscle fiber necrosis in dystrophin deficient muscular dystrophy. **Brain & Development**, v. 28, n. 7, p. 473-476, 2006.

KHODADADEH, S.; McCLELLAND, M. R.; PATRICK, J. H.; EDWARDS, R. H.; EVANS, G. A. Knee moments in Duchenne muscular dystrophy. **Lancet**, v. 6, n. 2, p. 544-545, 1986.

KOENIG, M.; BEGGS, A. H.; MOYER, M.; SCHERPF, S.; HEINDRICH, Q. K.; BETTECKEN, T. T.; MENG, T. G.; MULLERJ, C. R.; LINDLOF, M.; KAARIAINEN, H.; DE LA CHAPELLET, A.; KIURU, A.; SAVONTAUS, M-L.; GILGENKRANTZ, H.; RKAN, D.; CHELLY, J.; KAPLAN, J-C.; COVONE, A. E.; ARCHIDIACONO, N.; ROMEO, G.; LIECHTI-GAILATI, S.; SCHNEIDER, V.; BRAGA, S.; MOSER, H.; DARRAS, B. T.; MURPHY, R.; FRANCKE, U.; CHEN, J. D.; MORGAN, G.; DENTON, M.; GREENBERG, C. R.; WROGEMANN, K.; DLONDEN, L. A. J.; VAN PAASSEN, H. M. B.; VAN OMMEN, G. J. B.; KUNKEL, L. M. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. **American Journal of Human Genetics**, v. 45, p. 498-506, 1989.

KOHLER, M.; CLARENBACH, C. F.; BÖNI, L.; BRACK, T.; RUSSI, E. W.; BLOCH, K. E. Quality of life, physical disability, and respiratory impairment in Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Respiratory and Critical care medicine**, v. 172, p. 1032-1036, 2005.

KORNEGAY, J. N.; CUNDIFF, D. D.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; OKAMURA, C. S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 493-500, 2003.

KOVANEN, V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 30, n. 1, p. 20-25, 2002.

KUMAR, A.; BORIEK, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **FASEB Journal**, v. 17, p. 386–396, 2003.

LANDISCH, R. M.; KOSIR, A. M.; NELSON, S. A.; BALTGALVIS, K. A.; LOWE, D. A. Adaptative and nonadaptative responses to voluntary wheel running by mdx mice. **Muscle Nerve**, v. 38, n. 4, p. 1290-1303, 2008.

LEE, D.; STAKEBAKE, E.; WALTER, R.; CARRIER, D. Effects of mass distribution on the mechanics of level trotting in dogs. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1715-1728, 2004.

LEE, D.; BERTRAM, J.; TODHUNTER, R. J. Acceleration and balance in trotting dogs. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 3565–3573, 1999.

LEITÃO, A. V. A.; DURO, L. A.; PENQUE, G. M. C. A. Progressive muscular dystrophy – Duchenne type. Controversies of the kinesiotherapy treatment. **São Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 5, p. 995-999, 1995.

LETTTS, R. M.; WINTER, D. A.; QUANBURY, M. Locomotion studies as an aid in clinical assessment of childhood gait. **Canadian Medical Association Journal**, v. 112, n. 3, p. 1091-1095, 1975.

LIEBER, R. **Skeletal muscle, structure, function and plasticity**: the physiological basis of rehabilitation. 2. ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2002. p. 287-346.

LIU, J. M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; KORNEGAY, J. N. Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 30, p. 767-773, 2004.

LONGO-ARAÚJO DE MELO, E.; MORENO-VALDÉS, M. T. Evaluación de la calidad de vida de los niños con distrofia muscular progresiva de Duchenne. **Revista de Neurología**, v. 45, n. 2, p. 81-87, 2007.

LOVERING, R. M.; PORTER, N. C.; BLOCH, R. J. The Muscular Dystrophies: from genes to therapies. **Physical Therapy**, v. 85, n. 12, p. 1372-1388, 2005.

LUTHERT, P.; VRBOVA, G.; WARD, K. M. Effects of slow frequency electrical stimulation on muscles of dystrophic mice. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 43, p. 803-809, 1980.

MACKEY, A. L.; DONNELLY, A. E.; ROPER, H. P. Muscle connective tissue content of endurance-trained and inactive individuals. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 15, p. 402-408, 2005.

MANZUR, A. Y.; KINALI, M.; MUNTONI, F. Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 93, n. 11, p. 986-990, 2008.

MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian Journal of Morphology and Science**, v. 21, n. 3, p. 145-152, 2004.

MCCLOREY, G.; MOULTON, H. M.; IVERSEN, P. L.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. **Gene Therapy**, v. 13, p. 1373-1381, 2006.

MCDONALD, C. M. Physical activity, health impairments and disability in neuromuscular disease. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, p. 108-120, 2002. Supplement.

MCLAUGHLIN JR., R.; ROUSH, J. K. Effects of increasing velocity on braking and propulsion times during force plate gait analysis in greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p. 159-161, 1995.

MCLAUGHLIN JR., R.; ROUSH, J. K. Effects of subject stance time and velocity on ground reaction forces in clinically normal greyhounds at the trot. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, n. 12, p. 1666-1671. 1994.

MCLOON, L. K. Focusing on fibrosis: halofuginone-induced functional improvement in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, p. 1505-1507, 2008.

MEIJ, B. P.; SUWANKONG, N.; VAN DEN BROM, W. E.; VENKER-VAN HAAGEN, A. J.; HAZEWINKEL, H. A. Tibial nerve somatosensory evoked potentials in dogs with degenerative lumbosacral stenosis. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 168-175, 2006.

MERCURI, E.; MAYHEW, A.; MUNTONI, F.; MESSINA, S.; STRAUB, V.; VAN OMMEN, G. J.; VOIT, T.; BERTINI, E.; BUSHBY, K. TREAT-NMD Neuromuscular

Network: Towards harmonisation of outcome measures for DMD and SMA within TREAT-NMD. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 11, p. 894-903, 2008. Report of three expert workshops: TREAT-NMD/ENMC workshop on outcome measures, 12th--13th May 2007, Naarden, The Netherlands; TREAT-NMD workshop on outcome measures in experimental trials for DMD, 30th June--1st July 2007, Naarden, The Netherlands; conjoint Institute of Myology TREAT-NMD meeting on physical activity monitoring in neuromuscular disorders, 11th July 2007, Paris, France.

NAGARAJU, K.; WILLMANN, R. TREAT-NMD Network and the Wellstone Muscular Dystrophy Cooperative Research Network. Developing standard procedures for murine and canine efficacy studies of DMD therapeutics. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 7, p. 502-506, 2009. Report of two expert workshops on "Pre-clinical testing for Duchenne dystrophy": Washington DC, October 27th-28th 2007 and Zürich, June 30th-July 1st 2008.

NASCIMENTO, C. C. F.; PADULA, N.; MILANI, J. G. P. O.; SHIMANO, A. C.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUTI, A. C. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle to swimming, immobilization and rehabilitation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 818-824, 2008.

NGUYEN, F.; CHEREL, L.; GUIGAND, I.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 100-108, 2002.

NGUYEN, F.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M.; CHEREL, Y. Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 145-163, 2005.

NICHOLSON, L. V. B.; JOHNSON, M. A.; BUSHBY, K.; GARDNER-MEDWIN, D.; CURTIS, A.; GINJAAR, I. B.; DEN DUNNEN, J. T.; WELCH, J. L.; BUTLER, T. J.; BAKKER, E.; VAN OMMEN, G-J. B.; HARRIS, J. B. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 2. Correlations within individual patients. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, p. 737-744, 1993.

NISHIYAMA, A.; TAKESHIMA, Y.; SAIKI, K.; NARUKAGE, A.; OYAZATO, Y.; YAGI, M.; MATSUO, M. Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. **BMC Medical Genetics**, v. 8, n. 19, 2007. doi:10.1186/1471-2350-8-19. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/8/19>>. Acesso em: 27 maio 2009.

PARKER, A. E.; ROBB, S. A.; CHAMBERS, J.; DAVIDSON, A. C.; EVANS, K.; O'DOWD, J.; WILLIAMS, A. J.; HOWARD, R. S. Analysis of an adult Duchenne muscular

dystrophy population. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 98, n. 10, p. 729-736, 2005.

PASSERINI, L.; BERNASCONI, P.; BAGGI, F.; CONFALONIERI, P.; COZZI, F.; CORNELIO, F.; MANTEGAZZA, R. Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, n. 9, p. 828-835, 2002.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the Neurological Science**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PORTER, J. D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H. J.; RAO, J. S.; MERRIAM, A. P.; RICHMONDS, C. R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F. H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient *mdx* mice. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 3, p. 263-272, 2002.

PRADA, I. L.; MASSONE, F.; CAIS, A.; COSTA, P. E. M.; SELLEDA, M. M. Bases metodológicas e neurofuncionais da ocorrência de dor/sofrimento em animais. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v. 1, p. 1-13, 2002.

QUINN, M. M.; KEULER, N.; LU, Y.; FARIA, M. L. E.; MUIR, P.; MARKEL, M. D. Evaluation of Agreement between numerical rating scales, visual analogue scoring scales and force plate gait analysis in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 360-367, 2007.

RAMPOLDI, E.; MEOLA, G.; CONTI, A. M.; VELICOGNA, M.; LARIZZA, L. A comparative analysis of collagen III, IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy biopsies and cell cultures. **European Journal of Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 27-34, 1986.

RIDEAU, Y. Treatment of Duchenne's myopathy with early physiotherapy. Critical analysis. **Archives of Frenchy Pediatrics**, v. 42, n. 1, p. 17-21, 1985.

ROTH, S. M.; MARTEL, G. F.; ROGERS, M. A. Muscle biopsy and muscle fiber hypercontraction: a brief review. **European Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 4-5, p. 239-245, 2000.

SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI, A.; MOGNOL, P.; THIBAUD, J. L.; GALVEZ, B. G.; BARTHÉLÉMY, I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; CUSELLA DE ANGELIS, M. G.; TORRENTE, Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.;

COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. **Nature**, v. 444, p. 574-579, 2006.

SCHATZBERG, S. J.; ANDERSON, L. V. B.; WILTON, S. D.; KORNEGAY, J. N.; MANN, C. J.; SOLOMON, G. G.; SHARP, J. H. Alternative dystrophy gene transcripts in Golden Retriever Muscular Dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 21, p. 991-998, 1998.

SEGAWA, M.; FUKADA, S.; YAMAMOTO, Y.; YAHAGI, H.; KANEMATSU, M.; SATO, M.; ITO, T.; UEZUMI, A.; HAYASHI, S.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; TSUJIKAWA, K.; YAMAMOTO, H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 17, p. 3232-3244, 2008.

SILVA, G. C. A. **Análise cinemática da marcha de cães da raça Golden Retriever saudáveis**. Dissertação (Mestrado). 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

STEPHENS, H. R.; DUANCE, V. C.; DUNN, M. J.; BAILEY, A. J.; DUBOWITZ, V. Collagen types in neuromuscular diseases. **Journal of Neurological Sciences**, v. 53, n. 1, p. 45-62, 1982.

STROBER, J. B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 3, n. 2, p. 225-234, 2006.

SUWANKONG, N.; MEIJ, B. P.; KLAVEREN, N. J. V.; WEES, A. V.; MEIJER, E.; BROM, W. E. V. D.; HAZEWINKEL, H. A. W. Assessment of decompressive surgery in dogs with degenerative lumbosacral stenosis using Force Plate Analysis and questionnaires. **Veterinary Surgery**, v. 36, p. 423-431, 2007.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C., MARTINS, P. C.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAIN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, n. 3, p. 241-248, 2008.

VALENTINE, B. A., BLUE, J. T., COOPER, B. J. The effect of exercise on canine dystrophic muscle. **American Neurological association**, v.26, p. 588, 1989.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of Neurological Sciences**, v.97, p. 1-23, 1990.

VAN KLAVEREN, N. J.; SUWANKONG, N.; BOER, S.; VAN DEN BROM, W. E.; VOORHOUT, G.; HAZEWINKEL, H. A. W.; MEIJ, B. P. Force Plate analysis before and after dorsal decompression for treatment of degenerative lumbosacral stenosis in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 450-456, 2005.

VAN DEN BOGAERDT, A. J.; VAN DER VEEN, V. C.; VAN ZUIJLEN, P. P.; REIJNEN, L.; VERKERK, M.; BANK, R. A.; MIDDELKOOP, E.; ULRICH, M. M. Collagen cross-linking by adipose-derived mesenchymal stromal cells and scar-derived mesenchymal cells: Are mesenchymal stromal cells involved in scar formation? **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 4, p. 548-558, 2009.

VAN DER WALT, A. M.; STEWART, A. V.; JOUBERT, K. E.; BEKKER, P. Canine hip extension range during gait. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 79, n. 4, p. 175-177, 2008.

VIGNOS, P. J.; WAGNER, M. B.; KARLINCHAK, B.; KAIRJI, B. Evaluation of a program for long-term treatment of Duchenne muscular dystrophy: Experience at the University Hospital of Cleveland. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 78, n. 12, p. 1844-1852, 1996.

WANG, Z.; CHAMBERLAIN, J. S.; TAPSCOTT, S. J.; STORB, R. Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. **ILAR Journal**, v. 50, n. 2, p. 187-198, 2009.

WHITE-TRAUT, R. C.; SCHWERTZ, D.; MCFARLIN, B.; KOGAN, J. Salivary cortisol and behavioral state responses of healthy newborn infants to tactile-only and multisensory interventions. **Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v. 38, n. 1, p. 22-34, 2009.

ZHOU, G.; XIE, H.; ZHANG, S.; YANG, Z. Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead. **Chinese Medical Journal**, v. 119, n. 16, p. 1381-1391, 2006.