THAÍS PEIXOTO GAIAD

**Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular
esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2006

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.1717
FMVZ

Gaiad, Thaís Peixoto

Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) / Thaís Peixoto Gaiad. – São Paulo: T. P. Gaiad, 2006.
98 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

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. Fisioterapia. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3. Modelo GRMD. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação funcional e histopatológica da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: influência da cinesioterapia motora”, protocolo nº900/2006, utilizando 06 (seis) cães, sob a responsabilidade de Carlos Eduardo Ambrósio (Pós-Doc.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 17/05/2006.

(We certify that the Research “Functional and histopathologic assessment of the skeletal muscle fiber in the Golden Retriever Muscular Dystrophy - cinesiotherapeutic influence”, protocol number 900/2006, utilizing 06 (six) dogs, under the responsibility of Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting on the 17th of May of 2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GAIAD, Thaís Peixoto

Título: Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Dedico esta pesquisa e seus primeiros resultados,
à todas as crianças que cruzaram meu caminho como Fisioterapeuta.
Lembro de cada rosto e cada sorriso.
Que Deus abençoe vocês e suas mães maravilhosas!

Aos animais, Atchim, Ringo, Peter, Nyx, Thor, Hércules,
Winner, Oddie, Lucky e Hi.
Que os anjos lhes acompanhem sempre...

Ao meu pai, José Roberto e minha mãe, Maria Luiza....
Aos meus avós maternos, Aristeu e Carmem Ligya
E paternos, José e Victória (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, carinhosamente Caju... pela acolhida na Veterinária e entendimento de minhas idéias como Fisioterapeuta. Obrigada pela orientação, pelo companheirismo na elaboração e entusiasmo com esta pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, pela confiança e oportunidade em realizar meu sonho como profissional.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blasquez pela paciência e primeiros ensinamentos nos achados em microscopia.

À Profa. Dra. Mayana Zatz, pelo exemplo de luta e dedicação à causa das distrofias musculares.

À todo o Grupo do Canil GRMD! Aos colegas que me acolheram quando cheguei, aos que chegaram comigo e àqueles que ainda chegam para começar novos trabalhos com esses animais maravilhosos...

À equipe da ABDIM que me abriu as portas e recebeu para conversas, aprendizagem e mais um contato com as crianças e suas mães.

À amiga Alida Abatemarco Catelli por todas as conversas, que não foram poucas.....

Aos funcionários e amigos, Diogo, Ronaldo e Sandra pela atenção nos procedimentos de laboratório; Maicon, Cauê e Jaque pelos trabalhos prestados.

Ao Augusto, pelo cuidado com os cães e com todos nós, do canil!

À tia Maria Helena e tio Jorge pelo carinho com que nos receberam em São Paulo.

Ao meu segundo pai e minha segunda mãe, João e Marli Dias Machado, amo vocês!

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos amigos, Rosemberg Ferracini, Flávio Ribeiro Alves, Rusvênia Luiza, Cristiane Porto, Ana Paula da Silva e Matheus Tajra pela força, amizade e carinho neste período.

Ao Alex, pai da Flora e nosso melhor companheiro! Obrigada por abraçar esse sonho comigo.

Ao Felipe, pelas análises estatísticas que me proporcionaram entendimento dos dados.

Às minhas irmãs, Beatriz e Natália pelos encontros em Piracicaba que renovavam os ares....

RESUMO

GAIAD, T. P. **Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**. [Physiotherapy influence in the Golden Retriever Muscular Dystrophy motor function and histopathology of skeletal muscle (GRMD)]. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Esta pesquisa teve como objetivo investigar a influência da Fisioterapia como coadjuvante no tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne. Utilizou-se um protocolo de atividades físicas direcionadas para as alterações músculo-esqueléticas características da patologia, no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através de uma analogia entre as duas espécies. Foram selecionados seis animais machos e distróficos, do grupo do Canil GRMD / USP. A confirmação da patologia foi realizada pela análise do DNA, realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano – IB / USP. As idades variaram entre seis e treze meses no início da pesquisa (média de $10,16 \pm 3,43$ e média de peso $18,86 \pm 3,04$ kg). A primeira coleta foi realizada em Setembro / 2005 e a coleta II, após seis meses (março / 2006). Buscou-se levantar dados a respeito do desempenho funcional dos animais, amplitude de movimento articular (ADM) e, análise histopatológica da musculatura esquelética, com a quantificação da área de colágeno em relação à área total de tecido muscular. A avaliação funcional mostrou que entre as idades de seis e doze meses, a fraqueza muscular começou a se refletir em perdas funcionais importantes. A partir dos doze meses, observa-se uma maior estabilidade nos graus de dificuldade para o desempenho funcional. Os valores, em graus, obtidos na avaliação da ADM das articulações do joelho ($107,83^\circ \pm 4,49$), tarso ($114,16^\circ \pm 15,3$) e carpo ($151,16^\circ \pm 11,05$) dos animais GRMD foram significativamente diferentes quando comparados aos valores médios para as mesmas articulações dos animais normais da mesma raça ($115,89^\circ \pm 8,71$; $123,57^\circ \pm 8,69$; $131,42^\circ \pm 8,48$, respectivamente). Não foi encontrada diferença significativa entre as médias da articulação cotovelo do grupo distrófico ($120^\circ \pm 9,48$) comparados com animais normais da mesma raça ($119,82^\circ \pm 8,65$) ($p < 0.05$). A média dos valores da ADM do joelho e cotovelo da coleta I e II se manteve, no grupo tratado e não tratado. Houve aumento na média da articulação do tarso no grupo tratado da coleta II ($141,66^\circ \pm$

7,63) em relação à coleta I ($115,83^\circ \pm 13,83$). No carpo houve manutenção da ADM no grupo tratado comparando as duas médias. A média da área de deposição de colágeno na coleta I e II para o grupo *não tratado* se manteve, havendo aumento significativo da área de colágeno para os animais do grupo *tratado* pela Fisioterapia ($p < 0.05$). Observa-se que os mesmos animais que tiveram ganho de função com a Fisioterapia, tiveram maior área de colágeno depositado. A aplicação fisioterapêutica no modelo GRMD favoreceu o ganho funcional em relação à macro estrutura articular e muscular, porém a degeneração da ultra estrutura manteve o curso da doença.

Palavras-chave: Fisioterapia. Distrofia muscular de Duchenne. Modelo GRMD.

ABSTRACT

Physiotherapy influence in the Golden Retriever Muscular Dystrophy motor function and skeletal muscle histopathology (GRMD). [Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)]. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The aim of this research was investigate the Physiotherapy influence as a complementary treatment in the Duchenne Muscular Dystrophy. A physical activities protocol was used focusing the skeletal muscle alterations, characteristics from the pathology, in the GRMD model through an analogy between these species. Six males and dystrophic animals from the GRMD kennel/USP were selected. The pathology confirmation was done by the DNA analysis in the Center of Human Genome – IB / USP. The younger dog was six months and the older one, thirteen (mean age $10,16 \pm 3,43$ and mean weigh $18,86 \pm 3,04$ kg). The first collect was in september 2005 and the collect II after six mounths (march/2006). Data about the animals functional status, joint range of movement (ROM) and skeletal muscle histopathological analysis was get. The functional assessment showed that between the six and twelve months of age, the muscular weakness started to reflects in important functional lost. From twelve months, there is a major stability of the difficult degrees to realize the functional activities. The values from the ROM assessment of the knee ($107,83^\circ \pm 4,49$), tarsal ($114,16^\circ \pm 15,3$) and carpal joint ($151,16^\circ \pm 11,05$) from the GRMD animals were statistically different compared to the mean values of the same joints in normal dogs of the same breed ($115,89^\circ \pm 8,71$; $123,57^\circ \pm 8,69$; $131,42^\circ \pm 8,48$, respectively). There was no difference between the mean from the elbow joint of the dystrophic group ($120^\circ \pm 9,48$) when compared with normal dogs from the same breed ($119,82^\circ \pm 8,65$) ($p < 0.05$). The mean value from the knee and elbow joint in the collect I and II was the same, in the treated and no treated group. There was a mean improvement from the tarsal joint of the treated group in the collect II ($141,66^\circ \pm 7,63$) related to collect I ($115,83^\circ \pm 13,83$). In the carpal joint, there was a stable median in the treated group between the two means (collect I and II). The mean from the deposition area of collagen in the collect I and II in relation of no treated group was the same. There was a significant increased of the collagen area to the animals from the treated group by the physiotherapy ($p < 0.05$). The same

animals that had a improvement in the function with the physiotherapy had a bigger collagen area deposition. The physiotherapy application in the GRMD model leads to a better functional status to the joint and muscular gross structure, but the ultra structure degeneration had a maintenance of the pathology course.

Key words: Physiotherapy. Duchenne Muscular Dystrophy. GRMD model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A – Fotografia de goniômetro universal da marca ISP utilizado nas avaliações de Amplitude de Movimento Articular; B – Fotografia de biópsia aberta para coleta de fragmento do músculo vasto lateral pré e pós fisioterapia.....	45
Figura 2 -	A – Fotografia de obstáculo n.1: Animal realiza flexão de cabeça, tronco e membros; B – Fotografia de obstáculo n. 2: Ultrapassagem de obstáculo a 10 cm e 20 cm do solo, com movimentação ativa dos membros torácicos e pélvicos.....	45
Figura 3 -	Fotografia de tipos de terrenos percorridos durante o trajeto da Fisioterapia: A – Grama; B – Cimento; C – Fotografia de animal sendo estimulado a passar de um nível de terreno a outro; D – Fotografia de balisa para trabalhar a flexibilidade da musculatura lateral do tronco.....	46
Figura 4 -	Valores da ADM da articulação joelho de animais normais da raça Golden Retriever e GRMD.....	59
Figura 5 -	Valores da ADM da articulação tarso de animais normais da raça Golden Retriever e GRMD.....	60
Figura 6 -	Valores da ADM do Carpo de animais normais da raça Golden Retriever e GRMD.....	61
Figura 7 -	Média da ADM da articulação do Joelho na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia.....	62
Figura 8 -	Média da ADM da articulação do Tarso na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia.....	63
Figura 9 -	Média da ADM da articulação do Cotovelo na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia.....	64
Figura 10 -	Média da ADM da articulação do Carpo na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia.....	65

Figura 11 - **A** - Fotomicrografia do músculo vasto lateral esquerdo, animal distrófico, idade 18 meses. Tecido conjuntivo fibroso perimisial (→) e endomisial (*), coloração HE, barra = 100µm. **B** - Fotomicrografia polarizada de músculo esquelético adulto, não distrófico, coloração Picrossírius, barra = 100 µm. **C**- Fotomicrografia polarizada de músculo vasto lateral distrófico, animal não tratado, idade 18 meses, coloração Picrossírius, barra = 100µm. **D** - Fotomicrografia polarizada de músculo vasto lateral distrófico, animal tratado, idade 18 meses, coloração Picrossírius, barra = 100µm.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Animais selecionados do Canil GRMD Brasil / USP para a pesquisa	38
Tabela 2 -	Idade em meses e Peso dos animais no início do experimento (coleta I).....	51
Tabela 3 -	Idade em meses e Peso dos animais ao final do experimento (coleta II).....	51
Tabela 4 -	Avaliação funcional do animal BI1M4 (tratado) com 10 meses - setembro / 2005	53
Tabela 5 -	Avaliação funcional do animal BR3M7 (não tratado) com 13 meses - setembro / 2005	53
Tabela 6 -	Avaliação funcional do animal BR3M5 (tratado) com 13 meses - setembro / 2005	55
Tabela 7 -	Avaliação funcional do animal BR3M2 (não tratado) com 13 meses - setembro / 2005	55
Tabela 8 -	Avaliação funcional do animal CH1M3 (tratado) com 6 meses - setembro / 2005	57
Tabela 9 -	Avaliação funcional do animal CH1M5 (não tratado) com 6 meses - setembro / 2005	57
Tabela 10 -	Valores médios da área de colágeno (em micrômetros quadrados) dos seis animais GRMD na coleta I e II e animal normal.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.2	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO.....	38
3.2.1	Avaliação funcional	39
3.2.2	Amplitude de Movimento Articular (ADM)	41
3.2.3	Biópsia muscular	41
3.3	PROTOCOLO DE TRATAMENTO FISIOTERÁPICO.....	42
3.4	PROTOCOLO HISTOLÓGICO.....	47
3.4.1	Processamento para inclusão em paraplast	47
3.4.2	Procedimento para material congelado	48
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS.....	48
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.	RESULTADOS	51
4.1	AVALIAÇÃO FUNCIONAL.....	52
4.1.1	Avaliação funcional do grupo I	53
4.1.2	Avaliação funcional do grupo II	55
4.1.3	Avaliação funcional do grupo III	57
4.2	AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DE MOVIMENTO ARTICULAR (ADM).....	58
4.2.1	Animais GRMD e normais da raça Golden Retriever	59
4.2.2	Animais GRMD <i>tratados e não tratados</i>	61
4.2.2.1	Articulação do Joelho	62

4.2.2.2	Articulação do Tarso.....	63
4.2.2.3	Articulação do Cotovelo.....	64
4.2.2.4	Articulação do Carpo.....	65
4.3	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FIBRA MUSCULAR	
	ESQUELÉTICA.....	66
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	90

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A doença neuromuscular mais comum, de evolução mais rápida e grave, a Distrofia Muscular de Duchenne, tem origem genética e se manifesta por um defeito no gene da distrofina, proteína responsável, entre outras funções, pela integridade da membrana basal da fibra muscular. O resultado deste defeito é a lesão progressiva das células musculares à medida que são solicitadas durante as contrações musculares para gerar movimento. Por ser de caráter recessivo, ligado ao cromossomo X, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) afeta meninos numa proporção de 1 para cada 3.500 nascidos vivos, sendo que a menina é, em geral, apenas portadora, com 25% de chance de gerar filhos do sexo masculino com a mesma patologia.

Apesar desta patologia ter sido descrita pela primeira vez em 1868 por Duchenne, as famílias portadoras e com filhos afetados continuam sem possibilidade de cura. Os primeiros sintomas costumam se manifestar aos dois anos de idade, porém, somente são percebidos pela família perto dos cinco anos, quando a criança começa a ter dificuldade para correr, subir ou descer escadas e apresentar quedas freqüentes. Esta dificuldade ocorre devido à fraqueza muscular que inicialmente acomete a cintura pélvica e, posteriormente, a cintura escapular. A fraqueza muscular inicial, que impede a realização perfeita da marcha e outras atividades funcionais próprias da idade, como correr, brincar, sentar e levantar, progressivamente leva a criança à cadeira de rodas, por volta dos dez anos e ao óbito, próximo aos vinte anos, devido ao comprometimento da musculatura respiratória.

No Brasil, a dificuldade de acesso da população em geral aos testes diagnósticos necessários, neste caso, o exame de DNA, enzimas séricas e biópsia muscular, tem atrasado o diagnóstico definitivo e impedido que muitos pais, com filhos afetados, evitem o nascimento de outros filhos com a mesma patologia. A partir do diagnóstico definitivo, as crianças devem começar a receber o tratamento de suporte indicado, como fisioterapia motora e respiratória, hidroterapia, suplementação nutricional, corticoterapia.

Porém não existe, até o momento, um tratamento para bloquear ou reverter o processo da DMD. O uso de esteróides ou drogas imunossupressoras tem sido empregado com o objetivo de atrasar a progressão da patologia, mas tem se mostrado incapaz de interromper o curso da doença. O tratamento físico, através do acompanhamento das alterações musculares e esqueléticas que se desenvolvem em associação com a fraqueza muscular, é realizado freqüentemente pela Fisioterapia. O objetivo é prevenir o aparecimento precoce das contraturas e deformidades ósseas, características da patologia, além de retardar a perda da deambulação, responsável pela perda rápida da força muscular e aumento dos encurtamentos musculares e complicações cardio - pulmonares.

Ainda assim, poucos são os estudos que tratam sobre os reais benefícios da fisioterapia nestes indivíduos. A prática de exercícios ou atividade física é controversa, uma vez que o ganho ou manutenção da força muscular, necessário para as atividades funcionais, exige contração da musculatura e, em crianças portadoras de DMD, a ausência da distrofina provoca progressivas lesões nas fibras musculares. Por outro lado, é sabido que a ausência da atividade física leva a uma hipotrofia generalizada devido ao desuso, o que acarreta em perda de força e resistência física necessárias para as atividades do dia-a-dia. Atualmente,

emprega-se a fisioterapia como terapia de manutenção da função músculo-esquelética e respiratória, com escassa comprovação científica de sua influência na evolução da DMD.

A pesquisa da DMD com modelos animais vem sendo realizada em diferentes espécies, com grande quantidade de estudos em camundongos *mdx*, importante fonte de estudo da patogênese e dos efeitos da terapia gênica e transplante celular. Porém, a ausência da distrofina para o modelo *mdx* é menos crítica para sua função muscular, do que para os humanos. O modelo animal que mais se assemelha ao humano em relação à evolução da patologia, dano muscular e níveis de enzimas séricas no sangue, é o cão Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). Além das alterações musculares serem as mais próximas daquelas encontradas em humanos, cães adultos do modelo GRMD apresentam peso corporal relativamente semelhante ao de meninos afetados, o que possibilita um melhor monitoramento da fraqueza muscular da patologia e estratégias de tratamento durante os experimentos.

Esta pesquisa teve como objetivo investigar a influência da Fisioterapia, como coadjuvante no tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne, utilizando um protocolo de atividades físicas direcionadas para as alterações músculo - esqueléticas características da patologia, no modelo GRMD. Buscou-se entender a repercussão do tratamento fisioterápico, muitas vezes, única forma de terapia para crianças portadoras de DMD, através de uma analogia entre as duas espécies.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum, grave e de evolução mais rápida dentre as miopatias hereditárias. Recebe este nome em alusão ao neurologista francês que forneceu a primeira descrição completa da patologia, em 1868 (JORDE, 2004). É uma doença genética, de caráter recessivo ligado ao cromossomo X, associada a um defeito no gene da distrofina, levando à deficiência ou ausência desta proteína na membrana da célula muscular. Isto gera degeneração progressiva da musculatura esquelética (KORNEGAY et al., 1999), podendo acometer a musculatura cardíaca e o sistema nervoso (HARRINSON; BRAUNWALD, 1987).

Embora a função da distrofina ainda esteja sendo estudada, é provável que ela esteja envolvida na manutenção da integridade estrutural do citoesqueleto da célula. A distrofina é uma proteína grande (427 kDa) e responde por cerca de apenas 0.002% da massa protéica da célula muscular estriada. Está localizada na superfície intracelular do sarcolema, em associação a várias glicoproteínas integrais da membrana, formando um complexo glicoproteína-distrofina. (BERNE, 2004). No caso de portadores da DMD, nos quais a distrofina está ausente, as células musculares gradualmente morrem, à medida que são submetidas à tensão pelas contrações musculares (JORDE, 2004).

Acredita-se que, além de sua função mecânica de estabilidade da membrana da fibra muscular, o complexo distrofina – glicoproteína (CDG) esteja envolvido com sinalizações que promovem a sobrevivência celular (MARQUES, 2004).

A incidência da DMD é de um para cada três mil e quinhentos meninos nascidos vivos (BERNE, 2004; JORDE, 2004; STROBER, 2006) e, no Brasil, estima-se que ocorram mais de 400 novos casos por ano desde 1993 (ARAUJO et al., 2004). Ocorre principalmente em pessoas do sexo masculino, sendo que as mulheres são portadoras e desenvolvem a patologia em duas únicas situações: na Síndrome de Turner (XO) e nos casos onde os dois genes herdados forem afetados. Mulheres heterozigotas, portadoras do gene da DMD são normalmente livres da doença, embora 8 a 10% das mesmas apresentem algum grau de fraqueza muscular (ZATZ; FROTA-PESSOA, 1986).

Os primeiros sintomas da patologia percebidos pela família são o atraso no desenvolvimento motor, retardo na aquisição da marcha, dificuldades em descer e subir escadas, tendência a andar na ponta dos pés e quedas freqüentes (ARAUJO et al., 2004). Os mesmos autores relatam que, no Brasil, a idade de percepção dos primeiros sintomas pelos pais é de dois anos e a idade do diagnóstico definitivo, sete. Em outros países, como Reino Unido, Estados Unidos, Áustria, México e Chile, a idade do diagnóstico costuma ser de cinco anos, ou seja, dois anos mais cedo do que o encontrado neste estudo brasileiro e já considerado tarde para estes mesmos países. Isto implica em atraso no início do tratamento destas crianças, uma vez que uma intervenção específica só poderá ser aplicada após o diagnóstico definitivo. O aconselhamento genético aos pais desta criança afetada pela DMD também não poderá ser realizado até que os exames sejam feitos e o diagnóstico confirmado.

As manifestações clínicas e os antecedentes familiares são fundamentais no diagnóstico da DMD, sendo confirmados pelos resultados dos exames realizados (SHEPHERD, 1996). Diamant e Cypel (1996) apontam que para

o diagnóstico das Distrofias Musculares Progressivas são exames essenciais: a biópsia muscular, a eletromiografia (EMG), a dosagem das enzimas séricas, entre elas a creatinoquinase (CPK), e os testes para análise do DNA.

De acordo com Zatz e Frota-Pessoa (1986) o recurso diagnóstico mais eficaz é a determinação da atividade das enzimas musculares creatinoquinase e piruvatoquinase no soro sanguíneo, o que não ocorre em indivíduos normais, uma vez que estas enzimas estão presentes somente nas fibras musculares. Essas enzimas têm uma atividade até cem vezes maior que a normal em portadores de DMD e este aumento se manifesta desde o nascimento, alcançando os maiores valores entre os dois e três anos de idade. Harrinson e Braunwald (1987) apontam que a atividade sérica de creatinoquinase mantém-se alta por muitos anos, até começar a declinar, quando a inatividade e a perda de massa muscular forem acentuadas. A dosagem da creatinoquinase (CPK) é de extrema importância, uma vez que também servirá de indicação no diagnóstico diferencial entre as formas de distrofias musculares progressivas. Na DMD, os autores colocam que os níveis CPK estão aumentados de 100 a 300 vezes na fase pré-clínica.

À análise da estrutura do músculo esquelético a partir da biópsia, observa-se padrão distrófico, ou seja, comum às distrofias musculares progressivas, mostrando hipertrofia e atrofia de fibras, perda da forma poligonal em corte transversal, necrose e regeneração de fibras com deposição de tecido conjuntivo e adiposo. Em algumas distrofias, como as congênitas (DMC) e fascioescapulohumeral (DFEH), o padrão distrófico da fibra muscular não se apresenta em idades precoces. Desta forma, a ausência de alterações distróficas características, nem sempre descarta a existência de uma distrofia muscular (ERAZO-TORRICELLI, 2004).

A coleta de material para biópsia é realizada normalmente nos músculos quadríceps, gastrocnêmio ou deltóide. Observa-se alteração no comprimento da fibra muscular, fibras necrosadas com presença de fagocitose e substituição das fibras por gordura e tecido conjuntivo (CAROMANO, 1999). Strober (2006) relatou que um achado característico da DMD é a degeneração e regeneração crônica na biópsia, além da presença de fibrose endomisial e infiltração de tecido adiposo. Segundo Marques (2004), o músculo esquelético na Distrofia Muscular de Duchenne e Becker, perdem a capacidade de regeneração e as miofibrilas são gradualmente substituídas por tecido adiposo e conjuntivo, o que explica o sinal clínico de pseudohipertrofia seguido de atrofia muscular.

O estudo imuno-histoquímico permite detectar a presença ou ausência de proteínas do sarcolema ou ligadas a esta membrana. Através de *Western blot* pode-se diagnosticar a DMD ao detectar menos de 3% de distrofina no músculo, associada à diminuição de α -sarcoglicanas (ERAZO-TORRICELLI, 2004).

Wang et al. (1999) investigaram trinta pacientes portadores de DMD e notaram que alterações histopatológicas foram observadas em todos os casos estudados, como degeneração, necrose e regeneração de fibras musculares. Em relação às reações imuno-histoquímicas, todos os sujeitos mostraram reação negativa para anticorpos anti-distrofina Dys1-3. Em três dos trinta casos estudados, com quadro clínico severo, foram observadas algumas características diferentes na morfometria, como ausência de diferença no diâmetro das fibras do tipo I e II, e o diâmetro das fibras do tipo I em um dos casos foi menor do que todos os outros trinta, com grande proliferação de tecido conjuntivo e adiposo.

Segundo Cohen (2001), a DMD se manifesta como uma fraqueza muscular de progressão relativamente rápida, que começa antes dos cinco anos de

idade. Os indivíduos afetados evoluem para cadeira de rodas por volta dos quatorze anos e vão a óbito em torno dos trinta anos, em decorrência da fraqueza da musculatura respiratória.

A perda da força muscular é mais evidente nos segmentos proximais que nos distais, afeta os membros inferiores mais que os superiores, e músculos extensores mais que flexores (ARMAND et al., 2005).

No estágio inicial da patologia observa-se, ocasionalmente, queixa de dor muscular durante o exercício, principalmente nas panturrilhas. A fraqueza muscular origina-se nos músculos iliopsoas, glúteos e quadríceps e, logo a seguir, no grupo tibial anterior, tornando a criança incapacitada para correr, subir escadas e levantar-se do chão. O sinal de Gowers ou fenômeno do “levantar miopático” é característico e consiste em levantar-se a partir do chão, apoiando sucessivamente as mãos nos diferentes segmentos dos membros inferiores, de baixo para cima, como se a criança estivesse ascendendo sobre si mesma (DIAMENT; CYPEL, 1996).

Observa-se, ainda, um aumento do volume do tríceps sural acompanhado de fraqueza da cintura pélvica. Esta pseudo - hipertrofia da musculatura é causada pela proliferação anormal do tecido intersticial, em algumas fibras do músculo gastrocnêmio, podendo ser observada em grupos musculares como os masseteres, deltóides, serrátil anterior, quadríceps entre outros (DIAMENT; CYPEL, 1996). Segundo Jorde (2004), o aumento do volume muscular é resultado da infiltração do músculo por tecido adiposo e conjuntivo, e visto com frequência precocemente no curso da doença.

A fraqueza muscular, que afeta diversos grupos musculares, leva à perda da deambulação e, posteriormente, ocorre parada respiratória e morte, geralmente ao final da segunda década de vida (ARAÚJO et al., 2004).

Até o momento não existe um tratamento para bloquear ou reverter o processo da DMD (CAROMANO, 1999; STROBER, 2006). Atualmente, terapias moleculares, celulares e farmacológicas, vêm sendo testadas a fim de diminuir a progressão da patologia, aumentar a massa muscular e manter a integridade da membrana da fibra muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005).

Dubowitz (2005) discutiu os efeitos do uso da prednisona na DMD. Segundo o autor, a terapia à base de corticóide vem sendo testada por diferentes grupos de pesquisa, com algumas sugerindo melhora da força e função muscular de meninos portadores de DMD. Por outro lado, são conhecidos os efeitos colaterais importantes desse medicamento, principalmente o ganho excessivo de peso, o que coloca em dúvida os benefícios do uso da droga por longos períodos.

Em outra pesquisa com 103 meninos, utilizando duas doses diferentes de prednisona, os autores encontraram três efeitos colaterais estatisticamente significantes: crescimento de pêlo, síndrome de Cushing e ganho de peso. Outros efeitos também observados neste grupo foram alterações de comportamento, sintomas gastrointestinais, acne, glicosúria, hematomas e catarata (MENDELL et al., 1999).

Estudo com gêmeos monozigotos, com sete anos e meio de idade, utilizando um inibidor do hormônio do crescimento em dose terapêutica, mostrou progressão importante da patologia na criança tratada com placebo, quando comparada com a que recebeu a droga. Isto sugere que o tratamento com o inibidor

do hormônio do crescimento pode ser benéfico para pacientes portadores de DMD (ZATZ; BETTI; FROTA-PESSOA, 1986).

Strober (2006) relata que a suplementação nutricional vem sendo utilizada na DMD, associada ou não com medicamentos. Em geral, foram testados suplementação por aminoácidos que parecem melhorar a força muscular, porém, quando estes foram associados com prednisona, os estudos mostraram melhores resultados.

A Fisioterapia motora e respiratória é indicada para prevenir complicações, retardar seqüelas da doença e melhorar a qualidade de vida de portadores de distrofia, tanto em relação aos aspectos cardio - respiratórios quanto aos músculo - esqueléticos (ARAUJO et al., 1994; CAROMANO, 1999; EAGLE, 2002).

Outros autores apontam que a restrição da atividade física, da cinesioterapia convencional e, especialmente, a prevenção da fadiga muscular, aparentemente, preservam a capacidade funcional (LEITÃO; DURO; PENQUE, 1995). Brooke et al. (1989) acompanharam 283 meninos com DMD durante dez anos e não encontraram relação entre o desenvolvimento de contraturas articulares e exercícios de alongamento passivo. Entretanto, estes mesmos autores concluem que a suspensão total de atividades físicas poderia levar a problemas psicológicos na criança, bem como atrofia devido ao desuso global da musculatura, propondo um programa de atividades físicas domiciliar, envolvendo ocupação recreativa e escolar, além de exercícios de alongamento muscular.

A eficiência de um programa fisioterápico, em indivíduos portadores de DMD, pode ser verificado contando-se os anos desde o início da deambulação até a perda da mesma e início do uso de cadeiras de rodas (RIDEAU, 1985). Demos

(1983) estudou um grupo de cento e sessenta e três pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne que recebiam tratamento fisioterápico diário e comparou com outro grupo não tratado. Utilizando como parâmetro a idade de início da deambulação até a ida para a cadeira de rodas, ele encontrou uma diferença de três a quatro anos entre o grupo tratado e não tratado, com este último perdendo a capacidade de andar sozinho primeiro.

Rideau (1985) observou diferença de oito meses para outros dois grupos, tratados e não tratados, utilizando o mesmo parâmetro de avaliação. Neste mesmo estudo, a média de idade de óbito do grupo estudado foi de dezoito anos e oito meses para pacientes tratados e vinte anos e dois meses para os não tratados.

Ansved (2003) coloca que a literatura científica, recomenda diferentes programas de exercício para as distrofias musculares, a qual é escassa, mas, aquelas encontradas, sugerem um efeito benéfico da atividade física nestes indivíduos, principalmente naqueles com alterações mínimas da função muscular. É recomendado evitar exercícios com resistência e contração excêntrica da musculatura, porém, segundo o autor, até o presente momento não existe evidências científicas de que o treinamento físico possa influenciar a evolução das distrofias musculares, a longo prazo. Segundo Vignos et al. (1996), em um estudo de cento e quarenta e quatro meninos com idade média de oito anos e nove meses, o uso de órteses para manter o indivíduo na postura bípede, mesmo após a perda da marcha, foi importante para controlar as contraturas musculares e até mesmo prolongar a habilidade de deambulação.

Em um encontro realizado no Reino Unido, em janeiro de 2002, profissionais reuniram-se para definir parâmetros da prática de prescrição de exercícios físicos para as desordens neuromusculares, em relação ao tipo de

exercício, duração e frequência dos mesmos. Os principais objetivos da Fisioterapia, definidos pelo grupo, foram a manutenção ou melhora do alongamento, 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 ílio-tibiais, estímulo da atividade voluntária, através da natação e hidroterapia, e promoção da simetria postural, através de exercícios (EAGLE, 2002).

Childers et al. (2002) sugerem que o maior envolvimento de músculos relacionados com a contração excêntrica nas observações clínicas de pacientes distróficos, pode ser explicado por um ciclo de fraqueza, contração excêntrica, dano na miofibrila, seguida de nova fraqueza. Desta forma, atividades como subir escadas e correr, que sabidamente envolvem contração excêntrica da musculatura, devem ser evitadas durante um programa de fisioterapia para distrofia muscular.

A Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM, 2006) aponta que a fraqueza muscular, que acomete o portador de DMD, leva a uma hipotrofia de certos grupos musculares em diferentes graus, o que altera o equilíbrio destes indivíduos, que passam a utilizar posturas compensatórias. A partir daí, surgem os primeiros encurtamentos e contraturas musculares que resultarão em deformidades ósseas e mais fraqueza muscular. Este ciclo, que se estabelece com o início da evolução da patologia, deve ser trabalhado através de exercícios, orientações e acompanhamento do fisioterapeuta, a fim de que se evite a progressão rápida deste processo. Desta forma, os principais objetivos do tratamento devem ser a manutenção e/ou melhora da força muscular, prevenção de deformidades através da manutenção e/ou ganho da amplitude articular, manutenção da funcionabilidade e

da capacidade vital. Para tanto são sugeridos a cinesioterapia que consiste em exercícios de alongamento muscular, e mobilização global, exercícios passivos, ativo – livre, ativo – assistido, exercícios respiratórios e a hidroterapia.

A hidroterapia foi apontada por Eagle (2002) como sendo de preferência para tratamento de crianças com desordens neuromusculares, porém, existem poucas publicações que apontem seus reais benefícios. A Abdim (2006) coloca que devido às propriedades físicas da água, a movimentação voluntária e adoção das diversas posturas que podem ser facilitadas, torna-se possível a realização de exercícios de alongamento com alívio da dor.

A ausência da proteína distrofina também é encontrada em outras espécies animais, como cães, gatos, ratos, peixes e invertebrados. Ainda que estas espécies apresentem fenótipos diferentes, devido a uma aparente resposta específica da ausência da distrofina em cada uma delas, estes modelos animais vêm sendo estudados na tentativa de se identificar um tratamento eficaz, através da integração dos achados. Segundo Vainzof et al. (2005), estudos realizados nos modelos animais são cruciais para aumentar os conhecimentos a respeito de doenças genéticas humanas e investigação de novas terapias experimentais.

O modelo de laboratório mais comum para a Distrofia Muscular de Duchenne é o *mdx mouse* (COLLINS; MORGAN, 2003), devido à facilidade de manipulação do genoma murino (VAINZOF et al., 2005). Apesar de o *mdx* ser um homólogo desta patologia, o dano e a função muscular são, comparativamente, menos intensos do que em humanos, resultando em um tempo de sobrevivência próximo ao normal. A ausência de distrofina para o *mdx* é menos crítico para a função muscular do camundongo, que para os humanos (COLLINS; MORGAN, 2003). Ainda, esse modelo apresenta um grande número de fibras revertentes, entre

dois e três por cento, que passam a sintetizar novamente, de forma espontânea, a distrofina (VAINZOF et al., 2005).

Segundo Shelton e Engvall (2005), os roedores são importantes fontes de estudo da patogênese e efeitos da manipulação genética e transplante celular, porém, os estudos com caninos e felinos vêm fornecendo dados de maior relevância clínica, uma vez que são modelos para o teste de novas terapias, avaliando os benefícios das mesmas em termos de função.

Um homólogo da DMD é também observado em diferentes raças de cães, como o Golden Retriever, Rottweiler, Pointer, Beagle e, dentre estas raças, o modelo de distrofia muscular no Golden Retriever tem sido o mais estudado (COLLINS; MORGAN, 2003). O modelo GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) apresenta as alterações musculares mais próximas daquelas encontradas nos humanos, além de existir diversas similaridades entre os cães afetados e os meninos portadores de DMD (HOWELL et al., 1997). Entre elas encontramos a atividade aumentada da CPK, atrofia muscular associada à contraturas, necrose muscular, degeneração e mineralização com regeneração concomitante, fibrose do endomísio e perimísio e cardiomiopatias. Assim como em pacientes portadores da DMD, cães jovens freqüentemente morrem devido à parada cardíaca ou respiratória, ainda que muitos sobrevivam e alcancem alguns anos de vida (NGUYEN et al., 2002). Segundo Howell et al. (1997) alguns animais GRMD vivem por mais de seis anos de vida, com outros indo a óbito nos primeiros dias de vida, devido à forma “neonatal fulminante” da doença.

A patogênese do GRMD tem manifestação *in útero* com desenvolvimento de lesões musculares linguais, além de extensas necroses dos músculos dos membros, tronco e pescoço, podendo ser identificadas ao nascimento

(VAINZOF et al., 2005). Nguyen et al. (2002) encontraram os músculos da língua, diafragma, intercostais e musculatura esquelética do tronco grandemente afetados em neonatos GRMD. Valentine e Cooper (1991) já haviam descrito esta seletividade de acometimento muscular ao nascimento, atribuindo à maior atividade destes músculos afetados neste período durante as atividades de respirar, sugar e engatinhar.

Outros autores pesquisaram animais GRMD em quatro diferentes idades: dois, quinze, trinta e sessenta dias de vida e sua relação com o início da degeneração das miofibrilas dos músculos quadríceps e tibial anterior (COZZI et al., 2001). Seus resultados confirmam que as alterações musculares histopatológicas já estão presentes aos dois dias de vida, o que significa que o processo de degeneração tem início antes do nascimento do animal, apesar da extensão do dano variar de um animal para outro. A proliferação de tecido conjuntivo já foi considerada significativa aos quinze dias, muito antes de se completar o processo de maturação muscular. Em cães adultos, eles encontraram níveis baixos de regeneração, enquanto que a necrose e a degeneração permaneceram estáveis.

Em relação ao quadro clínico, Howell et al. (1997) observaram que os filhotes afetados, geralmente, sugam com menos intensidade, são mais fracos do que os não afetados e tendem a ganhar pouco peso. Os sinais mais específicos da patologia como hipotrofia dos membros, geralmente ocorrem entre a sexta e oitava semana de vida. Durante a evolução da patologia, os membros posteriores são primeiramente afetados do que os anteriores; desta forma, à medida que o animal caminha ou corre, os membros posteriores avançam simultaneamente como “salto de coelho”. Durante o primeiro ano de vida a marcha destes animais se torna cada vez mais difícil e com maior gasto de energia. Observa-se hiperextensão do carpo,

tarso e abdução dos membros, além de hipertrofia da língua e atrofia da musculatura temporal, o que leva à dificuldade na deglutição em alguns cães.

Estratégias de tratamento têm sido estudadas no modelo GRMD devido ao peso de cachorros adultos serem semelhantes ao dos meninos portadores de DMD, apresentando, assim, quantidade de tecido muscular equivalente, o que possibilita o monitoramento da fraqueza muscular, característica da patologia, durante a pesquisa com terapia gênica (HOWELL et al., 1997). Collin e Morgan (2003) relatam que o número de terapias já investigadas, tanto no modelo animal como em humanos, é escasso. A transferência de mioblastos mostrou resultados negativos no modelo GRMD, e a transfecção gênica vem sendo avaliada em cães, a fim de se estabelecer protocolos para a aplicação em humanos.

Estudos com células-tronco procuram levar ao músculo distrófico células musculares normais, com objetivo de que estas novas células se fundam com as distróficas melhorando as alterações patológicas e a função muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005). Experimentações com terapia gênica no modelo mdx com o vetor *rAAV/microdystrophin*, mostraram redução na degeneração das miofibrilas e aumento da resistência muscular, sem aumentar a massa e a força muscular dos animais. Injeções musculares com o vetor *rAAV/mIgfb1* aumentaram a massa muscular, mas não foram capazes de proteger a fibra muscular do processo de degeneração (ABMAYR et al., 2005).

A intervenção fisioterapêutica como estratégia de tratamento, utilizando o modelo experimental GRMD, ainda não foi relatada na literatura nos modelos animais e, em humanos portadores de DMD, os trabalhos são controversos em indicar ou não a prática de exercícios físicos e seu papel na evolução da patologia. Observa-se que, de maneira geral, atividades recreativas ou de realização das

atividades de vida diárias, pelos portadores, são geralmente indicadas, porém poucos são os estudos que avaliam seus reais benefícios ou malefícios (TOPIN et al., 2002; UCHIKAWA et al., 2004; VIGNOS, 1983; VIGNOS et al., 1996).

Torna-se necessário que novos estudos em modelos animais sejam realizados para investigar a eficácia ou não da fisioterapia direcionada para as alterações já descritas, que ocorrem com a evolução da Distrofia Muscular de Duchenne, a fim de que esta terapia possa servir de coadjuvante e novos avanços ocorram no tratamento desta patologia.

3 Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O plantel do Canil GRMD – Brasil, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia – Setor de Anatomia, possui dez animais portadores de distrofia muscular homóloga à Distrofia Muscular de Duchenne encontrada em humanos, entre seis e trinta e quatro meses, destinados a terapias para a Distrofia Muscular. Dez fêmeas portadoras, com idades entre dezoito e quarenta e três meses consideradas reprodutoras, além de um macho normal de, aproximadamente, setenta e dois meses utilizado estritamente para acasalamento.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para esta pesquisa foram selecionados seis animais machos e distróficos, do grupo do Canil GRMD / USP. A confirmação da patologia foi realizada pela análise do DNA de leucócitos, realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano – IB / USP. Os critérios de inclusão na pesquisa foram idade, parentesco, proximidade de características clínicas entre os animais selecionados e a estabilidade dos parâmetros clínicos.

Os animais 1 e 2 eram de ninhadas diferentes, mas com datas de nascimentos próximas, além de semelhanças de porte, peso e características clínicas. Os animais do grupo II eram de mesma ninhada, assim como os animais 5 e 6 (grupo III) (Tabela 1).

Para fins de avaliação e comparação dos dados obtidos, os animais foram subdivididos em três grupos de dois animais. Em cada um dos grupos, um

animal manteve sua rotina diária sem modificações junto ao grupo do Canil GRMD e o outro participou do programa de fisioterapia elaborado para esta pesquisa.

A sigla de cada um dos animais corresponde à sua tatuagem de identificação: as duas primeiras letras se referem ao nome da mãe, o primeiro número designa a ninhada da mãe, M designa o sexo do animal (masculino), e o segundo número, a ordem de nascimento dos filhotes.

Tabela 1 - Animais selecionados do Canil GRMD Brasil / USP para a pesquisa

Grupos	Animais	Data nascimento	Peso
I	Animal 1 (BI1M4)	14/11/2004	18,5 kg
	Animal 2 (BR3M7)	23/07/2004	13,5 kg
II	Animal 3 (BR3M5)	23/07/2004	21,2 kg
	Animal 4 (BR3M2)	23/07/2004	22 kg
III	Animal 5 (CH1M3)	24/02/2005	18 kg
	Animal 6 (CH1M5)	24/02/2005	20 kg

Fonte: Pesquisa de campo / 2005

3.2 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Os animais GRMD selecionados para a pesquisa foram avaliados no início da pesquisa (setembro / 2005) e após seis meses (março / 2006), com avaliações que buscaram levantar dados a respeito do desempenho funcional do animal, amplitude de movimento articular (ADM), a fim de acompanhar a evolução da patologia através dos encurtamentos musculares e contraturas articulares, e análise histopatológica da musculatura esquelética, com a quantificação da área de fibras colágenas em relação à área total de tecido muscular.

3.2.1 Avaliação funcional

A fim de verificar a situação funcional dos seis animais no início da pesquisa, os mesmos foram submetidos a uma avaliação que teve como objetivo abordar o desempenho durante a realização de suas atividades diárias. Os animais receberam a pontuação “sem dificuldade”, “pouca dificuldade”, “muita dificuldade” ou “não realiza” durante a execução das tarefas de *deglutição, caminhada, subir rampas e escadas, apoio pélvico e postura quadrúpede*, como descrito na ficha de avaliação abaixo. Os animais foram avaliados no início da pesquisa (setembro / 2005) e após os seis meses (março/2006).

MODELO DE FICHA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Data da avaliação: _____ Tatuagem: _____
 Nome do animal: _____ Pai: _____ Mãe: _____
 Idade (em meses): _____ Data do nascimento: _____
 Tipo de parto: _____ Sucção ao nascer: _____

ATIVIDADES FUNCIONAIS

1) Deglutição

- ☐ Sem dificuldade. Capaz de deglutir sólidos sem regurgitação ou engasgos.
- ☐ Pouca dificuldade. Capaz de deglutir alimentos pastosos sem regurgitação ou engasgos.
- ☐ Muita dificuldade. Alimenta-se de comida pastosa com regurgitação ou engasgos.
- ☐ Não realiza. Incapaz de deglutir alimentos pastosos, necessita alimentação por sonda ou solução intravenosa.

2) Postura quadrúpede

- ☐ Sem dificuldade. Apoio nos quatro membros, sem alterações aparentes.
- ☐ Pouca dificuldade. Apoio nos quatro membros com base alargada dos membros pélvicos.
- ☐ Muita dificuldade. Mantém a postura quadrúpede quando colocado, porém não assume sozinho.

- ☐ Não realiza. Incapaz de sair da postura deitada e passar para quadrúpede.

3) Caminhada

- ☐ Sem dificuldade. Marcha normal, sem alterações aparentes.
- ☐ Pouca dificuldade. Marcha com a base alargada dos membros pélvicos, com dissociação pélvica.
- ☐ Muita dificuldade. Marcha com a base alargada dos membros pélvicos e “joelhos” em extensão, sem dissociação pélvica.
- ☐ Não realiza. Incapaz de realizar a marcha.

4) Apoio Pélvico

- ☐ Sem dificuldade. Capaz de se apoiar somente nos membros pélvicos e permanecer por alguns segundos.
- ☐ Pouca dificuldade. Capaz de se apoiar nos membros pélvicos sem se manter na postura.
- ☐ Muita dificuldade. Esboça o movimento, sem sucesso.
- ☐ Não realiza. Incapaz de realizar o movimento.

5) Subir e descer rampas

- ☐ Sem dificuldade. Sobe e desce uma rampa de 1 m, sem alterações aparentes.
- ☐ Pouca dificuldade. Sobe a rampa com lentidão e desce com a base alargada dos quatro membros.
- ☐ Muita dificuldade. Sobe a rampa com lentidão, porém é incapaz de descer.
- ☐ Não realiza. Incapaz de subir a rampa.

Sinais de fadiga durante a realização do teste: _____

Aspecto geral (trofismo): _____

3.2.2 Avaliação da Amplitude de Movimento Articular (ADM)

A amplitude das articulações do cotovelo, carpo, joelho e tarso para o movimento de flexo – extensão dos seis cães foram avaliados através de goniometria e comparados com os dados de normalidade para os cães de mesma raça, a fim de acompanharmos a evolução e instalação das deformidades nos cães afetados do grupo não tratado e do grupo que recebeu fisioterapia. Os dados foram coletados com um goniômetro universal médio da marca ISP (Figura 1A), antes do início do programa de exercícios e ao final do mesmo, seis meses depois. Durante a coleta, os cães não receberam qualquer tipo de sedação para evitar que fossem mascarados sinais fisiológicos de dor ao estiramento excessivo das massas musculares e articulações. Foram posicionados em decúbito lateral, confortavelmente, e a amplitude do movimento articular medida a partir do ponto de flexão máxima da articulação avaliada, até a extensão máxima, através da movimentação passiva e lenta da articulação pelo avaliador.

A terminologia anatômica utilizada seguiu a Nomina Anatômica Veterinária (NAV, 2005).

3.2.3 Biópsia muscular

A biópsia foi coletada do ventre do músculo vasto lateral ou bíceps femoral do membro pélvico esquerdo de cada um dos cães, antes e após a intervenção fisioterapêutica (seis meses de intervalo), para podermos avaliar a evolução da patologia na morfologia da fibra muscular na presença da cinesioterapia

em cães distróficos e no grupo controle. Foi realizado biópsia do tipo aberta e retirado um fragmento de 1 cm² (Figura 1B). 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 7 dias.

3.3 PROTOCOLO DE TRATAMENTO FISIOTERÁPICO

Após a primeira avaliação nos cães, utilizando os três protocolos listados acima, o grupo tratado foi submetido ao tratamento fisioterápico elaborado para a pesquisa e descrito abaixo. Os parâmetros de frequência, duração e modalidade do exercício terapêutico foram selecionados, levando-se em consideração o que vem sendo preconizado para o tratamento fisioterápico de

¹ Acepran. Lab Univet S/A. Rua Clímaco 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.

pacientes portadores de DMD, após levantamento bibliográfico (ANSVED, 2003; CHILDERS et al., 2002; DEMOS, 1983; EAGLE, 2002; LEITÃO; DURO; PENQUE, 1995; RIDEAU, 1985; ROOKE et al., 1989) e pesquisa de campo (ABDIM, 2006). As sessões de Fisioterapia tiveram frequência de três vezes semanais, com quarenta e cinco minutos de duração para cada animal durante seis meses. Os objetivos do programa fisioterapêutico foram manter a amplitude de movimento articular e a flexibilidade muscular, manutenção das atividades funcionais dos animais afetados, bem como prevenir complicações cardiopulmonares e musculoesqueléticas.

Para atingir os objetivos traçados, uma área de 30 metros de comprimento por 5 metros de largura foi organizada para que os animais percorressem o espaço, enquanto realizavam as atividades propostas. A partir do ponto de partida (ponto 0), os cães foram treinados a ultrapassar o obstáculo de n. 1, onde era preciso que se realizasse uma flexão de cabeça, tronco e membros (Figura 2A). Continuando a percorrer o trajeto livremente, os mesmos ultrapassavam os obstáculos de número 2 e 3, onde eram treinados a saltar sobre a corrente que se encontrava a 10 e 20 cm do chão, respectivamente (Figura 2B). Os animais percorreram dois tipos de terrenos diferentes dentro do mesmo espaço, o cimento e a grama (Figura 3A e B). Durante a marcha livre, os cães eram chamados a passar de um nível de terreno a outro, descendo 30 cm e depois subindo para voltar à pista (Figura 3C). Os cães foram treinados a caminhar entre três cones arranjados como balisa, a fim de trabalhar a flexibilidade lateral do tronco (Figura 3D).

Cada sessão de fisioterapia tinha início no ponto 0 com os animais caminhando livremente e percorrendo os obstáculos dispostos pela pista. Considerou-se UMA VOLTA COMPLETA, a saída do ponto zero, o percorrer de todo o trajeto e voltar ao ponto zero, completando 60 metros em cada volta. Os animais

foram treinados a percorrer 300 metros de pista ou 5 voltas completas em cada sessão. Ao final dos 300 metros, os cães permaneciam em decúbito lateral para descanso e, em seguida, era realizada a mobilização passiva de tronco, membros pélvicos e torácicos. Foram respeitados sinais de fadiga, que apareceram durante a realização da caminhada, podendo o animal descansar entre uma volta e outra, caso demonstrasse necessidade.

Figura 1 - **A** – Fotografia de goniômetro universal da marca ISP utilizado nas avaliações de Amplitude de Movimento Articular; **B** – Fotografia de biópsia aberta para coleta de fragmento do músculo vasto lateral pré e pós fisioterapia

Figura 2 - **A** – Fotografia de obstáculo n.1: Animal realiza flexão de cabeça, tronco e membros; **B** – Fotografia de obstáculo n. 2: Ultrapassagem de obstáculo a 10 cm e 20 cm do solo, com movimentação ativa dos membros torácicos e pélvicos

Figura 3 - Fotografia de tipos de terrenos percorridos durante o trajeto da Fisioterapia: **A** – Grama; **B** – Cimento; **C** – Fotografia de animal sendo estimulado a passar de um nível de terreno a outro; **D** – Fotografia de balisa para trabalhar a flexibilidade da musculatura lateral do tronco

3.4 PROTOCOLO HISTOLÓGICO

Doze fragmentos musculares coletados a partir de biópsia aberta (seis referentes da coleta I e outros seis da coleta II) foram incluídos em Paraplast, corados com Hematoxilina e Eosina, para análise estrutural da fibra muscular. Outros doze fragmentos dos mesmos músculos e mesma coleta foram congelados para corte em criostato, coloração com Picrossírius, para quantificação do colágeno entre as fibras musculares.

3.4.1 Processamento para inclusão em Paraplast

Doze fragmentos de músculo esquelético foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%, tratados em série crescente 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 cortes de 5µm para obtenção das lâminas foram desparafinizados em estufa a 60°C por 2 horas, e coradas com Hematoxilina e Eosina para análise estrutural e das características histopatológicas do músculo distrófico. As mesmas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, e capturadas, utilizando-se o software Zeiss® KS 400.

3.4.2 Procedimento para material congelado

Após a coleta dos doze fragmentos musculares, os mesmos foram pulverizados com talco, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a 80°C negativos. Cada fragmento foi fixado em stub de metal com TissueTek® e realizados cortes transversais seriados em Criostato Leica CM 1850 a 20°C negativos com espessura de 6 a 8 μm em lâminas de vidro, previamente silanizadas com 3-aminopropiltrietoxi-silano (APES). Os cortes foram fixados em Solução de Bouin por 20 minutos e corados com Picrossírius para diferenciar o colágeno do músculo estriado.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO

Os seis animais GRMD tiveram três lâminas selecionadas, de cada uma das coletas, I e II, previamente coradas com Picrossírius, para a quantificação do colágeno. Um animal normal, macho, adulto, teve três lâminas avaliadas, também coradas com picrossírius para controle dos animais distróficos. Com auxílio de um microscópio óptico Axioscópico Zess® com uma câmera Olympus BX 60 acoplada, foram medidos 30 campos por coleta de cada animal, em objetiva de 20x, sendo que cada campo media 603.126 μm^2 . A imagem de cada campo foi digitalizada e tratada com luz polarizada, de forma a contrastar o colágeno da coloração de fundo por limiar de cor. Após a separação, a imagem foi binarizada e a proporção volumétrica ocupada pelas fibras colágenas em cada imagem, medida e analisada por um programa de morfometria específico do software Zeiss® KS 400.

A quantidade de colágeno presente em cada campo foi medida em unidades de área (μm^2). O valor obtido nos trinta campos das duas coletas de cada um dos animais foi somado e encontrado a média e o desvio padrão de cada animal. Este valor foi designado como *área média de colágeno por animal* (AMCA). Como o valor da *área do campo por animal* (ACPA) foi constante, os valores de cada animal foram convertidos em porcentagem pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{AMCA}}{\text{ACPA}} \times 100$$

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença entre as médias encontradas para os valores da Amplitude de Movimento Articular dos animais normais, animais distróficos do grupo tratado e não tratado, foi calculada através do teste *t de Student*.

A média (μm^2) encontrada para cada um dos animais, em relação à área de colágeno, foi primeiramente comparada com a média do grupo. Os valores do animal BR3M2 mostraram-se estatisticamente fora da média do grupo de animais distróficos, sendo excluídos da análise do grupo não tratado em relação ao colágeno.

Foram analisadas as diferenças entre as médias da área de colágeno do animal normal, grupo tratado e não tratado através do teste *t de Student*. Estabeleceu-se grau de confiança de 95% e os valores, considerados estatisticamente diferentes para *p value* < 0.05.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Após aplicação dos protocolos de avaliação das atividades funcionais, amplitude de movimento articular e biópsia muscular nos seis animais, os três cães pertencentes ao grupo tratado foram submetidos ao programa de Fisioterapia descrito no protocolo de tratamento fisioterápico (item 3.4) durante seis meses. Após este período, todos os animais foram reavaliados utilizando-se os mesmos protocolos. A idade e peso dos animais no início e final do experimento estão listados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Idade em meses e Peso dos animais no início do experimento (coleta I)

Grupos	Animais	Idade	Peso
I	Animal 1 (BI1M4)	10 meses	18,5 kg
	Animal 2 (BR3M7)	13 meses	13,5 kg
II	Animal 3 (BR3M5)	13 meses	21,2 kg
	Animal 4 (BR3M2)	13 meses	22 kg
III	Animal 5 (CH1M3)	6 meses	18 kg
	Animal 6 (CH1M5)	6 meses	20 kg

Fonte: Pesquisa de campo / 2005

Tabela 3 – Idade em meses e Peso dos animais ao final do experimento (coleta II)

Grupos	Animais	Idade	Peso
I	Animal 1 (BI1M4)	17 meses	17,2 kg
	Animal 2 (BR3M7)	20 meses	13,8 kg
II	Animal 3 (BR3M5)	20 meses	18,1 kg
	Animal 4 (BR3M2)	20 meses	22,7 kg
III	Animal 5 (CH1M3)	12 meses	20 kg
	Animal 6 (CH1M5)	12 meses	22,9 kg

Fonte: Pesquisa de campo / 2006

Os dados foram descritos separadamente em relação a cada uma das avaliações: Avaliação funcional, Avaliação da Amplitude de Movimento e Avaliação Histológica.

4.1 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

A avaliação das atividades funcionais foi coletada de setembro de 2005 a março de 2006, mensalmente com data estipulada entre o primeiro e quinto dia do mês, seguindo o protocolo estabelecido. Abaixo estão descritos dois momentos da Avaliação funcional: antes do programa de exercícios (setembro de 2005) e após seis meses de Fisioterapia (março de 2006). Cada grupo de animais (I, II e III) foi descrito separadamente com seus respectivos graus de dificuldades para realizar cada uma das tarefas avaliadas (Tabelas 4 a 9).

Os seis animais avaliados apresentaram sucção fraca ao nascer, necessitando sondagem naso - gástrica para administração de sucedâneo de leite. Todos os partos foram do tipo normal, sem intercorrências.

4.1.1 Avaliação Funcional do Grupo I

Tabela 4 - Avaliação funcional do animal B11M4 (tratado) com 10 meses - setembro / 2005

	Sem dificuldade	Pouca dificuldade	Muita dificuldade	Não realiza
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada		X		
Apoio pélvico			X	
Subir e descer rampas		X		
Animal B11M4 (tratado) com 17 meses – março / 2006				
Deglutição			X	
Postura quadrúpede		X		
Caminhada			X	
Apoio pélvico			X	
Subir e descer rampas		X		

Fonte: Pesquisa de Campo / 2005 e 2006

Tabela 5 - Avaliação funcional do animal BR3M7 (não tratado) com 13 meses – setembro / 2005

	Sem dificuldade	Pouca dificuldade	Muita dificuldade	Não realiza
Deglutição			X	
Postura quadrúpede		X		
Caminhada			X	
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas		X		
Animal BR3M7 (não tratado) com 20 meses – março / 2006				
Deglutição			X	
Postura quadrúpede		X		
Caminhada			X	
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas		X		

Fonte: Pesquisa de Campo / 2005 e 2006

O animal B11M4 (experimental) do grupo I apresentou aumento na dificuldade em realizar as atividades de deglutição e caminhar. Em seis meses, passou a ter “muita dificuldade” em deglutir alimentos pastosos, sendo necessário que o animal começasse a se alimentar em plano inclinado para evitar a perda de peso, comum neste estágio da doença em nosso grupo de animais. A deambulação que já acontecia com os membros pélvicos em base alargada na primeira avaliação (animal com 10 meses), passou a ser realizada em postura fixa da articulação do joelho para a marcha, aos 18 meses para compensar a fraqueza da musculatura proximal de cintura pélvica. O seu controle, animal BR3M7, com 13 meses na avaliação inicial, já apresentava, “muita dificuldade” para estas duas atividades e manteve suas características durante o período de seis meses.

4.1.2 Avaliação Funcional do Grupo II

Tabela 6 - Avaliação funcional do animal BR3M5 (tratado) com 13 meses – setembro / 2005

	Sem dificuldade	Pouca dificuldade	Muita dificuldade	Não realiza
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada		X		
Apoio pélvico	X			
Subir e descer rampas	X			
Animal BR3M5 (tratado) com 20 meses – março / 2006				
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada		X		
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas		X		

Fonte: Pesquisa de Campo / 2005 e 2006

Tabela 7 - Avaliação funcional do animal BR3M2 (não tratado) com 13 meses – setembro / 2005

	Sem dificuldade	Pouca dificuldade	Muita dificuldade	Não realiza
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada		X		
Apoio pélvico	X			
Subir e descer rampas	X			
Animal BR3M2 (não tratado) com 20 meses – março / 2006				
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada			X	
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas		X		

Fonte: Pesquisa de Campo / 2005 e 2006

Os dois animais deste grupo, BR3M5 (tratado) e BR3M2 (não tratado) eram de mesma ninhada e apresentavam, na primeira avaliação funcional, 13 meses. Diferente do animal BR3M7 (grupo I – 13 meses) que manteve seu quadro funcional entre os 13 e 20 meses, os animais do grupo II apresentaram aumento do grau de dificuldade em realizar as tarefas de *Apoio pélvico* e *Subir e descer rampas*. Aos 13 meses os dois animais realizavam sem dificuldade aparente estas duas tarefas e passaram a se manter nos membros pélvicos somente com apoio dos torácicos em alguma superfície ou se manter na postura por poucos segundos. Passaram a subir a rampa com mais lentidão e descer com a base alargada, mostrando requerer mais esforço para realizar esta atividade.

O animal controle, BR3M2, apresentou “muita dificuldade” no item *Caminhar*, o que significa que entre 13 e 20 meses ele passou de uma marcha com a base alargada do membro pélvico, o que já sugere uma fraqueza da musculatura proximal (cintura pélvica) para marcha associando a base alargada com contratura da articulação do joelho. Esta situação não se repete no animal experimental BR3M5, que pode ter sofrido influência positiva da mobilização passiva e exercícios ativo-livres utilizando esta articulação.

4.1.3 Avaliação Funcional do Grupo III

Tabela 8 - Avaliação funcional do animal CH1M3 (tratado) com 6 meses – setembro / 2005

	Sem dificuldade	Pouca dificuldade	Muita dificuldade	Não realiza
Deglutição	X			
Postura quadrúpede	X			
Caminhada	X			
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas	X			
Animal CH1M3 (tratado) com 12 meses – março / 2006				
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada		X		
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas		X		

Fonte: Pesquisa de Campo / 2005 e 2006

Tabela 9 - Avaliação funcional do animal CH1M5 (não tratado) com 6 meses – setembro / 2005

	Sem dificuldade	Pouca dificuldade	Muita dificuldade	Não realiza
Deglutição	X			
Postura quadrúpede	X			
Caminhada	X			
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas	X			
Animal CH1M5 (não tratado) com 12 meses – março / 2006				
Deglutição		X		
Postura quadrúpede		X		
Caminhada		X		
Apoio pélvico		X		
Subir e descer rampas		X		

Fonte: Pesquisa de Campo / 2005 e 2006

Os animais CH1M3 (tratado) e CH1M5 (não tratado) apresentaram perda funcional em cinco das seis atividades avaliadas. Aos seis meses de idade, primeira avaliação, os dois não mostravam dificuldades em realizar suas atividades diárias, exceto o *Apoio pélvico*, que requer sobrecarga de força muscular nos membros pélvicos no momento, em que os membros torácicos ficam livres do solo. Após seis meses, passaram a apresentar engasgos ou regurgitações na ingestão de alimentos sólidos, sendo necessária a transição para a forma pastosa. A *postura quadrúpede* e a *caminhada* tiveram sua base alargada, o que sugere fraqueza da musculatura proximal do membro pélvico, característico da patologia. Observou-se lentidão na execução do *subir e descer rampa*, o que não foi observado seis meses antes, refletindo uma diminuição da força muscular global, uma vez que o plano inclinado solicita maior força.

4.2 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DE MOVIMENTO ARTICULAR (ADM)

Foram descritos os valores em graus da Amplitude de Movimento máxima de flexo-extensão das articulações do cotovelo, joelho, carpo e tarso dos seis animais GRMD no início do experimento e após os seis meses de Fisioterapia, e os valores da média das mesmas articulações de animais normais da raça Golden Retriever.

4.2.1 Animais GRMD e normais da raça Golden Retriever

Os valores obtidos da avaliação da ADM dos seis animais distróficos no início da pesquisa foram comparados, primeiramente, com a média dos valores da ADM de quatorze cães normais da raça Golden Retriever. A média de idade dos animais normais avaliados foi de 17 meses e o peso médio de $25,53 \pm 2,39$. Os valores obtidos da avaliação da articulação do joelho, tarso e carpo, de animais distróficos ($10,16$ meses $\pm 3,43$ e média de peso $18,86 \pm 3,04$ kg), foi significativamente diferente quando comparados à média da mesma articulação dos animais normais ($p < 0.05$) (Figura 4, 5 e 6).

Não foi encontrada diferença significativa entre as médias da articulação do cotovelo do grupo distrófico ($120^\circ \pm 9,48$) quando comparado com os animais do grupo normal da mesma raça ($119,82^\circ \pm 8,65$) ($p < 0.05$).

Figura 4 - Valores da ADM da articulação do joelho de animais normais da raça Golden Retriever e GRMD

Figura 5 - Valores da ADM do Tarso de animais normais da raça Golden Retriever e GRMD

A diminuição estatisticamente significativa das médias da amplitude de tarso e articulação do joelho dos animais GRMD comparado com animais normais da mesma raça ($p < 0.05$), sugere uma limitação de movimento causada por encurtamento muscular devido ao acúmulo de tecido conjuntivo característico da patologia.

Figura 6 - Valores da ADM do Carpo de animais normais da raça Golden Retriever e GRMD

Ao analisar a média dos valores dos dois grupos, observa-se Amplitudes de Movimento aumentados para as articulações do carpo para os animais GRMD quando comparado com animais normais, o que sugere hiperextensão desta articulação neste grupo de animais distróficos.

4.2.2 Animais GRMD tratados e não tratados

A média dos valores de ADM das quatro articulações avaliadas do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia (coleta II – março / 2006) foram comparadas com os valores da ADM do mesmo grupo na primeira coleta (setembro / 2005) (Figura 7 a 10).

4.2.2.1 Articulação do Joelho

Figura 7 - Média da ADM da articulação do Joelho na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia

Nesta articulação, a média dos valores da coleta II para os dois grupos, tratados e não tratados, se manteve em relação à média dos valores da coleta I ($p < 0.05$). Em seis meses, tanto o grupo que recebeu a Fisioterapia como o que serviu de controle, mantiveram a amplitude de movimento da articulação do joelho.

4.2.2.2 Articulação do Tarso

Figura 8 - Média da ADM da articulação do Tarso na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia

A média dos valores da articulação do Tarso na coleta II para o grupo *não tratados* se manteve em relação à média dos valores da coleta I. O grupo *tratado* mostrou aumento significativo da média na coleta II em relação à coleta I ($p < 0.05$). Desta forma, o grupo que recebeu Fisioterapia mostrou ganho da ADM nesta articulação. Já o grupo não tratado, manteve o encurtamento avaliado e comparado com os animais normais de mesma raça.

4.2.2.3 Articulação do Cotovelo

Figura 9 - Média da ADM da articulação do Cotovelo na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia

Analisando os valores da ADM da articulação do cotovelo, não houve diferença significativa entre as médias na coleta II comparadas com a coleta I para os dois grupos, tratado e não tratado ($p < 0.05$). A articulação não sofreu influência da evolução da distrofia no período estudado neste grupo de animais, com idades entre 6 e 20 meses.

4.2.2.4 Articulação do Carpo

Figura 10 - Média da ADM da articulação do Carpo na coleta I e II do grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia

Na avaliação da articulação do Carpo, o grupo tratado pela Fisioterapia manteve a média dos valores na coleta I e II. O grupo não tratado apresentou diminuição significativa das médias da amplitude de movimento da coleta I para o coleta II ($p < 0.05$). A manutenção dos valores no grupo tratado e diminuição no grupo não tratado interferiu positivamente, em relação do processo fisioterápico no curso da patologia.

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA

Os valores obtidos após a mensuração da área do colágeno nos cortes microscópicos da musculatura esquelética dos seis animais GRMD e um animal normal, utilizado para controle, foram descritos em forma de porcentagem em relação à medida do campo total.

O animal normal utilizado como controle da amostra de animais GRMD apresentou 1,69% de fibras colágenas (Figura 11B), o que foi significativamente menor que a média de $5,7\% \pm 0,325$ encontrada para os seis animais distróficos no início da pesquisa (coleta I) ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa entre os grupos, *tratado* ($5,37\% \pm 1,77$) e *não tratado* ($5,84\% \pm 3,52$) no início da pesquisa (coleta I) ($p < 0.05$).

Tanto o grupo *tratado* como o grupo *não tratado*, aumentaram a deposição de colágeno no músculo vasto lateral ou bíceps femoral no período de seis meses, intervalo entre a coleta I e II. Porém, estatisticamente, o valor da coleta I ($5,84\% \pm 3,52$) e II ($9,05 \pm 1,40$) (Figura 11C) para o grupo *não tratado* se manteve, havendo aumento significativo da área de colágeno nestes grupos musculares para os animais do grupo *tratado* pela Fisioterapia (coleta I: $5,37\% \pm 1,77$; coleta II: $5,99 \pm 1,71$) ($p < 0.05$) (Figura 11D). Os valores do animal normal, animais do grupo *tratado* e *não tratado* na coleta I e II estão descritos em micrômetros quadrados (μm^2) na tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios da área de colágeno (em micrômetros quadrados) dos seis animais GRMD na coleta I e II e animal normal

Grupo tratado			
	BI1M4	BR3M5	CH1M3
Coleta I	44.368,37 ± 100.701,1	29.347,93 ± 8.985,6	23.604,62 ± 5.572,57
Coleta II	47.713,86 ± 12.335,67	32.782,16 ± 4.884,08	27.844,74 ± 8.450,89
Grupo não tratado			
	BR3M7	BR3M2	CH1M5
Coleta I	50.237,4 ± 1.853,76	83.706,1 ± 4.028,91	20.207,2 ± 4.204,28
Coleta II	60.600,35 ± 9.360,08	65.666,92 ± 3.205,73	48.612,44 ± 22.880,07
Animal normal: 10.164,04 ± 4.587,16			

Fonte: Pesquisa de Campo / 2006

Figura 11 - **A** - Fotomicrografia do músculo vasto lateral esquerdo, animal distrófico, idade 18 meses. Tecido conjuntivo fibroso perimisial (→) e endomisial (*), coloração HE, barra = 100μm. **B** – Fotomicrografia polarizada de músculo esquelético adulto, não distrófico, coloração Picrosirius, barra = 100 μm. **C**- Fotomicrografia polarizada de músculo vasto lateral distrófico, animal não tratado, idade 18 meses, coloração Picrosirius, barra = 100μm. **D** – Fotomicrografia polarizada de músculo vasto lateral distrófico, animal tratado, idade 18 meses, coloração Picrosirius, barra = 100μm.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Observando os resultados encontrados neste grupo de animais GRMD, nota-se que cães de mesma ninhada, mesmo grupo e com hábitos semelhantes, apresentam fenótipos diferentes entre si e, em cada animal, as características da patologia evoluem em ritmos distintos. Essa diferença fenotípica é comumente observada em meninos portadores de uma doença genética homóloga a dos animais GRMD, a Distrofia Muscular de Duchenne e, um dos fatores que dificultam a elucidação de perguntas e tentativas de tratamento nestas crianças.

Vainzof e Zatz (2003) relataram que estudos moleculares em indivíduos com distrofias musculares, têm apresentado variabilidade clínica inter e intra-familiar em diferentes desordens genéticas, levantando a importância de outros fatores, que não os genéticos, na determinação da expressão fenotípica.

A variabilidade fenotípica à quantidade de proteína distrofina no complexo glicoproteína-distrofina (CDG), e local da deleção do gene, apontando características variáveis associadas à DMD, como a deficiência mental, a intolerância ao exercício, formas intermediárias entre Becker e Duchenne, aumento da creatinoquinase sem alterações clínicas, entre outras. (MUNAIN; URTIZBEREA, 1998).

Apesar das particularidades, percebe-se que, de maneira geral, as características da DMD apontadas na literatura puderam ser observadas neste grupo de animais estudados. Em neonatos, foi observada fraqueza ao sugar, como já descrito por Howell et al. (1997). Nas primeiras semanas de vida, ao iniciar as atividades de engatinhar e explorar o ambiente observa-se que os filhotes distróficos apresentaram, com frequência, dificuldade em sustentar o peso do corpo sobre os

membros pélvicos e torácicos, além de ficarem limitados ao espaço, não sendo capazes de subir pequenos degraus. Dificuldade na deglutição de alimentos sólidos e líquidos, alterações no padrão de marcha, da postura quadrúpede, lentidão nas mudanças de postura e fraqueza muscular foram observados neste grupo em diferentes graus para cada um dos animais.

Devido a esta variabilidade e à presença de características comuns aos animais, foi utilizada a Ficha de Avaliação Funcional no início da pesquisa para levantar dados a respeito do desempenho de funções básicas da rotina do animal e, acompanhar a evolução da patologia durante os seis meses da pesquisa.

Protocolos de avaliação funcional estão descritos na literatura e são utilizados com frequência como parâmetros de avaliação na reabilitação de humanos portadores de doenças neurológicas, genéticas e traumáticas (CARRILLO, 1994; GARCIA, 1994). Na reabilitação das doenças neuromusculares algumas escalas são utilizadas, como o Índice de Barthel (ROCCO et al., 2005), a Functional Independence Measure (FIM) – (UCHIKAWA et al., 2004), e outras, estão em construção ou adaptação, como a Motor Function Measure (MFM) validada especificamente para as distrofias musculares (BÉRARD et al., 2005) procurando aumentar a sensibilidade às mudanças clínicas e manter a sua confiabilidade. Estas avaliações focam a função motora, mas nem sempre são capazes de detectar pequenas alterações na força muscular, porém como os resultados refletem a dificuldade em realizar tarefas, elas sugerem o envolvimento de determinados grupos musculares responsáveis pela realização da atividade.

Sabe-se que todo movimento depende de algum grau de força muscular e, durante um processo de reabilitação, o ganho de força está relacionado com melhora do desempenho funcional e, contrariamente, a perda da força muscular

em processos degenerativos ou de caráter evolutivo, como é o caso das distrofias musculares, resultam em perda da capacidade de realizar tarefas funcionais.

Em animais, testes manuais para a mensuração de Força Muscular não são possíveis, uma vez que estes requerem atividade motora voluntária e, os animais não respondem aos comandos verbais necessários para a realização dos mesmos. A fraqueza muscular é a principal característica das distrofias musculares, desta forma, o uso da Ficha de Avaliação Funcional neste experimento procurou elucidar alguns pontos referentes a força e função muscular no desempenho das atividades diárias dos animais do modelo GRMD.

Ao avaliar cada um dos grupos, comparando o animal tratado, ao seu controle, não tratado, observa-se que no grupo I, o animal não tratado manteve suas características da primeira coleta durante os seis meses do experimento. Nota-se que o animal já apresentava “pouca e muita dificuldade” para realizar as tarefas funcionais avaliadas. O animal controle BR3M7 manteve as características da primeira avaliação, com 13 meses, na segunda, com 20 meses, sugerindo que este período foi de estabilidade para seu quadro funcional.

O animal BI1M4 (tratado), teve aumento no grau de dificuldade em realizar a deglutição e caminhada. A caminhada, que já acontecia com os membros pélvicos em base alargada na coleta I, passou a ser realizada após seis meses com o joelho em postura fixa. Esta adaptação para a marcha reflete um encurtamento muscular, confirmado nos resultados da Amplitude de Movimento Articular e, também, uma compensação à fraqueza muscular da cintura pélvica. Esta compensação em contratura de articulações distais para compensar a fraqueza proximal e dar estabilidade ao movimento foi descrita em meninos portadores de DMD por Strober (2006).

Armand et al. (2005) analisando a marcha de meninos com DMD verificaram que eles se mantêm na postura em pé utilizando a flexão plantar do tornozelo e da hiperlordose lombar.

Apesar do grupo de animais GRMD apresentar um encurtamento muscular para a articulação do joelho estatisticamente significativa, como mostrado nos achados da ADM para os animais GRMD e normais da mesma raça, esta limitação ainda não havia interferido na função de marcha do animal BI1M4, que passou a apresentar esta característica na coleta II, com 18 meses, diferente de seu controle BR3M7, que já apresentava esta característica de marcha aos 13 meses (coleta I). Isto sugere que a Fisioterapia pode ter mantido a mobilidade da articulação e, prolongado o aparecimento de contraturas na articulação do joelho no animal tratado.

Em relação ao Grupo II, os achados mostram que tanto o animal tratado (BR3M2), como o não tratado (BR3M5), tiveram aumento do grau de dificuldade para as atividades de *Apoio pélvico* e *Subir e descer rampas*, entre os 13 e 20 meses. A perda funcional nestas duas atividades diárias sugere uma diminuição da força muscular, que mesmo não podendo ser avaliada por testes de força muscular convencionais devido à ausência de resposta dos animais ao comando, pode ser demonstrada através de atividades que requerem uma sobrecarga de força nos músculos do membro pélvico, uma vez que os torácicos estão livres do contato com o solo. Na atividade de *Subir e descer rampas*, além da contração excêntrica da musculatura do quadríceps na descida e do tríceps sural na subida ser solicitada, todos os grupos musculares precisam gerar mais força muscular para vencer um terreno inclinado.

O animal não tratado BR3M2 apresentou, ainda, “muita dificuldade” para o item *Caminhar* na coleta II, aos 20 meses. Isto significa que ele passou a utilizar a postura fixa do joelho associada à base alargada, o que reflete a fraqueza da musculatura proximal da cintura pélvica. Esta situação não se repete no animal tratado BR3M5, que apesar de ser de mesma ninhada, idade e semelhanças no quadro funcional no início do experimento, não apresentou evolução semelhante neste item da avaliação, podendo ter sofrido influência positiva da mobilização passiva e exercícios ativos – livres nesta articulação.

A partir da observação do grupo III, nota-se que o período entre seis e doze meses foi marcado por alterações importantes no quadro funcional destes dois animais, característico por perda de força que se reflete na diminuição da agilidade em realizar tarefas básicas, bem como dificuldade em realizar atividade que solicitam sobrecarga da musculatura do membro pélvico. Os dois animais deste grupo evoluíram sem diferenças aparentes entre seu desempenho de função, mesmo que o animal CH1M3 tenha sido tratado com Fisioterapia. Mais observações, destes dois animais, a partir da idade de doze meses associada à Fisioterapia poderiam oferecer novas sugestões para a evolução de grupo tratado e não tratado.

Analisando os resultados descritos na coleta I para os Grupos I, II e III, observa-se que os dois animais do grupo III, com seis meses (CH1M3 e CH1M5), tiveram “pouca dificuldade” em apenas uma atividade funcional (*Apoio pélvico*), e todas as outras atividades avaliadas foram classificadas como “sem dificuldade”. Os animais, com dez (BI1M4) e treze meses (BR3M7) do grupo I, não apresentaram atividade classificada como “sem dificuldade”, apresentando “pouca e muita dificuldade” para a realização das atividades funcionais avaliadas. Os animais do

grupo II com treze meses (BR3M2 e BR3M5), mostraram-se “sem dificuldade” para realizar duas das cinco atividades avaliadas.

Esses resultados referentes à avaliação funcional mostram que entre as idades de seis e doze meses, a fraqueza muscular começou a se refletir em perdas funcionais importantes. Até os seis meses, os animais não haviam demonstrado diferença em relação a animais considerados normais para realizar as atividades funcionais básicas, como a *Deglutição*, *Caminhada*, *Postura quadrúpede*, *Subir e descer rampas*. Porém, já mostravam pouca dificuldade em realizar o *Apoio pélvico*, que se manteve pelos seis meses do experimento. A partir dos doze meses, observa-se uma maior estabilidade nos graus de dificuldade para o desempenho funcional, e, apesar de alguns animais apresentarem perdas, elas ocorrem de maneira lenta, não ocorrendo aumento do grau de dificuldade em mais do que três das atividades avaliadas no mesmo período.

Beenakker et al. (2005) relacionaram função motora e força muscular com meninos portadores de DMD, e observaram que uma pequena redução da força muscular era acompanhada por uma grande diminuição da habilidade funcional, principalmente em estágios intermediários da doença, definido pelos mesmos autores como sendo entre os cinco e oito anos de idade.

A função motora foi relacionada com a idade em meninos DMD e normais neste mesmo estudo, e os autores concluíram que a performance dos pacientes com DMD declinou severamente com a idade, enquanto que em crianças normais a performance motora melhora com a idade.

Em outra pesquisa, Parker et al. (2005) avaliaram a força muscular de cento e sessenta e dois meninos com DMD entre cinco e quinze anos. Os resultados mostraram que no grupo de meninos entre cinco e treze anos houve perda de 0.25

unidades de força / ano, enquanto que em outro grupo com idade entre quatorze e quinze anos, os meninos perderam 0.06 unidades de força / ano, sugerindo que na fase pré-púbere, ou seja, antes dos treze anos, ocorreu a maior perda de força muscular.

Em caninos, a transição da fase jovem para a adulta no macho ocorre aos doze meses (SENGER, 2003), o que pode explicar a maior perda da capacidade funcional em idades inferiores a esta nos animais GRMD estudados.

Analisando os resultados da Amplitude de Movimento Articular neste grupo de animais GRMD, observa-se que as quatro articulações avaliadas, cotovelo, carpo, joelho e tarso, comportaram-se de maneira diferente durante a evolução da distrofia muscular. Com exceção da articulação do cotovelo, que não apresentou diferença significativa em relação ao grupo de animais normais de mesma raça, as outras três mostraram angulações diferentes do normal na primeira coleta, sugerindo adaptações articulares e periarticulares nos animais distróficos.

A ausência de diferença entre os valores da ADM do cotovelo do grupo GRMD comparado com o grupo normal, e a manutenção desses valores pelo período de seis meses, com quatro dos seis animais com idades acima de 12 meses, confirma os achados de Howell et al. (1997) sobre a seletividade de acometimento da patologia, que segundo os autores afeta primeiramente o membro pélvico e posteriormente o torácico.

É possível que em estudos posteriores com animais GRMD em idades mais avançada seja encontrado diferença significativa também nesta articulação, devido à evolução da doença.

Em um estudo realizado com dezesseis cães Labradores Retrievers normais, foram avaliadas as ADM das quatro articulações, com os animais sem

sedação, e encontraram uma média de valores para a flexão máxima do cotovelo de $36^\circ \pm 2$, e extensão máxima de $166^\circ \pm 2$, resultando em um intervalo de angulação de 130° (JAEGER; MARCELLIN-LITTLE; LEVINE, 2002). Considerando que os animais são do mesmo porte do Golden Retriever, mas não de mesma raça, observa-se uma proximidade nos valores encontrados nesta pesquisa para os animais normais ($119,82^\circ \pm 8,65$).

As articulações do Joelho e Tarso dos animais GRMD avaliados tiveram valores diminuídos em relação aos valores dos animais normais da raça Golden Retriever. Apesar dos animais permanecerem a maior parte do dia livres, em um pátio, e não restritos de movimentação para as atividades diárias, observa-se, neste grupo, uma tendência a permanecer grande parte do tempo deitado, preferencialmente em decúbito lateral. Esta atitude reflete a dificuldade em permanecer constantemente na postura quadrúpede e a necessidade de períodos intercalados de descanso para evitar a fadiga muscular. Essa pobreza de movimentos gerada pelo desuso dos membros, leva a encurtamentos musculares.

Eagle (2002) relata que a fraqueza muscular nas doenças neuromusculares resultam em desequilíbrios musculares e levam à compensações para manter a postura em pé. Estes são os fatores que geram mudanças no comprimento da fibra muscular e desencadeiam contraturas. Ainda, a força muscular gerada por um músculo, depende do seu comprimento, e se o mesmo já está comprometido pela fraqueza muscular, pode ficar mais prejudicado se seu comprimento estiver diminuído.

Normalmente, a movimentação constante dos segmentos corporais em si, mantém a flexibilidade dos tecidos moles periarticulares e a lubrificação da articulação com a produção de líquido sinovial. De acordo com Platt e Garosi (2004),

em animais portadores de doenças neuromusculares, o descanso faz com que a força muscular seja momentaneamente reestabelecida. Os mesmos autores atribuem às contraturas musculares a causa da limitação do movimento característica das doenças musculares.

Mann, Wagner-Mann e Tangner (1988) relataram os valores da Amplitude de Movimento Articular do membro pélvico de dezessete animais normais de diferentes raças sob anestesia geral. Os animais avaliados pesavam em média 25 kg e apresentaram $143^{\circ} \pm 7$ graus para a articulação do Joelho, e $134^{\circ} \pm 8$ para o Tarso. As duas mensurações estão acima do encontrado para os animais Golden Retriever normais em nosso estudo, porém diferentes raças, podem gerar amplitudes de movimento variadas, uma vez que cada uma tem um porte específico.

Kornegay et al. (1994) relataram amplitudes do Tarso em treze animais GRMD aos três e seis meses de idade. Eles observaram uma diminuição significativa da ADM neste período, com uma média de $117,6^{\circ} \pm 24,55$ graus nos animais aos seis meses. Estes valores estão próximos aos encontrados nos seis animais de nossa pesquisa, que com uma média de idade de $10,16 \pm 3,46$ meses apresentaram $115,83 \pm 13,83$ graus para a mesma articulação.

Nossos achados mostraram que a ADM da articulação do Tarso teve aumento no grupo tratado, e se manteve no grupo não tratado. Comparando os achados desta articulação dos animais GRMD na coleta I com os animais normais da mesma raça, encontramos limitação de movimento para os animais distróficos. O aumento na Amplitude de Movimento para esta articulação nos animais tratados após o experimento aponta para uma contribuição da Fisioterapia neste grupo, uma vez que o grupo não tratado manteve a limitação inicial.

Os autores sugerem que a contratura do Tarso pode ser explicada pelo acometimento da musculatura extensora precocemente na distrofia, e à maior atividade dos músculos flexores sobre esta articulação (KORNEGAY et al, 2003).

Esta seletividade foi atribuída por Valentine e Cooper (1991) à solicitação de diferentes grupos musculares em diferentes fases da vida do animal. Em neonatos, os músculos mais afetados encontrados por estes autores, foram os intercostais, diafragma, língua, musculatura proximal dos membros e do tronco e pescoço. Kornegay et al (2003) atribuíram o acometimento precoce da musculatura extensora à flexora ao recrutamento desses grupos musculares, na sustentação de peso, e maior envolvimento da musculatura extensora em contrações excêntricas, o que, segundo Childers et al. (2002) produzem maior dano muscular devido ao estabelecimento do ciclo de fraqueza, contração excêntrica, dano na miofibrila, seguida de nova fraqueza.

Strober (2006) relata que a deformidade em “eqüino” da articulação do tornozelo de meninos portadores de DMD é comumente utilizada como uma compensação da fraqueza da musculatura proximal. Analisando a marcha dos animais distróficos de nosso grupo, nota-se que por volta dos seis meses de idade os animais já apresentam alterações na postura durante a marcha, principalmente a base do membro pélvico alargada. Entre os seis e doze meses, eles evoluem para uma marcha com base alargada associada à extensão do joelho e carpo, com pouca mobilidade dessas articulações durante os passos.

De acordo com Kornegay et al. (1994), assim como os meninos com DMD apresentam contraturas que produzem limitações funcionais, muitas vezes mais importantes que a própria fraqueza muscular, contraturas articulares no animais GRMD alteram a conformação e restringem a marcha progressivamente,

principalmente entre os três e seis meses de idade. A mensuração da ADM do Tarso foi sugerida pelos mesmos autores como tendo uma função prognóstica da evolução da distrofia, elucidando as diferenças fenotípicas destes animais.

Ainda que Kornegay et al. (1999) tenham encontrado uma relação proporcional entre aumento de idade e diminuição da ADM do Tarso em seus animais, a idade limite do estudo foi de seis meses. Na literatura não foi encontrado relato de animais GRMD acima dos seis meses e seus respectivos valores de angulação do Tarso.

Em relação ao joelho, tanto o grupo tratado como não tratado não apresentaram mudanças significativas dos valores da coleta II em relação à coleta I, porém em relação aos animais normais, mostraram limitação significativa da ADM. Kornegay et al. (2003) relataram diminuição da angulação da articulação do Joelho nos seus animais GRMD avaliados.

Nosso grupo de animais permanece durante todo o dia, livre, com espaço para atividades e, ainda que o grupo *não tratado* não seja estimulado, as intensidades de frequência e duração dos exercícios terapêuticos propostos podem não ter sido suficientes para provocar alterações significativas nesta articulação bastante acometidas pela patologia. É possível que um intervalo maior de Fisioterapia para o grupo tratado, e animais com idade inferior à média dos 10,16 meses, para tentar atuar no momento em que os encurtamentos e contraturas estão se instalando, possa trazer novos resultados.

Os valores da articulação do Carpo nos animais distróficos, mostraram valores acima do considerado normal para os animais da mesma raça, o que reflete uma hiperextensão desta articulação nos animais estudados já aos 10 meses de idade. Apesar da distrofia ter como característica o acometimento tardio do membro

torácico (ARMAND et al., 2005), Howell et al. (1997) e Kornegay et al. (1994) também encontraram valores aumentados para a amplitude de movimento do carpo em seus animais GRMD.

A pouca mobilidade nos membros pélvicos deste grupo de animais pode ter provocado um aumento da sobrecarga nos membros torácicos, associado a maior descarga de peso nesses membros. Probst (1998) descrevem que o centro de gravidade do animal quadrúpede encontra-se na região torácica e durante a marcha estes membros recebem 30% do peso em cada membro torácico, enquanto os pélvicos recebem 20 % cada.

Esta característica do centro de gravidade do animal quadrúpede pode explicar o retardo na perda da marcha nos animais distróficos quando realizamos uma analogia com os meninos. Os animais mantêm a marcha por anos, alguns até o óbito próximo aos seis anos (HOWELL et al., 1997). A posição avançada do centro de gravidade indica que os membros torácicos são mais sobrecarregados que os pélvicos , recebendo a carga resultante da propulsão. Os membros pélvicos fornecem a força de propulsão e o deslocamento para frente (MIKAIL; PEDRO, 2005)

Ainda que os animais não tratados tenham mantido a característica de hiperextensão do Carpo, os animais tratados pela Fisioterapia apresentaram diminuição desta amplitude. Isto sugere que a prática dos exercícios terapêuticos foi capaz de promover uma maior estabilidade pelas estruturas moles periarticulares nesta articulação, além de produzir uma adaptação de toda biomecânica da postura e marcha que possibilitou a observação de valores mais próximos dos considerados normais para a mesma raça.

A deposição de tecido conjuntivo no músculo e sua relação com o exercício foi avaliada, através do estudo da quantidade de colágeno no músculo esquelético dos animais tratados e não tratados pela Fisioterapia.

Histologicamente, além das lesões características do músculo esquelético distrófico, como alteração no diâmetro das fibras, necrose, regeneração, hialinização, calcificação das fibras musculares, resposta inflamatória e presença de gigantócitos (MYIAZATO, 2005; NGUYEN et al., 2002), a fibrose do endomísio e perimísio é outro achado comum, porém sua relação com o exercício terapêutico tem sido pouco estudada.

Nas Distrofias Musculares, fibras que atingem o estágio de degeneração são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo fibroso e adiposo (DICKINSON; LECOUEUR, 2002). Segundo Marques (2004), a substituição das miofibrilas pelo tecido fibroso explica o sinal de pseudohipertrofia muscular observado em estágios precoces da doença.

O músculo esquelético, assim como outros tecidos do corpo, quando lesado, é substituído por uma cicatriz de tecido conjuntivo. A cicatrização, ou restauração da continuidade tecidual perdida tem início com a lesão e se resolve com as respostas do organismo ao estágio inflamatório, de reparo e de remodelagem. O resultado de uma inflamação crônica no tecido muscular é a fibrose, a deposição de uma quantidade anormal de tecido conjuntivo fibroso. A formação da fibrose nos processos de reparação de tecidos pode reduzir ou limitar a função normal do tecido reparado (BANKS, 1999). O grau de reparo após uma lesão está diretamente relacionado ao grau de desarranjo sarcolêmico e endomisial (PROBST, 1998).

Os resultados deste estudo mostraram que os animais distróficos em relação ao normal apresentaram aumento na quantidade de colágeno depositado no perimísio e endomísio. Tal achado indica que estes animais, com idades entre seis e treze meses, já sofreram degenerações e necroses importantes das miofibrilas, observadas em situação de reparo tecidual.

Alguns autores quantificaram por estudo imuno – histoquímico os tipos de colágenos encontrados no tecido conjuntivo do perimísio 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.

Sabe-se que as fibras colágenas do tipo I, II e III são intersticiais, e encontradas em ossos, tecido conjuntivo frouxo e denso, túnica média vascular, parede do trato gastrointestinal, cartilagem, córnea; e as fibras do tipo IV e V na membrana basal (BANKS, 1999). Neste estudo, com animais GRMD, utilizamos a microscopia de luz polarizada para diferenciar as fibras colágenas do tecido muscular e quantificá-las na morfometria, porém não foi caracterizado o tipo de fibra colágena predominante.

Ainda que a Fisioterapia tenha oferecido contribuições para o grupo tratado em relação à Amplitude de Movimento Articular do Tarso e Carpo, e conseguido manter ou prolongar o aparecimento de alterações na função de marcha de alguns dos animais distróficos, a deposição de colágeno nestes animais tratados aumentou, discretamente, no intervalo entre a coleta I e II, e se manteve no grupo não tratado.

Devido ao grupo tratado ter sido submetido ao exercício, é provável que ciclos de contração e relaxamento muscular, na ausência da distrofina tenham gerado lesões nas miofibrilas que foram gradualmente substituídas pelo tecido conjuntivo fibroso. No caso do grupo não tratado, a restrição do exercício pode ter evitado lesões musculares, uma vez que a avaliação quantitativa do colágeno mostrou-se estável na coleta I e II para este grupo.

Segundo Guyton (2003), as proteínas fibrosas possuem característica elastomérica, ou seja, podem alterar seu comprimento quando submetidas ao estiramento. Essa característica do tecido fibroso sugere que a movimentação frequente da musculatura provocada pela Fisioterapia, pode ter criado uma tensão em estiramento e aumentado a área de colágeno no tecido muscular no grupo tratado.

Probst (1998) relata que a fase de remodelagem das cicatrizes é caracterizada por deposição de novas fibras colágenas com remoção de outras pelas collagenases teciduais, podendo ter continuidade por anos.

Além do estiramento provocado pelo exercício no grupo tratado, é possível que os animais que participaram da Fisioterapia tenham interferido na fase de remodelagem da cicatriz de tecido conjuntivo fibroso (PROBST, 1998), fazendo com que este novo tecido fosse moldado às exigências de função requerida pela musculatura. Isto explicaria a relação de ganho funcional nas duas importantes articulações distais, tarso e carpo, responsáveis pela sustentação de peso do corpo, concomitante ao aumento da área de fibras colágenas no músculo destes mesmos animais.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A aplicação fisioterapêutica no modelo GRMD mostrou ganho funcional em relação a macro estrutura articular e muscular, porém a degeneração da ultra estrutura manteve o curso da doença.
- O grupo tratado e não tratado pela Fisioterapia responderam de maneira diferente à evolução da distrofia em relação à ADM do Tarso. Esta amplitude, que apresentava limitação no início da pesquisa nos seis animais, teve aumento na ADM nos três animais tratados, e se manteve limitada nos não tratados.
- Os animais GRMD tratados pela Fisioterapia mostraram manutenção na atividade funcional *Caminhada* e melhora na limitação da ADM do tarso.
- Entre as idades de seis e doze meses, a fraqueza muscular começou a se refletir em perdas funcionais importantes nos animais GRMD. A partir dos doze meses, observa-se uma maior estabilidade nos graus de dificuldade para o desempenho funcional, e, apesar de alguns animais apresentarem perdas, elas ocorrem de maneira lenta.
- A idade dos doze meses mostrou-se importante nas mudanças funcionais dos animais GRMD, coincidindo com a transição da fase jovem para a adulta. A fase de maior crescimento corporal, até os doze meses, foi associada com maiores perdas das atividades funcionais avaliadas.

- A limitação nas Amplitudes de Movimento Articular do joelho e tarso dos animais GRMD assemelham-se às alterações observadas em meninos portadores de DMD.
- A hiperextensão da articulação carpo significa sobrecarga dos membros pélvicos sobre o torácico devido ao centro de gravidade do animal quadrúpede.
- Qual a real relação da degeneração muscular e do seu tipo de colágeno depositado, na evolução da distrofia muscular?
- O estudo da relação função motora e deposição de tecido fibroso no músculo, mostrou que os mesmos animais que tiveram ganho de função com a Fisioterapia, tiveram maior área de colágeno depositado.
- O colágeno depositado, descrito na literatura como tecido conjuntivo fibroso e característico da patologia, provavelmente é consequente à lesão das miofibrilas, porém sua presença em maior ou menor quantidade pode não estar relacionada à perda da função muscular.
- Se a restrição de atividades que gera encurtamentos importantes para as crianças que permanecem grande parte do dia em uma mesma postura, for responsável pela menor deposição de colágeno, como mostra estes primeiros achados, uma maior deposição de colágeno pode estar relacionada com ganho de amplitudes de movimento e consequentemente, função muscular.

- A duração de seis meses de fisioterapia utilizada na metodologia desta pesquisa provocou poucas alterações no grupo de animais estudados.
- A variabilidade fenotípica dos animais GRMD estudados dificultam a extrapolação destes achados para uma população maior. Novas pesquisas poderão utilizar esses primeiros dados da Fisioterapia motora no modelo GRMD para elucidar sua influência no tratamento com crianças portadoras de DMD.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDIM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE DISTROFIA MUSCULAR. **Fisioterapia**. Disponível em: <<http://www.abdim.org.br/fisioterapia.html>>. Acesso em: 17/maio/2006.

ABMAYR, S.; GREGOREVIC, P.; ALLEN, J. M.; CHAMBERLAIN, J. S. Phenotypic improvement of dystrophic muscles by rAAV/microdystrophin vectors is augmented by Igf1 Codelivey. **Molecular Therapy**, v. 12, n. 3, p. 441-450, 2005.

ARAUJO, A. P. Q. C.; DECO, M. C. de; KLÔH, B. S.; COSTA, M. R.; GÓIS, F. V.; GUIMARÃES, A. F. C. M. Diagnosis delay of duchenne muscular dystrophy. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n. 2, p. 179 - 183, 2004.

ANSVED, T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 6, n. 4, 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.

ATS. AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS. Respiratory care of the patient with duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. **American Journal of Respiratory and critical care medicine**, v. 170, p. 456-465, 2004.

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

BEENAKER, E. A. C.; MAURITS, N. M.; FOCK, J. M.; BROUWER, O. F.; VAN DER HOEVEN, J. H. Functional ability and muscle force in healthy children and ambulant Duchenne muscular dystrophy patients. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 9, p. 387-393, 2005.

BÉRARD, C.; PAYAN, C.; HODGKINSON, I.; FERMANIAN, J. A motor function measure scale for neuromuscular diseases. Construction and validation study. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 463–470, 2005.

BERNE, R. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 236-237.

BROOKE, M. H.; FENICHEL, G. M.; GRIGGS, R. C.; MENDELL, J. R.; MOXLEY, R.; FLORENCE, J.; KING, W. M.; PANDYA, S.; ROBISON, J.; SCHIERBECKER, J. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. **Neurology**, v. 39, n. 4, p. 475–481, 1989.

CAROMANO, F. A. C. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (DMD). **Arquivos de Ciências da Saúde de Unipar**, v. 3, n. 3, p. 211-218, 1999.

CARRILO, Valverde. Escalas de actividades de la vida diária. **Reabilitación**, v. 28, n. 6, p. 377-388, 1994.

CHAKKALAKAL, J. V.; THOMPSON, J.; PARKS, J. R.; JASMIN, B. J. Molecular, cellular and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 880-891, 2005

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.

COHEN, H. **Neurociências para fisioterapeutas**: incluindo correlações clínicas. 2.^a ed. São Paulo: Manole, 2001. 494 p.

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.

DEMOS, J. Results of the treatment of Duchenne de Boulogne myopathy by early physiotherapy. A comparative study with untreated subjects. **Archives of Frenchy Pediatrics**, v. 40, n. 8, p. 609–613, 1983.

DIAMENT, A.; CYPEL, S. (Coord.). **Neurologia Infantil**. 3.^a ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1113-1131.

DICKINSON, P. J.; LECOUTEUR, R. A. Muscle and Nerve biopsy. **Neuromuscular Diseases**, v. 32, n. 1, p. 63–102, 2002.

DUBOWITZ, V. **Prednisone for duchenne muscular dystrophy**. 2005, v. 4. Disponível em: <<http://neurology.thelancet.com>>. Acesso em: dezembro/2005.

EAGLE, M. Report on the Muscular Dystrophy Campaign workshop: exercise in neuromuscular diseases. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 975–983, 2002.

ERAZO-TORRICELLI, R. Actualización en distrofias musculares. **Revista de Neurología**, v. 39, n. 9, p. 860-871, 2004.

GARCIA, F. M. Escalas de valoración funcional. Aplicaciones, características y criterios de selección. **Rehabilitación**, v. 28, n. 6, p. 373-376, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003.

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.

HARRISON, T. R.; BRAUNWALD, E. **Principles of Internal Medicine**. v. 1, 1987. p. 1000; 2013-2074.

HOWELL, J. M.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. Use of the dog model for duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, p. 325- 28, 1997.

JAEGGER, G.; MARCELLIN-LITTLE, D. J.; LEVINE, D. Reliability of goniometry in Labrador Retrievers. **American Journal of Veterinary Research**. v. 63, n. 7, p. 979–986, 2002.

JORDE, L. B. **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 111-113.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J. H.; SCHUELER, R. O.; BETTS, W. Tarsal Joint contracture in dogs with Golden Retriever Muscular Dystrophy. **Laboratory animal science**, v. 44, n. 4, p. 331-333, 1994.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Journal of the neurological sciences**, v. 166, p. 115-121, 1999.

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.

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

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.

MENDELL, J. R.; MOXLEY, R. T.; GRIGGS, R. C.; BROOKE, M. H.; FENICHEL, G. M.; MILLER, J. P.; KING, W.; SIGNORE, L.; PANDYA, S.; FLORENCE, J.

Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in duchenne's muscular dystrophy. **The New England journal of medicine**, v. 321, n. 21, p. 1481–1482, 1989.

MIKAIL, S.; PEDRO, C. R. **Fisioterapia veterinária**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2005. p. 13 – 33.

MYIAZATO, L. G. **Distrofia Muscular no Golden Retriever**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MUNAIN, A. L.; URTIZBEREA, J. A. Clasificación clinicogenética de las distrofias musculares. **Medicina Clínica**. v. 111, n. 6, p. 226–235, 1998.

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.

Nomina Anatômica Veterinária. INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. 5. ed. Knoxville, 2005. 190 p.

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.

PLATT, S. R., GAROSI, L. S. Neuromuscular weakness and collapse. **Veterinary Clinics Small animal practice**. v. 34, p. 1281–1305, 2004.

PROBST, C. W. Cicatrização das feridas e regeneração de tecidos específicos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1998. p.66–78.

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.

ROCCO, F. M.; GIANINI LUZ, F. H.; ROSSATO, A. J.; FERNANDES, A. C.; OLIVEIRA, A. S. B.; BETETA, J. T.; ZANOTELI, E. Avaliação da função motora em crianças com distrofia muscular congênita com deficiência da merosina. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 2-A, p. 298–306, 2005.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2 ed. Washington: Current conceptions inc. 2003.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases – Review. **Neuromuscular Disorders**, XX, p. 1 – 12, 2005.

SHEPHERD, R. **Fisioterapia em pediatria**. 3 ed. São Paulo: Livraria Santos, 1995. p. 280-292.

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.

TOPIN, N.; MATECKI, S.; LE BRIS, S.; RIVIER, F.; ECHENNE, B.; PREFAUT, C.; RAMONATXO, M. Dose-dependent effect of individualized respiratory muscle training in children with Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 576–583, 2002.

UCHIKAWA, K.; LIU, M.; HANAYAMA, K.; TSUJI, T.; FUJIWARA, T.; CHINO, N. Functional status and muscle strength in people with Duchenne muscular dystrophy living in the community. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 36, p. 124–129, 2004.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 543–555, 2003.

VAINZOF, M.; YAMAMOTO, L. U.; KOSSUGUE, P. M.; FOGAÇA, L. L. Q.; VELLOSO, F. Z.; AYUB, D.; MUNIZ, V. P.; ZATZ, M.; SILVA, H. C. A.; MASSIRONI, S. M. G.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, J. R. E.; D'ANGELES, F. H. F.; LACERDA NETO, J. C.; MORTARI, A. C.; BORGES, A. S.; REZENDE, L. A. L.; RAHAL, S. C. Animal models of neuromuscular disorders. **Revista Neurociências**, v.13, n.3, 2005.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscles in neonatal dogs. **Neuromuscular Disorders**, v. 1, p. 31–38, 1991.

VIGNOS, P. J. Physical models of rehabilitation in neuromuscular disease. **Muscle Nerve**, v. 6, n. 5, p. 323-38, 1983.

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 Hospitals of Cleveland. **The journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 78, n. 12, p. 1844-1852, 1996.

WANG, J.; FORST, J.; SCHÖDER, S.; SCHÖDER, M. Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p. 150-158, 1999.

ZATZ, M.; BETTI, R. T.; FROTA-PESSOA, O. Treatment of Duchenne muscular dystrophy with growth hormone inhibitors. **American Journal of Medical Genetics**, v. 24, n. 3, p. 549-66, 1986.

ZATS, M.; FROTA-PESSOA, O. Distrofias Musculares. **Ciência Hoje**, v. 4, n. 26, p. 26-32, 1986.