

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM PATOLOGIA**

GEORGE MACIEL CAVALCANTI

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE
FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS ESQUELÉTICAS
EM PACIENTES COM Distrofia
MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)**

**Recife-PE
2006**

GEORGE MACIEL CAVALCANTI

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE
FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS ESQUELÉTICAS
EM PACIENTES COM Distrofia
MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)**

**Dissertação apresentada ao Mestrado
em Patologia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Patologia, área de concentração Patologia
Geral.**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros

Professora Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia – C.C.B./UFPE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Diógenes Luís da Mota

Professor Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia – C.C.B./UFPE

**Recife-PE
2006**

Cavalcanti, George Maciel
Análise histoquímica e morfométrica de fibras musculares estriadas esqueléticas em pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD) / George Maciel Cavalcanti. – Recife : O Autor, 2006.
ix, 39 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Ciências da saúde – Patologia. 2. Sistema neuromuscular – Distrofia muscular de Duchenne – Análise histoquímica e morfométrica. 3. Fibra muscular – Área e diâmetro menor – Porcentagem de fibras – Relativa e absoluta. I. Título.

616.74
616.748

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-127



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: GEORGE MACIEL CAVALCANTI

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA TESE: "Análise histoquímica e morfométrica de fibras musculares estriadas esqueléticas de pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD)"

ORIENTADORA: Profa. Paloma Lys de Medeiros

CO-ORIENTADOR: Prof. Diógenes Luis da Motta

TESE DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 03/03/2006

BANCA EXAMINADORA:

Profª Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima

Prof. Diógenes Luis da Motta

Prof. Marcelo Moraes Valença

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha Mãe, que faleceu uma semana antes da minha formatura de graduação e não pôde estar de corpo presente num dos maiores sonhos de sua vida. Isso me deu forças para que pudesse seguir adiante, e hoje fazer esta homenagem tão merecida a pessoa que mais amo na minha vida.

Agradecimentos

- **A Deus e Jesus Cristo pelo meu aprendizado e evolução neste plano.**
- **Aos meus pais Edson e Célia (*in memorian*), minha eterna gratidão pelo apoio, incentivo e amor, fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, e principalmente pela vida.**
- **Aos meus avós, pelo grande ensinamento de vida que me foi dado.**
- **Aos meus tios Paulo e Lúcia, por toda paciência e ajuda durante meus estudos, sendo de fundamental importância para a conclusão deles.**
- **Ao meu irmão por todo o apoio dispensado nas horas difíceis.**
- **A minha namorada, pelo apoio irrevogável dado ao longo deste trabalho.**
- **A Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros, minha especial homenagem, pela credibilidade, confiança, ensinamentos e orientações na realização deste trabalho.**
- **Ao Prof. Dr. Diógenes Luis da Mota, pelo interesse, dedicação, paciência e pelo o apoio na realização da Análise Morfométrica deste trabalho.**
- **A Prof^a. Dr^a. Leila Chimelli, meus sinceros agradecimentos, pelos ensinamentos e pela liberação dos seus pacientes para que eu pudesse realizar este trabalho.**

- A Prof^a. Dr^a. Adriana Maria da Silva Telles, pela oportunidade de ministrar suas disciplinas como professor de estágio à docência no departamento de Patologia da UFPE.
- Ao estagiário André de Sá Braga Oliveira, pela sua amizade, essencial e inestimável colaboração, tornando possível a realização de parte deste trabalho.
- Ao técnico Heliomar, do laboratório de Neuropatologia da UFRJ, pela importante colaboração no desenvolvimento da técnica de congelamento deste trabalho.
- A todos que compõem o Departamento de Patologia da UFPE, pela amizade que foi construída neste período, e que levarei pra sempre.
- Aos colegas de Mestrado, pela convivência e companheirismo.
- A todos aqueles que direta ou indiretamente tiveram uma parcela de participação, colaborando no desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

DM – distrofia muscular

DMD - distrofia muscular de Duchenne

DMB - distrofia muscular de Becker

DMRM - distrofia muscular das cinturas escapular e pélvica ou de Erb

DMS - distrofia muscular Steinert

DFSH - distrofia muscular fácio-escápulo-humeral ou de Landouzy-Déjerine

DMC - distrofia muscular congênita

ATPase – Adenosina Trifosfatase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – manobra de Gowers. O levantar miopático caracteriza-se: 1) o paciente inicialmente firma as mãos e os pés no chão; 2) a seguir, eleva o tronco apoiado com uma das mãos; 3) tenta elevar o tronco ao máximo e 4) o abdome torna-se proeminente, acentuando um quadro de lordose (<http://www.distrofiamuscular.net>).

Figura 2 – Desenho esquemático ilustrando a organização do músculo esquelético. (a) acima no canto direito; (b) o esboço das fibras musculares e bainha envoltória(<http://fcm.unicamp.br/departamentos/anatomia/musduchenne.html>)

Figura 3 - Corte transversal de músculo estriado esquelético, para mostrar o perimísio (setas) e o endomísio (cabeças de seta). Coloração: tricrômico de Masson (Fotomicrografia gentilmente cedida pelo Porf. Dr. Diógenes Luís da Mota do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE).

Figura 4 – Tipos de fibras musculares observadas com o auxílio da histoquímica (DAVID; GRAHAM, 1997).

Figura 5 – Fotomicrografias do músculo *vastus lateralis* direito de paciente com distrofia muscular de Duchenne (DMD), coradas pela técnica histoquímica das ATPases, onde observamos os diferentes tipos de fibras (I, IIa e IIb). A) pH= 9,6, B) pH= 4,6 e C) pH= 4,3. Aumento de 200X

Figura 6- Frequência relativa (%) das fibras musculares (tipos I, IIa e IIb), de cada paciente avaliado nesta pesquisa com distrofia de Duchenne. Valores percentuais discriminados acima de cada coluna.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Biópsia Muscular: Classificação das Fibras Musculares (WILMORE, 2001).

Tabela 2 – Biópsia Muscular: Características estruturais e funcionais (CLOSE, 1967).

Tabela 3 – Diâmetros menores médios e proporções médias das fibras musculares de humanos adultos normais (BROOKE; ENGEL, 1969).

Tabela 4. Área total dos tipos de fibra muscular de cinco pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Valores ($\bar{X} \pm dp$) da área (μm^2) das fibras tipo I, IIa e IIb, da região medial do músculo *vastus lateral* direito.

Tabela 5 – Diâmetro total dos tipos de fibra muscular de cinco pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Valores ($\bar{X} \pm dp$) do diâmetro menor (μm) de fibras tipo I, IIa e IIb da região medial do músculo *vastus lateralis* direito.

Tabela 6 - Frequência absoluta (%) de fibras dos tipos I, IIa e IIb da região medial do músculo *vastus lateralis* direito dos pacientes afetados.

RESUMO

As distrofias musculares (DM) constituem um grupo heterogêneo de desordens geneticamente determinadas e acompanhadas de destruição progressiva de fibras musculares, que se manifestam com fraqueza progressiva e perda da massa muscular, iniciando-se geralmente na infância. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma desordem recessiva ligada ao cromossomo X, sendo considerada a mais comum e grave das distrofias em crianças, para qual não existe terapia efetiva. Este estudo objetivou analisar, através da histoquímica e morfometria, a predominância dos tipos de fibras musculares estriadas esqueléticas em pacientes com DMD. Biópsias do músculo *vastus lateralis* foram coletadas de cinco pacientes, do sexo masculino, com faixa etária de 13 a 15 anos, com diagnóstico clínico de DMD, no Setor de Neuropatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de agosto de 2004 a junho de 2005. Amostras foram coradas pelo método histoquímico para a ATPase miofibrilar (ATPases 9,6;4,6 e 4,3). A análise morfométrica realizada no nosso estudo revelou que as fibras musculares do tipo I apresentaram valores percentuais maiores do que as fibras IIa e IIb em todos os pacientes; além disso, as fibras musculares do tipo I apresentaram diâmetro e área maiores do que as fibras do tipo IIa e IIb, porém, com valores muito próximos, estando estes resultados de acordo com os achados da literatura. As análises histoquímica e morfométrica realizadas na avaliação dos pacientes dessa pesquisa demonstraram ser ferramentas importantes no auxílio do diagnóstico qualitativo e quantitativo das fibras musculares esqueléticas acometidas nesse tipo de doença.

Palavras-chave: Histoquímica; morfometria; músculo *vastus lateralis*; distrofia muscular de Duchenne.

ABSTRACT

The muscular dystrophies (MD) form a well-recognized heterogeneous group of genetic determined disorders and accompanied of progressive destruction of muscle fibers expressed with progressive muscle weakness and loss of muscle mass. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive disorder, considered the most common and most severe muscular dystrophy in childhood, for which is not effective therapy. The predominance of muscle fiber types were analyzed by histochemistry and morphometry in patients with DMD. Skeletal muscle biopsies were collected from the *vastus lateralis* muscle of five patients, boys between 13 and 15 years old, with clinical diagnostic of DMD, in the Setor de Neuropatologia do Hospital das Clínicas do Rio de Janeiro of August 2004 at June 2005. Samples stained by the myofibrillar ATPase by the histochemistry method (ATPases 9.6, 4.6 and 4.3). The morphometrical analysis achieved an increased of the percentage in the values of type I fiber than that types IIa and IIb in all patients. Furthermore, the type I fiber had a larger cross-sectional area and mean diameter than type IIa and IIb fibers, although with proximate values, where our results are according to the specialized literature. Thus, both histochemistry and morphometric analysis could be important tools in the aid of the qualitative and quantitative diagnostic of muscle fibers attacked in this type of disease.

KEYWORDS: Histochemistry analysis, Morphometrical analysis, *vastus lateralis* muscle, dystrophy muscular of Duchenne.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Definição da doença	01
1.2. Aspectos genéticos	02
1.3. Breve revisão da literatura	03
1.4. Estrutura normal do músculo esquelético estriado	07
1.5. Tipos de fibra	10
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Geral	16
3.2. Específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Desenho do estudo	17
4.2. Casuística	17
4.3. Biópsia muscular	17
4.4. Análise histoquímica	19
4.5. Análise morfométrica	19
4.6. Análise estatística	20
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÕES	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
9. ANEXOS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição da doença

As distrofias musculares (DM) constituem um grupo heterogêneo de desordens geneticamente determinadas e acompanhadas de destruição progressiva e irreversível da musculatura esquelética, que se manifestam com fraqueza progressiva e perda da massa muscular, iniciando-se geralmente na infância (ZATS et al., 1976). A etiologia dessa doença está diretamente relacionada a anormalidades intrínsecas da fibra muscular que induz à sua destruição; sendo assim, as distrofias são classificadas de acordo com o quadro clínico, gravidade e padrão de transmissão genética (ANDERSON, 1982).

Até o presente momento tem-se o conhecimento de mais de 30 formas diferentes de distrofia muscular progressiva, algumas mais benignas e outras mais graves, que podem atingir crianças e adultos de ambos os sexos. Todas atacam a musculatura, mas os músculos atingidos podem ser diferentes de acordo com o tipo de distrofia. Os principais tipos de distrofia muscular progressiva são: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular das cinturas escapular e pélvica ou de Erb (DMRM), distrofia miotônica de Steinert (DMS), distrofia muscular fácio-escápulo-humeral ou de Landouzy-Déjerine (DFSH), distrofia muscular congênita (DMC) e a distrofia muscular de Emery-Dreifuss (ANDERSON, 1982; KUNKEL; BEGGES; HOFFMAN, 1989).

Dentre as diferentes miopatias, a DMD de herança recessiva ligada ao cromossomo X é a mais comum, com uma incidência de um em cada 3.000 nascimentos de sexo masculino (EMERY, 1993).

Ainda que o epônimo, distrofia muscular de Duchenne, seja aplicado a mais comum e a mais severa distrofia muscular em crianças, Duchenne não foi o primeiro a descrever

essa condição. Dez anos antes de Duchenne relatar o seu primeiro caso de distrofia muscular, um médico de Londres chamado Meryon tinha descrito a doença. Entretanto, Duchenne forneceu um abrangente relato sobre as características clínicas e a progressão patológica da doença pelo estudo do músculo microscopicamente (BROWN; HOFFMAN, 1988; GUTMANN; FISCHBECK, 1989; JAY et al., 1993).

1.2. Aspectos genéticos

O isolamento do gene defeituoso na DMD e a identificação do produto deste gene (a distrofina) foram de extrema importância no diagnóstico da distrofia muscular (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987; HOFFMAN et al., 1988; GUTMANN; FISCHBECK, 1989). Hoje, o teste de DNA para as mutações do gene da distrofina e a análise da distrofina nas amostras de biópsias musculares fazem parte integral no diagnóstico das distrofinopatias, incluindo os tipos DMD e DMB, com implicações significativas para o aconselhamento genético de famílias afetadas (KOENING et al., 1987; 1989; HOFFMAN, 1987; HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1988; MONACO et al., 1988).

A descoberta do gene que codifica a distrofina delineou não só a causa da DMD, mas também incentivou a pesquisa na grande família das várias proteínas associadas a distrofina (DUNNEN et al., 1989; WORTON, 1995).

O complexo de proteínas associado a distrofina, consiste numa cadeia de proteínas que atravessa a membrana da célula muscular, formando uma ligação entre a matriz extracelular e a actina intracelular. Defeitos nos componentes do complexo glicoproteína-distrofina vêm sendo relatados para várias distrofias musculares. Desta forma, a detecção das deleções ou duplicações por estudos genéticos através das provas de DNA

possibilitaram a descoberta precisa do portador, o aconselhamento familiar e o diagnóstico pré-natal de DMD (WORTON, 1995).

Todavia, mutações delicadas num gene, podem ser de difícil detecção pelas técnicas comuns. Logo, a análise da distrofina tem um papel importante no diagnóstico das distrofias Xp21.1 e sua distinção em relação às outras, como as distrofias autossômicas não ligadas ao X (KOENING et al., 1989). Na DMD o padrão mais encontrado em imunohistoquímica da distrofina, é a ausência de coloração da mesma, embora uma pequena porcentagem de fibras imunoreativas, referidas como reversíveis, possam ser observadas (HOFFMANN et al., 1988; JAY et al., 1993; WORTON, 1995).

1.3. Breve revisão da literatura

As primeiras descrições clínicas referentes à distrofia muscular datam do século XIX, quando Charles Bell, famoso pela descrição da paralisia do nervo facial (Paralisia de Bell) relatou um caso de distrofia muscular (BELL, 1830 apud ADAMS, 1975). Dentre outros casos isolados dessa doença, foi citado por Partridge em 1847 apud Adams (1975), um caso de um menino acometido de doença muscular progressiva; cuja necropsia revelou uma espantosa degeneração gordurosa no músculo.

Foi Edward Meryon, do Hospital St Thomas de Londres, quem primeiro deu uma completa e vívida descrição de DMD. Seus pacientes incluíam oito meninos afetados de três famílias; cujo um deles já havia sido relatado por Partridge (MERYON, 1852 apud ADAMS, 1975). Meryon foi rápido em reconhecer a natureza familiar e a predileção dessa doença por crianças do sexo masculino. Em seu livro “Practical and Pathological Researches on the various forms of paralysis”, Meryon descreveu uma família com quatro primos afetados e transmissão através de três irmãs (MERYON, 1864 apud ADAMS,

1975). Examinando o músculo na necropsia, ele notou gotículas de óleo, degeneração granular e destruição de algumas áreas nas fibras elementares, sugerindo sem dúvida a substituição do músculo por gordura e doença miofibrilar avançada; dessa forma, Meryon antecipou a descrição de Duchenne em dez anos (MERYON, 1957; MERYON, 1864 apud ADAMS, 1975).

Guillaume-Benjamin-Amand Duchenne (1806–1875) nasceu em Boulogne, na França e escolheu estudar medicina em Paris, com a intenção de ser um médico de família, vindo a exercer a profissão por dez anos, afastado da capital. Em 1842, Duchenne decidiu voltar à Paris para seguir uma carreira dedicada as doenças neuromusculares (GOWERS, 1888 apud ADAMS, 1975).

Duchenne era fascinado por eletricidade, tanto para diagnóstico como para tratamento. Ele construiu uma máquina para estimulação de nervos e músculos. Aprendeu, sozinho, microscopia e fotografia. Sua experiência clínica extraordinária foi resumida em “L’Electrisation Localisée”, a terceira e última edição que foi impressa em 1872. Suas descrições clínicas incluem uma vasta lista de tópicos como paralisia bulbar progressiva, paralisia por congelamento, surdez nervosa, doença cerebelar, pólio, mecanismo da expressão facial, paralisia histérica e ainda escreveu “Physiologie des Mouvements” (DUCHENNE, 1872 apud ADAMS, 1975).

Em 1861, Duchenne descreveu seu primeiro caso de distrofia que agora recebe seu nome, com o título “Paraplégie hypertrophique de l’enfance de cause cérébrale”. Por causa do prejuízo intelectual dos meninos afetados, Duchenne inicialmente pensou que a origem fosse cerebral. Em 1862, no seu “Album de photographies pathologiques”, ele publicou algumas fotos clínicas notáveis sobre a doença (DUCHENNE, 1868; DUCHENNE, 1872 apud ADAMS, 1975).

A associação de duas observações contraditórias, isto é, paralisia e hipertrofia muscular, confundiram extremamente Duchenne. Em 1865, ele desenvolveu seu próprio instrumento para biópsia muscular, o “Tissue Punch”, que, com pouca dor, porções mínimas de partes profundas dos músculos poderiam ser removidas. Com esse instrumento ele tornou-se apto para estudar a doença muscular numa criança, vindo a observar hiperplasia do tecido conjuntivo intersticial, com produção de mais ou menos tecido fibroso e classificou a lesão anatômica fundamental dos músculos como paralisia pseudo-hipertrófica (DUCHENNE, 1868 apud ADAMS, 1975).

Num relato publicado em 1868, Duchenne deu uma explicação abrangente da doença baseado num estudo de treze casos. Ele dirigiu sua atenção para o incomum aumento do músculo e a extrema fibrose associada e propôs o termo, paralisia muscular pseudo-hipertrófica, a qual foi popularizada por William Gowers (GOWERS, 1879 apud ADAMS, 1975), ao caracterizar os movimentos desses pacientes - manobra de Gowers, sendo essa expressão utilizada até os dias atuais para o reconhecimento do levantar miopático (**Figura 1**).



Figura 1 – manobra de Gowers. O levantar miopático caracteriza-se: 1) o paciente inicialmente firma as mãos e os pés no chão; 2) a seguir, eleva o tronco apoiado com uma das mãos; 3) tenta elevar o tronco ao máximo e 4) o abdome torna-se proeminente, acentuando um quadro de lordose (<http://www.distrofiamuscular.net>).

Até 1870, Duchenne já tinha visto 40 casos (apud BROWN, HOFFMAN, 1988). Ele descreveu três estágios críticos: um de movimentos débeis, um de aparente hipertrofia, e, finalmente, de paralisia. Suas amostras de biópsias musculares confirmaram a acumulação gradual de fibrose e a substituição gordurosa do músculo em estágios mais tardios, com grave prognóstico para os meninos afetados. Em 1871, Duchenne teve a oportunidade de examinar o material medular de um desses casos e observou que não havia lesão neurogênica, como tinha imaginado (DUCHENNE, 1872 apud BROWN, HOFFMAN, 1988). Em 1883, Poore resumiu e traduziu os vários trabalhos de Duchenne para o “New Sydenham Society” (apud BROWN, HOFFMAN, 1988).

Duchenne morreu de hemorragia cerebral no seu aniversário de 69 anos. Sua carreira foi realmente única, ele foi o médico em Paris que não era afiliado com nenhuma instituição em particular, mas era bem-vindo em todas. Ele não tinha interesse em receber honras ou medalhas da sociedade ou dos grandes centros acadêmicos. Quando ele morreu, Duchenne foi reconhecido como um médico-cientista original (JAY; VAJSAR, 2001).

Atualmente, por meio do exame de DNA, é possível, na maioria dos casos, detectar com segurança se uma mulher é portadora ou não do gene da DMD ou DMB e é possível também, a realização do diagnóstico pré-natal, que consiste em saber, numa fase bem precoce da gravidez, se o feto herdou ou não o gene defeituoso, ou seja, se será uma criança normal ou afetada pela distrofia (com 95 a 99% de certeza). Outra importante consequência da descoberta do gene da DMD e DMB foi a identificação do produto que este gene codifica: uma proteína chamada Distrofina, que está ausente ou em quantidade muito diminuída nos meninos afetados pela DMD, e alterada, porém parcialmente funcional, nos pacientes com DMB (MANDELL, 1989; MANOLE, 1995; SIRONI et al., 2001).

Hoje sabemos que a Distrofina faz parte de um complexo de proteínas, todas elas necessárias para a manutenção da permeabilidade da membrana da célula muscular. Assim, na deficiência total ou parcial da Distrofina, haverá uma degeneração progressiva dos músculos esqueléticos (MUNTONI; FERLINI, 2003).

1.4. Estrutura normal do músculo estriado esquelético

Os músculos são os elementos do corpo humano com propriedades de encurtamento e alongamento que quando acionados, de forma voluntária ou involuntária, produzem o movimento dos segmentos corporais. Além disso, atuam no sentido de estabilizar as articulações (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Os músculos unem-se aos ossos pelos tendões, os quais são estruturas contínuas com tecido conjuntivo denso que envolve o músculo externamente constituindo a fascia ou aponeurose. Esse tecido conjuntivo emite septos que ao penetrarem no interior do músculo o subdividem em fascículos ou feixes de fibras. Cada um destes feixes consiste em um conjunto de fibras, as unidades funcionais musculares. Cada fibra também se subdivide em fibrilas, porém, do ponto de vista prático, esta subdivisão não tem valor, pois as fibrilas contraem-se conjuntamente (**Figura 2**).

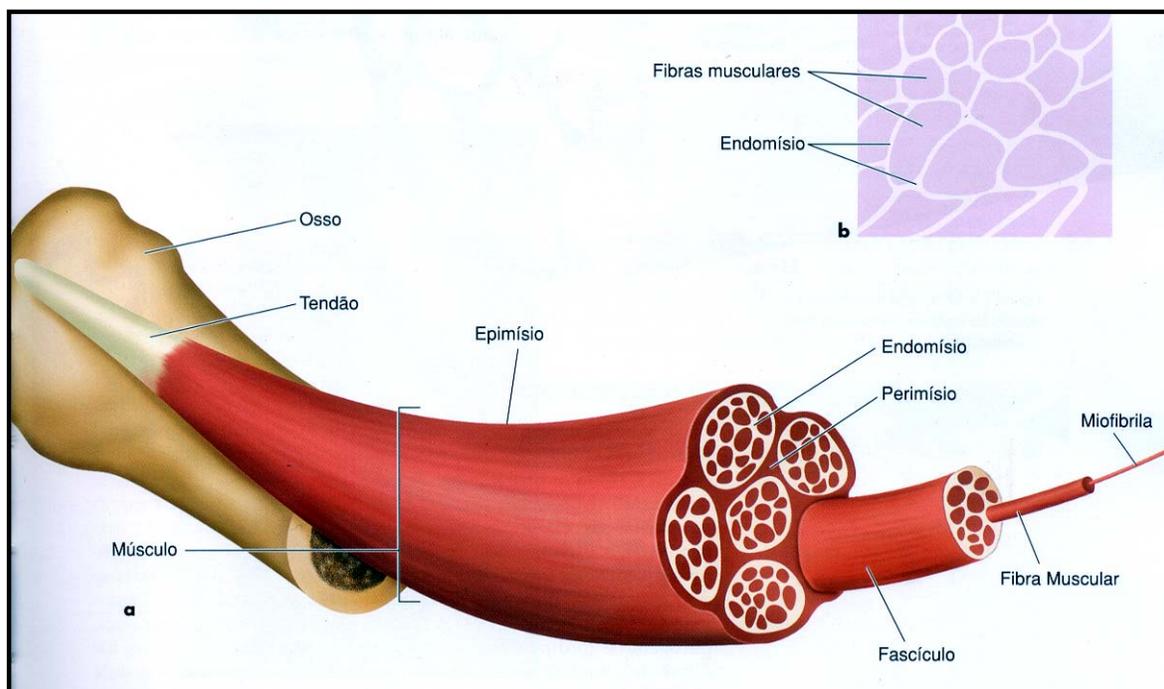


Figura 2 – Desenho esquemático ilustrando a organização do músculo esquelético (a). Acima no canto direito (b), esboço das fibras musculares e bainha envoltória (<http://www.fcm.unicamp.br/departamentos/anatomia/musduchenne.html>).

Cada fibra muscular possui uma bainha elástica, o sarcolema, que contém em seu interior numerosos núcleos. Esta bainha confere à fibra propriedades que permitem seu alongamento e encurtamento. No interior das fibras musculares existem proteínas com propriedades contráteis, as miofibrilas, dispostas como unidades em paralelo as quais são ativadas por um nervo motor (LEVY, 1984; GROUNDS, 1998; VIERCK, 2000, DAVIES, 2002).

O músculo esquelético é revestido por três tipos de tecido conjuntivo, o epimísio envolve todo o músculo, mantendo-o unido, o perimísio que circunda cada fascículo do músculo e o endomísio que recobre cada fibra muscular (**Figura 3**).

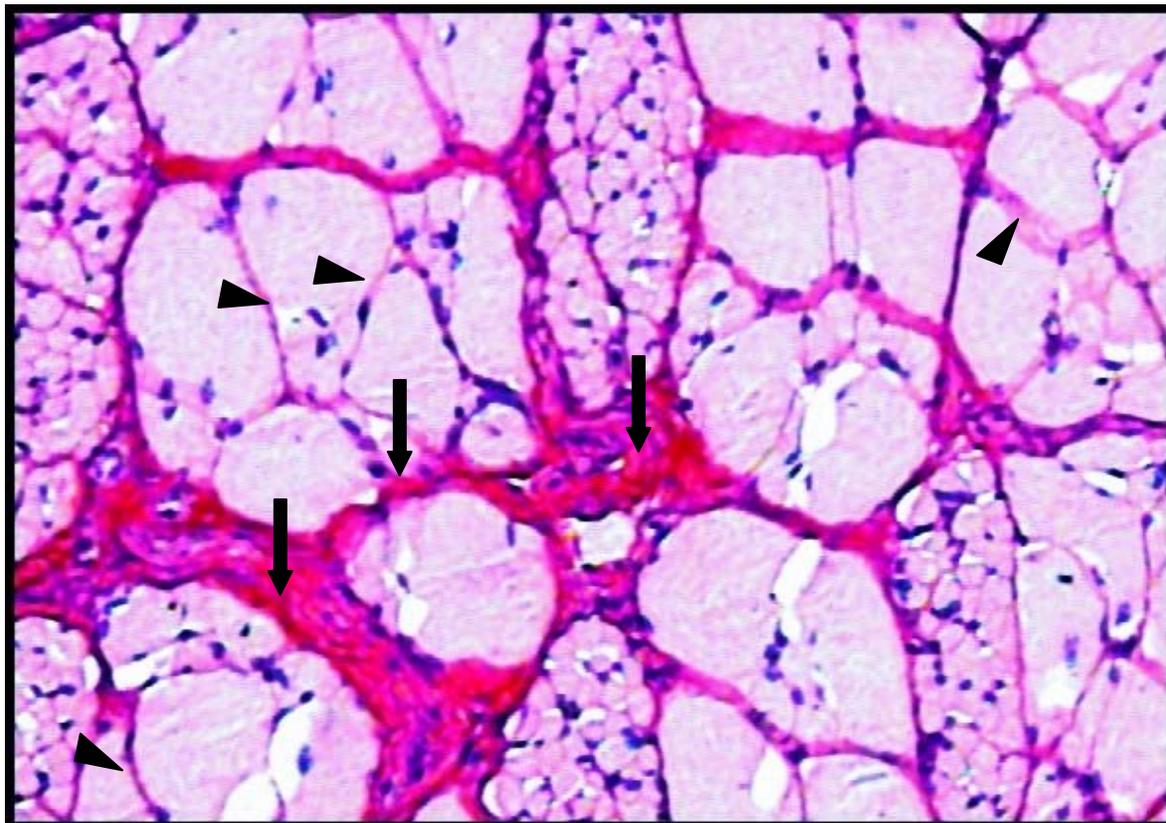


Figura 3 - Corte transversal de músculo estriado esquelético humano, para mostrar o perimísio (setas) e o endomísio (cabeças de seta). Coloração: tricrômico de Masson (Fotomicrografia gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Diógenes Luís da Mota do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE).

Uma fibra nervosa ao encontrar o sarcolema forma uma placa terminal, dependendo do sistema nervoso central, emitindo descargas elétricas, provocando as contrações musculares. Entre as fibras musculares há muitos vasos sanguíneos, assegurando a elas uma boa irrigação. Dentre os tecidos biológicos, o músculo é o mais plástico, caracterizando-se por sua capacidade de adaptação e de resposta a estímulos normais ou patológicos (COHEN, 1975; ROSE; ROTHSTEIN, 1982; GROUNDS, 1998; VIERCK, 2000, DAVIES, 2002; JUNQUEIRA; CANEIRO, 2004).

1.5. Tipos de fibra

Stefano Lorenzini relatou os diferentes tipos de fibras musculares em animais e sugeriu, com base na diferença de cor, a classificação de fibras brancas e vermelhas (CIACCIO, 1898).

Com o advento das técnicas histoquímicas, foi possível localizar sistemas enzimáticos e outros constituintes químicos celulares, e isso abriu caminho para uma correlação direta da atividade funcional de fibras individuais com sua morfologia. (DUBOWITZ; BROOKE, 1985; DUBOWITZ; PEARSE, 1960a).

Em 1960, foi demonstrada uma relação recíproca, entre a atividade da fosforilase e as várias enzimas oxidativas em fibras musculares individuais, e sugeriu-se que tanto o músculo humano como o músculo animal, poderiam apresentar dois tipos de fibra: o tipo I, com uma grande atividade oxidativa e baixa atividade glicolítica, e o tipo II, com baixa atividade oxidativa e grande atividade glicolítica. Fibras com atividade enzimática intermediária foram também observadas, mas essas fibras não foram delineadas como um tipo separado de fibra (DUBOWITZ; PEARSE, 1960 a, b).

Já em 1973, foi sugerido que os tipos de fibras e sistemas enzimáticos poderiam possuir o sistema de dupla fibra baseado na reação de ATPase padrão (pH 9,6). As fibras tipo I teriam uma reação fraca, enquanto as fibras tipo II uma forte reação (**Figura 4**) (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). Isso se tornou prático e proveitoso na avaliação de músculos normais e afetados. A subdivisão das fibras tipo II em três subtipos (IIa, IIb e IIc), pela reação seletiva com o padrão ATPase, depois de pré-incubação em pH 4,6 ou 4,3, também, provou ter significância em relação às mudanças seletivas no músculo humano e demonstrou notável correlação entre os tipos de fibra em animais, definindo-se algumas características fisiológicas (Tabelas 1 e 2). Isso foi igualmente útil para explicar o processo de maturação e desenvolvimento dos músculos no período fetal em seres humanos e nos animais (BROOKE; KAISER, 1970).

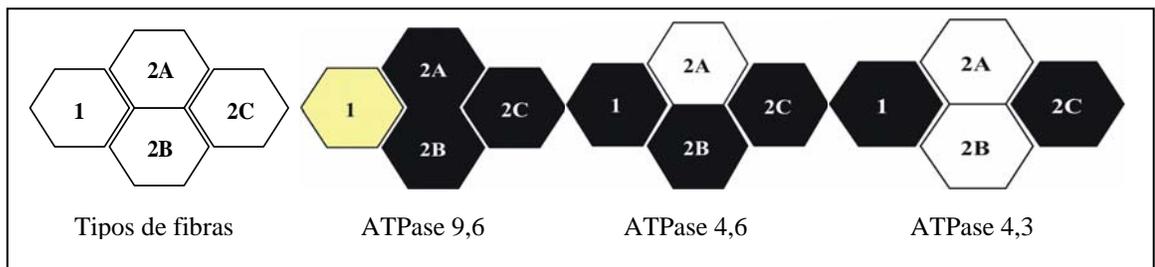


Figura 4 – Tipos de fibras musculares observadas com o auxílio da histoquímica (GRAHAM et al., 1997).

Tabela 1- Biópsia Muscular: Classificação das Fibras Musculares (WILMORE, 2001)

Sistema 1 Sistema 2 Sistema 3 (CARACTERÍSTICAS)	Contração lenta Tipo I OL	Contração rápida a Tipo IIa GOR	Contração rápida b Tipo IIb GR
Capacidade oxidativa	Alta	Moderadamente alta	Baixa
Capacidade glicolítica	Baixa	Alta	A mais alta
Velocidade contrátil	Lenta	Rápida	Rápida
Resistência à fadiga	Alta	Moderada	Baixa
Força da unidade motora	Baixa	Alta	Alta

OL(oxidativa lenta); GOR (glicolítica-oxidativa rápida); GR (glicolítica rápida)

Tabela 2 – Biópsia Muscular: Características estruturais e funcionais (CLOSE, 1967)

Características (C)	CL	CRA	CRb
Fibras por motoneurônio	10-180	300-800	300-800
Tamanho do motoneurônio	Pequeno	Grande	Grande
Velocidade de condução nervosa	Lenta	Rápida	Rápida
Velocidade de contração (ms)	110	50	50
Tipo de Miosina ATPase	Lenta	Rápida	Rápida
Desenvolvimento do retículo	Baixo	Alto	Alto
Força da unidade motora	Baixa	Alta	Alta
Capacidade aeróbia (oxidativa)	Alta	Moderada	Baixa
Capacidade anaeróbia (glicolítica)	Baixa	Alta	Alta

CL (característica fibra lenta); CRA (característica fibra rápida a); CRb (caracter. fibra rápida b)

Os tipos de fibras musculares são determinados pelo motoneurônio. Uma unidade motora consiste de um simples motoneurônio, e as fibras musculares que ele supre (CUMMING, 1994). Desta forma, as fibras musculares em cada unidade motora são todas do mesmo tipo. Na maioria dos músculos, existem dois tipos de unidade motora que podem ser divididas em: tipo I ou de contração lenta e tipo II ou de contração rápida. Os músculos que têm uma predominância de fibras de contração lenta são vermelhos devido à presença de grande quantidade mioglobina, enquanto os músculos de contração rápida são brancos (GRAHAM et al., 1997).

Existem muitos fatores que determinam a velocidade de contração das fibras musculares individuais. O maior deles resume-se nas isoformas particulares das proteínas contráteis, actina e miosina, e suas proteínas reguladoras associadas. Diferentes isoformas de miosina ocorrem em fibras musculares rápidas e lentas, assim como nos músculos na idade fetal e neonatal. Visto que a atividade ATPase da miosina lenta é menor do que a da miosina rápida, os tipos de fibras musculares podem ser reconhecidas pelo método ATPase à pH 9,6. Um grande fator que determina a velocidade de contração, é a velocidade de relaxamento, que é controlada pela taxa de recaptção de cálcio no retículo sarcoplasmático. Fibras tipo II rápidas têm retículo sarcoplasmático mais extenso do que as fibras tipo I lentas (EISENBERG; KUDA, 1976) e fibras tipo II são mais ricas em Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase que é a responsável pela recaptção do cálcio; desta forma, o relaxamento das fibras tipo II é mais rápido do que as fibras tipo I (PETTE; VRBOVÁ, 1985).

O consumo de energia das fibras musculares lentas e rápidas é refletido nos métodos histoquímicos. As fibras de contração rápida contam somente com a glicólise (glicolítica rápida ou fibras tipo IIb) ou em combinação com mecanismos oxidativos (oxidativa-glicolítica rápida ou fibras tipo IIa). Fibras tipo I de contração lenta contam com os mecanismos oxidativos para a geração de energia, contém mais mitocôndrias e um grande grau de vascularização do que as fibras tipo II (EISENBERG; KUDA, 1976). A combinação de metabolismo oxidativo e glicolítico nas fibras tipo IIa permite mais tensão de sustentação (fibras resistentes à fadiga), enquanto as fibras tipo IIb, utilizando apenas caminhos glicolíticos, são rapidamente fatigadas. Fibras tipo I são mais ricas em mitocôndrias e triglicerídeos: elas contêm menos glicogênio e enzimas (monofosforilase e fosfofrutoquinase) que estão associadas com o metabolismo do glicogênio e são mais pobres em ATPase que as fibras tipo II. Inversamente, fibras tipo II são ricas em

glicogênio, miofosforilase, fosfofrutoquinase e ATPase, mas apresentam menos mitocôndrias e triglicerídeos que as fibras tipo I (GRAHAM et al., 1997).

A proporção dos tipos de fibras musculares varia de acordo com o tipo de músculo em indivíduos adultos normais (**Tabela 3**). No músculo bíceps braquial e quadríceps femoral, fibras dos tipos I, IIa e IIb comportam cada uma 33% da população de fibras. No deltóide, entretanto, essa proporção difere entre partes superficiais e profundas (DUBOWITZ; BROOKE, 1985). Nas crianças, fibras tipo I e tipo II estão em proporções iguais (BROOKE; ENGEL, 1969) e o diâmetro principal da fibra varia com a idade e o treinamento atlético. O tamanho da fibra muscular é estimado pela medida do diâmetro menor e está compreendido entre 40 e 80 μm para o homem e entre 30 e 70 μm para a mulher.

Tabela 3 – Diâmetros menores médios e proporções médias das fibras musculares do vasto lateral de humanos adultos normais (BROOKE; ENGEL, 1969)

Classificação conforme o sexo	HOMEM		MULHER	
	Diâmetro (μm)	Proporção (%)	Diâmetro (μm)	Proporção (%)
I	61	36	53	39
IIa	69	24	52	29
IIb	62	40	42	32

2. JUSTIFICATIVA

Sendo as distrofias musculares componentes de um grupo de doenças muito heterogêneo, não só devido ao número delas, mais de 60 tipos e subtipos, assim como devido à dificuldade que os profissionais encontram para distinguí-las; a distrofia muscular progressiva de Duchenne (DMD), de herança recessiva ligada ao cromossomo X, é a mais comum, com incidência de um caso em cada 3.000 nascidos vivos do sexo masculino. Logo, a indicação da biópsia muscular tem, um papel importante, pois, busca fornecer ao médico um diagnóstico mais rápido, possibilitando o início mais precoce do tratamento, desta forma atenuando os sintomas e conferindo uma condição de vida melhor para aqueles portadores dessa doença, cujo prognóstico sombrio pode levar ao óbito rapidamente. Hoje em dia, a indicação não só da biópsia muscular, mas, a implementação das análises histoquímica e morfométrica como ferramentas no auxílio do diagnóstico da distrofia de Duchenne, podem ajudar em muito na compreensão das alterações características dos tipos de fibras acometidos no desenvolvimento dessa doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Analisar através de métodos histoquímico e morfométrico a predominância dos tipos de fibras musculares estriadas esqueléticas em pacientes com distrofia muscular de Duchenne.

3.2. Específicos

3.2.1. Caracterizar histoquimicamente a atrofia das fibras musculares estriadas esqueléticas nos pacientes com diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne.

3.2.2. Determinar os parâmetros morfométricos (área e diâmetro) das fibras musculares afetadas dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne.

3.2.3. Comparar os diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne com aqueles citados na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Planejamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal do tipo descritivo com relação à análise histoquímica e morfométrica das biópsias musculares de cinco pacientes, do sexo masculino, com faixa etária de 13 a 15 anos e diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne.

4.2. Casuística

Biópsias musculares foram coletadas de cinco pacientes, do sexo masculino, com faixa etária de 13 a 15 anos e diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne, no Setor de Neuropatologia do Hospital das Clínicas do Rio de Janeiro, no período de agosto de 2004 a junho de 2005.

As informações obtidas dos pacientes foram de acordo com as considerações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da CCS/UFPE (ANEXO 1), conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo tratadas rigorosamente com confidencialidade.

4.3. Biópsia muscular

A seleção do músculo a ser biopsiado, baseou-se na história clínica dos pacientes investigados considerando a distribuição da fraqueza muscular. A coleta do material foi realizada por biópsia aberta, sob anestesia local, sem infiltração anestésica do músculo a ser retirado.

Um fragmento de aproximadamente dois centímetros de comprimento da porção média do músculo vastus lateralis direito foi obtido de cada paciente (12 a 16 cm acima da patela) e em seguida transportado em gaze umedecida com solução salina (fisiológica) dentro de uma caixa de isopor com gelo, ao Setor de Neuropatologia do Hospital das Clínicas do Rio de Janeiro, percurso este realizado no máximo em 30 minutos. Cada fragmento foi seccionado em duas partes de dimensões semelhantes, para que fosse destinado um para o diagnóstico morfológico e o outro para o estudo morfométrico (estabelecendo-se o fragmento da direita do médico para o diagnóstico e o da esquerda para a morfometria). O fragmento destinado ao estudo histoquímico/morfométrico foi disposto sobre placa de cortiça, sendo posicionado de tal forma, que o seu maior diâmetro (sentido das fibras musculares) fosse mantido perpendicular à cortiça para obtenção de cortes transversais. Após este procedimento, o fragmento foi coberto com talco (a peça completa), o qual funciona como isolante térmico; logo em seguida, o fragmento foi imerso em nitrogênio líquido (-181° C) por 20 a 25 segundos, sendo então retirado e guardado num freezer a -80oC, em frasco numerado, para depois ser seccionado no criostato (Leica) à -20° C. Os cortes obtidos foram de $\pm 10 \mu\text{m}$ de espessura. Esses foram iniciados, padronizando-se o lado em que o músculo foi cortado pela navalha, no momento em que o fragmento foi dividido em duas partes, desprezando-se assim, os três primeiros cortes para eliminar qualquer interferência que tenha ocorrido pelo corte da navalha.

Cortes seqüenciais foram feitos de acordo com o seguinte protocolo: os primeiros fragmentos de cada preparação foram pré-incubados com as referidas ATPases (9,6; 4,6 e 4,3) perfazendo-se, desta forma, um conjunto de três preparações para cada paciente. Os fragmentos, de acordo com a ATPase escolhida, foram acolados às lâminas de forma

sucessiva, até completar um total de seis fragmentos por preparação, sendo os mesmos dispostos, lado a lado, em lâminas com tarjas foscas; onde o primeiro fragmento foi sempre colocado como referencial, próximo a parte fosca.

4.4. Análise histoquímica

A caracterização das fibras musculares em tipo I e tipo II dos pacientes com diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne foi possível através da análise histoquímica utilizando-se a enzima adenosina trifosfatase (método de BROOKE; KAISER, 1970) pré-incubada em meio alcalino como pH 9,6 (ATPase 9,6) e meios ácidos: pH 4,6 (ATPase 4,6) e pH 4,3 (ATPase 4,3). A análise qualitativa de cada grupo permitiu a distinção dos diferentes tipos de fibras. A intensidade de coloração foi avaliada de forma subjetiva (fibras claras – tipo I ou fibras escuras – tipo II). Essas preparações foram avaliadas quanto ao estudo morfométrico, para uma maior compreensão dos tipos de fibras musculares comprometidas.

4.5. Análise morfométrica

A análise morfométrica das fibras musculares foi realizada por intermédio de um sistema de captação de imagens semi-automático composto dos seguintes instrumentos: Um microscópio ZEISS (modelo AXIOLAB) tendo, acoplada a este uma câmera digital (Sony, Japan), conectada a um computador Pentium III 2.0; com placa de captura de imagens (ATI) e software (IMAGE – LAB 2000), pertencente ao setor de Histologia e Análise de Imagens do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia – C.C.S./UFPE.

Foram analisadas três preparações coradas pelo método histoquímico (ATPases 9,6; 4,6 e 4,3) de cada paciente, sendo que cada preparação apresentava seis fragmentos e de cada fragmento foram analisados cinco campos e contadas três fibras por campo, totalizando 90 fibras por preparação.

Os parâmetros analisados foram os seguintes: área (A) e diâmetro menor (d). Além desses, a frequência relativa por tipo de fibra muscular (I, IIa e IIb), foi obtida pela análise do tecido marcado com ATPase 4,6 no aumento de 100X, através da contagem de aproximadamente 560 fibras por paciente, perfazendo-se um total de aproximadamente 2800 fibras no conjunto dos cinco pacientes estudados.

A morfometria da área (A) e do diâmetro menor (d) das fibras musculares tipo I, foram realizadas pela ATPase 9,6, as fibras tipo IIa pela ATPase 4,6 e as fibras tipo IIb pela ATPase 4,3. Tanto a área como o diâmetro menor das fibras musculares foram analisados no aumento de 200X.

4.6. Análise estatística

A análise estatística constou da distribuição de frequência das fibras tipo I, IIa e IIb e de medidas descritivas para indicar os valores médios e a variabilidade dos dados encontrados. Assim, os resultados obtidos foram expressos na forma de média, desvio-padrão, mediana e valores mínimo e máximo; bem como de frequências relativa e absoluta (%).

5. RESULTADOS

A análise histoquímica da biópsia muscular de cada um dos cinco pacientes, com diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne demonstrou através da observação microscópica peculiaridades como irregularidade no diâmetro das fibras, sem fluxo de células inflamatórias.

A análise qualitativa de cada grupo de fibras permitiu a distinção dos diferentes tipos. As fibras dos tipos I e II foram identificadas pela natureza da ATPase de sua miosina, que diferiram pela estrutura protéica entre os demais tipos de fibras (**Figura 5: A, B e C**).

Na figura 5A observamos de forma objetiva a intensidade de coloração, que nos permitiu classificar as fibras musculares em tipo I ou fibras claras e tipo II ou fibras escuras, pela técnica histoquímica das ATPases, pré-incubadas em pH alcalino (9,6). As fibras do tipo IIa e IIb foram caracterizadas quando pré-incubadas em meios ácidos (pH = 4,6 e pH = 4,3, respectivamente), como podemos observar na figura 5 (B e C).

Essas preparações foram avaliadas quanto ao estudo morfométrico, para uma maior compreensão das características inerentes aos tipos de fibras musculares comprometidas nesses pacientes. Os parâmetros analisados no estudo em questão foram a área, o diâmetro menor e a porcentagem de fibras musculares do músculo vastus lateralis direito dos pacientes clinicamente diagnosticados com distrofia muscular de Duchenne.

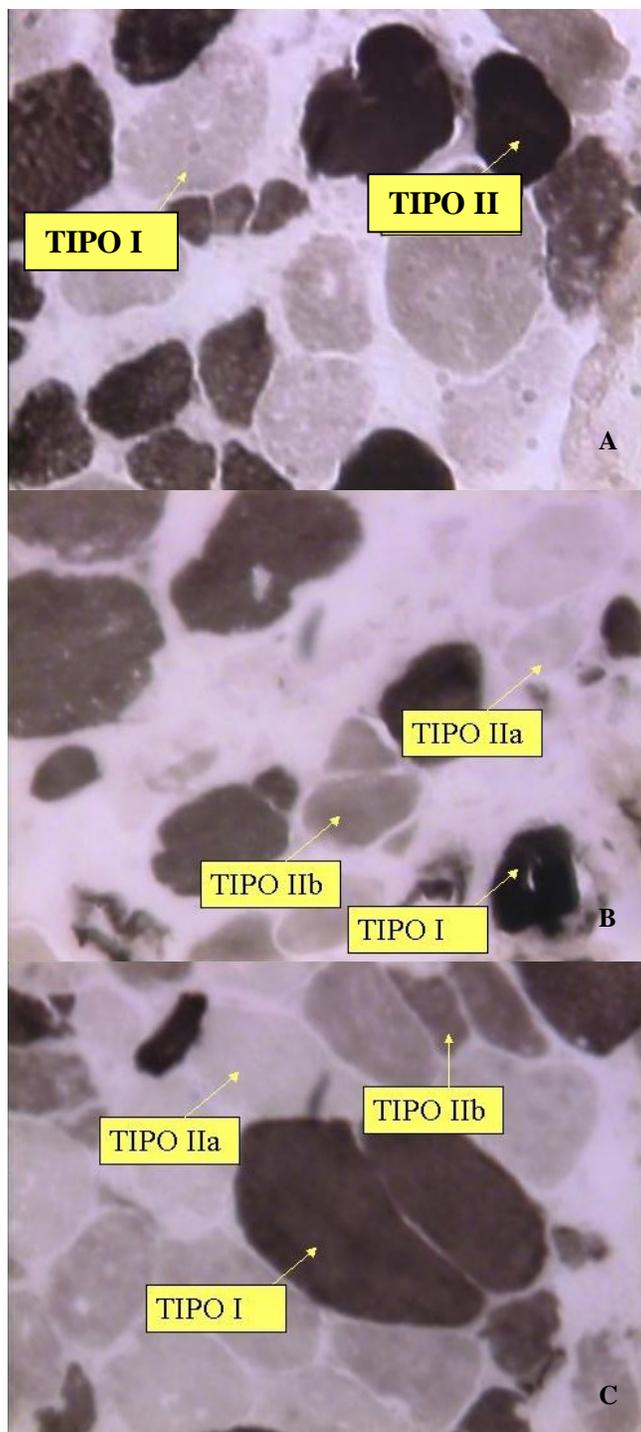


Figura 5 – Fotomicrografias do músculo vastus lateralis direito de paciente com distrofia muscular de Duchenne (DMD), coradas pela técnica histoquímica das ATPases, onde observamos os diferentes tipos de fibras (I, IIa e IIb). A) pH= 9,6, B) pH= 4,6 e C) pH= 4,3. Aumento de 200X.

A área total das fibras tipo I, dos cinco pacientes estudados, foi maior que aquela observada para as fibras do tipo IIb, e esta maior que a área total para as fibras IIa ($1107,6 \pm 825,3 \mu\text{m}^2$, $1016,9 \pm 679,7 \mu\text{m}^2$ e $964,0 \pm 626,0 \mu\text{m}^2$, respectivamente) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Área total dos tipos de fibra muscular de cinco pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Valores ($\bar{X} \pm dp$) da área (μm^2) das fibras tipo I, IIa e IIb, da região medial do músculo vastus lateral direito

Fibras	Área total em μm^2 ($\bar{X} \pm dp$)	Mediana	Mínimo	Máximo
Tipo I	$1107,6 + 825,3$	863,0	165,1	6016,1
Tipo IIa	$964,0 + 626,0$	849,8	91,8	3514,9
Tipo IIb	$1016,9 + 679,7$	884,9	110,6	4673,3

O diâmetro total das fibras tipo I, dos cinco pacientes estudados, foi maior que aquele observado para as fibras tipo IIb, e este último foi maior quando comparado as fibras tipo IIa ($30,7 + 10,7 \mu\text{m}$, $29,7 + 9,8 \mu\text{m}$ e $28,9 + 10,9 \mu\text{m}$, respectivamente) (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Diâmetro total dos tipos de fibra muscular de cinco pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Valores ($\bar{X} \pm dp$) do diâmetro menor (μm) de fibras tipo I, IIa e IIb da região medial do músculo vastus lateralis direito

Fibras	Diâmetro total em μm ($\bar{X} \pm dp$)	Mediana	Mínimo	Máximo
Tipo I	$30,7 + 10,7$	28,5	10,5	69,3
Tipo IIa	$28,9 + 10,9$	28,5	8,8	62,7
Tipo IIb	$29,7 + 9,8$	28,6	8,3	72,0

A análise da frequência absoluta das fibras musculares dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne revelou os seguintes percentuais: fibras tipo I (63,08 %), fibras tipo IIa (21,66 %) e para as fibras do tipo IIb (15,25 %) (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Frequência relativa (%) e absoluta de fibras dos tipos I, IIa e IIb da região medial do músculo vastus lateralis direito dos pacientes afetados

Fibras musculares	n	%
Tipo I	1762	63,08
Tipo IIa	605	21,66
Tipo IIb	426	15,26
Total	2793	100,00

n= número de fibras musculares

Em 80% dos pacientes as fibras tipo I são observadas em maior número que as fibras tipo IIa, e estas, por sua vez, em maior número que as fibras do tipo IIb. A frequência relativa (%) dessas fibras foram, respectivamente, as seguintes: a) paciente (1) com 59,31%, 21,31% e 19,37%; b) paciente (2) com 51,26%, 31,77% e 16,97%; c) paciente (3) com 62,74%, 23,53% e 13,72%; d) paciente (4) com 42,91%, 38,33% e 18,75%. Entretanto, em 20% dos casos (paciente 5) as fibras tipo IIb (10,59%) apresentaram-se em maior número que as do tipo IIa (9,05%); porém, manteve-se a predominância de fibras tipo I (80,35%) (Figura 6).

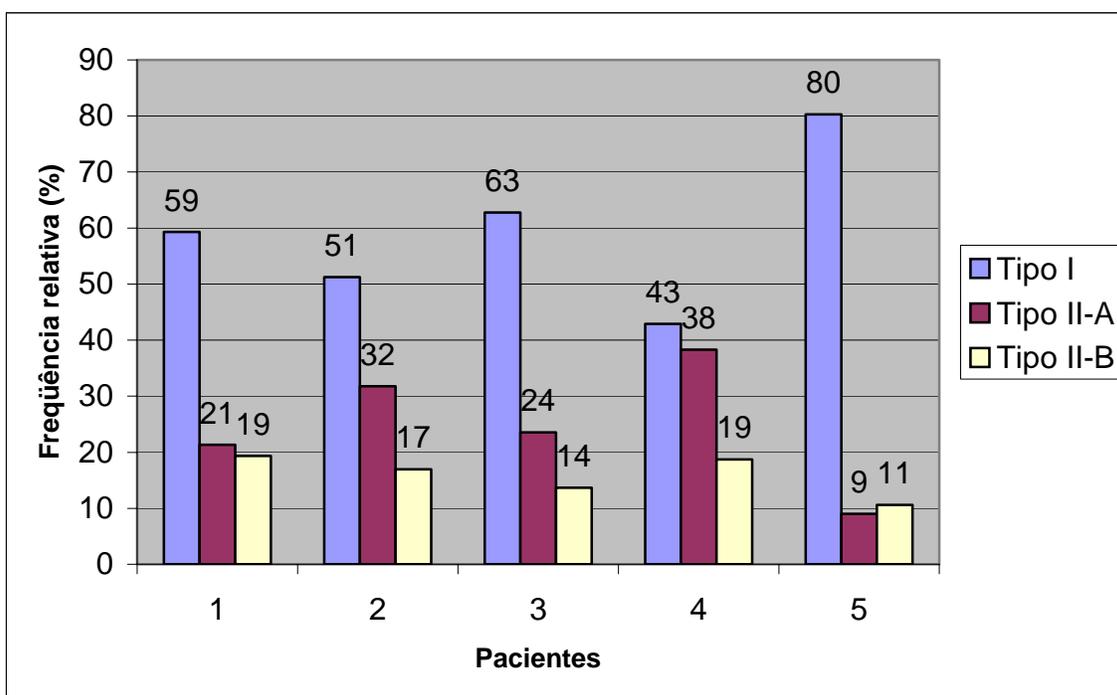


Figura 6- Frequência relativa (%) das fibras musculares (tipos I, IIa e IIb), de cada paciente avaliado nesta pesquisa com distrofia de Duchenne. Valores percentuais discriminados acima de cada coluna.

6. DISCUSSÃO

As distrofias musculares progressivas constituem um grupo de doenças, caracterizadas por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética, e que tem sido objetivo de muitas pesquisas. Neste estudo, verificou-se através da análise histoquímica e morfométrica, que os cinco pacientes com distrofia muscular de Duchenne, apresentaram alterações características de acordo com os achados da literatura.

Toop e Emery (1974) relataram que na maioria das biopsias musculares dos pacientes com distrofia de Duchenne, havia uma predominância das fibras musculares do tipo I; por outro lado, as fibras tipo IIb apresentavam-se como as mais afetadas, na maioria das vezes, predominando em menos de 15% entre as fibras existentes. Em nossa casuística observamos que as fibras musculares do tipo IIb foram as mais afetadas percentualmente em quase todos os pacientes, corroborando com os achados mencionados na literatura; com exceção de um paciente, que apresentou valores percentuais elevados das fibras do tipo IIb com relação ao tipo IIa, sugerindo-se ter ocorrido influência genética e/ou procedimentos fisioterápicos iniciados precocemente com a instalação do quadro, para retardar a evolução da doença.

Estudos realizados por Donner et al. (1975) revelaram alterações histológicas comuns a todos os tipos de distrofia muscular como perda de fibras musculares, fibras residuais de tamanho maior ou menor que o normal, todas num arranjo aleatório, bem como aumento de lipócitos e fibrose. Em nosso estudo ficou evidente a perda de fibras musculares, assim como a variação de tamanho (diâmetro menor) dessas fibras e presença de fibras residuais.

Ao longo das investigações, alguns estudos demonstraram uma classificação para os diâmetros menores das fibras musculares esqueléticas, considerado-os normais com relação à idade; todavia estabeleceu-se que a partir dos 13 anos de vida, nenhuma alteração desse parâmetro ocorreria em função da idade (BROOKE; ENGEL, 1969; DONNER; RAPOLA; SOMMER, 1975). Nossa avaliação corrobora com a investigação desses autores; uma vez que, foram acompanhados cinco pacientes na faixa etária de 13 a 15 anos, com alterações substanciais dos diâmetros menores em função dos tipos de fibra muscular.

Dubowitz e Brooke (1985) relataram que a predominância das fibras musculares tipo I estaria associada com condições miopáticas e particularmente com distrofias geneticamente determinadas, e que a predominância das fibras musculares tipo II estaria associada com doenças do neurônio motor. Em nossa pesquisa observamos que as fibras musculares tipo I apresentaram valores percentuais maiores que aqueles referidos para os tipos IIa e IIb em todos os pacientes; além disso, as fibras musculares tipo I apresentaram diâmetro e área maiores que as fibras tipo IIa e IIb, porém, com valores muito próximos.

Os achados histológicos referidos por Dubowitz e Brooke (1985) para a DMD foram o aparecimento de degeneração e fagocitose, variação do tamanho das fibras, proliferação do tecido conjuntivo do endomísio e do perimísio e basofilia; assim como nos estágios avançados apresentava infiltração adiposa. Este mesmo autor referiu ainda, que a principal alteração observada neste tipo de doença é a grande variabilidade do tamanho de todos os tipos de fibras musculares, estando nossos achados de acordo com essa observação.

Simoneau e Bouchard (1989) demonstraram os valores percentuais de fibras musculares do vastus lateralis e de suas respectivas áreas, a partir de um estudo com 215

indivíduos do sexo masculino, caucasianos da América do Norte e sem nenhuma sintomatologia, com idade de 16 a 33 anos.

Nesta mesma linha de pensamento, Emery em 1993 demonstrou em função da frequência dos tipos de fibras musculares (I, IIa e IIb), que o tipo de fibra predominante representaria aquele que apareceria numa proporção maior que 55% em relação ao total de fibras existentes. Nossos resultados revelaram uma frequência absoluta de 63,08% especialmente para as fibras tipo I, de acordo com aqueles referidos na literatura.

Graham et al. (1997) verificaram em suas avaliações, também, com pacientes normais que, ao dividir as fibras em tipos I e II, uma proporção percentual (1:2) era observada com relação a essas fibras, respectivamente. Todavia, quando as mesmas eram divididas em I, IIa e IIb, denotava-se uma proporção (1:3) para cada tipo de fibra analisada.

De certa forma, a variação no tamanho das fibras musculares observadas com o auxílio da biópsia muscular constituiu um importante achado nos casos de distrofia muscular e um dado relevante que ajudou na confrontação com outros tipos de distrofias.

Em nossa análise foram utilizados fragmentos do músculo vastus lateralis em todas as biópsias realizadas. Segundo alguns autores o aumento das panturrilhas e de outros determinados músculos é progressivo nos estágios iniciais da doença, porém a maioria dos músculos, mesmo os pseudo-hipertrofiados de início, acaba diminuindo de tamanho; apenas os gastrocnêmios e, em menor extensão, os vastus lateralis e deltóides continuam grandes, peculiaridade que pode chamar atenção antes que a fraqueza se evidencie (ADAMS; VICTOR; ROPPER, 1997; ZATZ, 2002).

Neste trabalho, reforçamos os achados da análise do tecido marcado com ATPase 4,6, onde as fibras musculares esqueléticas do tipo I apresentaram diâmetro menor e área

maiores que aqueles observados para as fibras tipo IIa e IIb, porém sempre com valores muito próximos. Estes eventos, que comumente ocorrem para um tecido específico, são gerados por uma diversidade protéica e podem envolver mecanismos regulatórios de expressão gênica (MUTONI; TORELLI; FERLINI, 2003).

Na mesma linha de observação, verificamos que as fibras musculares do tipo IIb apresentaram o diâmetro menor e a área aumentados com relação as fibras do tipo IIa, porém, as fibras do tipo IIb são as mais afetadas nessa doença e onde o processo de proliferação adiposa foi mais proeminente. Alguns autores abordam sobre os ciclos de necrose e reparo que ocorrem nos músculos distróficos, culminando com a destruição das fibras musculares e substituição adiposa (KAPSA, KORNBERG, BYRNE, 2003).

No contexto geral, o diâmetro menor e a área das fibras musculares esqueléticas do vastus lateralis de todos os pacientes acompanhados, apresentaram-se menores que os resultados encontrados na literatura para pessoas normais, repercutindo na qualidade de vida dos pacientes afetados (ADAMS; VICTOR; ROPPER, 1997; PICCININNI; FALSINI; PIZZI, 2004)).

A biópsia muscular, mesmo sendo, considerada um exame invasivo, deve ser indicada se não for encontrada a deleção no gene da distrofina, se não houver história familiar ou em crianças que são casos isolados, nas fases iniciais, para um diagnóstico diferencial entre DMD e DMB (ZATS, 2002; MUNTONI; TORELLI; FERLINE, 2003; DAY et al., 2005).

7. CONCLUSÕES

- A análise histoquímica possibilitou a caracterização de três tipos de fibras: I, IIa e IIb.
- As fibras musculares tipo IIa foram as mais acometidas com relação aos parâmetros morfométricos (diâmetro menor e a área total).
- As fibras musculares tipo IIb foram percentualmente as mais acometidas com relação as demais fibras estudadas.
- As fibras musculares do tipo I foram predominantes em todos os pacientes estudados.
- A histoquímica e a morfometria demonstraram ser ferramentas importantes no auxílio do diagnóstico deste tipo de doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.D. **Muscular Dystrophies**. In: Diseases of Muscle. 3ª ed., Maryland USA: Harper & Row Publishers, 1975, p. 268-315.

ADAMS, R.D.; VICTOR, M.; ROPPER, A.H. Distrofias Musculares. In: **Neurologia**. 6ª ed., Chile: McGraw-Hill Interamericana, 1997, p. 927-938.

ANDERSON, W.A.D.; KISSANE, J. M. **Patologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, v. 2, p. 1685-1700.

BELL, C. **The Nervous System of the Human Body**. Second edition. London: Longman, 1830.

BROOKE MH, ENGEL WK. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types: four childrens biopsies. **Neurology**; v. 19, p. 591-605, 1969.

BROOKE, M. H. & KAISER, K. K. Muscle Fibre Types: how many and what kind? **Archives of Neurology** (Chicago), v. 23, p. 369 – 379, 1970.

BROWN RHJ, HOFFMAN EP. Molecular biology of Duchenne muscular dystrophy. **Trends in Neurol Sci.**, v. 1988; v. 11, p. 450–54, 1988.

CIACCIO, G. V. La découverte des muscles blancs et des muscles rouges, chez la laplin, revendiquée en faveur de S. Lorenzini. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 30, p. 287, 1898.

CLOSE, R. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. **Journal of Physiology**. London, 1967, 193, p. 45-55.

CUMMING W. J. K., FULTHORPE J., HADGSON P., MAHON M. **Color Atlas of muscle pathology**. London: Mosby-Wolfe, 1994.

COHEN, C. The protein switch of muscle contraction. **Sci. Am.**, v. 233, p. 36, 1975.

DAVID I. GRAHAM, et al. **Greenfield's Neuropathology**. 6^a ed. EUA ou Inglaterra: Arnold, 1997, p. 489-571.

DAVIES, K.E. Dystrophin-associated proteins and muscular dystrophies. **Sci & Med.**, v.8, n.6, p.308, 2002.

DAY, J.W.; RANUM, L.P.W. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies, **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 5-16, 2005.

DONNER, M.; RAPOLA, J.; SOMMER, H. Congenital muscular dystrophy: A clinico-pathological and follow-up study of 13 patients. **Neuropediatrie**, v. 6, p. 239, 1975.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. **Muscle Biopsy: A Modern Approach**, 1st edn. London: Philadelphia & Toronto: W. B. Saunders, 1973.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. **Muscle Biopsy: A Practical Approach**, 2nd edn. London. Philadelphia & Toronto: W. B. Saunders, 1985.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. E. Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. **Nature** (London), v.185, p. 701, 1960a

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. E. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochemie**, v. 2, p. 105, 1960b.

DUCHENNE, G.B. Recherches sur le paralysie musculaires pseudohypertrophique ou paralysie myosclerotique. **Arch. Gen. Med.**, n. 6, v.11, pp. 5, 179, 305, 421, 552, 1868.

DUCHENNE, G.B. **De l'Electrisation Localise et son Application a la Pathologie et a la therapeutique**. 3a ed., Paris: Bailliere, 1872.

EISENBERG, B.R.; KUDA, A.M. Discrimination between fiber populations in mammalian skeletal muscle using ultrastructural parameters. **J Ultrastruct Res**, v. 54, p. 76-88, 1976.

EMERY, A.E.H. **Duchenne muscular dystrophy** (2a ed.). Oxford and New York: University Press, 1993, p. 25-45.

GOWERS, W.R. Pseudo-hypertrophic Muscular Paralysis. In: **A Clinical Lecture**. London: Churchill, 1879.

GROUND, M.D. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. **Ann NY Acad Sci.**, v. 854, p. 78, 1998.

GUTMANN DH, FISCHBECK KH. Molecular biology of Duchenne and Becker's muscular dystrophy: clinical applications. **Ann Neurol.**, v. 26, p. 189–94, 1989.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.; KUNKEL, L.H. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v.51, p. 919-928, 1987.

HOFFMAN, E.P. et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, p. 1.363-1.368, 1988.

JAY V, BECKER LE, ACKERLEY C, RAY P. Dystrophin analysis in the diagnosis of childhood muscular dystrophy: an immunohistochemical study of 75 cases. **Pediatr. Pathol.**, v. 13, p. 635–57, 1993.

JAY V, VAJSAR J. The Distrophy of Duchenne. Toronto: The Divisions of Pathology and Neurology, **Lancet**; Feb, n. 17, v. 357, p. 550–552, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Muscular In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9ª ed., 1999, p. 159-178.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Muscular. In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª ed., 2004, p. 184-205.

KAPSA, R.; KORNBERG, A.J.; BYRNE, E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Lancet Neurol.**, v. 2, p. 299-310, 2003.

KOENIG, M. et al. Complete cloning of Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, v. 50, p. 509-517, 1987.

KOENIG, M.; BEGGS, A. H.; MOYER, M.; SCHERPF, S. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 45, p. 498-506, 1989.

KUNKEL, L.M.; BEGGS, A.H.; HOFFMAN, E.P. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy: emphasis on improved diagnosis. **Clin. Chem.**, v. 35, n. 7, p. B21-B24, 1989.

LEVY, J.A. **Doenças Musculares – estudo clínico e diagnóstico**. 1ª reimpressão Rio de Janeiro – São Paulo: Livraria Atheneu, 1984.

MANDEL, J.L. Dystrophin: the gene and its product. **Nature**; v. 339, p. 584-586, 1989.

MANOLE, E. The dystrophin gene and its product: a view. **Rom. J. Neurol. Psychiatry**; v. 33, p. 109-119, 1995.

MERYON, E. On glandular and fatty degeneration of voluntary muscles. **Med. Chir. Trans.**, v. 35, p. 73-84, 1852.

MERYON, E. **Practical and Pathological Researches on various Forms of Paralysis**. London: Churchill, 1864, p. 200-215.

MONACO et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of DMD locus. **Genomics**, v. 2, p. 90-95, 1988.

MUNTONI, S.T.; FERNILI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **Lancet Neurol.**, v. 2, p. 731-740, 2003.

PARTRIDGE. Fatty degeneration of voluntary muscles. **Trans Pathol Soc Lond.**, v. 1, p. 334, 1847.

PEARSON, C.M. Serum enzymes in muscular dystrophy and certain other muscular and neuromuscular diseases. I. Serum glutamic oxalacetic transaminase. **N. Engl. J. Med.**, v. 256, p. 1069-1075, 1967.

PETTE D, VRBOVÁ G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. **Muscle and Nerve**, v. 8, p. 676-89, 1985.

PICCININNI, M.; FALSINI, C.; PIZZI, A. Quality of life in hereditary neuromuscular disease. **Acta Neurol Scand.**, v. 109, p. 113-119, 2004.

POORE GV. **Selections from the clinical works of Dr Duchenne** (de Boulogne). London: The New Sydenham Society, 1883.

RAPAPORT D. Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a e cf23a in Duchenne muscular dystrophy. **Am. J. Med. Genet.**, v. 39, p. 437- 441, 1991.

RAPAPORT D et al. A deletion including the brain promoter of the Duchenne muscular dystrophy gene is not associated with mental retardation. **Neuromuscular Disorders** v. 2, p.117-120, 1992.

ROBERT, K.; KORNBERG, A. J.; BYRNE, E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Lancet Neurol.**, v. 2, p. 299-310, 2003.

ROSE. S.J.; ROTHSTEIN, J.M. Muscle Biology and physical therapy. **Phys Ther, Albany**, v. 62, n. 12, p. 1-6, 1982.

SILVA, E. C. Aspectos biomecânicos musculares relacionados à administração experimental de corticosteróide sistêmico. Dissertação apresentada ao Mestrado de Bioengenharia da USP. Ribeirão Preto, 2002.

SIMONEAU, J.A.; C. BOUCHARD. Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. **Am. J. Physiol.** 257 (Endocrinol. Metab. 20): E567-E572, 1989.

SIRONI, M. et al. Transcriptional activation of the non-muscle, full-length dystrophin isoforms in Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. **J. Neurol. Science**; v. 186, p. 51-57, 2001.

TOOP, J.; EMERY, A.E.H. Muscle histology in fetuses at risk for Duchenne muscular dystrophy. **Clinical Genetics**, 5, 230, 1974.

VIERK, J. et al. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biol. Intl.**, v. 24, p. 263, 2000.

WILMORE J. H., COSTILL D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2001, p. 39-40.

WORTON R. Muscular dystrophies: diseases of the dystrophinglycoprotein complex. **Science**; 270: 755-56, 1995.

ZATS, M.; FROTA-PESSOA, O.; LEVY, J.A.; PERES, E.A. Creatine-phosphokinase (CPK) activity in relatives of patients with X-linked muscular dystrophies: a Brazilian study. **J. Genet. Hum.**, v. 24, n. 2, p. 153-168, 1976.

ZATZ M, VIANNA-MORGANTE AM, CAMPOS P & DIAMENT AJ. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localization of the DMD locus. **J. Med. Genet.**, v. 18, n. 6, p. 442-447, 1981.

ZATS, M. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e prevenção das doenças hereditárias. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 85-99, 2002.

* De acordo com NBR 6023 e NBR 10520 da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002

9. ANEXOS

CAVALCANTI, G.M. Análise histoquímica e morfométrica de fibras musculares...



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 377/2004-CEP/CCS/UFPE

Recife, 04 de agosto de 2004

Ref. Protocolo de Pesquisa N°179/2004 - CEP/CCS/UFPE

Intitulado: "Caracterização das Distrofias Musculares por Estudo Enzimático através de Amostras Obtidas por Biópsia"

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE analisou, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 04 de agosto de 2004.

Ressaltamos que ao pesquisador responsável deverá apresentar relatório, em 20/12/2005

Atenciosamente,


Prof. Fernando José Lins de Azevedo
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa - CEP/CCS/UFPE

Ào
Sr. George Maciel Cavalcanti
Coord. Pós-graduação em Anatomia Patologica CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: (81) 2126. 8588; cepccs@ufpe.br