

Natália da Costa Pinheiro; Maria Julia Marques ;Samara Camaçari de Carvalho; Cíntia Yuri Matsumara; Ana Paula Tiemi Taniguti.

Contato: pinheiro8908@gmail.com

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA, BIOLOGIA CELULAR E FISIOLOGIA E BIOFÍSICA, IB, UNICAMP, CAMPINAS/SP

Apoio financeiro:   

Palavras Chave: Distrofia muscular de Duchenne - quadríceps - regeneração/ degeneração muscular - camundongo *mdx*

INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum das distrofinopatias, acometendo uma em cada 3500 crianças nascidas vivas do sexo masculino (ENGEL et al., 1994). A DMD é causada por mutação no gene responsável pela expressão da proteína distrofina, cuja ausência em fibras musculares provoca instabilidade no sarcolema e degeneração muscular progressiva (GROUNDS et al., 2005). Pacientes com DMD apresentam perda progressiva da força muscular e vão a óbito por insuficiência cardiorrespiratória na segunda década de vida (ENGEL et al., 1994). Inúmeros estudos utilizam o músculo quadríceps do camundongo *mdx* por ser um dos mais susceptíveis a mionecrose (PUTTEN et al., 2010). No presente projeto padronizamos a técnica de retirada e congelamento do músculo quadríceps, após realizar estudos histopatológicos, garantido melhor fixação do material e qualidade de resultados. Também padronizamos a técnica da grade invertida para avaliação da força muscular dos camundongos *mdx*.

OBJETIVOS

1. Padronizar a técnica da “grade invertida” para avaliação da força dos membros anteriores e posteriores dos animais *mdx*.
2. Realizar análise histopatológica comparativa das diferentes partes do músculo quadríceps, quanto à degeneração muscular, regeneração e fibrose.

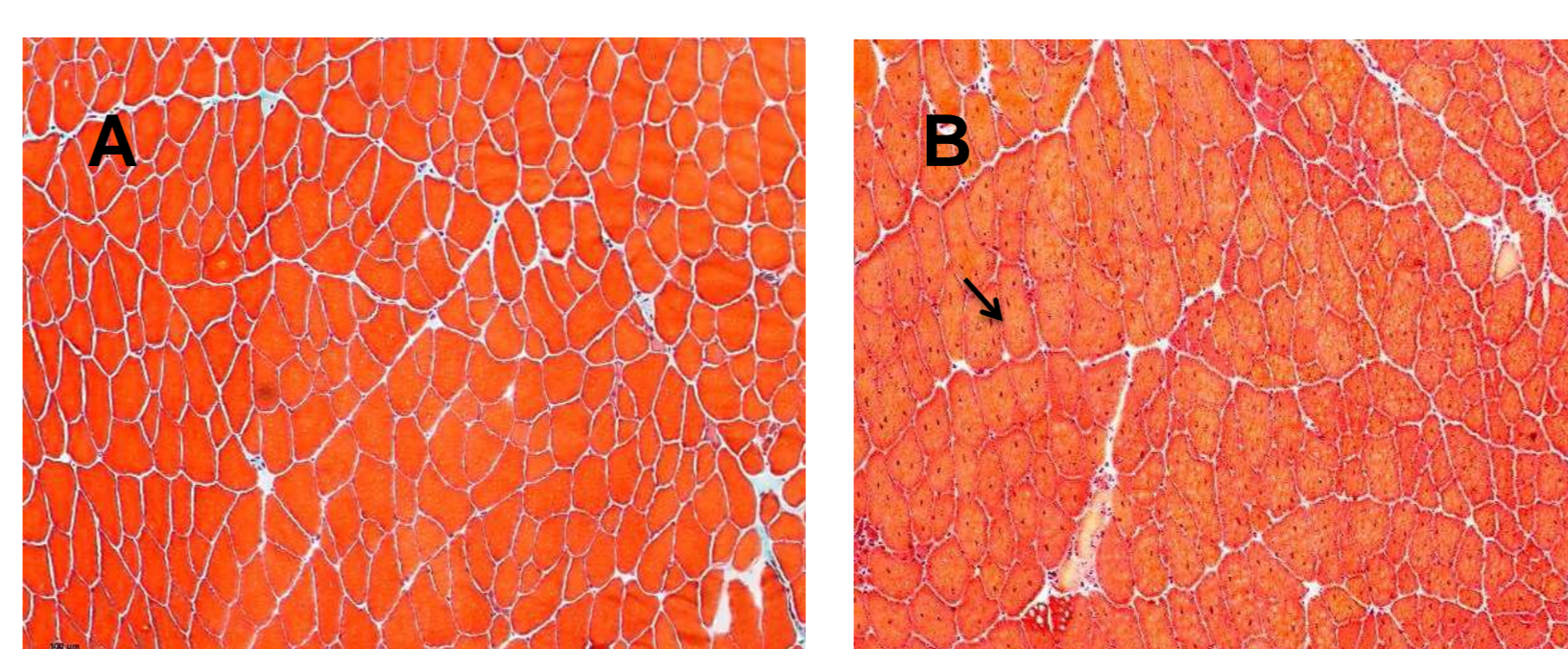
MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos camundongos com 4 meses de idade, de ambos os sexos, sendo 5 *mdx* e 5 C57BL/10. A degeneração muscular foi analisada por meio da quantificação de fibras marcadas com Azul de Evans. A regeneração foi avaliada através da mensuração do número de fibras musculares com núcleo central coradas com Hematoxilina-Eosina. A área de fibrose foi evidenciada pela coloração de Tricrômico de Masson. A avaliação da força muscular (Figura 1) foi feita uma vez por semana, no período da manhã, durante 3 semanas consecutivas. Os camundongos foram colocados sobre a grade, esta era girada em um ângulo de 180° a 32,5 cm de altura e o tempo de permanência deles agarrado na grade era quantificado.



Figura 1: À esquerda, camundongo *mdx* em posição para medida do tempo de permanência, na grade invertida (rotação de 180°).

RESULTADOS



Em A e B corte transversal do músculo quadríceps, parte medial, de um C57BL/10 e porção do conjunto de vastos, de um *mdx*, respectivamente. A ausência de coloração verde entre as fibras em ambos os animais, indica ausência de fibrose nesta idade (4 meses). Notar presença de fibras com núcleo central no músculo distrófico (seta em B). Coloração tricrômico de Masson.

Avaliação da degeneração e regeneração muscular (%)

		Conjunto de Vastos	Conjunto de Reto
Degeneração (AE)	Média	0,77	0,42
	Desvio padrão	0,19	0,13
Regeneração (HE)	Média	87,12	84,1
	Desvio padrão	1,72	3,09

Tabela 1: Análise histopatológica do músculo quadríceps de animais *mdx*. Porcentagem de fibras marcadas com AE e porcentagem de fibras com núcleo central coradas com HE. Observe que menos de 1% das fibras estão marcadas com AE e cerca de 85% das fibras apresentam núcleo central, revelando ausência de degeneração e predomínio de fibras regeneradas, respectivamente.

Medida de Força – Grade Invertida

	C57BL/10 (M)	C57BL/10 (F)	<i>mdx</i> (M)	<i>mdx</i> (F)
Média	38,16	75,94	47,21	257,99*
Desvio Padrão	18,43	91,76	12,25	106,70

Tabela 2: Média e desvio padrão do tempo de permanência na grade, em segundos, ao longo de 3 semanas. *diferença significativa (teste t de Student; p<0,05) quando comparado a todos os grupos. M significa macho e F é o mesmo que fêmea.

CONCLUSÃO

A análise histopatológica comparativa do quadríceps (conjunto de vastos e reto femoral) de camundongos *mdx* com 4 meses de idade sugere que o processo de degeneração-regeneração ocorre de forma semelhante nas diferentes porções do músculo quadríceps e apresenta reduzida atividade mionecrótica. A avaliação da força pela técnica da grade invertida revelou que as fêmeas *mdx* aparentam ser mais fortes que os animais dos demais grupos, mas isto pode estar relacionado ao comportamento de paralisação apresentado pelos camundongos *mdx* quando colocados em um ambiente estranho, fato não observado em animais controle (YAMAMOTO et al., 2010).

REFERÊNCIAS

1. ENGEL, A. G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K. H. Muscular dystrophies. In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Myology. New York: McGraw-Hill, v. 2, p. 1133-1187, 1994.
2. GROUNDS, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. Scandinavian J Med Sci Sports, v. 15, p. 381-391, 2005.
3. PUTTEN, M.; WINTER, C.; ROON-MOM, W.; OMMEN, G.; HOEN, P.A.C. AARTSMA-RUS. A months mild functional test regime does not affect disease parameters in young *mdx* mice. Neuromuscul Disord v. 20, p. 273-280, 2010.
4. YAMAMOTO, K.; YAMADA D.; KABUTA, T.; TAKAHASHI, A.; WADA K.; SEKIGUCHI, M. Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient *mdx* mice. Neuromuscul Disord v. 20, p.505-511, 2010.