

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MARCUS ALEXANDRE MENDES LUZ

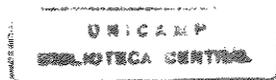
## ESTUDO *IN VIVO* DA CAPACIDADE REGENERATIVA DE FIBRAS MUSCULARES DE CAMUNDONGOS MDX

Este exemplar correspondo à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Marcus Alexandre Mendes Luz e aprovada pela Comissão Julgadora. 17/11/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na Área de Histologia.

Orientador : Prof. Dr. Humberto Santo Neto

200102144



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC  
N.º CHAMADA:  
TI UNICAMP  
L979e  
V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 43499  
PROC. 16-392107  
C  D   
PREC. R\$ 11,00  
DATA 14/02/01  
N.º CPD \_\_\_\_\_

CM-00154303-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**Luz, Marcus Alexandre Mendes**  
**L979e** Estudo *in vivo* da capacidade regenerativa de fibras musculares de  
Camundongos *mdx*/ Marcus Alexandre Mendes Luz. -- Campinas,  
SP:[s.n.], 2000.  
63f. ilus.

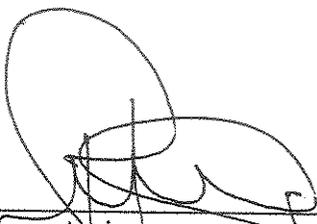
Orientador: Humberto Santo Neto  
Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Musculos - Regeneração. 2. Distrofia. 3. Tibia – Musculo..  
I. Santo Neto, Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 17/11/2000

**BANCA EXAMINADORA**

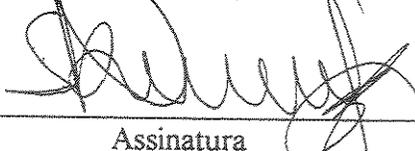
Prof. Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)



---

Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



---

Assinatura

Prof. Dr. Joffre Gazzelli Filho



---

Assinatura

Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca

---

Assinatura

À minha mãe

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Marilurdes**, pelo apoio em todas as circunstâncias.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto**, pela orientação, compreensão e confiança.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga**, pela solicitude em oferecer as primeiras oportunidades e orientações acerca do mestrado na presente área.

À **Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca**, pelos valorosos ensinamentos e principalmente pela sincera amizade.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques** pelas oportunas sugestões que contribuíram para a valorização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Joffre Guazzelli Filho**, pelas sugestões oferecidas na pré-banca.

Ao **Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro**, pelas informações técnicas e recursos disponibilizados.

Ao **Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada** e à **Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon**, pelas considerações pertinentes ao exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Solange G. Pires D'Avila**, pelo auxílio oferecido na documentação fotográfica.

Ao **HT. Domingos Zanchetta Neto**, pelo apoio irrestrito oferecido sempre e pela valiosa amizade.

Aos HTs. **Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula**, pela disposição e auxílio nos procedimentos experimentais.

À amiga **Elaine Minatel**, pela amizade e prestatividade.

À Sras. **Silvia Helena Burghi Kalaf, Helena Regina Gomes, Lillian Alves Senne Panagio, Lourdes Pinheiro, Odete de Camargo Fabiano e Ana Floriano Rodrigues** pela dedicação e atenção oferecidas sempre.

À Sra. **Marlene Lima Francisco**, pela manutenção e cuidados com os animais empregados no experimento.

***“Não há um só homem nem uma só ação que não tenha a sua importância;  
em todos e através de tudo se desenvolve a idéia da humanidade.”***

**Schopenhauer**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## Sumário

Resumo

Abstract

<b>I. Introdução.....</b>	<b>11</b>
1. Distrofia Muscular de Duchenne.....	14
1.1. A descoberta da doença e as primeiras observações.....	15
1.2. Evolução do quadro clínico da DMD.....	16
1.3. Etiologia e patogênese.....	17
2. Regeneração muscular.....	20
2.1. Células satélites.....	21
2.2. Mecanismo de regeneração muscular.....	22
2.3. Fibras musculares regeneradas.....	23
3. Animais distróficos.....	26
4. Objetivo.....	29
<b>II. Material e Métodos.....</b>	<b>31</b>
1. Animais e grupos experimentais.....	32
2. Procedimentos experimentais.....	32
<b>III. Resultados.....</b>	<b>37</b>
1. Quadro clínico.....	38
2. Alterações morfológicas.....	38
3. Quantificação das populações de fibras musculares.....	39
4. Quantificação da fibrose intersticial.....	47
<b>IV. Discussão.....</b>	<b>48</b>
<b>V. Conclusão.....</b>	<b>57</b>
<b>VI. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>59</b>

## RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia ligada ao cromossomo X, provocada pela ausência de *distrofina*, uma proteína da membrana da fibra muscular esquelética, cuja função está relacionada à manutenção da estabilidade do sarcolema. A ausência de *distrofina*, altera a integridade estrutural do sarcolema fazendo com que a fibra muscular sofra necrose e posterior regeneração. Com o surgimento de uma linhagem de camundongos mutantes (*mdx*) cujas fibras musculares à semelhança dos pacientes humanos são deficientes em *distrofina*, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com estes animais. Até o início da senilidade, os camundongos não apresentam fraqueza muscular e não vão a óbito. Outra diferença fenotípica fundamental entre a DMD humana e a dos camundongos é o fato de que, nestes últimos, as fibras musculares mantêm a capacidade de regeneração. É certo que a ausência de *distrofina* seja a responsável direta pela necrose das fibras musculares, entretanto, é possível que a perda da capacidade regenerativa esteja relacionada a outros fatores. Um desses fatores, fundamental no presente trabalho, refere-se às células satélites das fibras musculares precursoras dos mioblastos e que originam novas fibras musculares. Estudos *in vitro* com células satélites de pacientes com DMD, demonstram que elas perdem, com o avançar da idade, a capacidade de se dividir. Dessa forma o presente trabalho procura demonstrar experimentalmente a capacidade regenerativa das fibras do músculo tibial anterior através de uma série de injeções de cloridrato de lidocaina 2%. Os animais de ambos os grupos (Grupo A – *mdx*; Grupo B – Black 10) foram submetidos a 20 e 55 aplicações de cloridrato de lidocaina, induzindo-se ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares. Os músculos coletados foram incluídos em historresina e corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina e Picrosirius-hematoxilina (para análise de tecido conjuntivo). Após a quantificação das populações das fibras musculares, os resultados mostraram que ao final 55 aplicações, a população de fibras regeneradas nos animais *mdx* sofreu uma redução de 48% em relação ao grupo controle, sendo que, ao final de 20 aplicações a redução da população de fibras foi de 0.2%. Não foi constatado o desenvolvimento de fibrose, o que exclui a tese sustentada por alguns pesquisadores, de que este fator seria o responsável pela redução da capacidade regenerativa das fibras. De acordo com nossos resultados, podemos concluir que a redução da capacidade regenerativa das fibras está diretamente ligada a exaustão da capacidade miogênica das células satélites, não se encontrando qualquer evidência de que a redução desta atividade esteja associada ao aparecimento de fibrose intersticial.

## ABSTRACT

The Duchenne (DMD) muscular dystrophy is a myopathy chromosome X-linked caused by the absence of dystrophyn, a protein of the skeletal muscular fiber's membrane, whose function is related to the sarcolemma's stability. The absence of dystrophyn, alters the sarcolemma's structural integrity causing the muscular fiber to suffer necrosis and later regeneration. The regenerative capacity, however, markedly declines as from 3 years of age, when the necrotic fibers start to be replaced by adipose-fibre tissues. With the appearance of a line of mutant mice (mdx) whose muscular fibers in semblance with human patients are dystrophyn deficient, various studies are being developed with these animals. Up to the beginning of senility, the mice did not show muscular weakness and did not die. Another fundamental phenotypical difference between a human DMD and the mice is the fact that, in the latter, muscular fibers maintain regeneration capacity. It is true that the absence of dystrophyn is directly responsible for the muscular fiber necrosis, however, it is possible that the loss of regenerative capacity can be related to other factors. One of these factors refers to the satellite cells of the muscular fibers forerunners to the myoblasts and which originate new muscular fibers. *In vitro* studies of satellite cells from DMD patients, shows that they lose, as age increases, the capacity for reproduction. Therefore, this work endeavours to demonstrate experimentally the regenerative capacity of the tibial fore muscle fibers through a series of injections of 2% lidocaine hydrochloride. The animals of both groups (Group A - mdx; Group B -Black 10) were submitted to 20 and 55 administrations of lidocaine hydrochloride, inducing cycles of degeneration and regeneration of the muscle fibers. The collected muscles were included in hystoresin and stained using Haematoxilyn and Eosin and Picrosirius haematoxilyn methods (for conective tissue analysis). After quantification the muscle fibers population, results showed that at the end of the 55 administrations, the regenerative fibers population in mdx animals dropped 48% when compared to the control group, and that, at the end of 20 administrations the fibers population dropped 0.2%. The developement of fibrosis was not noted, which excludes the thesis supported by some researchers, that this factor would responsible for the reduction of the regenerative capacity of the fibers. According to our results, we can conclude that the fibers reduction of regenerating capacity is directly linked to the satellite cells exhaustion of the myogenic capacity, not having found any evidence that the reduction of this activity is associated of interstitial fibrosis.

## I - INTRODUÇÃO

---

A *distrofia muscular de Duchenne (DMD)* é uma miopatia ligada ao cromossomo X, transmitida pela mãe assintomática ao filho do sexo masculino acometendo 1 em cada 3.500 crianças. Os primeiros sinais clínicos da doença manifestam-se ao redor dos 4 anos de idade através da dificuldade de caminhar e erguer-se de superfícies, progredindo para escoliose, incapacidade de locomoção e finalmente morte do paciente, que ocorre em geral por volta dos 20 anos de idade. Face a isto, a DMD tem sido considerada a mais comum e uma das mais graves distrofias (ENGEL *et al.*, 1998).

O aparecimento da DMD deve-se à ausência de distrofina, uma proteína da membrana citoplasmática da fibra muscular esquelética, cuja função parece ser a de manutenção da estabilidade da mesma (BONILLA *et al.*, 1988; HOFFMAN *et al.*, 1987). Portanto, a ausência de distrofina alteraria a integridade estrutural do sarcolema (PASTERNAK *et al.*, 1995) levando à lesões focais do mesmo. Acredita-se que essas lesões permitiriam um influxo de cálcio a partir do meio extracelular. A entrada abrupta e em elevada concentração do cálcio ativaria o sistema de contração muscular resultando em hipercontração das miofibrilas; com isto, ocorreria a necrose da fibra muscular e com posterior remoção do material necrótico por fagocitose (BERTORINI *et al.*, 1982).

Após a fagocitose, parte das fibras degeneradas são substituídas por fibras musculares neoformadas às custas de processo regenerativo. A capacidade regenerativa, contudo, declina acentuadamente a partir de 3 anos de idade, quando então as fibras necróticas passam a ser substituídas por tecido fibro-adiposo. Quando este processo atinge os músculos da respiração, em especial o diafragma, uma grande parte dos pacientes vai a óbito por insuficiência respiratória (ENGEL *et al.*, 1998).

Em seres humanos as pesquisas sobre a patogênese e o tratamento da DMD tem limitações óbvias. Com isto, até 1984 pouco se sabia a respeito dessa miopatia. Um grande avanço no conhecimento dessa doença e em especial no seu tratamento, surgiu a partir daquele ano quando BULFIELD e colaboradores (1984) descreveram uma linhagem de camundongos cujas fibras musculares esqueléticas à semelhança dos pacientes não apresentavam distrofina, denominada linhagem *x chromosome-linked muscular dystrophy* (**mdx**).

Contudo, existe uma diferença fenotípica entre as fibras de pacientes portadores de DMD e aquelas dos camundongos *mdx*. Essa diferença refere-se ao fato de que nestes últimos, as fibras musculares mantêm a capacidade de regeneração até o início da senilidade (20 meses de idade).

Várias hipóteses tem sido consideradas para explicar a perda da capacidade regenerativa ( ANDERSON, 2000; REIMANN *et al.*, 2000). Entretanto, dentre elas duas tem sido mais aceitas. Uma delas refere-se à exaustão da capacidade mitótica das células satélites das fibras musculares, que são responsáveis pela atividade miogênica após repetidos ciclos de degeneração e regeneração (HESLOP *et al.*, 2000; IRINTCHEV *et al.*, 1997, WEBSTER & BLAU, 1990; BOCKHOLD *et al.*, 1998). Outro fator responsável por este processo seria a fibrose intersticial, que constituiria uma barreira mecânica impedindo a migração das células satélites através do conjuntivo, comprometendo, assim, o processo regenerativo (ITAGAKI *et al.*, 1995; BOCKHOLD *et al.*, 1998). Entretanto, estas duas hipóteses não têm sido efetivamente demonstradas.

## **1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

---

### 1.1. A descoberta da doença e as primeiras observações

As primeiras observações da distrofia muscular de Duchenne (DMD) foram feitas por Duchenne e publicadas em 1861. Entretanto, algumas constatações referentes à mesma doença já haviam sido relatadas em 1853 por Little ao descrever o quadro clínico de dois irmãos que apresentaram sintomas que não eram compatíveis com as patologias conhecidas até então (ENGEL *et al.*, 1998).

Nos dois casos houve óbito em idade precoce, e o exame necroscópico possibilitou pela primeira vez, a descrição dos achados presentes nesta miopatia. Na análise microscópica observou-se um grande número de fibras musculares destruídas, entremeadas por tecido adiposo. Em estudos subsequentes feitos por Growers, 1886 e Erb, 1891 (*apud* ENGEL *et al.*, 1998) foram descritos outros aspectos da doença, como por exemplo, a heterogeneidade no diâmetro das fibras, proliferação do conjuntivo intersticial e substituição fibro-adiposa do tecido muscular. Além disso estabeleceu-se a descrição do quadro clínico da doença, caracterizado por enfraquecimento da musculatura das extremidades do corpo, lordose, hipertrofia muscular do segmento atingido, redução da motricidade, ausência de distúrbios sensoriais e protusão das escápulas. Ao final do século XIX, apesar dos conhecimentos sobre a sintomatologia da doença, nada se sabia sobre a etiologia havendo ainda pouco conhecimento sobre a evolução da DMD.

## 1.2. Evolução do quadro clínico da DMD

As alterações histopatológicas promovidas pela DMD iniciam-se no período neonatal, porém são clinicamente identificáveis durante a infância. Entre 3 e 6 anos de idade inicia-se a lordose da coluna e os primeiros sinais, como hipertrofia dos músculos gastrocnêmios, dificuldade de levantar-se e quedas frequentes. A partir de 11 anos de idade, a força dos músculos dos membros pélvicos diminui rapidamente, sendo que os músculos flexores dos dedos, bíceps femoral e quadríceps femoral são os mais atingidos, podendo ter sua função reduzida de 50 a 70%. O comprometimento destes músculos reduz significativamente a atividade motora do indivíduo, impossibilitando-o muitas vezes de caminhar ou exercer qualquer tipo de ação que dependa destes músculos. A atividade física portanto, decresce abruptamente entre os 7 e 11 anos de idade (ENGEL *et al.*, 1998).

No período correspondente à segunda década de vida, após a perda da capacidade de locomoção, há uma redução da massa muscular dos membros acompanhada de uma cifoscoliose pronunciada. Em seguida, ocorre comprometimento parcial dos músculos respiratórios, levando a uma insuficiência progressiva na pressão inspiratória e expiratória, culminando em falência respiratória. Assim sendo, o óbito ocorre mais frequentemente por insuficiência respiratória. Os demais pacientes vão a óbito por insuficiência cardíaca (ENGEL *et al.*, 1998).

### 1.3. Etiologia e Patogênese

Como já referido, a DMD é uma miopatia ligada ao cromossomo X, sendo que as translocações e deleções detectadas neste foram observadas na banda 1 da região 2 do braço curto do cromossomo, denominada de banda Xp21. Essa banda apresenta uma seqüência de nucleotídeos responsáveis pela expressão de uma proteína composta por 3685 aminoácidos que integra o sarcolema da fibra muscular denominada distrofina (VERELLEN *et al.*, 1984; FRANCKE *et al.*, 1985).

O código de seqüência para a expressão de distrofina é realizado por 79 exons, e comandada pela atuação de diversos promotores presentes em alguns tipos celulares, como as células musculares, as células gliais, as células de Purkinje e as células de Schwann. O promotor muscular para a distrofina é bastante ativo nos músculos esqueléticos e cardíacos. A expressão da distrofina muscular é regulada de acordo com as etapas do desenvolvimento. Nos músculos fetais, a distrofina é detectada no sarcolema depois da nona semana de gestação, aumentando progressivamente sua expressão nas junções neuromusculares e miotendinosas, na superfície das membranas dos túbulos T e junto à diversas junções celulares (ENGEL *et al.*, 1998).

Quanto à organização molecular, a distrofina é um dímero antiparalelo associado à outras proteínas estruturais do sarcolema. O dímero de distrofina apresenta-se dividido em quatro domínios; o primeiro relacionado com a  $\alpha$ -actina, o segundo ligado à espectrina, o terceiro à ancarina e o último à um complexo de proteínas unidas à laminina (ENGEL *et al.*, 1998).

A distrofina localiza-se junto ao sarcolema, unida à proteínas integrantes que comunicam-se com os elementos da matriz extracelular na face externa, e com as proteínas do citoesqueleto na face interna (Figura 1). Este modelo sugere que a distrofina, unida às proteínas integrantes, confere a estabilidade da superfície da membrana da fibra muscular durante sua contração e relaxamento (ENGEL *et al.*, 1998).

Há uma interação entre os elementos do sarcolema e do citoesqueleto e a distrofina, de modo que uma deficiência na expressão desta compromete a expressão e organização das demais proteínas, promovendo a deterioração da fibra, diante de uma lesão (BONILLA *et al.*, 1988). Uma deficiência na síntese de distrofina promoveria uma fragilidade da fibra muscular tornando-a suscetível à lesão e à necrose. Comumente, a lesão está relacionada a um acúmulo intracelular de cálcio, geralmente localizado na região subsarcolemal da fibra, que promoveria uma lesão direta da membrana da célula muscular (BERTORINI *et al.*, 1982).

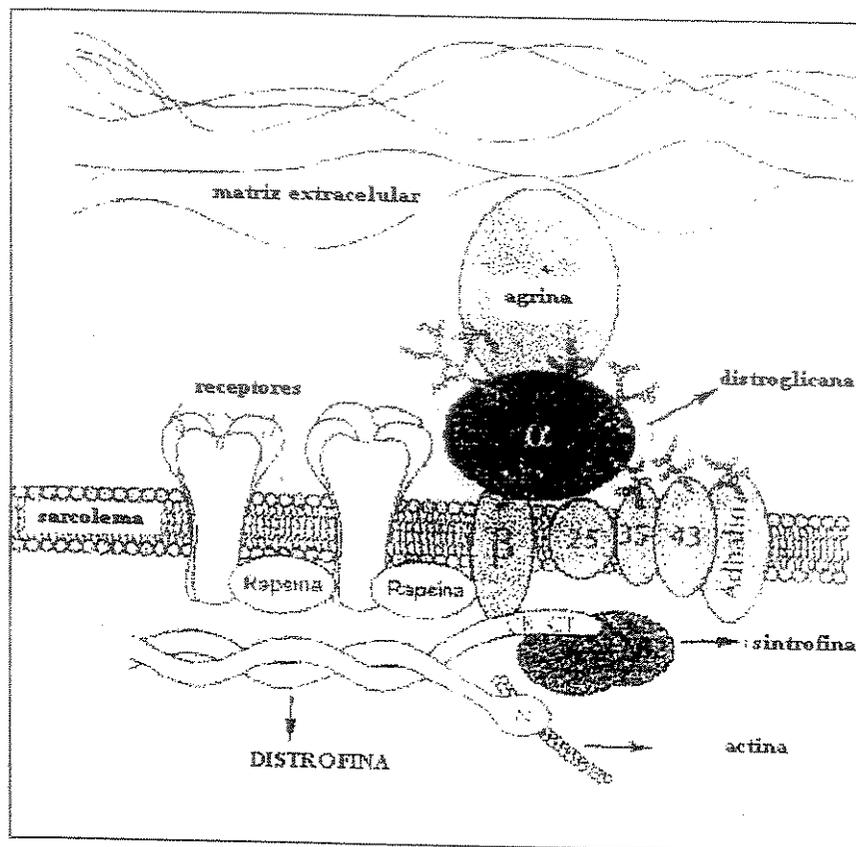


Figura 1. A molécula de distrofina como interface entre o sarcolema e o sistema de proteínas contráteis da fibra muscular. Adaptado de *Sunada e Campbell, Curr. Op. Neurology*, 8, p. 379-384, 1995.

## **2. REGENERAÇÃO MUSCULAR**

---

## 2.1. Células satélites

Está bem estabelecido que o processo de regeneração muscular depende essencialmente da presença de células denominadas células satélites. Estas células, presentes em todos os vertebrados, permanecem quiescentes e só são ativadas diante de uma lesão mecânica ou química das fibras musculares quando, então, entram em um processo equivalente à histogênese no embrião para reparar a fibra muscular lesada.

As células satélites são células que apresentam núcleo oval, grande, heterocromático, considerado inativo; ribossomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, numerosas vesículas junto à membrana plasmática e centríolos visíveis, que desaparecem durante a miogênese. Distribuem-se pela extensão das fibras, alojando-se em suas depressões, logo acima do sarcolema (MAURO, 1978).

Quando observadas à microscopia de luz convencional, as células satélites assemelham-se à fibroblastos, intimamente ligadas à superfície das fibras musculares, sendo muitas vezes confundidas com núcleos destas (ENGEL *et al.*, 1998).

A frequência e a distribuição das células satélites na fibra muscular está relacionada à diversos fatores como a topografia da fibra, o tipo de fibra muscular e a idade do indivíduo. No músculo sóleo, por exemplo, encontra-se uma média de 5000 células satélite/mm<sup>3</sup>, enquanto que o tibial anterior apresenta apenas 900 células satélite/mm<sup>3</sup> (SCHMALBRUCH & HELLHAMMER, 1976).

Os fatores que controlam esta distribuição desigual não são bem conhecidos, mas podem estar associados ao processo de maturação do músculo, desempenho contrátil e idade do indivíduo.

*Durante a fase inicial do desenvolvimento as células satélites são mais abundantes, quando contribuem para o desenvolvimento do músculo no período pós-natal, diminuindo abruptamente em poucos meses. Esse declínio é consequência da fusão das células satélite entre si durante o crescimento muscular. A diminuição numérica destas células torna-se mais acentuada conforme aproxima-se a senilidade. Devido a isso, o potencial proliferativo das células torna-se limitado. (SCHMALBRUCH & HELLHAMMER, 1976).*

## **2.2. Mecanismo de regeneração muscular**

*A regeneração muscular decorre da formação de miotubos a partir da mobilização, fusão e diferenciação das células satélites. Após uma lesão, ocorre um rápido influxo de cálcio na fibra muscular que promove uma hipercontração imediata acompanhada pelo acúmulo de uma massa densa e irregular de miofilamentos e pelo desenvolvimento de necrose. A instalação de um quadro necrótico na fibra muscular não compromete, na maioria dos casos, a integridade do tubo endomysial assim como das células satélites. Esta preservação é que permite a regeneração muscular ( KARPATI & CARPENTER, 1988).*

*A preservação do tubo endomysial tem grande importância no restabelecimento estrutural da fibra. Ele coordena a mobilização das células satélites no início da regeneração, orienta o posicionamento dos miotubos neoformados através das proteínas presentes na lâmina basal, limita espacialmente o crescimento dos miotubos, promove o crescimento, a proliferação e a diferenciação das células satélites.*

*Após uma lesão, os fragmentos do sarcoplasma restantes no interior do tubo endomysial são progressivamente destruídos por proteases endógenas, juntamente com a*

atuação do infiltrado celular de polimorfonucleares. Dentro de 48 horas o material necrótico é completamente removido por macrófagos derivados dos monócitos do sangue circulante. Estas células podem permanecer no local da lesão por 2 dias (CARLSON, 1986).

Concomitantemente, as células satélites são ativadas e passam da fase G<sub>0</sub> para a fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, com rápida proliferação. Estas células contribuem para o processo de regeneração reparando as miofibras lesadas, formando novas miofibras ou ainda aumentando o número de núcleos das miofibras parcialmente lesadas. Nesta fase observa-se mitoses abundantes e a formação de um aglomerado de células no espaço formado pela remoção do material necrótico. Há uma migração centrípeta das células, que passam a se dispor linearmente no centro da fibra, formando um tubo denominado de miotubo multinucleado. Seqüencialmente, as células do miotubo fundem-se numa única estrutura que irá reconstituir a cito-arquitetura da fibra muscular (PEARSON, 1973). Ao final deste processo tem-se uma fibra regenerada (**Figura 2**).

### **2.3. Fibras musculares regeneradas**

A musculatura esquelética normal é formada por fibras musculares longas e cilíndricas, com núcleos achatados e fortemente corados, distribuídos na periferia da célula abaixo do sarcolema. Na porção central da fibra encontram-se os elementos contráteis da célula na forma de estrias organizadas em faixas isotrópicas e anisotrópicas (sob luz polarizada).

Após um processo regenerativo decorrente de uma lesão qualquer, a fibra muscular regenerada perde suas características de fibra muscular normal. A distribuição periférica dos núcleos cede lugar à uma disposição centralizada, constituindo o processo de centronucleação (TORRES & DUCHEN, 1987; NARITA *et al.*, 1999).

Com o processo de regeneração, os núcleos apresentam-se volumosos, de aspecto vesicular, com cromatina descondensada e nucléolo proeminente (ZACHARIAS & ANDERSON, 1991; TORRES & DUCHEN, 1987), características de núcleos presentes em células em atividade de síntese. Esta atividade é ainda evidenciada pela presença de um citoplasma basofílico ( devido ao alto teor de RNA – BENOIT & BELT, 1970) e de escassez de elementos contráteis, visível pelo número reduzido de estriações.

Atualmente, acredita-se que a centronucleação é o indicativo de um processo de regeneração que se desenvolve numa determinada fibra, sendo o parâmetro adotado para a distinção da fibra regenerada de uma não regenerada ( TORRES & DUCHEN, 1987; NARITA *et al.*, 1999), atuando ainda na compensação da fragilidade da fibra muscular regenerada em animais distróficos como suporte mecânico, como propõe NARITA *et al.*, 1999.

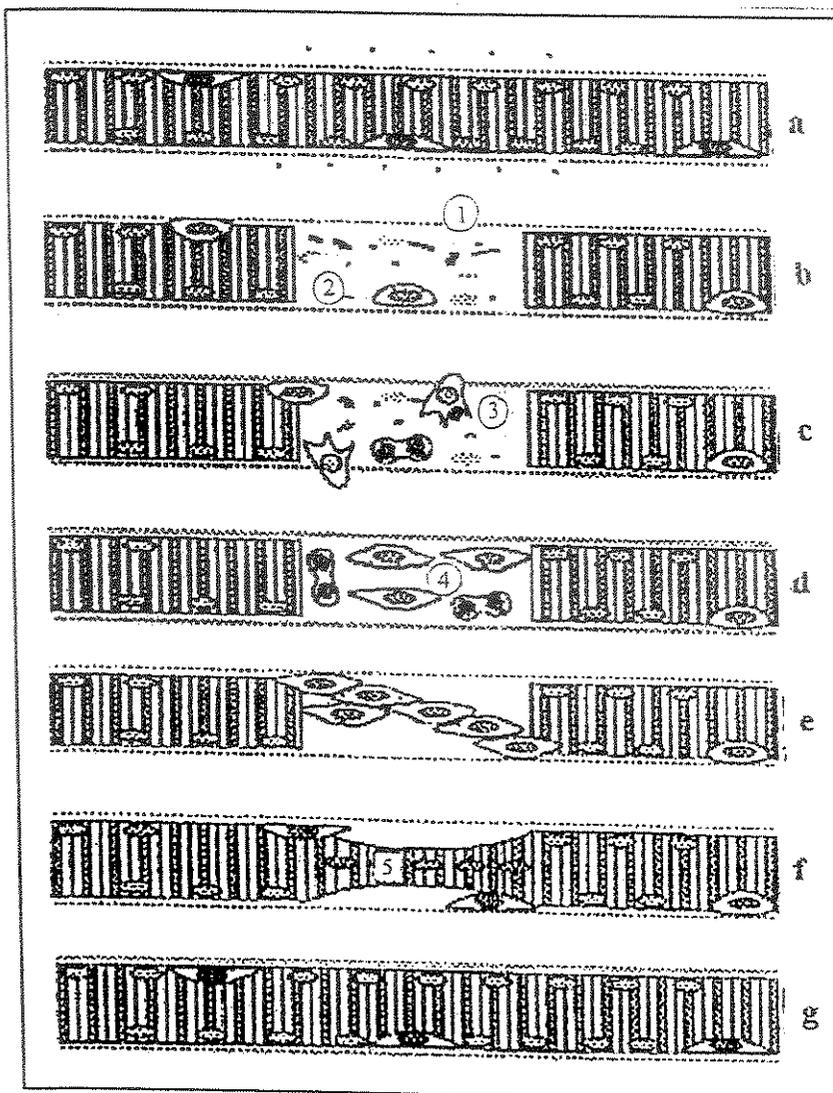


Figura 2 - Etapas da regeneração muscular. a. Fibra muscular exposta à agente lesivo (área pontilhada); b. Fibra muscular com tubo endomysial íntegro (1) e células satélite remanescentes (2); c. Fagocitose do material necrótico (3) e início da divisão das células satélite (4); d. Proliferação das células satélite; e. Migração centrípeta das células satélite; f. Fusão das células satélite e formação do miotubo (5); g. Restabelecimento da fibra muscular. *Adaptado de Bischoff, R. Myology (v.1), p. 97-118, 1998.*

### **3. ANIMAIS DISTRÓFICOS**

---

Até o final da década de 80, o estudo da DMD estava restrito às análises de biópsias ou ao cultivo de células, sendo impossível uma observação experimental controlada da degeneração muscular. Entretanto, surge nesse período uma linhagem de camundongos mutantes originados da linhagem C57Bl/10, denominados de *mdx* (*x chromosome-linked muscular dystrophy*).

Esses camundongos apresentam deficiência na produção de distrofina nas suas fibras musculares, reproduzindo assim, as características das fibras musculares dos pacientes portadores de DMD (BULFIELD *et al.*, 1984; SICINSKI *et al.*, 1989). Face a isto, os camundongos distróficos vem sendo extensivamente utilizados como modelo experimental para investigação de diversos aspectos da DMD. Assim sendo, muito o que se sabe hoje sobre a fisiopatologia da doença deve-se aos estudos realizados com esses animais (PASTERNAK *et al.*, 1995; LEFAUCHER *et al.*, 1995; PASTORET & SEBILLE, 1995; HAGIWARA *et al.*, 1995; IRINTCHEV *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1998; BOCKHOLD *et al.*, 1998; VILQUIN *et al.*, 1998;).

Apesar da ausência da distrofina ser um achado comum tanto nos pacientes portadores de DMD quanto nos camundongos *mdx*, a evolução do quadro clínico não é exatamente a mesma para cada um deles. Até o início da senilidade, os camundongos não apresentam fraqueza muscular, não desenvolvem escoliose ou lordose e não vão a óbito. Em camundongos jovens e adultos (cerca de 52 semanas de idade) as fibras musculares necróticas são totalmente substituídas por fibras regeneradas.

Nestes animais tem-se observado que a capacidade regenerativa não decresce em relação aos animais não distróficos. Alguns estudos (ANDERSON *et al.*, 1998) sugerem

que a regeneração das fibras musculares permanece uniforme durante a vida do animal, podendo apresentar entretanto, discreta redução.

Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares nos animais distróficos inicia-se por volta de 20 dias de idade. Entre 35 e 90 dias a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras. Neste período encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE *et al.*, 1986).

Apesar da idéia geral de que em animais *max* não há declínio da capacidade regenerativa das fibras musculares, estudos mais recentes (LEFAUCHER *et al.*, 1995) demonstram que esta capacidade diminui em animais idosos (65 a 104 semanas), em especial nos músculos esqueléticos de grande volume, como por exemplo, o quadríceps e músculos posturais, e o diafragma. Apesar da progressiva degeneração das fibras acompanhada de regeneração, a diferença fenotípica fundamental entre a DMD humana e a dos camundongos, está no fato de que, nestes últimos, as fibras musculares são substituídas por novas fibras musculares, não havendo manifestação de sinais clínicos que demonstrem o comprometimento da locomoção, da respiração, ou óbito decorrente desse fator (TORRES & DUCHEN, 1987).

Apesar da ausência de correlação entre os quadros clínicos da DMD e da distrofia em camundongos *max*, este modelo experimental tem se mostrado eficiente na análise desta miopatia, já que permite reproduzir a lesão muscular em dimensões proporcionais à DMD, justificando a metodologia adotada neste trabalho: a indução de ciclos de degeneração e regeneração da fibra muscular.

## **4. OBJETIVOS**

---

O objetivo do presente trabalho é investigar *in vivo*, através de técnicas histológicas, citoquímicas e morfométricas, em animais da linhagem mdx, se existe declínio da capacidade regenerativa muscular após sucessivos ciclos de degeneração e o quanto isto se deve à exaustão da capacidade mitótica ou ao desenvolvimento de fibrose intersticial.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

---

## 1. Animais e Grupos Experimentais

Foram empregados camundongos de duas linhagens; a *linhagem mdx* - *camundongos distróficos* - adquiridos junto ao Biotério do Depto. de Imunologia do ICB - USP e mantidos no Biotério do Depto. de Anatomia e a *linhagem C57/Black 10* - grupo controle, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, os quais representam a linhagem que deu origem aos animais distróficos mdx, (BULFIELD *et al.*, 1984).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

1 - *Grupo Experimental A*, composto de 10 animais, sendo 5 de cada uma das linhagens. O músculo tibial cranial direito de cada animal recebeu 20 aplicações de cloridrato de lidocaina, e o músculo esquerdo não recebeu aplicações, sendo utilizado como controle dentro do grupo.

2 - *Grupo Experimental B*, composto de 10 animais, sendo 5 de cada uma das linhagens. O músculo tibial cranial direito de cada animal recebeu 56 aplicações de cloridrato de lidocaina, e o músculo esquerdo não recebeu aplicações, sendo utilizado como controle dentro do grupo.

## 2. Procedimentos Experimentais

### a. *Injeção intramuscular de cloridrato de lidocaina*

Cada um dos animais foi imobilizado mecanicamente. O terço médio do ventre muscular do tibial cranial direito foi injetado por via transcutânea com 0.1 ml de cloridrato de lidocaina a 2% sem vasoconstrictor (Xilocaína® Astra Química).

A utilização do cloridrato de lidocaína em injeções teve como objetivo induzir ciclos repetitivos de degeneração e regeneração das fibras. A cada 4 dias os músculos dos animais foram injetados até atingir-se um total de 20 e 56 vezes injeções, produzindo-se, respectivamente, 20 e 56 ciclos de degeneração e regeneração (WEBSTER & BLAU, 1990).

b. *Coleta, fixação e processamento dos músculos*

Quinze dias após a última injeção os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de 0.3 ml de hidrato de cloral a 10%. O plastrão esternal foi aberto aproximadamente na linha mediana, o coração exposto e foi realizado uma abertura no átrio direito. A seguir, utilizando-se de uma agulha 25X7 montada em seringa de 20 ml perfundiou-se o animal com aproximadamente 40 ml de formol-cálcio (formaldeído PA a 40%, 10 ml; água destilada, 90ml; acetato de cálcio, 1g.) A seguir a região cranio lateral do membro pélvico foi então incisada por aproximadamente 1 cm e o músculo tibial cranial direito (tratado) retirado e fixado na mesma solução de formol-cálcio durante 24 horas. O material foi processado pela técnica de inclusão em historesina e submetido à microtomia, obtendo-se cortes transversais do terço médio do ventre muscular com 2  $\mu$ m de espessura. Os cortes obtidos foram submetidos a dois tipos de coloração:

- a. Hematoxilina e Eosina: utilizado na análise morfológica e quantificação das populações de fibras;
- b. Picrosírius – Hematoxilina: utilizado para a quantificação de tecido conjuntivo (fibrose intersticial).

A mesma metodologia foi aplicada ao músculo esquerdo de cada um dos animais dos referidos grupos.

#### *b1. Técnica de Inclusão em historesina*

A historesina é um meio de inclusão que pertence ao grupo das resinas poliméricas, as quais se constituem em massas sólidas através da ação de agentes polimerizantes.

O processamento do material incluiu as seguintes etapas.

##### *b1.1. Desidratação e inclusão*

Os fragmentos previamente fixados foram lavados e imersos em etanol 70% e progressivamente desidratados em etanol 95%, etanol absoluto I e etanol absoluto II ficando imersos por 30 min. em cada solução.

Após o último banho de etanol absoluto, os fragmentos foram transferidos para uma solução de etanol-resina por 3 horas sendo sequencialmente transferido para a resina pura, onde permanece *overnight*

##### *b1.2. Emblocamento*

No momento do emblocamento, o material foi acondicionado em formas diminutas à qual adicionou-se a resina e o polimerizador. A polimerização deve ser realizada à vácuo. A influência de temperaturas mais elevadas aceleram a polimerização, podendo utilizar-se deste recurso em alguns casos.

Uma vez polimerizada a resina, os blocos foram retirados das formas e fixados em suportes de madeira com cola de secagem rápida.

##### *b1.3. Microtomia e coleta dos cortes*

A obtenção de cortes em historesina procede-se da mesma forma que na microtomia de materiais em parafina, sendo utilizada navalha de vidro em ângulo reto, à partir da qual foi possível obter-se cortes de 2 $\mu$ . A distensão dos cortes foi realizada em cubas de água fria.

Os cortes foram então colhidos em lâminas previamente tratadas com poli-L lisina e secos em placa aquecedora. A coloração seguiu-se imediatamente após a secagem.

#### *b1.4. Coloração*

##### *- Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina:*

Os cortes foram hidratados e corados em solução de hematoxilina por 15 min. Em seguida foram lavados em água corrente para retirar o excesso do corante. Sequencialmente, corou-se com eosina por 10 min. Novamente lavou-se os cortes em água destilada, seguindo-se a desidratação e montagem dos cortes em verniz (Behemer *et al.*, 1976).

##### *- Técnica de coloração pelo picrosirius – hematoxilina:*

Os cortes foram hidratados e corados em solução de picrosirius por 60 min. Em seguida foram lavados em água corrente e corados com hematoxilina por 14 min. Novamente lavou-se os cortes em água corrente por 10 min. seguindo-se a desidratação e montagem dos cortes em verniz (Junqueira *et al.*, 1979).

#### *c. Análise do Material*

c.1. Contagem da população de fibras: selecionou-se um corte de músculo tibial cranial de cada um dos animais dos grupos A e B empregados no experimento, corado pelo método da H.E. A contagem das populações de fibras foi feita empregando-se um retículo com linhas paralelas horizontais e verticais que dividiam o campo microscópico em 4 regiões distintas, acoplado à ocular de microscópio de luz Nikon, com auxílio de um contador manual. Foram contadas todas as fibras do corte para a estimativa da população total de fibras do músculo juntamente com a população de fibras regeneradas.

c.2. Quantificação da fibrose intersticial: Calculou-se a Densidade de Volume (Vv) baseando-se na fórmula  $Vv = Pp/Pt$ , onde Pp refere-se aos pontos parciais (no caso os

pontos que caíram sobre conjuntivo) e Pt aos pontos totais (Pontos do sistema teste; neste caso igual a 168).

Foram analisadas 5 lâminas (Coradas por Picrosirius – hematoxilina) por grupo (n=5) onde contou-se 5 campos diferentes por lâmina, num total de 25 campos por grupo. Calculou-se o Vv de cada campo e extraiu-se uma média de cada grupo, que então foi comparada com os demais grupos.

#### *d. Tratamento estatístico dos dados quantitativos*

Os dados obtidos foram plotados e os gráficos foram executados em programa Excel / microsoft, juntamente com o cálculo das porcentagens de fibras normais, regeneradas e da fibrose intersticial, além do cálculo da correlação dos dados (r de Pearson).

### **III - RESULTADOS**

---

## **1. Quadro Clínico**

Não foram observados sinais que revelaram o comprometimento da capacidade de locomoção nos animais de ambos os grupos, comprovando assim a ausência de eventuais lesões nervosas pela droga ou pela agulha durante a aplicação. Também à inspeção, não foram observadas alterações referentes à massa muscular como atrofia ou hipertrofia.

## **2. Alterações morfológicas**

Nos músculos controle, as fibras musculares apresentaram contornos aproximadamente poligonais/arredondados, núcleos periféricos, achatados e com cromatina compactada e nucléolos inconspícuos. Nos músculos controle que receberam injeção de cloridrato de lidocaína, as fibras apresentaram-se contornos poligonais/arredondados, núcleos esféricos, centrais e grandes, cromatina descondensada, nucléolo proeminente e citoplasma com áreas basófilas (**Figuras 3 e 4**).

As fibras regeneradas dos músculos obtidos da linhagem mdx apresentaram contornos poligonais/arredondados, núcleos esféricos, centrais e grandes, cromatina descondensada, nucléolo proeminente e citoplasma com áreas basófilas (**Figuras 5 e 6**). Foram observadas ainda algumas fibras, com núcleos picnóticos, de volume reduzido, apagados ou ainda ausentes, citoplasma vítreo, homogêneo e altamente eosinofílico. Algumas fibras apresentam áreas de rarefação subsarcolemal (**Figura 7**).

Após 20 injeções, as fibras musculares dos animais distróficos não apresentaram indícios de necrose ou presença de tecido fibroso ou adiposo junto às fibras musculares.

Ao final de 56 aplicações, foi possível observar-se áreas isoladas de fibras necróticas localizadas, principalmente, na porção central do músculo, em meio à uma grande quantidade de fibras regeneradas com diâmetro reduzido quando comparada às demais fibras. Pequena quantidade de infiltrado inflamatório também pode ser constatada. Houve formação de feixes de conjuntivo em alguns pontos do tecido e infiltração de fibroblastos nos espaços intersticiais (**Figura 8**).

Nos animais do grupo controle com 20 aplicações não foram observadas alterações significativas. A redução do diâmetro das fibras acompanhada de atrofia fascicular só foi observada no grupo com 56 aplicações, em proporções inferiores ao observado no grupo anterior.

### **3. Quantificação das populações de fibras musculares**

A contagem das fibras do músculo tibial cranial dos animais distróficos com 20 aplicações, revelou uma população média de  $3696 \pm 382,56$  fibras musculares, das quais  $1996 \pm 806,51$  apresentaram regeneração. Portanto a população de fibras regeneradas equivaleu a 54% da população total de fibras (**Tabela 1, Gráfico 1**)).

Os dados referentes ao grupo controle, com o mesmo número de aplicações, revelaram população total de  $3556 \pm 1089,0$  fibras, das quais  $1419 \pm 545,43$  apresentaram regeneração, equivalendo a 39.7% da população total de fibras (**Tabela 2, Gráfico 2**).

Nos animais distróficos que receberam 56 aplicações de cloridrato de lidocaina, a população total de fibras musculares foi de  $4236 \pm 515,86$ , sendo que destas,  $1117 \pm 187,93$  eram fibras regeneradas significando que o percentual de fibras regeneradas foi de

26.3% (**Tabela 3, Gráfico 4**). Nos animais controle que receberam o mesmo número de aplicações, a porcentagem do número de fibras regeneradas foi de 39.7% (população total  $4647 \pm 382,46$  fibras, com  $1847 \pm 197,41$  regeneradas - **Tabela 4, Gráfico 3**).

O coeficiente de correlação (R de Pearson) entre o grupo controle e o distrófico com 20 aplicações não apontou correlação significativa entre os dados ( $R = -0,764$ ), tendo portanto baixa significância (0,05).

Entretanto, entre os mesmos grupos com 56 aplicações foi verificada uma forte correlação ( $R = 0,963$ ), com alto nível de significância (0,001).

Estes dados demonstram que após 56 aplicações, ocorreu uma redução significativa da população de fibras regeneradas dos animais distróficos.

**Tabela 1 - Grupo A - distrófico, músculo tibial cranial direito, com 20 aplicações:**

Grupo A - distróficos	Total de Fibras	Fibras regeneradas	% de fibras regeneradas
MDX A - I	3006	1815	60.3%
MDX A - II	3643	1768	48.5%
MDX A - III	4157	1598	38.4%
MDX A - IV	3842	2561	66.6%
MDX A - V	3834	2204	57.4%
Média do grupo A	$3696 \pm 382,56$	$1996 \pm 806,51$	54%

**Tabela 2 - Grupo B - controle, músculo tibial cranial direito, com 20 aplicações:**

Grupo B - controle	Total de Fibras	Fibras regeneradas	% de fibras regeneradas
B10 TAT - I	3658	1235	33.7%
B10 TAT - II	3297	1616	49%
B10 TAT - III	4329	2377	54.9%
B10 TAT - IV	3166	1052	33.2%
B10 TAT - V	3331	817	24.5%
Média do grupo B	3556 ± 1089,0	1419 ± 545,43	39.9%

**Tabela 3 - Grupo A - distrófico, músculo tibial cranial direito, 56 aplicações:**

Grupo A - distóxicos	Total de Fibras	Fibras regeneradas	% de fibras regeneradas
MDX A - I	3919	871	22.2%
MDX A - II	3427	991	28.9%
MDX A - III	4907	1421	28.9%
MDX A - IV	4359	1102	25.2%
MDX A - V	4568	1204	26.3%
Média do grupo A	4236 ± 515,86	1117 ± 187,93	26.3%

**Tabela 4 - Grupo B - controle, músculo tibial cranial direito, 56 aplicações:**

Grupo B - controle	Total de Fibras	Fibras regeneradas	% de fibras regeneradas
B10 TAT - I	4537	1576	34.7%
B10 TAT - II	4148	1767	42.5%
B10 TAT - III	5312	2183	41%
B10 TAT - IV	4736	1896	40%
B10 TAT - V	4505	1853	41.1%
Média do grupo B	4647 ± 382,46	1847 ± 197,41	39.7%

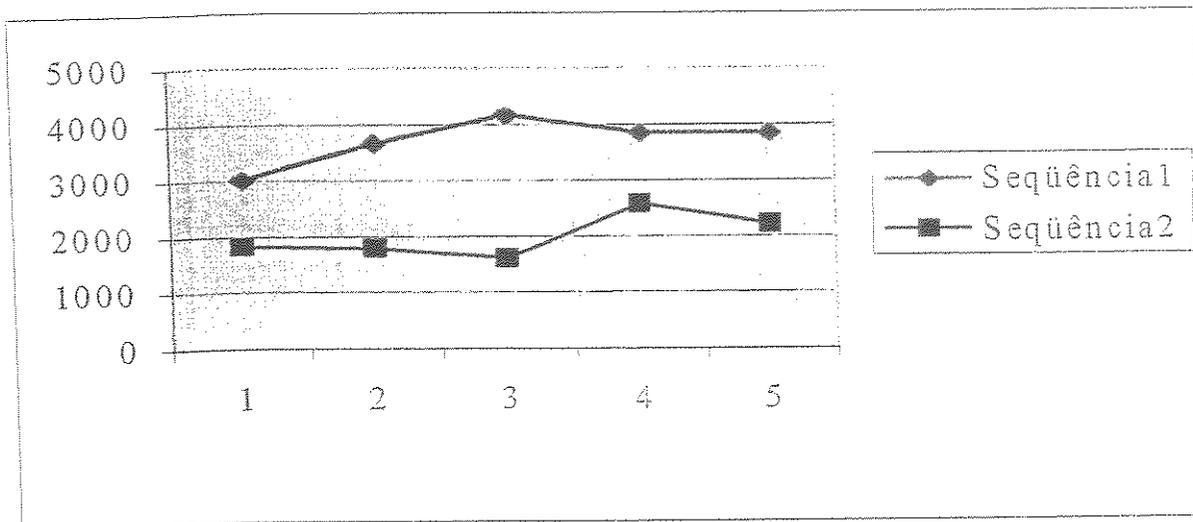


Gráfico 1- Grupo A, 20 aplicações: número total de fibras (Seqüência 1) e número de fibras regeneradas (Seqüência 2).

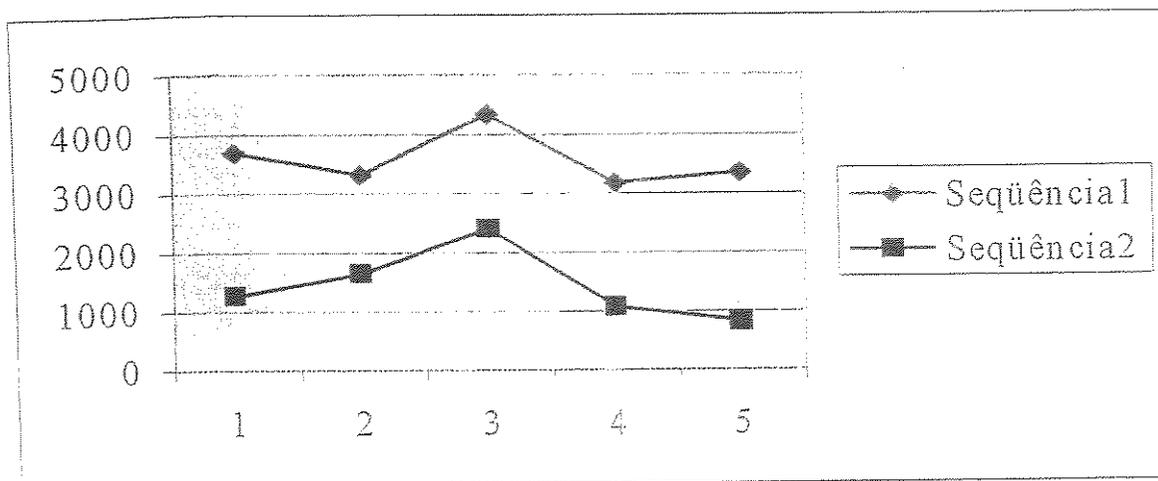
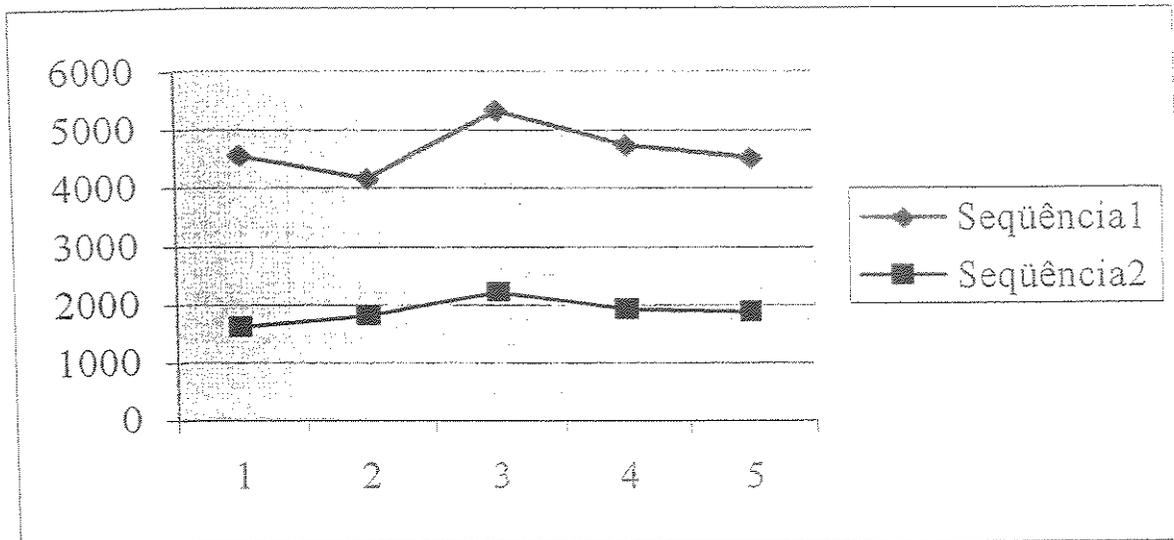
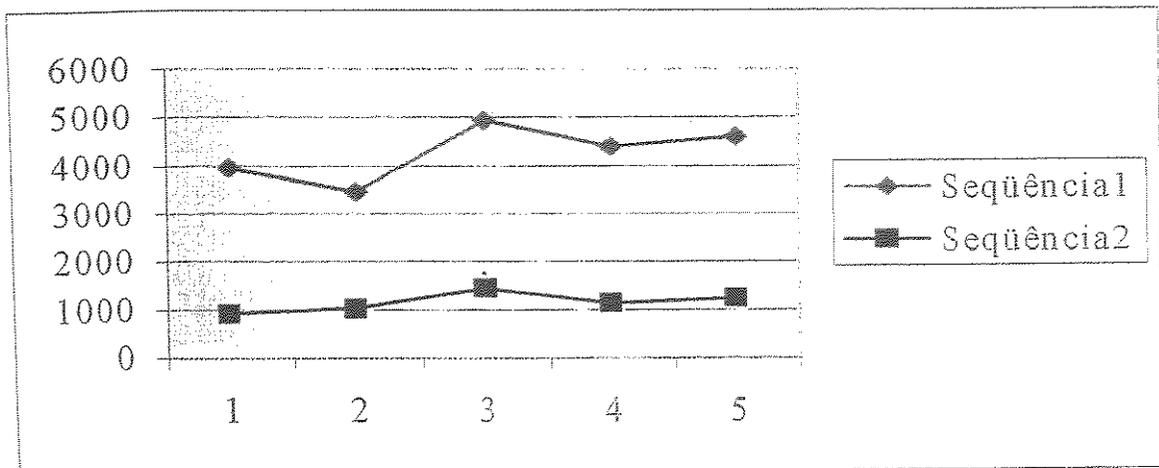


Gráfico 2- Grupo B, 20 aplicações: número total de fibras (Seqüência 1) e número de fibras regeneradas (Seqüência 2).



**Gráfico 3- Grupo A, 56 aplicações: número total de fibras (Seqüência 1) e número de fibras regeneradas (Seqüência 2).**



**Gráfico 4 - Grupo B, 56 aplicações: número total de fibras (Seqüência 1) e número de fibras regeneradas (Seqüência 2).**

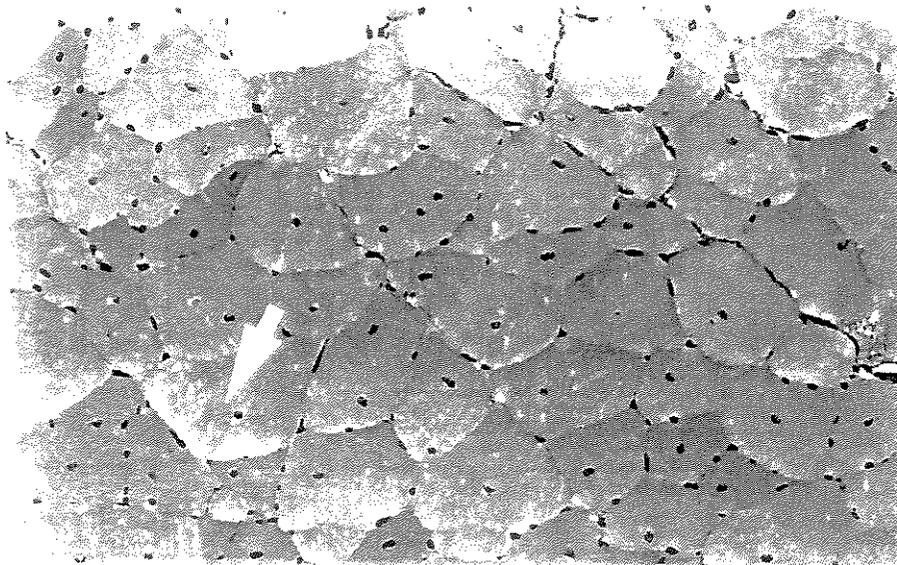


Figura 3. Músculo controle tratado com 56 injeções. Fibras regeneradas, com centronucleação (seta). H.E., 200X.

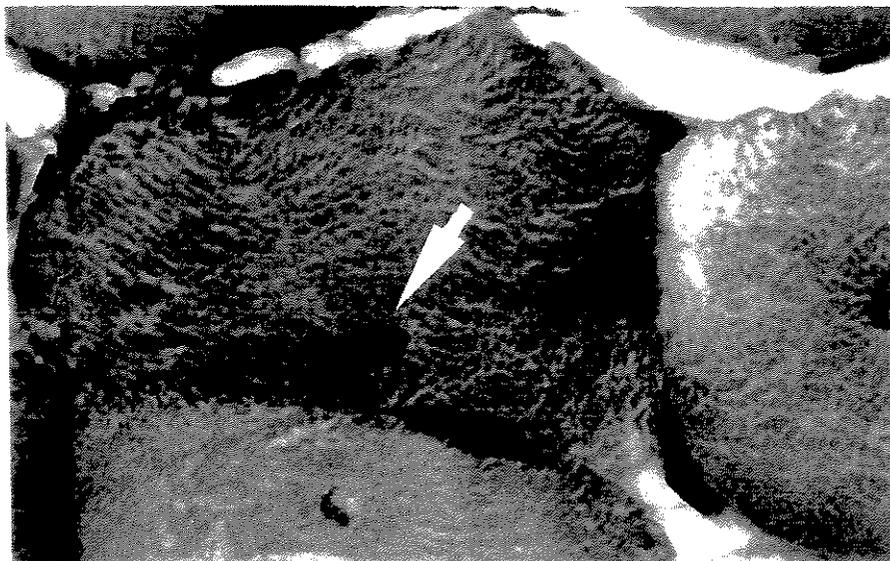


Figura 4. Músculo controle tratado com 56 injeções. Fibra regenerada, com centronucleação (seta). H.E., 1000X.

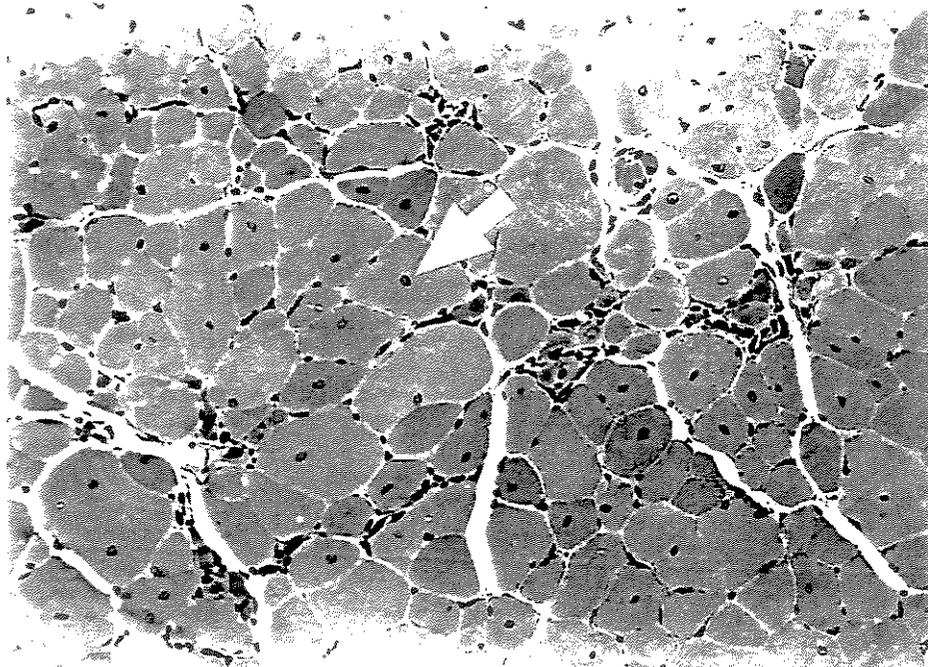


Figura 5. Músculo distrófico tratado com 56 injeções. Heterogeneidade no diâmetro das fibras regeneradas, centronucleação (seta). H.E., 200X.

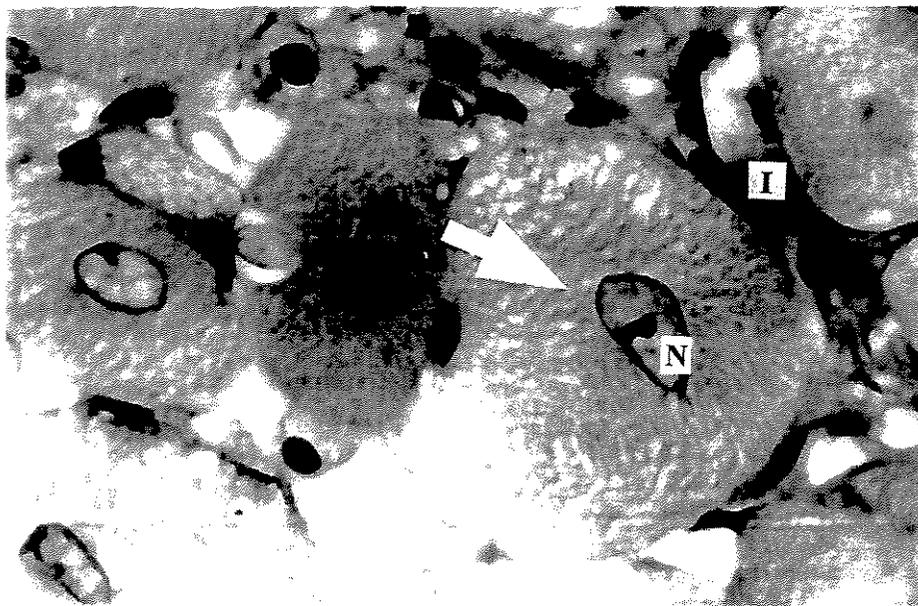


Figura 6. Músculo distrófico tratado com 56 injeções. Centronucleação (seta). Nucléolo evidente e cromatina descondensada (N). Discreto infiltrado inflamatório (I). H.E., 1000X.

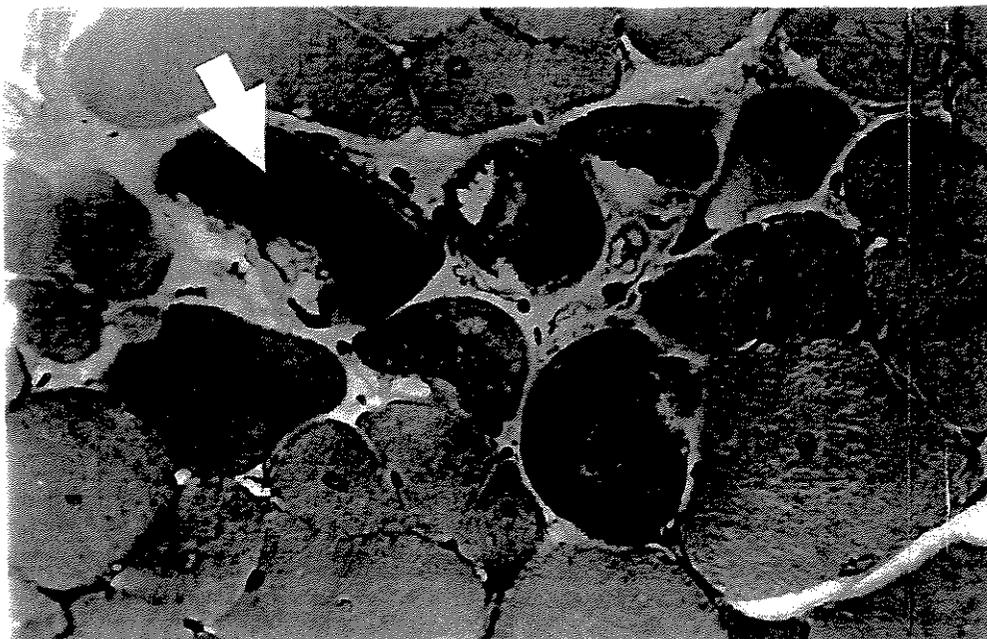


Figura 7. Músculo distrófico tratado com 56 injeções. Fibras necróticas, eosinofílicas e com citoplasma vítreo (seta). H.E., 400X.

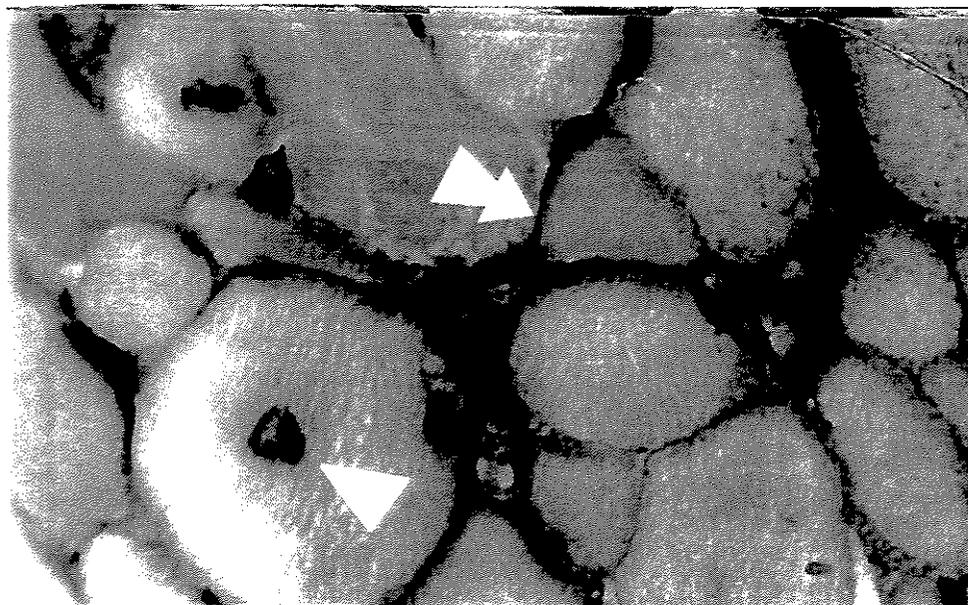


Figura 8. Músculo distrófico tratado com 56 injeções. Espessamento do endomísio (seta), centronucleação (cabeça de seta) . Picrosirius – Hematoxilina, 1000X.

#### 4. Quantificação da fibrose intersticial

Os resultados obtidos revelaram que o grupo controle com 20 aplicações apresentou média do Vv igual a 3 %, sendo que o mesmo grupo com 56 aplicações apresentou média do Vv igual a 3.2 %, com variação de 0.2 % entre os grupos.

O grupo de animais distróficos com 20 aplicações, apresentou média do Vv igual a 2.7 % e o grupo que recebeu 56 aplicações apresentou média do Vv: 3 %, com variação de 0.3%. A diferença da variação do Vv dos grupos analisados foi de 0.1%, não sendo portanto, significativa (Tabela 5).

O cálculo do coeficiente de correlação (R de Pearson) entre o grupo controle e o distrófico com 20 e 56 aplicações não apontou correlação entre os dados de ambos os grupos.

**Tabela 5 - Quantificação da fibrose intersticial – Número de pontos sobre sistema teste (168 pontos) por animal/grupo e Densidade de volume (Vv) dos cortes do músculo tibial anterior direito nos grupos analisados .**

Animal /Grupo	B10 – 20	B10 – 56	Mdx – 20	Mdx - 56
I	31	31	28	27
II	27	31	10	40
III	28	40	27	26
IV	19	14	19	24
V	28	28	31	13
Vv (%)	3.0 %	3.2 %	2.7 %	3.0 %

#### **IV. DISCUSSÃO**

---

Neste trabalho empregamos camundongos mdx associados a um modelo experimental onde, através de injeção de um anestésico local são induzidos repetidos ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares. Este modelo baseia-se no fato de que alguns anestésicos locais, ao interagirem com a membrana da fibra muscular produzem na mesma, pequenas lesões focais que resultam inicialmente na entrada abrupta de íons cálcio. Com isto ocorre inicialmente hipercontração das fibras musculares seguido por necrose das mesmas. Essa seqüência de eventos assemelha-se ao o que ocorre em fibras musculares distróficas na DMD. Algumas horas após a mionecrose, tem início o processo de fagocitose e ao final de 48 horas o material necrótico é totalmente removido. Apesar da a extensa lesão de fibras musculares, as estruturas nervosas intramusculares como os feixes axonais e os terminais nervosos, bem como o tubo endomisial são preservados. Por isto, o emprego dos anestésicos locais vem sendo amplamente utilizado para a compreensão de diversos fatores envolvidos na regeneração muscular (BENOIT & BELT, 1970)

Em que pese o fato de os camundongos mdx estarem, há cerca de duas décadas, sendo estudados para a compreensão de diversos aspectos da DMD, alguns autores os tem considerado como um modelo clínico inadequado para (os estudos acerca desta doença) estudos daquela doença humana (ANDERSON *et al.*,1988). Isto deve-se especialmente a uma antiga idéia de que, contrariamente ao o que ocorre em crianças portadoras de DMD, em animais jovens, não há comprometimento da capacidade de regeneração muscular. Assim sendo, o emprego de camundongos mdx com idade semelhante as utilizadas neste trabalho, poderia ser questionado e as observações dele originadas serem vistas com ressalvas.

Contudo, diversas observações recentes reforçam a utilidade dos camundongos mdx como um bom modelo para estudos da DMD. Um exemplo disto refere-se as observações de que a partir dos 20 dias de idade, as fibras musculares de camundongos distróficos, à semelhança das fibras de pacientes com DMD, passam a sofrer sucessivos ciclos de degeneração e regeneração (TANABE *et al*, 1986). Dessa forma é possível uma observação contínua da progressão da distrofia *in vivo*, o que obviamente seria inviável em pacientes com DMD ou em culturas de células. Outro estudo demonstra que em animais idosos (acima de 20 meses), as fibras musculares também perdem sua capacidade regenerativa (LEFAUCHEUR *et al*, 1995). A perda da capacidade regenerativa em fibras musculares é sem dúvida a característica mais marcante na DMD humana. Portanto esses dados reforçam a validade do emprego de camundongos mdx no presente trabalho.

Assim como nos pacientes portadores de DMD, em camundongos mdx os músculos esqueléticos não são igualmente comprometidos. Músculos com maior massa como por exemplo músculos quadríceps femoral e gastrocnêmio são mais intensamente afetados que músculos com menor massa. Também os aspectos da distrofia são mais acentuados nos músculos envolvidos na manutenção postural e na respiração, como por exemplo sóleo, esternomastóideo, bem como naqueles de ação contínua como os músculos intercostais e diafragma.

Neste trabalho utilizamos o músculo tibial cranial. Considerando-se que este é um músculo intermediário em termos de volume e que o mesmo apresenta desprezível função postural poder-se-ia em princípio questionar a razão do mesmo ter sido escolhido. Também poder-se-ia questionar a validade em se generalizar para toda a musculatura os resultados obtidos a partir de observações com o mesmo.

*Selecionamos o músculo tibial cranial, principalmente, por duas razões de ordem técnica. A primeira refere-se a facilidade que o mesmo oferece para que as injeções sejam feitas sem a necessidade de anestesia geral do animal. Caso tivéssemos que proceder, a cada injeção do anestésico, uma anestesia geral possivelmente o experimento teria de iniciar-se com um grande número de animais pois parte significativa dos camundongos seria perdida face a repetição semanal da anestesia geral. Assim como em humanos o músculo tibial situa-se na face cranio lateral da perna sendo portanto recoberto apenas por pele e tecido subcutâneo. Por isto, injeções intramusculares puderam ser realizadas com relativa facilidade através da pele. A segunda razão da escolha do músculo tibial cranial deve-se ao fato do mesmo ser recoberto tanto em sua face profunda, como superficialmente, por uma fâscia muscular relativamente espessa. A presença desta faz com que qualquer líquido, que não contenha substâncias capazes de digerir elementos do tecido conjuntivo, como por exemplo hialuronidase e colagenase, ao ser injetado no ventre muscular do tibial permaneça restrito a esse músculo. Admite-se assim que este fato facilitaria a ação do cloridrato de lidocaína.*

*Acreditamos que o fato do músculo tibial cranial ser um músculo menos comprometido pela distrofia não deverá limitar as observações deste trabalho. Contrariamente a isto é possível que seu emprego torne nossas conclusões com maior capacidade de generalização que caso tivéssemos empregado um músculo em que os sinais da distrofia fossem mais intensos. O que pode ocorrer de diferente em relação a outros músculos é que no curso natural da doença o músculo tibial cranial sofra um menor número de ciclos de degeneração e regeneração. Assim sendo ao utilizá-lo estaríamos induzindo um determinado número de mitoses que seria menor caso empregássemos um*

músculo postural ou de maior volume. Dessa forma, utilizando-se um músculo não comprometido na evolução natural da doença, estaríamos preservando o modelo da atuação de outros fatores de interferência.

Os músculos controle (tibial cranial esquerdo) de ambos os grupos não foram submetidos a nenhum tipo de aplicação, uma vez que foram utilizados para quantificar a população total de fibras no músculo de ambos os grupos sem a interferência de nenhum agente indutor de lesão.

É fato conhecido que a introdução de uma agulha no ventre muscular promove uma lesão mecânica imediata nas fibras e conseqüentemente desencadeia o processo de regeneração da população de fibras atingidas. Dessa forma, esta metodologia comprometeria a quantificação da população de fibras do referido músculo em condições normais.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar *in vivo* se o decréscimo do número de fibras regeneradas em animais distróficos se deve à exaustão da capacidade regenerativa das células satélites ou à fibrose intersticial.

Está bem estabelecido que a necrose das fibras musculares deve-se a ausência de distrofina, porém, a perda da capacidade de regeneração das fibras musculares seguramente não está associada a este fator (RAFAEL *et al.*, 1998; GROUNDS *et al.*, 1992; ITAGAKI *et al.*, 1995). Também é sabido que a regeneração das fibras musculares, independente da natureza da lesão ou do agente lesivo, faz-se pela ativação das células satélites que situam-se junto ao sarcolema das fibras musculares (BISCHOFF, 1998).

Estudos *in vitro* com células satélites obtidas de pacientes com DMD, demonstram que elas perdem, com o avançar da idade, a capacidade de se reproduzir. Em crianças com

2 anos de idade, 6% dessas células são capazes de sofrer 50 divisões mitóticas; enquanto que aos 7 anos de idade, uma pequena fração delas divide-se apenas 10 vezes consecutivas. Isto contrasta com células satélites de crianças normais as quais, em sua totalidade, são capazes de se reproduzir *in vitro*, por 56 vezes sucessivas (WEBSTER & BLAU, 1990). Esses dados sugerem fortemente que a redução da capacidade de regeneração das fibras musculares deve-se à exaustão do potencial miogênico das células satélites.

Contudo, apesar da correlação existente entre a redução do número de divisões das células satélites e o agravamento da distrofia, a diminuição da capacidade mitótica destas células não é ainda um fator totalmente aceito para justificar o quadro clínico e os óbitos em pacientes com DMD. Um dos fatores que dificultam a aceitação dessa hipótese reside no fato dessas observações terem sido feitas *in vitro*.

Os primeiros estudos, em camundongos mdx, demonstraram que as células satélites são capazes de passarem por repetidos ciclos de degeneração e regeneração sem que isto comprometa a manutenção de sua capacidade miogênica. Essa conclusão deve-se ao fato de que a população de fibras musculares do músculo soleo não sofre alteração mesmo após ter recebido 12 aplicações de um anestésico local (ITAGAKI *et al.*, 1995). A persistência da capacidade replicativa de mioblastos de camundongos mdx foi também demonstrada por estudos *in vitro* (BOCKHOLD *et al.*, 1998), bem como por estudos *in vivo* que demonstram que não há diferença entre a capacidade regenerativa de músculos de camundongos mdx e C57bl/10 (GROUNDS *et al.*, 1992).

Nossos resultados mostraram que ao final 56 aplicações, a população de fibras regeneradas nos animais distróficos sofreu uma redução de 48% em relação ao grupo

controle. Por outro lado, ao final de 20 aplicações a redução da população de fibras foi de (0.2%), não sendo significativa em relação à população de animais distróficos.

Esses dados não são concordantes com aqueles de ITAGAKI *et al.* 1995. A razão para tal discordância não está clara, mas uma possibilidade refere-se ao número de injeções do agente mionecrótico. Considerando-se que a cada injeção cerca de 80% das fibras são atingidas, estima-se que ao final das 56 aplicações cada fibra sofra 44 ciclos de degeneração e regeneração (SADEH *et al.* 1985). Considerando-se ainda que a cada ciclo as células satélites sofrem 4 divisões mitóticas (BISCHOFF, 1998), calcula-se que ao final disto, em nossas condições experimentais cada célula satélite tenha sido submetida a 176 divisões.

Usando-se o mesmo raciocínio estima-se que nos experimentos de ITAGAKI *et al.* 1995, os 12 ciclos induzidos produziram apenas 40 divisões. Nossa hipótese é que esse número de divisões mitóticas seja insuficiente provocar alterações na capacidade regenerativa da fibra muscular. Essa idéia encontra sustentação em nossos próprios achados pois constatamos que mesmo com 20 aplicações, onde seriam induzidos 64 divisões, a capacidade regenerativa não se altera sugerindo que com esse número de mitoses não há exaustão da capacidade replicativa das células satélites. Dessa forma, o número de ciclos mitóticos observados neste modelo é insuficiente para comprometer o potencial miogênico, já que é inferior ao citado na literatura (WEBSTER & BLAU, 1990; SCHULTZ, 1996).

Contudo, a redução da população de fibras em 48% no grupo dos animais mdx em relação ao controle denota uma significativa diminuição no número de divisões mitóticas das células. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos nos estudos realizados

por WEBSTER & BLAU, 1990 e por IRINTCHEV *et al.*, 1997, referentes à redução da capacidade miogênica das células por exaustão dos ciclos mitóticos.

Um outro dado importante oferecido por KARPATI *et al.*, 1988, revela que ao final de 60 dias encontra-se uma população de fibras com centronucleação evidente que representa cerca de 80 % da população total de fibras do músculo, contudo, a porcentagem de fibras regeneradas obtida em nossos resultados é discordante. Uma possível explicação para este achado baseia-se nos estudos de ZACHARIAS & ANDERSON; 1991, onde é sugerida a possibilidade de uma redução no número de fibras regeneradas pelo retorno do núcleo para a periferia da fibra. Após a lesão, as fibras musculares apresentam seus núcleos distribuídos centralmente, sendo que parte delas progressivamente apresentam migração nuclear em direção à periferia, mas isso ainda não está totalmente estabelecido.

Ao mesmo tempo que se investiga a origem da redução do número de fibras regeneradas por meio da exaustão da capacidade mitótica das mesmas, diversos autores procuram estabelecer uma correlação entre esta redução e com a fibrose intersticial.

Está bem estabelecido que a proliferação do tecido conjuntivo está associada à substituição de fibras necróticas em pacientes portadores da DMD, caracterizando a fibrose. Da mesma forma, a proliferação de tecido conjuntivo em animais distróficos é descrita por TANABE *et al.*, 1986; LEFAUCHER *et al.*, 1995; ITAGAKI *et al.*, 1995 e IRINTCHEV *et al.*, 1997.

Para alguns autores a redução da capacidade regenerativa deve-se ao aumento da fibrose intersticial promovendo a formação de uma barreira mecânica. Isto impediria a migração das células satélites durante a formação do miotubo resultando num decréscimo

da atividade miogênica. Isto explicaria, por conseguinte, a evolução da DMD nos pacientes (LEFAUCHER *et al.*, 1995; ITAGAKI *et al.*, 1995).

Contudo, em nossos resultados não foi constatada fibrose intersticial. Foi possível observar pelo método do Picrosirius – Hematoxilina uma discreta formação de tecido conjuntivo e fibroblastos junto ao endomísio e perimísio, sem entretanto constituir uma fibrose propriamente dita (PASTORET & SEBILLE, 1995). Os dados obtidos com a análise estereológica da densidade de volume deste tecido formado junto aos músculos revelaram que a quantidade de conjuntivo presente nos animais B10 e MDX com 20 e 56 aplicações não variou de modo significativo, uma vez que em ambos, o aumento desse componente dentro do mesmo grupo não atinge 0.5 % e variação entre os grupos é de 0.1%, sendo portanto não significativa.

Dessa forma, os resultados obtidos não correspondem aos citados na literatura (LEFAUCHER *et al.*, 1995; ITAGAKI *et al.*, 1995), não havendo dados que sugiram a formação de fibrose nos animais distróficos. Este fato explica-se pela própria sucessão de eventos que integram o processo de reparo. Como não foi constatada uma redução do número de fibras musculares, não houve formação de um tecido fibroso cicatricial que permeasse os espaços deixados pela ausência fibras.

A ausência de uma fibrose maciça que impediria a migração dos mioblastos exclui a tese de que este fator seria o responsável pela redução da capacidade regenerativa das fibras e reforça a idéia de que esta redução estaria ligada à fatores intrínsecos às células, como um provável esgotamento da capacidade miogênica.

## V. CONCLUSÃO

---

De acordo com nossos resultados, podemos concluir que:

1. *A redução da capacidade regenerativa das fibras está diretamente associada a exaustão da capacidade proliferativa das células satélites;*
2. *Não há qualquer evidência de que a redução da capacidade regenerativa destas fibras esteja associada ao aparecimento de fibrose intersticial.*

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Anderson, J.E. A role for nitric oxide in muscle repair: Nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11(5), p1859-1874, 2000.
- Anderson, J.E.; Garret, K.; Moor, A.; McIntosh, L.; Penner, K. Dystrophy and myogenesis in mdx diaphragm muscle. *Muscle Nerve*, 21, p.1153-1165, 1998.
- Behemer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Neto, A.G.F. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: EDART - EDUSP, p.80, 1976.
- Benoit, P.W.; Belt, W. D. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine ®). *J. Anat.*, 107 (3), p.547-556, 1970.
- Bertorini, T.E.; Bhattacharya, S.K.; Palmieri, G.M.M.A.; Chesney, C.M. Pifer, D.; Baker, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 32, p. 1088-1092, 1982.
- Bischoff, R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology (vol.1)**. USA: McGraw-Hill, p. 97-118, 1998.
- Bockhold, K. J.; Rosenblatt, J.D.; Partridge, T. A. Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve*, 21, p.173-183, 1998.
- Bonilla, E.; Samitt, C.E.; Miranda, A.F.; Hays, A.P.; Salviati, G. DiMauro, S.; Kunkel, L.M.; Hoffman, E.P.; Rowland, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, 54, p.447-452, 1988.
- Bulfield, G.; Siller, W.G. ; Wight, P.A.; Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, p.1189-1192, 1984.

- Carlson, B.M. Regeneration of entire skeletal muscle. *Fed. Proc. Bethesda*, 45(5), p. 1456-1469, 1986.
- Engel, A.G.; Yamamoto, M.; Fischbeck, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology (vol.2)**. USA: McGraw-Hill, p. 1130-1187, 1998.
- Francke, U.; Ochs, H.D.; de Martinville, B. Minos Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, Chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am. J. Genet.*, 37, p.250-267, 1985.
- Grounds, M.; McGeachie, J. K. Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic mice: an autoradiographic study. *Muscle Nerve*, 15, p.580-586, 1992.
- Hagiwara, Y.; Mizuno, Y.; Takemitsu, M.; Matsuzaki, T.; Nonaka, I.; Ozawa, E. Dystrophin-positive muscle fibers following transplantation into mdx nude mice. *Acta neuropathol.*, 90, p. 592-600, 1995.
- Heslop, L.; Morgan, J.E.; Partridge, T.A. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *Journal of Cell Science*, 113(12), p. 2299 – 2308, 2000.
- Hoffman, E.P.; Brown, R.H.Jr.; Kunkel, L.M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51, p. 919-928, 1987.
- Irintchev, A.; Zweyer, M.; Wernig, A. Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophic mdx mice. *Neuromuscular Disorders*, 7, p.117-125, 1997.

- Itagaki, Y.; Saida, K.; Iwamura K. Regenerative capacity of mdx mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. *Acta Neuropathol.*, 89, p.380-384, 1995.
- Junqueira, L.C.; Bignolas, G.; Brentani, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissues sections. *Histochem.J.*, 11 (4), p. 447 – 455, 1979.
- Karpati, G.; Carpenter, S.; Prescott, S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve*, 11, p. 795-803, 1988.
- Lefaucher, J. P.; Pastoret, C.; Sebille, A.; Phenotype of Dystrophinopathy in old mdx mice. *The Anatomical Record.*, 242, p.70-76, 1995.
- Mauro, A. Muscle Regeneration. Raven Press-New York, 560p., 1978.
- Narita, S.; Yorifuji, H. Centrally nucleated fibers (CNFs) compensate the fragility of myofibers in mdx mouse. *Neuroreport*, 10, p.3233-3235, 1999.
- Pasternak, C.; Wong, S.; Elson, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 128 (3), p. 355-361, 1995.
- Pastoret, C.; Sebille, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of the Neurological Sciences*, 129, p. 97-105, 1995.
- Pearson, C.M. The striated muscle. The Williams & Wilkins Company - Baltimore, 518p., 1973.

- Rafael, J.A.; Tinsley, J.M.; Potter, A.C.; Deconinck, A.E.; Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin trasgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nature Genetics*, 19, p.79-82, 1998.
- Reimann, J.; Irintchev, A.; Wernig, A. Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx. *Neuromuscular Disorders*, 10(4-5), p. 276-282, 2000.
- Sadeh, M.; Czyewski, K.; Stern, L. Chronic myopathy induced by repeated bupivacaine injections. *Journal of the Neurological Sciencis*, 67, p.229-238, 1985.
- Schmalbruch, H.; Hellhammer, U. The number of satellite cells in normal human muscle. *Anat. Rec.* 185, 279-288, 1976.
- Schultz, E. satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Developmental Biology*, 175, p.84-94, 1996.
- Sicinski, P.; Geng Y.; Ryder-Cook, A. S.; Barnard, E.A.; Darlinson M.G.; Barnard, P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244, 1578-1580, 1989.
- Sunada, Y.; Campbell, K.P. Dystrophyn-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Current, Opinion in Neurology*, 8, p.379-384, 1995.
- Tanabe, Y.; Esaki, K.; Nomura, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.*, 69, p. 91-95, 1986.
- Torres, L.F.; Duchen, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphologicas studies of nerves, muscles an end-plates. *Brain*, 110, p.269-299,1987.

Verellen-Dumoulin, C.; Freund, M.; DeMeyer, R. Expression of an x-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal x-chromosome. *Hum. Genet.*, 67, p. 115-119, 1984.

Vilquin, J.T.; Brussee, V.; Asselin, I.; Kinoshita, I.; Gingras, M.; Tremblay, J.P. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle Nerve*, 21, p. 567-576, 1998.

Webster, C.; Blau, H. M. Accelerated Age-Related decline in replicative life-span of Duchenne Muscular Dystrophy Myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somatic Cell and Molecular Genetics.*, 16 (6), p.557-565, 1990.

Zacharias, J.M.; Anderson, J. E. Muscle regeneration after imposed injury is better in younger than older mdx dystrophic mice. *Journal of Neurological Science.*, 10, p.190-196, 1991.