



Trabalho Final

Mestrado Integrado em Medicina

Clínica Universitária de Medicina Física e Reabilitação

Alterações vasculares e novas abordagens terapêuticas na Distrofia Muscular de Duchenne

João Francisco Gonçalves Dionísio

Junho, 2017



Trabalho Final

Mestrado Integrado em Medicina

Clínica Universitária de Medicina Física e Reabilitação

Alterações vasculares e novas abordagens terapêuticas na Distrofia Muscular de Duchenne

João Francisco Gonçalves Dionísio

Orientado por: Prof.^a Doutora Anabela Cardoso Pinto Noronha Sanches

Junho, 2017

Lista de abreviaturas

- Antagonistas dos receptores da angiotensina II (**ARA II**)
- Complexo distrofina – glicoproteína (**CDG**)
- Distrofia Muscular de Becker (**DMB**)
- Distrofia Muscular de Duchene (**DMD**)
- Enzima Conversora da Angiotensina (**ECA**)
- Factor de crescimento endotelial vascular (**VEGF**)
- Factor de crescimento insulina-like 1 (**IGF-1**)
- Fosfodiasterase-5 (**PDE5**)
- Guanil Ciclase (**sGC**)
- Guanina Monofostato Ciclase (**cGMP**)
- Inibidores da Enzima conversora da Angiotensina II (**IECAs**)
- Óxido nítrico (**NO**)
- Óxido nítrico sintetase neuronal (**nNOS**)
- Receptor γ estrogénio- relacionado (**ERR γ**)
- Receptor 1 do factor de crescimento endotelial vascular (**VEGFR-1**)
- Receptor 2 do factor de crescimento endotelial vascular (**VEGFR-2**)
- Sistema-renina-angiotensina-aldosterona (**SRAA**)

Resumo

A distrofia muscular é uma doença neuromuscular, progressiva, hereditária ligada ao cromossoma X, atingindo crianças do sexo masculino. A distrofia muscular de Duchenne é a mais frequente e conhecida pela sua gravidade e rápida evolução. O fenótipo apresentado resulta de uma alteração do gene da distrofina, produzindo-se uma proteína distrofina inviável, formando-se um músculo vulnerável ao dano mecânico.

É uma doença incapacitante, caracterizada pela perda precoce da capacidade de andar, com diminuição da esperança média de vida, sendo hoje as principais causas de morte, principalmente condicionadas por doenças do foro cardiovascular.

A DMD actualmente não tem uma terapia curativa e encontra na fisioterapia, na cirurgia, no uso dos corticóides e no acompanhamento da patologia cardíaca inerente a esta patologia, os principais meios utilizados para atrasar o progresso da doença e melhorar a qualidade de vida destes doentes. O avanço nestas terapêuticas levou ao aumento da esperança média de vida nos últimos anos, de tal forma que atualmente é considerada uma patologia da criança mas também do adulto.

Os mecanismos fisiopatológicos caracterizam-se também por alterações do foro vascular nos territórios capilares arteriais, levando a uma isquémia funcional que contribui para a degradação progressiva do músculo estriado (cardíaco e esquelético), cada vez mais susceptível à lesão mecânica produzida pela atividade repetida e consequente da condição física do doente. É neste contexto que aparecem as abordagens vasculares como terapêuticas promissoras no tratamento da DMD, que visam melhorar a capacidade de relaxamento dos vasos que está alterada nesta condição, promovendo a vasodilatação e estimulando o processo de angiogénese, onde o VEGF assume um papel importante. Estes mecanismos pró-angiogénicos estimulam a miogénese, essencial para a regeneração do músculo lesado.

Esta revisão incide nos mecanismos vasculares que estão associados à DMD e no estudo dos mesmos para a identificação de possíveis alvos terapêuticos onde poderemos actuar, na tentativa de aumentarmos as opções terapêuticas nesta patologia.

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML.

Palavras-Chave: Distrofia muscular de Duchene; Distrofina; VEGF; Angiogénese; Miogénese;

Abstract

Muscular dystrophy is a progressive, hereditary neuromuscular disease linked to the X chromosome, affecting male children. Duchenne muscular dystrophy is the most frequent and is known for its severity and rapid evolution. The phenotype presented results from a change in the dystrophin gene, producing an infeasible dystrophin protein, forming a muscle vulnerable to mechanical damage.

It is a disabling disease, characterized by the early loss of walking ability, with a decrease in the average life expectancy. The main causes of death are the cardiovascular ones. being the main causes of death the cardiovascular causes.

DMD currently does not have a curative therapy, being the physiotherapy, surgery, the use of corticoids and the monitoring of the cardiac pathology inherent in this pathology, the main means used to delay the progress of the disease and to improve the quality of life of these patients. The advancement in these therapies has led to an increase in the average life expectancy in recent years, and is now considered not only a pathology of the child but also of the adult.

DMD is also characterized by vascular disorders, leading to functional ischemia that contributes to the deterioration of the patient's physical condition. It is in this context that vascular approaches appear as promising therapies in the treatment of DMD, which aim to improve the relaxation capacity of vessels which is altered in this condition, promoting vasodilation and stimulating the process of angiogenesis, where VEGF plays an important role. These pro-angiogenic mechanisms stimulate myogenesis, essential for the regeneration of the injured muscle.

This review focuses on the vascular mechanisms that are associated with DMD and their study for the identification of possible therapeutic targets where we can act in an attempt to increase the therapeutic options for this pathology.

The final work expresses the opinion of the author and not of the FML.

Key words: Duchenne muscular dystrophy; Dystrophin; VEGF; Angiogenesis; Myogenic;

Índice

Lista de abreviaturas.....	5
Resumo	7
Abstract	9
Introdução à Distrofia Muscular de Duchenne	13
- História Natural da Doença.....	13
- O papel da distrofina.....	17
- Tratamento	20
Novos alvos terapêuticos – o território vascular.....	23
Objetivo	27
Metodologia.....	29
Resultados	31
Discussão	33
1- A vasodilatação como resposta fisiológica	33
1.1 - Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)	33
1.2.- Fosfodiesterase-5 (PDE5)	35
2- O papel do VEGF no aumento da densidade da rede vascular	37
2.1- Modulação dos Recetores do VEGF – Flt-1 e Flk-1.....	39
2.2. - Miogénese	40
2.3 - Receptor γ estrogénio- relacionado (ERR γ)	41
3 - O exercício físico	42
Conclusão	47
Agradecimentos	49
Bibliografia.....	51

Introdução à Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular, progressiva e fatal, que afecta indivíduos do sexo masculino e que apresenta fenótipos variáveis tendo em conta o tipo de distrofina em causa.

A DMD é o tipo de distrofia muscular mais comum em crianças, com uma incidência de 1 caso em cada 3600-6000 recém-nascidos do sexo masculino. É uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossoma X em consequência de deleção variável no gene da distrofina. Conhecida pela sua gravidade e rápida evolução, é também a Distrofia Muscular mais conhecida e mais bem estudada de entre os vários tipos. A Distrofia Muscular de Becker (DMB) é a que mais se assemelha à DMD, com a diferença na gravidade, que é menor, e na evolução, que é mais lenta.

A DMD caracteriza-se principalmente pela fraqueza muscular e atrofia progressiva, levando à diminuição progressiva da capacidade funcional nomeadamente a de correr, subir escadas e de marcha, até à perda total de deambulação entre os 7 e os 13 anos.

A abordagem desta patologia sofreu uma revolução com a descoberta, nos anos 80, do gene da distrofina, permitindo melhor compreensão dos mecanismos etiopatogénicos e formulação de novas hipóteses terapêuticas.

A evolução positiva na sobrevida na DMD ocorreu assim devido às abordagens terapêuticas utilizadas actualmente e desenvolvidas ao longo do tempo, com o maior conhecimento das bases moleculares, celulares e da fisiopatologia das distrofias musculares.

- História Natural da Doença

O músculo esquelético é o primeiro a deteriorar-se com perda de autonomia funcional na primeira década de vida. Os problemas do miocárdio aparecem numa fase mais tardia, sendo que a cardiomiopatia clinicamente relevante em 90% dos casos aparece a partir dos 18 anos, consistindo essencialmente na fibrose do músculo cardíaco e alterações do ritmo e da condução. No coração o processo de remodeling cardíaco também ocorre e finaliza com fibrose. As autópsias realizadas dos miocárdios distróficos foram conclusivas na apresentação de áreas de hipertrofia, atrofia e de fibrose.

Há claramente doença no miocárdio muito antes do início dos sintomas clínicos, daí ser recomendado o tratamento de cardiomiopatia associada à DMD antes do início dos mesmos. Os estudos recomendam que se realize uma triagem ecocardiográfica no momento do diagnóstico ou a partir dos 6 anos de idade.

A estas alterações aliam-se alterações do foro respiratório, com a diminuição da força muscular dos músculos respiratórios, perda de mobilidade torácica, desvios cifoescolióticos da coluna progredindo para um severo compromisso respiratório do tipo restritivo.

As anomalias cárdio-respiratórias são a principal causa de morte na 3^a/4^a década de vida. A idade média de morte dos doentes com DMD era de 19,6 anos. Nos últimos 15 anos, observa-se um significativo aumento da esperança média de vida para os 27,9 anos, muito devido à implementação de ventilação mecânica assistida (Fig.1). No início as complicações respiratórias eram as mais frequentes causas de morte, mas o aparecimento da ventilação mecânica veio mudar este paradigma e colocar as causas cardíacas como as principais causas de morte destes doentes.²⁵

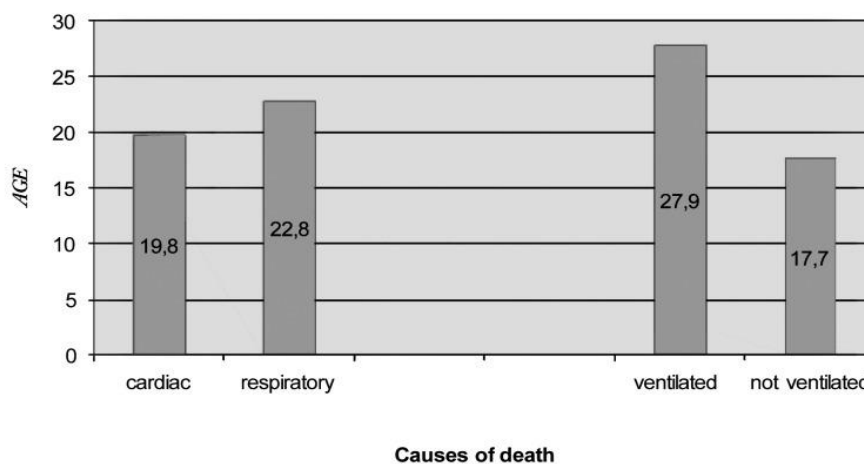


Figura 1 – Principais causas de morte na DMD

Pode-se assim concluir que o território cardíaco e as intervenções sobre o mesmo tem um papel muito importante no prognóstico vital dos doentes com DMD. Ao atuarmos com o objectivo de atenuar a isquémia funcional ao nível do território cardíaco conseguimos diminuir o risco cardíaco e prevenir o *remodeling* cardíaco e muscular.

Sabemos igualmente que os territórios pulmonar e cardíaco são fortemente afetados pela fibrose que ocorre no músculo distrófico, por substituição do tecido normal por

tecido conjuntivo que gera focos de ectopias potencialmente graves, limitando o funcionamento fisiológico destes sistemas.

Assim, os tratamentos que visem diminuir a fibrose muscular vão ser uma aposta no tratamento destes doentes e no aumento da esperança de vida, até lá, a opção de transplante cardíaco é já uma realidade em alguns destes doentes.³

O diagnóstico que é feito numa fase inicial através do exame físico, história familiar e testes laboratoriais com alterações ao nível da creatina quinase sérica (100/200 vezes mais), que são patognómicos de lesão muscular e levantam a suspeita, necessita porém, de ser confirmado por estudo genético e análise imuno-histoquímica. O famoso sinal de Gower's, que ocorre nas manobras de levante, em que o doente empurra o corpo para cima do joelho com a mão quando se levanta, é muito característico de fraqueza muscular proximal dos membros inferiores, e por isso tipicamente observado nestes doentes.

A quantidade de distrofina encontrada no músculo esquelético vai ser também fundamental para o diagnóstico diferencial entre a DMD e a DMB. Na primeira, temos ausência total de distrofina funcional, já na segunda temos uma deficiência parcial e focal desta proteína. Porém estão descritos alguns casos de DMD com quantidade de distrofina funcional residual, com um quadro clínico mais lento. Isto faz com que a DMB seja considerada uma variante mais leve da DMD, com o início mais tardio dos sintomas e com uma conservação do estado clínico e funcional durante mais tempo. Um estudo quantitativo mais completo da quantidade de distrofina teria por isso relevância não só no diagnóstico diferencial como também na elaboração prognóstica de casos individuais e no aconselhamento genético.²⁵ De qualquer maneira, esta relação carece ainda de mais estudos por não ser sempre assim tão linear. Assim, diferenciar a ausência total e parcial de distrofina pode ajudar a distinguir DMD de um fenótipo de distrofinopatia mais leve, como é o caso da DMB.

Os estudos genéticos realizados até ao momento permitiram identificar a região do genoma onde ocorrem com maior probabilidade as mutações na Distrofia muscular (mais de 4700 mutações identificadas até ao momento): a região que vai do exão 43 ao 52 e a região entre o exão 2 ao 19, sendo as deleções mais comuns as do exão 45. Este conhecimento do padrão de deleção nas distrofias musculares permite-nos fazer o diagnóstico diferencial destes dois tipos de distrofias. Assim sabe-se que as deleções que têm início e fim com exões que codificam códons completos não interferem no padrão de leitura de transcrição. Assim, as formas de distrofina incompletas, que

parcialmente vão manter a sua função, correspondem ao fenótipo típico da DMB, com uma evolução clínica mais lenta e início de sintomas tardio. Já na DMD, acontece que as deleções começam e terminam com um exão que tem apenas um codão parcial, assim sendo nesta deleção há uma transcrição incorreta, o que leva à interrupção total do processo, dando origem a uma proteína distrofina disfuncional, com uma distrofia com maior grau de gravidade pela total disfuncionalidade da proteína.

A diferenciação clínica entre a DMD e a DMB tem como base a dependência de cadeiras de rodas, antes dos 13 anos na primeira e após os 16 anos na segunda, sendo que nesta última, pode chegar aos 40 anos. Apesar da DMB se caracterizar por um envolvimento mais leve do músculo-esquelético, a cardiomiopatia dilatada continua a ser uma causa frequente de morte nestes doentes. Os estudos sobre as deleções revelaram que a deleção nos exões 45-55 tem um prognóstico favorável em comparação com outros exões, incluindo desde doentes assintomáticos a doentes com ligeira mialgia e intolerância ao exercício físico intenso. Contudo, a miocardiopatia dilatada acaba por, mais cedo ou mais tarde, estar presente. Outros estudos mostraram que as deleções nos exões 48-49 originam fenótipos com envolvimento cardíaco mais grave.²³ Estes dados são importantes na definição do prognóstico destes doentes. Assim a DMB é uma doença com um fenótipo variável, que inclui desde doentes assintomáticos a doentes com envolvimento muscular e cardíaco. O envolvimento do músculo esquelético é independente na maioria dos casos do envolvimento cardíaco, sendo que a disfunção cardíaca é considerada atualmente uma característica primária da DMB.²³

A DMD não tem uma terapêutica curativa, mas os tratamentos existentes têm permitido alterar o decurso natural da doença, intervindo na qualidade e na esperança média de vida, actualmente na 3ª década, assumindo os corticosteróides um papel fulcral no atraso do declínio da força e função muscular. Com o aumento da esperança média de vida destes doentes, a DMD, até então considerada uma doença da criança, passou a ser considerada também uma doença do adulto, tal como se demonstra na Figura 2²⁰.

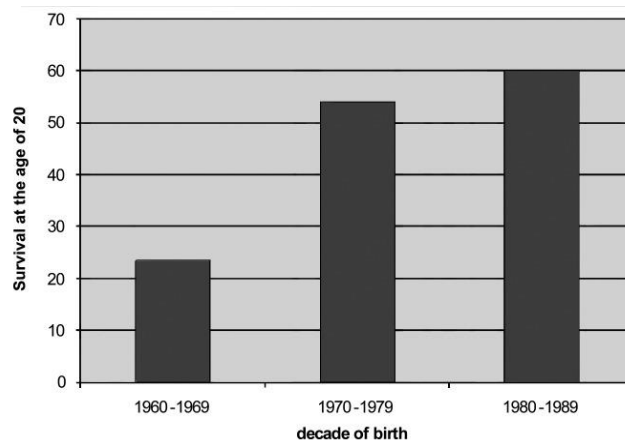


Figura 2 - Sobrevivência aos 20 anos de acordo com a década de nascimento

- O papel da distrofina

Atualmente sabe-se que a distrofina é uma proteína codificada pelo gene da distrofina, que se localiza no braço curto do cromossoma X, no locus Xp21.2. e que tem três papéis essenciais: estrutural, sinalizador e protector.

Em primeiro lugar, esta proteína forma o complexo distrofina – glicoproteína (CDG) no sarcolema, complexo este que tem como principal função ligar o citoesqueleto muscular à matriz extracelular, assumindo aqui o seu papel estrutural. Com a ausência/diminuição da distrofina, as fibras musculares tornam-se vulneráveis ao stress mecânico.

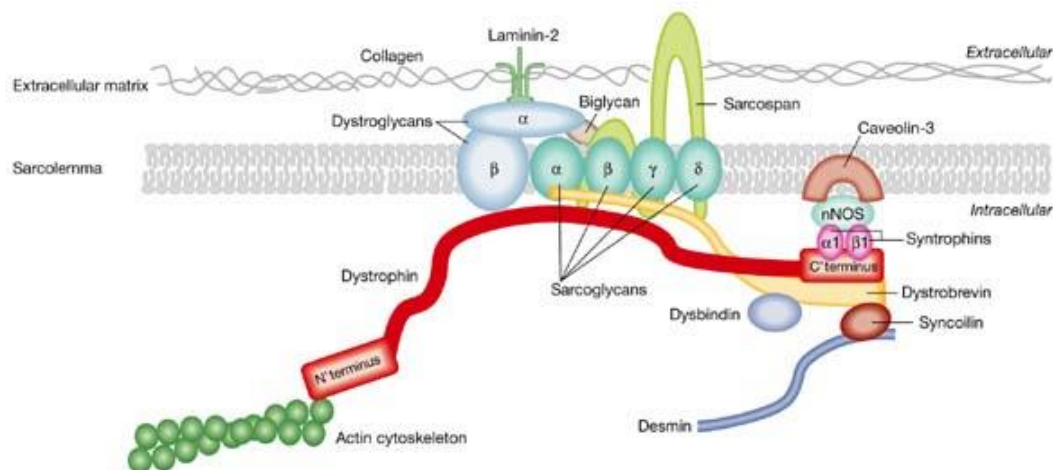


Figura 3- Complexo distrofina – glicoproteína (CDG) no sarcolema e a localização da Nos pela distrofina

A distrofina assume também o seu papel sinalizador, localizando a Óxido Nítrico sintetase (NOs) no sarcolema, esta última responsável pela produção de NO. Sabe-se que o NO é sintetizado pelas células endoteliais, pelos macrófagos e por algumas células neuronais, e assume uma importante função de sinalização extra e intracelular, através da interação com os receptores beta 2. Este promove o relaxamento do músculo liso, e assim ocorre a vasodilatação e broncodilatação fisiológicas. Actua assim em resposta à vasoconstrição fisiológica.¹⁶

A membrana das células com défice de distrofina tem assim maior susceptibilidade ao dano muscular a que acresce a dificuldade no relaxamento da musculatura vascular.

Todas estas anomalias levam a que o músculo se encontre constantemente sob condições isquémicas. Em resposta a estas alterações, originam-se ciclos repetitivos de degeneração e regeneração das miofibras, originando dano da membrana e consequente mionecrose. Esta última, leva à libertação de citoquinas, que recrutam células inflamatórias, havendo activação dos fibroblastos o que leva à fibrose, com proliferação do tecido conjuntivo, substituindo as normais fibras musculares, neste processo de remodeling fibrótico que à medida do tempo tende a pender para a fibrose progressiva com substituição de miócitos por fibrose e células adiposas. Assim, a inflamação crónica e a fibrose tornam-se essenciais para o desfecho desta patologia, com a existência de um influxo inapropriado de cálcio e sódio de base, daí que atualmente uma das abordagens na DMD tenha como alvo o controlo deste processo fibrótico.

Fisiologicamente, a capacidade regenerativa do músculo diminui com a idade, fazendo com que este defeito da degeneração/regeneração se agrave com o aumento da mesma. Por sua vez, a própria DMD caracteriza-se por uma regeneração muscular deficitária devido ao número limitado e à diminuição da capacidade das células satélite, que assumem esta função num músculo saudável.

Como já referido, o défice de distrofina leva á instabilidade das fibras da membrana do músculo, tornando as células musculares menos resistentes ao estímulo mecânico e mais susceptíveis ao influxo de electrólitos tal como o cálcio e o sódio. Assim o aumento do sódio intracelular vai originar a deplecção do ATP por alteração da bomba de Na^+ / K^+ . A água vai acompanhar as moléculas de sódio originando o edema celular. A concentração do ião cálcio extracelular vai exceder a concentração plasmática, originando um gradiente que leva á sobrecarga de Ca^+ . No músculo normal isto não

ocorre e a integridade das fibras musculares impede o influxo de electrólitos, não existindo sobrecarga de Ca^{+} que é um factor desencadeante do stress oxidativo.¹⁰

No músculo com défice de distrofina temos aparecimento de stress oxidativo, com produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS), levando à acumulação de metabolitos ácidos e substâncias inflamatórias.

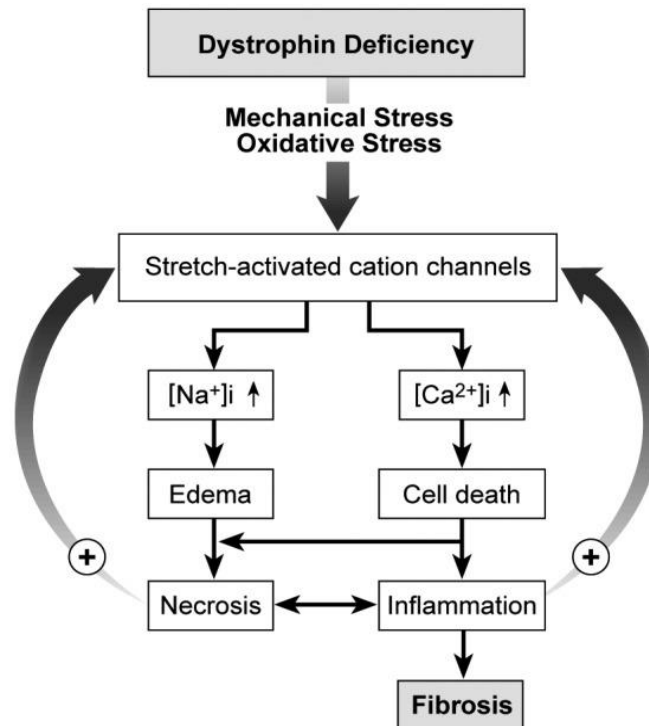


Figura 4 – Esquema do processo fibrótico iniciado pelo défice de distrofina

As espécies reativas de oxigénio (ROS) influenciam o funcionamento fisiológico do músculo-esquelético. São moléculas reguladoras de várias vias de sinalização, assumindo um papel fundamental em processos celulares como é o caso da expressão de genes e modificação de proteínas. A presença de ROS, quando geradas em excesso, assume especial importância tendo em conta os seus efeitos nocivos, nomeadamente no que diz respeito à fadiga muscular induzida pela disfunção mitocondrial provocada pelo stress oxidativo. Da mesma maneira, as ROS estão envolvidas no processo fisiológico inerente ao envelhecimento e às alterações da molécula de DNA. Apesar disto, existem dados mais recentes que identificam um papel facilitador essencial das ROS na adaptação do músculo ao exercício físico e a outros factores de stress muscular, quando em níveis otimizados, e ainda um papel funcional na imunidade inata e adaptativa.

Assim, as ROS que são geradas pela contração muscular são essenciais para a funcionalidade da célula muscular. No que se refere ao exercício físico moderado, o aumento da produção de ROS é uma resposta fisiológica fundamental. Já no que se refere ao exercício físico intenso/excessivo este aumento leva à lesão muscular. Através dos estudos referentes às doenças crónicas e musculares, como é o caso da DMD, sabe-se também que estas moléculas contribuem para necrose e inflamação das fibras musculares, dando origem a disfunção muscular, existindo vários estudos actuais sobre a relação ROS e DMD, que ao estimularem a produção de citocinas pró-inflamatórias aumentadas nas células musculares distróficas, conduzem posteriormente à necrose das fibras musculares. Mais estudos são necessários para identificar mais claramente o papel das ROS e do stress oxidativo no funcionamento fisiológico e fisiopatológico no músculo são e nas disfunções neuromusculares.²⁶

- Tratamento

Actualmente o tratamento destes doentes passa pela administração de corticosteróides, sendo os mais estudados e utilizados a prednisona, a prednisolona e o deflazacort. Sabe-se que são os únicos fármacos que conseguem modificar a história natural da doença, sendo capazes de atrasar a progressão da mesma, e de manter a força e função dos músculos esqueléticos a curto prazo (12 meses), prolongando o tempo de deambulação e melhorando a qualidade de vida destes doentes. Os estudos mostram um papel importante também na preservação da função respiratória e na prevenção da escoliose e da cardiomiopatia nos doentes com DMD, quando há tolerância ao fármaco para terapêutica a longo prazo. Os mecanismos de acção ainda não são totalmente conhecidos, apesar de existirem várias hipóteses formuladas. A evidência indica que a dose de 0,75 mg/ kg/dia de prednisona ou de prednisolona é uma dose segura e o deflazacort tem uma eficácia semelhante com uma dose diária de 0,9 mg/kg/dia.

Contudo, estes fármacos apresentam efeitos adversos que a longo prazo prejudicam a situação clínica do doente, nomeadamente, o aumento de peso, síndrome de cushing, alterações comportamentais, fraturas vertebrais, supressão do crescimento ósseo linear e ainda cataratas e imunossupressão. Estes efeitos implicam um controlo e monitorização regulares na utilização dos mesmos, com o intuito de otimizar a sua utilização nestes doentes. Na maioria dos casos os benefícios prevalecem sobre os efeitos adversos.

A decisão de qual dos corticoesteróides disponíveis deve ser utilizado , quando iniciar o tratamento e qual a melhor maneira de monitorizar os efeitos adversos deve ser tomada, tendo em conta as especificidades de cada criança, nomeadamente o estado funcional, a sua idade e os factores de risco pré-existentes para o aparecimento dos efeitos colaterais. Os estudos indicam que estes fármacos devem ser administrados precocemente, a partir dos 4/6 anos de idade, apesar de serem necessários mais estudos para se optimizar a dose ideal de equilíbrio entre os benefícios e os efeitos nefastos dos mesmos no quadro clínico destes doentes. Não é recomendada a administração nas crianças com idade inferior a 2 anos e que estejam ainda no desenvolvimento das capacidades motoras.

A prednisolona é frequentemente utilizada na Europa em vez de prednisona, e sabe-se que tem mecanismos de acção idênticos ao Deflazacort. A primeira tem a vantagem de ser mais económica e de ter grande disponibilidade no mercado. Já o Deflazacort apesar de apresentar menor risco de aumento de peso para alguns doentes, é mais caro e tem menor disponibilidade no mercado.

Alguns especialistas mantêm a terapêutica com corticoesteróides mesmo após a perda de deambulação, com o intuito de manter a força dos membros superiores e retardar a progressão da escoliose e o declínio da função cardíaca e respiratória. Neste caso, necessitam de monitorização adicional do ponto de vista cardiovascular, particularmente no que diz respeito à hipertensão, podendo exigir o ajuste das doses utilizadas.

Algum tempo após o início da corticoterapia, variável de doente para doente, os doentes acabam por invariavelmente perder força e função muscular, embora esteja provado que é uma perda menor do que a que ocorre nos doentes que não são submetidos a corticoterapia.¹⁴ É então um tratamento eficaz no que diz respeito ao prolongamento da função, mas não na recuperação total da função perdida. Em suma, as principais vantagens da corticoterapia nos doentes com DMD são: prolongamento do tempo e capacidade de andar, redução da necessidade de intervenção cirúrgica na coluna vertebral, redução da disfunção cardiopulmonar, atraso da necessidade de ventilação e aumento da sobrevida e qualidade de vida. Os parâmetros clínicos mais utilizados na avaliação da corticoterapia na DMD são: o prolongamento da capacidade de ficar de pé e levantar-se do chão, subir escadas e andar. O aumento da força muscular ou função não são incluídos. Os corticoesteróides são o único tratamento efetivo nos doentes com DMD atualmente. A inclusão de doentes sob corticoterapia em estudos

sobre DMD pode assim ser problemática por mascarar a evolução natural da doença¹⁴. O contrário, dada a evidência crescente, levanta problemas éticos.

A introdução dos corticoesteróides na terapêutica das distrofias musculares, em especial na DMD, no final da década de 60, permitiu o aumento da esperança média de vida dos doentes para a 3ª década de vida e veio revolucionar a abordagem a esta patologia, sendo actualmente a terapêutica utilizada mais eficaz.

A reabilitação motora, através da fisioterapia também assume um papel importante na qualidade de vida destes doentes atualmente, trabalhando a capacidade de andar e privilegiando o alongamento passivo e activo dos membros superiores e inferiores. Em conjugação com esta, é aconselhada a prática de natação na manutenção da capacidade cardio-respiratória, no abrandamento da diminuição de força e melhoria do estado geral. O objectivo é promover exercícios aeróbios, de baixa resistência, e de longa duração que possam prolongar ou manter a função do músculo distrófico, tendo sempre em consideração as especificidades de cada doente.

O tratamento das complicações ortopédicas, através da cirurgia, por exemplo no tratamento de deformidades das articulações e no alinhamento da coluna vertebral após o início da fase de declínio da doença, permitem aumentar a sobrevida e a qualidade de vida.²⁰

Mais recentemente, o tratamento da insuficiência ventilatória noturna com o uso de ventilação assistida em combinação com melhores cuidados cardíacos são responsáveis pelo aumento da esperança média de vida¹⁴. Tudo isto leva à necessidade de um tratamento multidisciplinar desta patologia, alargando a sua abordagem neurológica à fisioterapia e à cardiologia, com um tratamento integrador e abrangente.

Todos estes tratamentos, no entanto, não têm características curativas, mas visam melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida. Esta patologia encontra ainda algumas lacunas por existirem dificuldades na criação de ferramentas de avaliação funcional que sejam clinicamente abrangentes. Nos ensaios clínicos realizados, os doentes mais jovens têm mais fibras musculares e melhor funcionalidade das mesmas, em comparação com doentes mais velhos, sendo assim melhores candidatos para os estudos sobre as terapêuticas atuais da DMD.

Novos alvos terapêuticos – o território vascular

A isquemia funcional, preponderante no fenótipo da DMD, e o actual conhecimento do papel da distrofina permitem-nos acreditar que as terapias vasculares poderão ser fortes candidatas no futuro do tratamento da DMD, com o intuito de melhorar a capacidade de relaxamento vascular/vasodilatação e de aumentar a rede vascular, através do aumento da angiogénese – abordagem pró-angiogénica.

Como já anteriormente referido, na distrofia muscular há uma alteração do papel estrutural e de sinalização da distrofina, surgindo assim neste contexto a chamada teoria “two-hit” para a lesão do miócito e abordagem proposta para a sua atenuação através da terapia vascular, dando ênfase à necessidade de abordagens terapêuticas dirigidas aos territórios vasculares na DMD (Fig. 5).

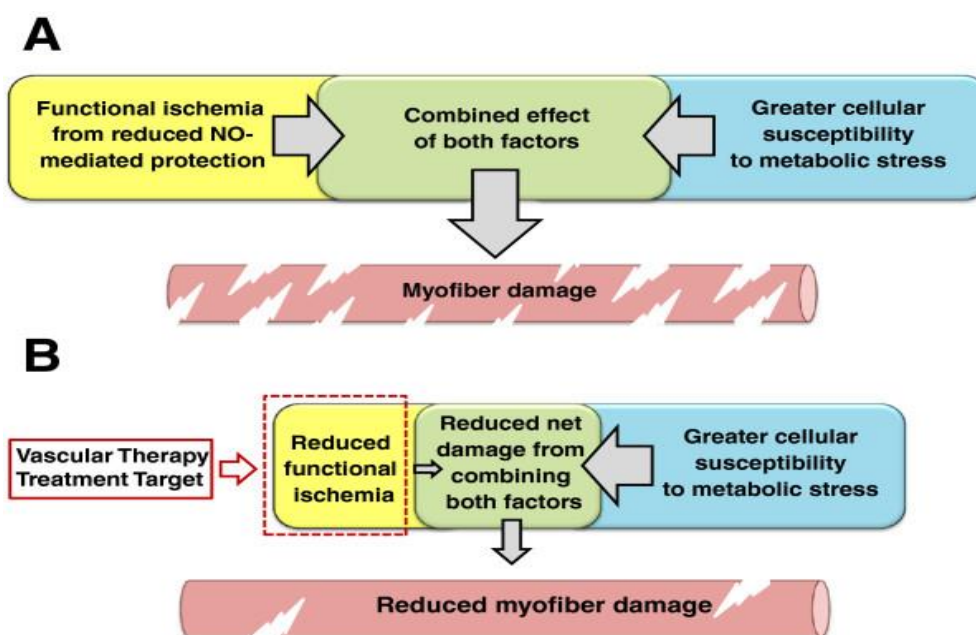


Figura 5 – Teoria “Two-hit”

A combinação dos efeitos da isquemia funcional dos músculos com défice de distrofina, devido à diminuição dos efeitos protetores do Óxido Nítrico com a maior susceptibilidade das células musculares ao stress metabólico, é essencial para a compreensão da lesão das miofibras.

O NO é então uma molécula de sinalização, que se difunde entre as células musculares lisas subjacentes aos vasos sanguíneos levando ao seu relaxamento,

facilitando a passagem do fluxo de sangue e desempenha igualmente um papel essencial na recuperação do músculo após fadiga. A sua função protetora passa também pela prevenção da isquémia face ao aumento da vasoconstrição induzida pela contração muscular. Porém, quando estudamos os ratos nNOS Knockout verifica-se que os mesmos não desenvolvem distrofia muscular, o que nos permite concluir que a degeneração muscular não pode ser explicada unicamente pela deficiência da nNOS mas por um conjunto mais alargado de mecanismos, o que dá mais força à teoria do “two-hit”.¹⁵

Embora não sejam únicos, estes dois factores assumem um papel preponderante, sendo evidente que as alterações da função vascular são catalisadoras da patógenese desta doença.⁵ Os autores da Two-Hit theory inferem que, actuar no combate à isquémica funcional, através da aposta num tratamento tendo como alvo o território vascular, pode reduzir o efeito da combinação dos dois pressupostos anteriores, diminuindo assim a lesão da miofibrila. Diminuindo a isquémia, pode-se diminuir a lesão dos miócitos, aumentar a perfusão tecidual e diminuir o risco cardíaco, através da prevenção do remodeling cardíaco e muscular. De facto, os resultados da intervenção com beta-bloqueantes e inibidores da enzima de conversão da angiotensina, com aumento da esperança média de vida, melhoria da insuficiência ventricular esquerda e indução de vasodilatação nos territórios vasculares periféricos podem deste modo ser consideradas terapêuticas dirigidas aos territórios vasculares (Ennen,2013).⁵

Outras novas abordagens terapêuticas, ainda em fase experimental e em ensaios nos modelos de ratos mdx, um modelo animal de Distrofia Muscular de Duchenne, intervindo diretamente na densidade capilar dos territórios vasculares pela indução de angiogénese através de administração direta do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) ou por downregulation do receptor tipo 1 (VEGFR-1 or Flt-1), têm mostrado a capacidade não só de aumento da angiogénese mas também na regeneração de miócito e na redução de fibrose.⁵

Na verdade, os dados obtidos nos estudos em ratos mdx, realizados com o intuito de estudar a melhoria da capacidade de relaxamento e aumento da densidade capilar para melhorar a perfusão tecidual, mostraram resultados promissores na melhoria dos fenótipos de DMD. Por outro lado, estas abordagens pró-angiogénicas parecem também ser pró-miogénicas, induzindo a capacidade de regeneração muscular, pelo recrutamento de células satélite, as células estaminais precursoras das células musculares.

Assim, atualmente com a informação existente e os estudos efectuados, estamos em condições de concluir que estes dois factores, nomeadamente a isquémia funcional dos músculos e a maior susceptibilidade das células musculares ao stress metabólico são essenciais na mediação do aumento da morte celular observada na DMD.

Outro aspecto a esclarecer e a discutir é se as alterações vasculares observadas na DMD são um efeito primário ou secundário da doença, pois sabe-se que as alterações vasculares são também uma resposta fisiológica ao envelhecimento, que está associado à diminuição da resposta à angiogénese, e no caso concreto da DMD são também uma resposta à progressão da doença.

Objetivo

Efetuei uma revisão bibliográfica que tem como principal objectivo discutir as novas terapêuticas para a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), tendo por base o actual conhecimento sobre esta patologia e a definição dos alvos terapêuticos onde se pode, ou poderá atuar, mais concretamente, no estudo da influência do território vascular no fenótipo apresentado e dos mecanismos vasculares associados à isquemia funcional do músculo distrófico e conseqüente agravamento da situação clínica, para assim identificarem-se os possíveis alvos terapêuticos dado que ainda não existe nenhuma terapia com intuito curativo e o tratamento atual restringe-se essencialmente ao uso de corticoides, beta-bloqueantes, IECAs, ventilação não-invasiva e fisioterapia, bem como ao tratamento das suas complicações.

Metodologia

A pesquisa inicial realizada na elaboração deste trabalho de revisão incluiu artigos de revisão publicados, entre 1990 e 2016, escritos em português e inglês, tendo sido realizada a pesquisa na base de dados PUBMED através da utilização das palavras-chave “Duchenne Muscular Dystrophy”, “Duchenne Muscular Dystrophy therapy” , “New treatments in Duchenne Muscular Dystrophy” e ainda “VEGF and Duchenne Muscular Dystrophy”.

Os artigos foram em primeiro lugar selecionados de acordo com o título e abstract, posteriormente lidos integralmente e foram submetidos a uma seleção final de acordo com a sua relevância e relação com a temática a abordar neste trabalho, como proposto inicialmente tendo em conta os objectivos enunciados, no que diz respeito às abordagens vasculares no tratamento da DMD.

Resultados

Depois de devidamente selecionados, dos 120 artigos escolhidos foram incluídos como referências bibliográficas de suporte a este Trabalho final de Mestrado cerca de 26 artigos, cujas referências se encontram no final deste trabalho.

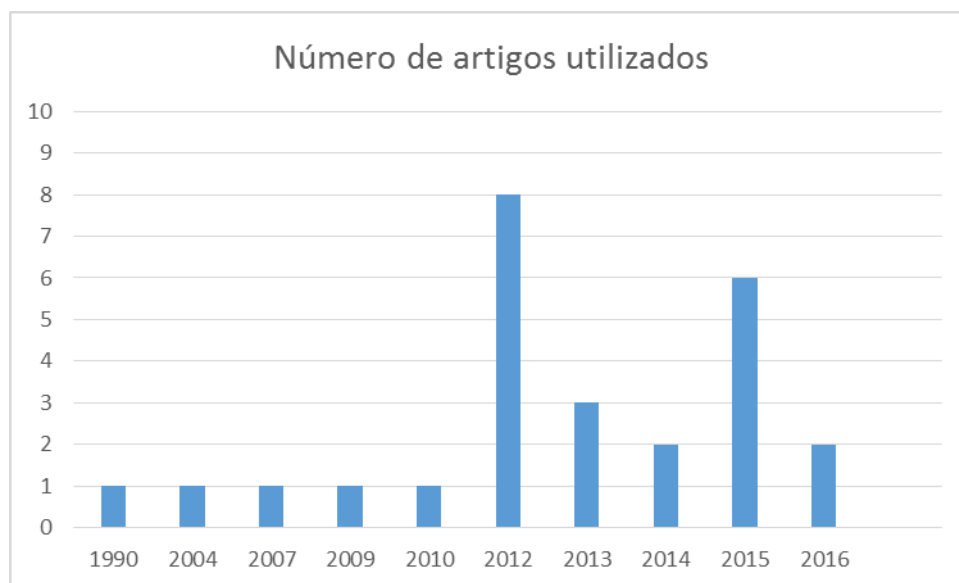


Figura 6 – Número de artigos utilizados por ano de publicação

Discussão

1- A vasodilatação como resposta fisiológica

Como já foi referido, a distrofina localiza a Óxido nítrico sintetase (NOs) no sarcolema, esta última responsável pela produção de Óxido nítrico (NO), para facilitar a vasodilatação do músculo em resposta ao aumento das necessidades metabólicas, evitando estadios de hipóxia nos tecidos. Assim a ausência de distrofina, diminui a sinalização de NO sintetase no sarcolema, com a consequente vasoconstrição e fluxo sanguíneo anormal durante a contração muscular esquelética.

Na tentativa de intervir neste processo de vasodilatação alterado como alvo terapêutico e conhecendo as funções das enzimas Fosfodiesterase-5 e da Enzima conversora da angiotensina (ECA), a utilização de fármacos que actuam na actividade destas enzimas poderá alterar a história natural da DMD, nomeadamente com os inibidores da ECA (IECAs) e os Inibidores da PDE5, aumentando consequentemente a perfusão e diminuindo a isquemia funcional.

1.1 - Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

A Enzima conversora da Angiotensina (ECA) faz parte do chamado Sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que tem um papel importante na regulação da resistência vascular periférica e do volume total de sangue do nosso organismo. Esta enzima assume como função principal converter a angiotensina I em angiotensina II, estimulando, desta forma, a normal contracção do músculo liso vascular, aumentando a resistência vascular periférica e a pressão arterial.

Ao impedirmos a produção de Angiotensina II, pela sua inibição através dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs), como é o caso do lisinopril, enalapril, ramipril, e captopril, melhoramos a capacidade de vasodilatação periférica com a diminuição da pressão arterial. De uma forma genérica, com a utilização dos IECAs nos doentes com DMD podemos, assim, diminuir a isquemia funcional e a mionecrose consequente, característica desta patologia. Sendo estes fármacos vulgarmente usados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e da hipertensão arterial, que afecta já muitos doentes com DMD em fases mais avançadas, apresentam

disponibilidade clínica que, aliada aos seus efeitos benéficos demonstrados na DMD, torna-os ótimos candidatos ao tratamento da mesma.⁵

Os estudos nos ratos mdx permitem-nos inferir que a utilização precoce de IECAs no doentes com DMD com uma função cardíaca normal, ou seja, com uma fracção de ejeção ventricular esquerda normal, permite atrasar o início e a progressão da disfunção ventricular esquerda e diminuir a mortalidade significativamente, comparando com o início mais tardio deste tratamento, quando já temos uma cardiomiopatia estabelecida. Esta administração precoce permite diminuir a pós-carga cardíaca, aumentar a contractilidade do miocárdio e melhorar o funcionamento hemodinâmico do músculo cardíaco. São necessários ainda mais estudos sobre os benefícios destes fármacos nos doentes com cardiomiopatia já estabelecida, que são ainda pouco esclarecedores. Contudo, estes são os fármacos de 1º linha no tratamento da cardiomiopatia na DMD.

Actualmente estão em estudo o uso de possíveis combinações de IECAs com bloqueadores β , esperando-se que com esta associação possamos obter resultados ainda mais promissores. Esta combinação nos doentes sem cardiomiopatia estabelecida vai permitir ao músculo cardíaco contrair mais devagar e com menos força, diminuindo o risco de lesão do músculo cardíaco, de arritmias e disfunções da automaticidade. Nos doentes com miocardiopatia já estabelecida, os estudos não demonstraram grande diferença na administração isolada ou associada com beta-bloqueadores, daí serem necessários mais estudos para avaliar a necessidade ou não do beta-bloqueador nestes casos específicos.⁵

Apesar de, com esta associação, termos um efeito positivo na sobrevivência a longo prazo, os estudos realizados até agora não mostraram diferenças significativas nos doentes tratados com IECAs isoladamente ou a combinação destes com um bloqueadores β a curto prazo e são por isso ainda alvo de controversia¹³.

Os ARAs II, antagonistas dos receptores da angiotensina II, são outra estratégia de actuar ao nível do SRAA. Os estudos da sua utilização nos ratos mdx não mostraram melhorias no músculo esquelético, mas no músculo cardíaco, pelo contrário, mostraram melhorar a função cardíaca, apesar de não serem ainda muito esclarecidos estes mecanismos, pensa-se ser por diminuição significativa da pós-carga no coração, o que

diminui a sobrecarga mecânica e a fibrose dos cardiomiócitos, diminuindo a longo prazo a mortalidade.

1.2.- Fosfodiesterase-5 (PDE5)

Quanto à fosfodiesterase-5 (PDE5), sabe-se que é uma enzima da família das fosfodiesterases cGMP (guanina monofostato ciclase) específicas, que participa da via de sinalização NO – cGMP, via esta em que a NO-sintetase produz o NO que activa a Guanil Ciclase (sGC) que finalmente sintetiza a cGMP. A cGMP activa, por sua vez, a proteína quinase G, induzindo a vasodilatação. É aqui que entra a PDE5 sendo a responsável pela degradação cGMP, promovendo a vasoconstrição, regulando-se deste modo os ciclos de vasoconstrição/vasodilatação necessários ao normal funcionamento do território vascular.

Da fisiopatologia da DMD, sabe-se que as membranas com défice de distrofina apresentam ausência de nNOS (óxido nítrico sintetase neuronal), havendo interrupção da via de sinalização NO- cGMP, originando a isquémia funcional.

Neste contexto aparecem os inibidores da PDE5, mais concretamente os inibidores cGMP-específicos da PDE5, actualmente utilizados no tratamento da disfunção eréctil devido à sua capacidade de induzir relaxamento da musculatura vascular lisa. Assim, com administração dos inibidores da PDE5, sendo o sildenafil e o tadalafil os mais utilizados, verifica-se um aumento dos níveis intracelulares de cGMP, prolongando-se, deste modo, a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo nos tecidos, nomeadamente no músculo. Assim, esta abordagem poderá ser um veículo de tratamento da DMD dirigido ao território vascular, com o potencial de minimizar a isquemia funcional.⁵

Estudos mostraram aumento da actividade da PDE-5 no músculo-esquelético dos ratos mdx, com diminuição da produção do cGMP, em comparação com um grupo controlo (Fig 7).¹⁵

Apesar de não serem tão esclarecedores, os estudos revelaram também que os inibidores da PDE-5 inibem o avanço do remodeling cardíaco nos estados iniciais da DMD. O sildenafil apresentou efeitos funcionais muito positivos, no combate ao dano do músculo cardíaco pelo aumento da carga de trabalho e pela manutenção de uma frequência cardíaca elevada. O tratamento através da inibição da PDE5 em doses padrão permite aliviar a isquémia induzida pelo exercício em doentes com DMD,

dependente da dose, e normalizar o aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético induzido pelo exercício.¹⁵

Actualmente estão em curso mais ensaios clínicos para avaliar a utilização destes inibidores nos doentes com DMD, mas tendo por base os estudos pré-clínicos e a disponibilidade clínica destes fármacos, por serem utilizados na disfunção erétil e hipertensão pulmonar, parecem ser uma boa abordagem no tratamento da DMD acautelando a indução de arritmia e o agravamento da cardiomiopatia, considerando as recomendações da American Heart Association.¹

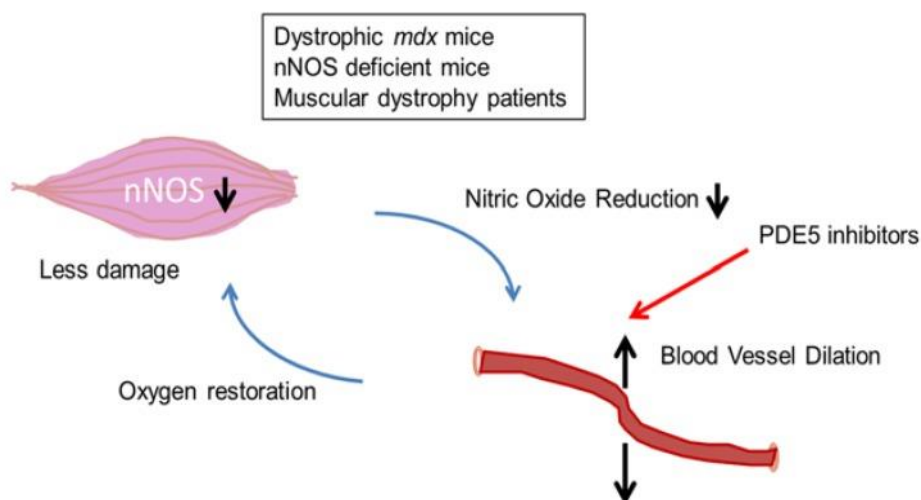


Figura 7 – O tratamento da DMD e os inibidores da PDE5

Outros estudos, sem muita evidência no músculo-esquelético humano, abordam os efeitos benéficos do Ácido acetilsalicílico (Aspirina) nas propriedades angiogénicas das células endoteliais nos ratos *mdx*. Este fármaco estimula uma maior libertação de NO das células endoteliais vasculares, aumentando o efeito protetor nas células endoteliais. Deste modo a utilização da aspirina poderá mostrar-se benéfica nesta patologia, aumentando a produção de NO (estimulando, assim, a vasodilatação) e aumentando também a longo prazo a densidade capilar e a permeabilidade da fibra muscular, com melhoria da resistência ao exercício físico.

2- O papel do VEGF no aumento da densidade da rede vascular

Outra forma de aumentar a perfusão tecidual, em particular do músculo esquelético e cardíaco que se encontra diminuída num doente com DMD, é aumentar a densidade da rede vascular que nutre os órgãos, neste caso o músculo, estimulando o processo de angiogénese. Neste contexto, o factor de crescimento endotelial vascular, o VEGF, assume um papel preponderante por ser um importante promotor da angiogénese, quer durante o processo de embriogénese, quer durante o período pós-natal.

A molécula de VEGF dominante na sinalização da angiogénese é o VEGF-A que actua pela ligação aos receptores VEGF, nomeadamente o receptor VEGF-1 (VEGFR-1 ou Flt-1) e o receptor VEGF-2 (VEGFR-2 ou Flk-1). Os estudos da expressão do gene do VEGF nos músculos dos pacientes com DMD mostraram que os níveis de VEGF são mais baixos em comparação com o grupo controlo.²²

Esta informação fez surgir a hipótese de se administrar VEGF directamente nestes doentes, de forma a aumentar a densidade capilar e a partir daí poder actuar no combate à isquemia funcional no músculo distrófico.

	Vasculature	Muscle	Physiological conditions
wild-type	<ul style="list-style-type: none"> • Normal capillary density • Normal angiogenesis • Normal flow-induced dilation in arteries 	<ul style="list-style-type: none"> • No area of necrosis • No area of intensive fibrosis • Normal regenerative capacity 	<ul style="list-style-type: none"> • Normal muscle function • Normal tissue perfusion
mdx mice	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased capillary density • Impaired angiogenesis • Decreased flow-induced dilation in arteries 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased area of necrosis • Increased area of fibrosis • Increased regenerating fibers 	<ul style="list-style-type: none"> • Muscle weakness • Increased or decreased tissue perfusion
mdx mice with enhanced angiogenesis	<ul style="list-style-type: none"> • Increased capillary density • Improved angiogenesis capacity • Decreased flow-induced dilation in arteries 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased area of necrosis • Decreased area of fibrosis • Enhanced capability of regeneration 	<ul style="list-style-type: none"> • Improved muscle strength • Increased tissue perfusion

Tabela 1– Relação entre o músculo, os capilares e a condição física

Tendo em conta esta hipótese, foram realizados vários estudos em modelos animais, ao comparar ratos mdx (com DMD), com ratos do tipo selvagem (grupo controlo), e ratos mdx aos quais foi administrado VEGF, com o objectivo de analisar relação entre o músculo, a capilaridade e as condições físicas. Os resultados foram muito promissores e reveladores do importante papel do VEGF na estimulação da angiogénese, em resposta à isquemia. No grupo controlo, registou-se uma densidade capilar normal, sem alterações musculares ou das condições físicas. Já os ratos mdx mostraram alteração da vasculatura, com diminuição da densidade vascular, e alterações no processo de angiogénese e na dilatação dos vasos como resposta fisiológica, reflectindo-se estas alterações no aumento das áreas de necrose e fibrose, com diminuição da força muscular e alteração da perfusão deste tecido, características tipicamente estabelecidas nos doentes com DMD. O grupo de ratos mdx ao qual se administrou VEGF apresentaram, ao nível do território capilar, um aumento da densidade e melhoria da capacidade angiogénica, com uma clara melhoria na capacidade de regeneração das fibras lesadas e diminuição das zonas de necrose e fibrose muscular, aumentando, deste modo, a força muscular e as condições de perfusão tecidual, alterando a deficitária condição física característica da distrofia muscular. A tabela 1 resume a relação demonstrada por Shimizu e colaboradores em 2014²². Actualmente, é conhecido o papel protetor do VEGF em relação aos neurónios motores da morte excitotóxica, estando em estudo também a sua possível utilização terapêutica da Esclerose Lateral Amiotrófica.⁴

Na verdade, o VEGF é o mais potente mitogeno específico das células endoteliais, recrutando-as para os focos hipóxicos ou isquémicos, estimula a sua proliferação e cuja ativação depende de sinalização de transcrição pelo HIF-1alfa.¹⁷ O HIF-1alfa sinaliza simultaneamente a transcrição de múltiplos genes implicados na angiogénese, glicolise, eritropoiese e biosíntese de catecolaminas e existe evidência acumulada que sugere que esta atuação é mediada por mecanismos independentes de *oxygen sensing*, tal como a redução da pressão parcial de O₂, a acidose, o calor, e o stress oxidativo na sequência de um exercício de alta intensidade.

Posto isto, prevê-se alcançar resultados idênticos nos doentes com DMD, mas é necessária uma maior informação e estudo sobre a acção do VEGF no músculo humano com défice de distrofina. Contudo, a administração futura do VEGF em doentes com DMD tem de ter em conta os seus efeitos deletérios, nomeadamente a formação de hemangiomas pelo crescimento anormal/excessivo dos vasos sanguíneos.

Os ratos mdx também mostraram especificamente diminuição da vascularização ao nível do tecido cardíaco em comparação com ratos selvagens. As abordagens pró-angiogénicas mostraram um efeito positivo da angiogénese no músculo cardíaco, com o aumento do número de capilares e consequentemente melhoria da função do miocárdio dilatado.²²

Para aumentar a eficiência vs eficácia desta possível terapêutica, um outro estudo mostrou que a combinação da administração de VEGF, promotor da angiogénese, com o factor de crescimento insulina-like 1 (IGF-1), promotor da regeneração muscular, pode complementar o efeito positivo do VEGF, por indução da recuperação funcional na lesão isquémica do músculo-esquelético de uma forma mais saliente do que com o VEGF isolado.²² Estes dados vêm reforçar a ideia da importância destas estratégias alternativas para se otimizar os ganhos no decurso natural na DMD, nomeadamente no que se refere às terapêuticas angiogénicas.

2.1- Modulação dos Recetores do VEGF – Flt-1 e Flk-1

Outra abordagem pró-angiogénica que possivelmente poderá aumentar a densidade da rede vascular passa pela modulação dos receptores do VEGF, o Flt-1 e o Flk-1, também com o objectivo de intervir na isquémia funcional provocada pela DMD.

Sabe-se que o Flt-1 tem alta afinidade de ligação para o VEGF-A, que comparando com o Flk-1, apresenta o domínio tirosina-cinase mais fraco, impedindo com a sua actividade o acesso do Flk-1 ao VEGF-A . Funciona, assim, como um regulador negativo da angiogénese, sendo que a diminuição dos níveis de Flt-1 provoca o aumento da concentração de VEGF-A livre disponível para ligar ao Flk-1 e induzir a resposta pró-angiogénica. O Flt-1 pelas suas características é um novo alvo a incidir na terapia pró-angiogénica na DMD. Inversamente, o principal efeito pró-angiogénico é gerado através do Flk-1.

Os estudos realizados com manipulação destes receptores em ratos mdx, mostraram um aumento da densidade capilar e o consequente aumento da perfusão do tecido muscular, com melhoria franca da função contráctil do musculo esquelético.

Estes mecanismos permitem-nos assim inferir que é possível estimular a angiogénese, através da modulação dos seus receptores, tal como com a administração directa do VEGF, deixando em aberto outra via de abordagem pró-angiogénica para responder à diminuição da perfusão.

2.2. - Miogénese

Estudos *in vitro* demonstraram que o VEGF estimula também o crescimento das células precursoras miogénicas. Assim, a utilização do VEGF como abordagem pró-angiogénica parece também ter repercussão na miogénese, induzindo a capacidade de regeneração muscular, pelo recrutamento de células satélite, as células estaminais precursoras das células musculares, comprovado em modelos de ratos mdx.

A relação entre os efeitos pro-angiogénicos destas abordagens com os efeitos pró-miogénicos ainda necessita maior estudo, mas os dados actualmente obtidos permitem-nos inferir que esta neovascularização induzida pelo VEGF no músculo com défice de distrofina promove um maior recrutamento de macrófagos, e a conseqüente remoção dos resíduos celulares, e o aumento da libertação de factores secretados por células mononucleares e miogénicas ativadas e do recrutamento de células mononucleares derivadas da medula óssea, que por fim irão libertar factores activadores do processo miogénico.

Neste processo miogénico, assumem especial importância as células satélite, essenciais no crescimento muscular pós-natal e na regeneração das fibras musculares, em interacção com os fibroblastos.

As células satélite proliferam em resposta ao exercício físico ou outro agente de stress, como o trauma, de modo de facilitar o crescimento e o remodeling muscular. Vários estudos realizados demonstram um aumento agudo de células satélite após exercício físico prolongado de resistência em jovens adultos e idosos. Assim, a manutenção da massa muscular depende da integridade da maquinaria regenerativa. Esta maquinaria permite aliviar numa fase precoce os distúrbios verificados nas doenças neuromusculares, como na DMD, em que se verifica uma regeneração muscular compensatória nos estadios iniciais da doença, na tentativa de contrariar a deterioração das fibras musculares pelo défice de distrofina.⁶ Com o agravamento da doença, tal como ocorre no envelhecimento fisiológico mas a outra escala, o músculo vai perdendo a sua capacidade de regeneração, pela diminuição, quer do número de células satélite, bem como pela perda da capacidade de diferenciação. Assumindo que a neovascularização induzida pelo VEGF induz, também, o processo miogénico,

poderemos promover a maior e melhor regeneração das fibras, estimulando a proliferação e a sobrevivência das células satélite.

Sabe-se também que o funcionamento destas células satélite, bem como do processo de regeneração, são dependentes da influência dos próprios capilares, através das células endoteliais e dos factores por elas libertados, que mostraram promover a proliferação das células satélite e a sua sobrevivência. Estudos mostraram que, no músculo adulto normal, as células satélite localizam-se próximo dos capilares, o que permite uma maior e melhor interação com as células endoteliais.²² Desta forma, podemos perceber a importância da relação entre a angiogénese e a miogénese no funcionamento normal do músculo nomeadamente no que diz respeito à relação entre os capilares e as células satélite. Este quadro é reforçado no músculo dos atletas, que apresenta maior número de capilares e de células satélite por miofibras, pois ao serem submetidos a uma maior carga de trabalho, vêem a sua densidade capilar aumentar (em resposta ao aumento das necessidades).

O VEGF torna-se, assim, num alvo terapêutico que requer maior investigação sendo o seu papel pró-angiogénico e pró-miogénico promissor no tratamento da DMD. Não obstante, sabe-se que a utilização futura do VEGF como terapêutica necessitará de uma monitorização apertada devido às suas capacidades carcinogénicas.

2.3 - Receptor γ estrogénio- relacionado (ERR γ)

Outra abordagem, também com base no aumento da densidade vascular, apesar de ainda pouco explorada, é através do conhecimento da funcionalidade do Receptor γ estrogénio- relacionado (ERR γ). Este receptor é conhecido pela sua elevada expressão no músculo-esquelético. E vários estudos enfatizam a sua capacidade de induzir factores angiogénicos, como o VEGF, promovendo a angiogénese no músculo. Estes estudos mostram que, no músculo-esquelético dos ratos mdx, o ERR γ apresenta uma regulação negativa. Ao promover-se a superexpressão selectiva deste receptor no músculo-esquelético desta estirpe de ratos, verificou-se a melhoria da rede capilar e, conseqüentemente, do fluxo sanguíneo, melhorando a tolerância ao exercício físico. Estes resultados necessitam ainda de ser transpostos para o músculo dos doentes com DMD.

3 - O exercício físico

Uma das abordagens terapêuticas muito faladas e estudadas na DMD é o exercício físico. O exercício físico tem sido proposto como terapia paliativa no doente com DMD, não recuperando as funcionalidades do doente, mas permitindo manter a amplitude articular, a flexibilidade, o alinhamento estrutural, evitando a irremediável contractura durante mais tempo. Por outro lado, o exercício físico moderado contribui para a redução da perda de força muscular, atrasando os tempos de perda de autonomia e é um estímulo para a síntese de proteínas musculares e para o funcionamento mitocondrial.

Os dados atuais sublinhados numa extensa revisão por Janek Hyzewicz et al, 2015, revelam a importância de uma atividade física moderada regular nos doentes com DMD no sentido de evitar a atrofia pelo desuso e todas as complicações que possam surgir como consequência do sedentarismo e falta de actividade. Sabe-se que também o exercício está associado à atenuação do stress oxidativo, melhoria do fluxo de cálcio, estímulo mecânico do sarcolema, diminuição da isquémia muscular recorrente, promoção da angiogénese e diminuição da fibrose que está presente nos músculos distróficos.

Contudo, os benefícios têm que ser sempre balanceados com as consequências nefastas para o músculo pelo seu excesso. Na história natural da DMD, à medida que a idade avança, progride também a perda da massa muscular, aumentando as dificuldades na realização de tarefas da vida diária, acabando por aparecer a dependência da cadeira de rodas, seguindo-se a cardiomiopatia e/ou a insuficiência respiratória e a morte antecipada. De acordo com os dados atuais relativos ao músculo com défice de distrofina, sabe-se também que o exercício físico excessivo poderá conduzir a lesão muscular num músculo que apresenta maior fragilidade das suas fibras. Assim poderemos estar a exacerbar o ciclo de degeneração/regeneração nos músculos distróficos e aumentar a deposição de tecido conjuntivo contribuindo para a evolução do quadro clínico da DMD. A dor muscular, a elevação do enzima CK e a mioglobínúria no período de 24h após o exercício são sinais de lesão por excesso de exercício, indicando que o exercício em causa não é indicado nestes doentes. Podemos assim concluir que o exercício de alta resistência e excêntrico está de todo contraindicado por aumentar o risco de lesão muscular.

Já o exercício físico de baixa intensidade parece ser benéfico, nomeadamente no que diz respeito ao exercício aeróbio e ao exercício dentro de água, como acima referido.

A manutenção da funcionalidade muscular com o exercício está assim condicionada pela fragilidade dos músculos com déficit de distrofina, daí ser ainda controversa a aposta no exercício físico nestes doentes.

Os estudos da influência do exercício físico no fenótipo dos ratos mdx mostram que, quando sujeitos a exercício físico de baixa intensidade (como corrida voluntária, natação) pelo período de 4-8 semanas há aumento da força e resistência muscular e da expressão de proteínas mitocondriais e de contração muscular, com diminuição do stress oxidativo. Já os dados sobre exercício de corrida revelam um agravamento da condição cardíaca e estão ainda por esclarecer os reais contributos da natação neste campo. Quando observados os dados nestes mesmos modelos referente ao exercício de elevada intensidade (como corrida voluntária, corrida em passadeira) durante 10 semanas observa-se uma aproximação ao fenótipo dos doentes com DMD, com diminuição da força muscular, aumento da necrose, fibrose e da deposição de tecido adiposo. Por outro lado, os dados dos estudos em doentes com DMD mostram que, nos estádios precoces (antes dos 12 anos), pode haver benefício com o treino de bicicleta, atrasando-se o comprometimento funcional destes doentes. Nos estádios mais avançados (após os 12 anos), os dados revelam que o treino dos músculos mastigadores e respiratórios melhora a capacidade funcional destes doentes.⁸ A comparação entre o exercício respiratório com ou sem instrumentos de assistência mecânica e os benefícios do exercício, mais concretamente da natação e da corrida no tecido cardíaco destes doentes tem ainda que ser esclarecidos. Contudo são necessários mais estudos, pois sabe-se que existem diferenças fisiológicas entre os ratos mdx e os doentes com DMD, nomeadamente nos primeiros em que há uma melhor e mais rápida recuperação da perda muscular progressiva, uma menor acumulação de tecido conjuntivo e adiposo, e mantêm a sua capacidade regenerativa até estádios mais avançados. Por sua vez, os doentes com DMD têm precocemente uma adaptação limitada ao exercício físico devido a uma patológica e acelerada redução da função cardiorespiratória, com limitação na utilização do O₂ periférico, diminuição de força muscular, muito concretamente dos membros inferiores. A resposta vasoconstritora dos músculos ao exercício nestes doentes não é atenuada, devido ao bloqueio dos mecanismos já anteriormente abordados.⁸

A figura 8 resume os principais resultados da revisão efetuada por Janek Hyzewicz et al, 2015 que visou a comparação dos efeitos de diferentes protocolos de exercício em ratos mdx e doentes com DMD

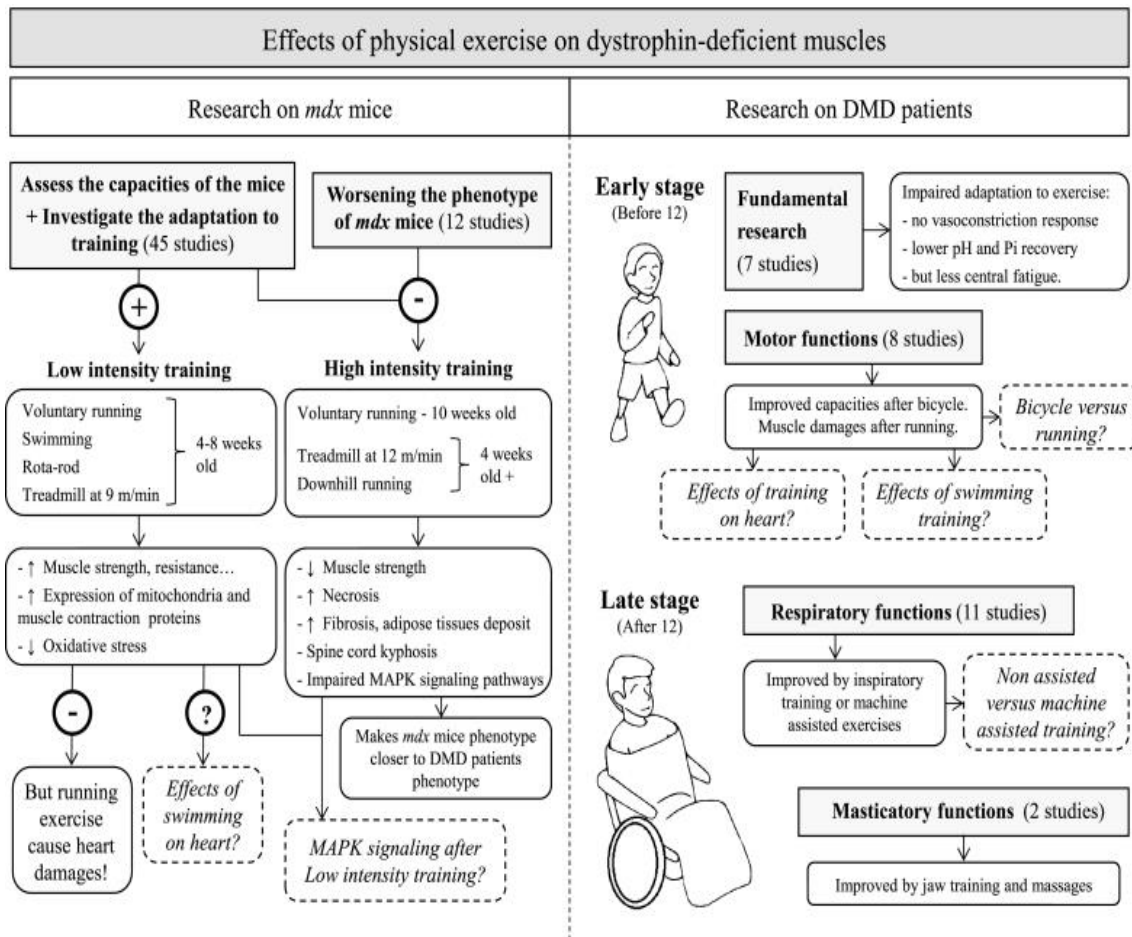


Figura 8 – Comparação dos dados dos estudos sobre efeitos do exercício físico sobre os músculos com défice de distrofina nos ratos mdx e nos doentes com DMD.

O exercício físico adequado num adulto saudável aumenta a libertação de IGF-1 e diminuição da miostatina. Estas modificações das citocinas tendem a promover efeitos anti-fibróticos. Este conhecimento pode ser utilizado no combate á fibrose dos músculos distróficos, sendo necessários mais estudos.

Mais concretamente, no que toca às abordagens vasculares no tratamento da DMD, pensa-se que o exercício físico possa também exercer um papel muito importante como

terapêutica vascular nesta patologia. Os estudos revelam que o exercício físico regular, num músculo saudável promove adaptações fisiológicas, estando incluída nestas a melhoria no processo angiogénico, para responder ao aumento das necessidades do organismo, o que nos leva a colocar a hipótese de que o exercício físico seja uma boa abordagem vascular no tratamento da DMD, muito principalmente devido ao efeito sistémico produzido por exercício multimuscular que contrasta com os efeitos localizados em exercício delineados para o aumento de força muscular de apenas pequenos e seletivos grupos de musculares.¹⁸

Os estudos musculares de atletas de alta competição revelaram a presença de uma extensa rede vascular, em relação aos indivíduos mais sedentários, revelando que o exercício físico regular promove os mecanismos angiogénicos. Por sua vez, outros estudos revelaram no músculo esquelético de jovens adultos saudáveis pós exercício um aumento da expressão do mRNA relacionado com a angiogénese. Estes mecanismos angiogénicos são estimulados pela hipóxia e pela tensão de cisalhamento a que estão sujeitos os músculos durante o exercício físico e pela libertação de factores de crescimento, como o VEGF. O exercício acaba por ter um poderoso efeito na angiogénese, nomeadamente ao nível do músculo esquelético e cardíaco, no aumento da rede vascular e consequente aporte de oxigénio aos órgãos de uma forma sistémica, que neste caso em concreto, opõe-se aos estudos de infiltração do VEGF nos ratos mdx, em que temos um efeito mais local e não plurisegmentar como ocorre com exercício físico multimuscular. Assim o exercício físico vai permitir um maior alcance a nível de todos os grupos musculares, quando comparado com a infiltração com VEGF, permitindo que, através de um método não tão invasivo como é a infiltração, possamos intervir de uma forma mais generalista e abrangente no decurso natural da DMD. Estudos mais recentes em doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica revelaram também que o exercício físico aumenta a produção de VEGF, sugerindo uma possível utilização do exercício como terapêutica futura nestes doentes.

Apesar de toda a informação disponível sabemos que alguns clínicos recomendam o exercício físico, mais em específico no início da doença, quando a força é maior. Pelo contrário há outros que se focam na evicção do esforço físico em excesso e por isso este é um assunto controverso na actualidade.³

A equipa multidisciplinar que acompanha estes doentes deve incluir um fisiatra, através do qual deve ser instituído um plano de fisioterapia e de exercício físico. Esta fisioterapia deve privilegiar o alongamento passivo e activo dos membros superiores e

inferiores, prevenindo as contracturas. Mesmo após o doente perder a sua capacidade de andar, estes exercícios mostraram ser importantes na melhoria da dor e da rigidez muscular, bem como na manutenção de um controlo adequado da angiogénese. Assim precisamos de actuar precocemente nas crianças com DMD e promover esta abordagem terapêutica.

Têm sido realizados vários estudos com o objectivo de definir com melhor precisão o tipo, a frequência e a intensidade do exercício físico que podem ser optimizados nos doentes com DMD. Os estudos atuais e recomendações tem por base os resultados obtidos em animais com fenótipos de distrofia muscular, tendo em conta o conhecimento da fisiopatologia desta doença. Os estudos não são totalmente esclarecedores e são necessários mais dados para se poder definir a quantidade de exercício físico adequada aos doentes com DMD, com a qual estes possam beneficiar, e perceber como o exercício físico pode ou não influenciar a evolução da doença. Os estudos atuais ainda apresentam muitas lacunas no que diz respeito ao conhecimento dos reais benefícios do exercício no tratamento da DMD. Porém a imobilização não é aconselhada, a força excessiva deve ser evitada, e nunca se pode esquecer que o exercício, para além da capacidade funcional existente, acarreta um aumento da susceptibilidade ao dano nos músculos distróficos, o que reforça a necessidade de mais e melhores estudos nesta área.

Nestas abordagens vasculares, fica ainda por esclarecer se o aumento da rede capilar que é gerada terapêuticamente pela estimulação da angiogénese é, do ponto de vista morfológico e funcional, idêntica à rede capilar base e se a mesma é, a longo prazo, benéfica para estes doentes.

Conclusão

A distrofina insuficiente, a rede capilar vascular e a sua contração assumem um papel fulcral na etiopatogénese da DMD, e a intervenção ao nível dos defeitos vasculares característicos desta doença permite-nos atenuar a isquémia funcional do músculo e intervir na história natural desta patologia.

Neste trabalho foi realizada uma avaliação sistemática das alterações específicas no músculo distrófico e, através do conhecimento dos reais mecanismos, foram estudados os possíveis alvos terapêuticos já identificados na literatura científica, numa abordagem diferente da que se faz por norma em casos de DMD.

Procurando intervir na capacidade deficitária de vasodilatação, em resposta fisiológica ao stress mecânico, o uso dos IECAs e os Inibidores da fosfodiesterase-5 permitem-nos melhorar a capacidade sistémica de relaxamento dos vasos, tendo um papel importante não só na prevenção e melhoria dos eventos cardíacos associados à DMD, bem como no decurso natural da DMD, já amplamente demonstrados na literatura científica. Tendo a vantagem de, uma vez que são actualmente utilizados como primeira linha em patologias como a Insuficiência cardíaca ou a disfunção eréctil, apresentarem perfis de segurança documentados, estando disponíveis clinicamente. Os estudos com os IECAs mostraram maior benefício com a sua administração precoce, antes de estabelecida qualquer cardiomiopatia. Os inibidores da PDE5 carecem de mais ensaios em doentes com DMD. Já os ARAs II mostraram ter benefícios no tratamento da cardiomiopatia associada à DMD.

As terapias pró-angiogénicas, através da administração directa do VEGF, isoladamente ou com associação do factor de crescimento insulina-like 1 (IGF-1), e da modulação do receptor do VEGF, ou ainda através de um exercício multimuscular de intensidade moderada, apresentaram alterações benéficas na arquitectura vascular nos ratos mdx, promovendo o aumento da função e força muscular e ainda da perfusão tecidual, com a consequente melhoria da condição física e do fenótipo. Os dados obtidos nos ratos mdx precisam ainda de mais estudos e de serem transpostos para ensaios clínicos em doentes com DMD, para avaliação da sua aplicabilidade numa futura terapêutica das distrofias.

Estas terapias, em estreita relação com os processos miogénicos, através da estimulação da regeneração do músculo pelas células satélite, poderão ser fundamentais

numa patologia que se caracteriza pelo esgotamento do ciclo normal de degeneração/regeneração e do número de células satélite funcionais. Os estudos mostram que a administração do VEGF estimula, desta forma, o crescimento das células precursoras miogénicas, tendo um grande contributo na regeneração das fibras lesadas.

Contudo, apesar do racional existir para a sua aplicação em portadores de DMD, não são terapias estabelecidas e carecem de mais e melhor investigação translacional.

Quanto ao exercício físico regular, apesar de controverso, muito principalmente, pela dificuldade em estabelecer-se a melhor frequência, regularidade, intensidade e duração do exercício físico, o seu papel como estimulador dos processos de angiogénese com efeito sistémico, em resposta ao estímulo mecânico é também uma abordagem vascular que também está atualmente em estudo, com resultados preliminares que mostraram o potencial benefício do mesmo e mais valia na sua utilização no tratamento dos doentes com DMD. Não estando por isso longe, uma demonstração de evidência que refute a posição atual de alguns clínicos que se opõem ao exercício como tratamento na DMD e muito em breve, estas terapias que têm como alvo a vasculatura poderão, individualmente ou em associação, ser utilizadas clinicamente, melhorando o prognóstico dos doentes com DMD.

Outra questão que esta revisão levanta e que será fundamental para a futura aplicação do VEGF (e demais associações) na DMD é saber se a vasculatura que é gerada terapêuticamente pela estimulação da angiogénese é morfológica e funcionalmente idêntica à vasculatura base, e qual o benefício a médio e longo prazo para os doentes com DMD. São também necessários mais estudos no que diz respeito à segurança na manipulação destes mecanimos angiogénicos, nunca esquecendo as suas capacidades carcinogénicas.

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar à minha orientadora, a Professora Anabela Pinto, por ter aceite este desafio desde o primeiro dia, pelo seu apoio e incentivo constantes, pela exigência e competência, e por acreditar em mim. Não podia deixar de agradecer também pelo seu acompanhamento médico e sentido de humanidade ao longo destes anos.

Agradecimento especial à minha família, à minha mãe Mercês, ao meu pai Juvenal e à minha irmã Andreia, pela presença e pelo apoio de todos, mesmo à distância, pela motivação e por nunca me falharem, apesar de longe sempre perto. Este trabalho tem um pouco de vós, e sem vocês não seria possível. Um agradecimento especial ao meu irmão Chico, que foi a pessoa que mais teve que me ouvir e acompanhar com a tese todos os dias em casa, e pelas suas revisões e raspanetes. Este trabalho também dedico a ele, pelo companheirismo no caminho durante todos estes anos. Obrigado.

À Mariana pelo apoio constante e incondicional, por estar sempre lá para mim e por me motivar nos momentos de maior cansaço ou desânimo, pelas revisões, pelos desabafos e incentivos e por acreditar sempre em mim.

A ti Pai, pela força no caminho e por nunca desistires de mim.

Por fim, agradeço e dedico este trabalho também, a todos os profissionais de saúde, médicos e fisioterapeutas que desde sempre trabalharam comigo e me acompanharam, e todos quantos pelo mundo fora trabalham para melhorar as condições e qualidade de vida dos doentes com Distrofia Muscular. E claro, a todos os doentes que sofrem de Distrofia Muscular e às suas famílias. O trabalho é uma pequena homenagem a todos eles.

Bibliografia

1. Armstrong, C. (Dezembro 2012). AHA Releases Statement on Sexual Activity and Cardiovascular Disease. *Am Fam Physician*, 1074-1076.
2. Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., . . . Constantin, C. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol. Elsevier Ltd*, 9(1):77–93.
3. Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., . . . Constantin, C. (Novembro 2009). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neuro online*, 9(1):77–93.
4. Carilho, R., Carvalho, M. d., Swash, M., Pinto, S., Pinto, A., & Costa, J. (2014). Vascular endothelial growth factor and amyotrophic lateral sclerosis: the interplay with exercise and noninvasive ventilation. *Muscle Nerve*, 545-50.
5. Ennen, J. P., Verma, M., & Asakura, A. (2013). Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy. *BioMed*, 3:9.
6. Farup, J., Madaro, L., Puri, P., & Mikkelsen, U. (2015). Interactions between muscle stem cells, mesenchymal derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease. *Cell Death and Disease*, 1-12.
7. Hoffman, E. P., Reeves, E., Damsker, J., Nagaraju, K., McCall, J. M., Connor, E. M., & Bushby, K. (Novembro 2012). Novel Approaches to Corticosteroid Treatment in Duchenne Muscular Dystrophy. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 23(4): 821–828.
8. Hyzewicza, J., Ruegg, U. T., & Takeda, S. (2015). Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2 , 325–342.

9. Jung, I.-Y., Chae, J. H., Park, S. K., Kim, J. H., Kim, J. Y., Kim, S. J., & Bang, M. S. (Fevereiro 2012). The Correlation Analysis of Functional Factors and Age with Duchenne Muscular Dystrophy. *Annals Rehabilitation Medicine*, 36(1): 22–32.
10. Klingler, W., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., & Schleip, R. (2012). The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myologica*, 184-195.
11. KR, W., Lechtzin, N., & Judge, D. (Fevereiro 2007). Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. . *Biochim Biophys Acta*. 2007 Feb;1772(2):229–37., 1772(2):229–37.
12. Lladó, J., Tolosa, L., & Olmos, G. (2013). Cellular and molecular mechanisms involved in the neuroprotective effects of VEGF. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:181.
13. Matthews, E., Brassington, R., Kuntzer, T., Jichi, F., & Manzur, A. (Maio 2016). Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*, 5;(5).
14. Merlini, L., & Sabatelli, P. (2015). Improving clinical trial design for Duchenne. *BMC Neurology*, 15:153.
15. Nichols, B., Takeda, S., & Yokota, T. (2015). Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains. *brain sciences*, 275-298.
16. Nowak, K. J., & Davies, K. E. (2004). Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* , 5 (9)872-6.
17. Ohno, H., & Shirato, K. (2012). Effects of Exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *J Phys Fitness Sports Med*, 5-16 .
18. Olfert, I., Baum, O., Hellsten, Y., & Egginton, S. (2016). Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 310(3).

19. P.Loenneke, J., Thiebaud, R. S., Abe, T., Manfro, I. G., & Marin, P. J. (Maio 2013). Acute blood flow restricted exercise to treat Duchenne muscular dystrophy: would it be efficacious? *Frontiers in physiology*, 1-3.
20. Passamano, L., Taglia, A., Palladino, A., Viggiano, E., D'Ambrosio, P., Scutifero, M., . . . Orlando Paciello Giulio Piluso, G. N. (2012). Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myologica*, 121-125.
21. R.Kole, & Leppert, B. (2012 Jul). Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov Med*, 14 (74):59-69.
22. Shimizu-Motohashi, Y., & Asakura, A. (2014). Angiogenesis as a novel therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy through decreased ischemia and increased satellite cells. *Frontiers in physiology*, 5:50.
23. Taglia, A., Petillo, R., D'Ambrosio, P., Picillo, E., Torella, A., Orsini, C., . . . Politano, L. (2015). Clinical features of patients with dystrophinopathy sharing the 45-55 exon deletion of DMD gene. *Acta Myologica*, 9-13.
24. Tovar-y-Romo, L. B., & Tapia, R. (2012). Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro*, 4 (2).
25. Werneck, L. C., & Bonilla, E. (1990). Distrofina na diferenciação das Distrofias. *Arq. Neuro_psiquiat*, 48(4): 454-464.
26. Zuo, L., & Pannell, B. K. (2015). Redox Characterization of Functioning Skeletal Muscle. *Frontiers in Physiology*, 1-9.

