KARLA PATRÍCIA CARDOSO ARAÚJO

**Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados
pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) - Avaliação da viabilidade da
terapia e reestruturação da Distrofina Muscular**

São Paulo

2009

KARLA PATRÍCIA CARDOSO ARAÚJO

**Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados
pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) - Avaliação da viabilidade da
terapia e reestruturação da Distrofina Muscular**

São Paulo

2009

KARLA PATRÍCIA CARDOSO ARAÚJO

**Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados
pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) - Avaliação da viabilidade da
terapia e reestruturação da Distrofia Muscular**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2207
FMVZ

Araújo, Karla Patrícia Cardoso

Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) – Avaliação da viabilidade da terapia e reestruturação da distrofina muscular / Karla Patrícia Cardoso Araújo. – 2009.

161 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. GRMD. 2. Bortezomibe. 3. Proteassoma. 4. Distrofina. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso de bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular progressiva – Avaliação da viabilidade da terapia e reestruturação da distrofina muscular", protocolado sob o nº893/2006, utilizando 05 (cinco) cães, sob a responsabilidade do Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/02/09".

(We certify that the Research "Use of bortezomib in GRMD dogs (Golden Retriever muscular dystrophy) – Therapy viability validation and restructure of the muscle dystrophy", protocol number 893/2006, utilizing 05 (five) dogs, under the responsibility of Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 02/11/2009).

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARAÚJO, Karla Patrícia Cardoso

Título: Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) – Avaliação da viabilidade da terapia e reestruturação da Distrofina Muscular

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
-------------	-------	-------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento:	_____
------------	-------	-------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento:	_____
------------	-------	-------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento:	_____
------------	-------	-------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento:	_____
------------	-------	-------------	-------

Dedico...

Louridete Araújo e Ana Maria Ferreira Cardoso Araújo.

Pai e mãe,

Depois de tanto tempo e ainda investindo em mim, digo que vencemos juntos. Sei das muitas renúncias que fizeram para que nós tivéssemos o melhor, e tudo isso movidos pelo amor.

Provavelmente sem o apoio de vocês eu não chegaria aqui. Vocês me deram todo amor, cuidado e carinho. Muitas vezes o orgulho que sentiam por mim me fez criar forças para
continuar...

Anne Karine Cardoso Araújo, Rodrigo Cardoso Araújo, Ricardo Cardoso Araújo.

Meus irmãos,

Agradeço a Deus pelo que Ele nos transformou. Ainda vamos viver o melhor nas nossas vidas. Obrigado por fazerem parte da minha!

Anna Vitória Araújo Miller, Maria Fernanda Araújo Miller, Diogo de Sá Cavalcante Araújo.

Meus sobrinhos,

Vocês são as sementes de uma família bendita. Torço para que vocês deem certo, sejam luz nesse mundo.

Amo a vida de vocês.

Dedico...

*A todos os cães do canil GRMD da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.
Em especial a Liz (K1); Gaspar (B7), Monstra (K3), Pequeno (K4) (in memorian) e Totó (K6.*

*Eu os acompanhei desde o nascimento, coincidentemente em dia de meu plantão.
Permaneceram firmes, enfrentaram e venceram o período crítico dos primeiros meses de vida
e depois se doaram com docilidade a essa pesquisa.*

Meu respeito e meu carinho!

Agradeço...

Ao meu orientador, Carlos Eduardo Ambrósio “Caju”, por todos os momentos durante esses 4 anos. Obrigado por acreditar com tanta garra nessa pesquisa, por ter me dado a oportunidade de conduzi-la. Tenho aprendido muito com você, a correr atrás das oportunidades e nunca querer parar, você realmente permitiu que eu voasse alto, muito além do que eu pudesse sonhar....

À Profa. Maria Angélica Miglino pela oportunidade da pós-graduação, pelo incentivo, por todo apoio durante o estágio no exterior. A senhora é exemplo de mulher guerreira e batalhadora, pesquisadora inigualável.

Ao Prof. David Feder pelo amor e dedicação à pesquisa da distrofia muscular. A ideia dessa pesquisa foi sua, espero ter apresentado um pouco daquilo que você gostaria de ter desenvolvido. Obrigada pela solicitude em sempre querer nos ajudar, tanto a mim como a todas as pessoas que requereram a sua prestimosa contribuição.

Ao Prof. José Ernesto Belizário do Laboratório de Ciclo Celular e Apoptose (ICB-USP) por ter me acolhido em seu laboratório e pelas discussões que engrandeceram esse trabalho.

Ao Prof. Paulo César Maiorka, pelo incentivo, pelas ideias e sugestões discutidas durante o exame de qualificação, por todo apoio.

À Profa. Silvana Lima Górnaiak, pela ajuda no delineamento experimental inicial dessa pesquisa, pela prontidão em sempre ajudar.

Ao pesquisador Michael Lisanti, por ter me recebido em seu laboratório no Instituto Kimmel Cancer Center (EUA), pela maravilhosa oportunidade e experiência adquiridas durante os três meses na Filadélfia.

A Gloria Bonuccelli, pesquisadora do Instituto Kimmel Cancer Center – Filadélfia (EUA). Por causa das suas pesquisas, essa tese foi conduzida. Ter tido a oportunidade de conhecê-la permitiu-me entender que não pode existir limites para o sonho. Por quatro anos, seus

trabalhos, que deram início a essa tese, foram meu ponto de partida, e meu estímulo em querer fazer o melhor. Obrigada por ter me recebido com tanto carinho, por toda paciência, estímulo, aprendizado.

A minha grande amiga Dulcinéa Gonçalves Teixeira, minha “maezona” durante o primeiro ano de doutorado, que me ensinou desde a montar uma prancha ate escrever um artigo. Todo o tempo que passamos juntas foi inesquecível, tantas lutas, alegrias, “banquetes”, organizações de simpósios, enfim, muitas lembranças! Obrigada querida amiga por ter acreditado em mim e por todo o carinho que me tem dispensado.

A minha amiga Thais Peixoto Gaiad, minha irmã de orientação, companheira de canil e das incríveis viagens internacionais! Obrigada por toda força, amizade, pelas ideias discutidas que iluminavam a minha pesquisa.

À Procássia Oliveira Lacerda. Entre uma conversa e outra, sempre sendo usada por Deus para tocar meu coração e me convencer da verdade, juntamente com seu esposo Ney. Obrigado a vocês por terem zelado por mim. Deus é fiel!

A minha amiga Adriana Franca, por todo estímulo, companheirismo, palavras de sabedoria, pela amizade sincera.

A minha amiga Elisângela, companheira de apartamento, engraçada, alegre. Obrigada Elisão por tudo que tem feito por mim, pela paciência e companhia.

Ao meu amigo Matheus Tajra (“Teteu”) pelo carinho, pelas gracinhas constantes que sempre me fazem rir, por ser meu companheiro de “escritório”!

Aos amigos e companheiros de canil: Cristianne Wenceslau, Juliana Jarra, Juliana Passos, Danielle Martins, Marta Chirchia, Marcelo Mendes, Marina Brólio, Marina Brito, Angélica Oliveira, Leandro Fadel, Flávio Ribeiro, Maria Angélica Pires. Vivemos tantos momentos inesquecíveis: revezamentos de 24 horas nos nascimentos de filhotes, pizzas de madrugada, os bate-papos durante os intervalos das refeições dos cães, reuniões para os plantões....

Aos colegas da pós-graduação pelos bons momentos de convívio, pelos simpósios, pelos cafezinhos na copa: Marcos Vinicius Mendes Silva, Adriana Morini, Marcelo Machado, Camila Ercolani, Fernanda Agreste, João Morini, André Francioli, Phelipe Favaron, Carlos Sarmiento, Álvaro Galdos.

A Dayson Friaça Moreira, orientado do Prof. Belizário, pela ajuda, prontidão e paciência. Obrigada por todo o tempo que você disponibilizou em me ajudar, pelas discussões de técnicas e pela padronização das mesmas e pelo otimismo e carinho. Também agradeço Guiomar Weizel (técnica) pelo carinho e acolhimento durante todo o período em que estive no Laboratório de Ciclo Celular e Apoptose.

Aos secretários Tatiana Domingues Curti, Jaqueline Martins de Santana, Maicon Barbosa da Silva, Maria Fátima Lourdes Minari e aos técnicos Maise Jesus de Oliveira, Ronaldo Agostinho da Silva, Sandra Freiburger Affonso e Edinaldo Ribas farias (“Índio”).

Aos meus amigos distantes que torceram tanto pela conclusão dessa pesquisa, mesmo sem entenderem... Jacão, quantos anos de amizade! Sonhamos juntas muitas coisas, inclusive a pós-graduação, obrigado pela força, pelas alegres conversas intermináveis durante o período no exterior. Ainda temos muitas promessas Jacão e vamos vivê-las todas!!!!

Roberta, minha amiguinha baiana, tantas saudades do tempo de faculdade, e você volta e meia me visitando em São Paulo, trazendo sua alegria, seu jeito inconfundível de ser, sua lealdade.

A minha prima Dailda que tanto me apoiou quando cheguei a São Paulo, pela sua garra, pelos conselhos para não desistir. Por ensinar a ser águia no meio dessa imensa cidade.

E a Augusto, pelo amor as nossas vidas. Pelos conselhos, pelo bom animo em todos os momentos e, sobretudo por viver com todas as suas forças a palavra de Deus.

“Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e Deus escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes” 1 Cor 1:27.

O Início e o Final de tudo,

Agradeço a Deus!

Senhor da minha vida, Deus meu, em Quem confio!

*Quantas vezes consagrei esse doutorado em suas mãos, porque o Senhor realiza o desejo do
coração.*

*O Senhor me deu muito mais do que sonhei, realmente o Senhor inclina os olhos do rei para
a direção que deseja. Quantas promessas tenho recebido, quantas bênçãos!*

E a Ti TODA HONRA E TODA GLÓRIA AGORA E SEMPRE!

RESUMO

ARAÚJO, K. P. C. Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) – Avaliação da viabilidade da terapia e reestruturação da Distrofina Muscular. [Use of Bortezomib in Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) – Therapy viability validation and restructure of the muscle dystrophy]. 2009. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A distrofia muscular progressiva no cão Golden Retriever (GRMD) é uma miopatia genética homóloga à Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que acomete humanos. A utilização do modelo canino é considerada ideal uma vez que a progressão da doença, as manifestações clínicas e a massa corporal se assemelham às apresentadas por meninos doentes. Sabe-se que a degradação de proteínas musculares e atrofia muscular estão intimamente relacionadas com a atuação do sistema catalítico ubiquitina-proteassoma. Estudos utilizando camundongos com distrofia muscular e músculos de humanos DMD (*in vitro*) tratados com inibidores de proteassoma (MG-132 e bortezomibe) apresentaram restauração da distrofina e das proteínas associadas à distrofina e melhora do fenótipo histopatológico. Nesta pesquisa, foram avaliados cinco cães GRMD, dois tratados com Bortezomibe e três controles. Coletou-se biopsia muscular antes de iniciar o tratamento e ao término do mesmo, para os testes de histologia, ultraestrutura e imunohistoquímica. Foram realizados semanalmente testes bioquímicos e em cada ciclo de aplicação do bortezomibe foi mensurada a taxa de inibição do proteassoma. Na primeira biopsia todos os cães apresentaram morfologia histopatológica das fibras musculares semelhantes. Ao final do tratamento, os cães tratados apresentaram menor deposição de tecido conjuntivo e infiltração de células inflamatórias que os cães não tratados julgados por meio da histologia, morfometria do colágeno e ultraestrutura. Na ultraestrutura observamos infiltração de macrófagos nas fibras, material degenerado, fibroblastos ativados e deposição de tecido conjuntivo em endomísio e perimísio das fibras. Pela análise de imunohistoquímica, não constatamos presença de distrofina na membrana sarcoplasmática de ambos os grupos avaliados. Entretanto, os cães tratados apresentaram maior expressão das proteínas α e β distroglicano, o que sugere uma melhora no fenótipo histopatológico da doença. Nos cães não tratados observou-se maior expressão de phospho- NF κ B e TGF- β 1 sugerindo maior ativação de fatores pró-apoptóticos e moléculas inflamatórias, e maior deposição de tecido conjuntivo, respectivamente. Os testes de inibição do proteassoma

indicaram maior inibição nas células sanguíneas uma hora após a aplicação do bortezomibe e estes se comportaram de forma dose-dependente. Concluímos que os inibidores de proteassoma podem melhorar a morfologia das fibras musculares dos cães GRMD tratados, diminuindo a deposição de colágeno e infiltração de células inflamatórias, bem como restaurar parte das proteínas associadas à distrofina na membrana sarcoplasmática das fibras musculares.

Palavras-chave: GRMD. Bortezomibe. Proteassoma. Distrofina.

ABSTRACT

ARAÚJO, K. P. C. **Use of Bortezomib in Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) – Therapy viability validation and restructure of the muscle dystrophy.** [Uso de Bortezomibe (PS-341) em cães da raça Golden Retriever afetados pela Distrofia Muscular Progressiva (GRMD) – Avaliação da viabilidade da terapia e reestruturação da distrofina muscular]. 2009. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) is a genetic myopathy homologue to Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) in human. Use of canine model is the better because the disease development, clinical signs and body mass are closed to the sick children. It has been known muscle protein proteolysis and muscle atrophy are related with ubiquitin-proteasome pathway. Researches using *mdx* mice and human muscle (*in vitro*) treated with proteasome inhibitor (MG-132 and bortezomib) showing rescue of the dystrophin and associated proteins and improvement of histopatological phenotype. In this research, were analyzed five GRMD dogs, two dogs were treated with Bortezomib and three dogs were control. Muscle biopsies were collected before the treatment and after the treatment to histology, ultrastructure and immunohistochemical muscle analysis. Biochemistry analyses were made once a week and measurement of proteasome inhibition was analysed in each cycle of Bortezomib administration. In the first biopsy, all the dogs showing closed histopathological morphology of muscle fibers. At the end of treatment, the treated dogs had lower connective tissue deposition and inflammatory cells infiltration than untreated dogs by histology, collagen morphometry and ultrastructural analysis. We noted by ultrastructural analysis macrophages inside the fibers, degenerated products, activated fibroblasts and connective tissue deposition in endomysium and perimysium of the fibers. The dystrophin immunohistochemistry was not presence in sarcoplasmatic membrane in both groups. However, the treated dogs showing bigger expression of α and β -dystroglycan, this fact means improved of disease histopathology phenotype. The untreated dogs had bigger expression of phospho-NF κ B and TGF- β 1, suggesting bigger activation of pro-apoptotic factors, inflammatory molecules and bigger connective tissue deposition respectively. The proteasome inhibition tests indicated bigger inhibition in the blood cells one hour post doses of bortezomib and was dose-dependent pathway. In conclusion, the proteasome inhibitors may improve the appearance of GRMD muscle fibers, lowered the connective tissue deposition

and infiltration of inflammatory cells, likewise to rescue the dystrophin- associated proteins in the muscle fiber membrane.

Keywords: GRMD model. Bortezomib. Proteasome. Dystrophin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês adenosin triphosphate)
DGC	Complexo distrofina-glicoproteína (do inglês dystrophin-glicoprotein-complex)
DMB	Distrofia muscular de Becker
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético (do inglês ethylenediamine tetraacetic acid)
FA	Fosfatase alcalina
GRMD	Distrofia muscular do cão Golden Retriever (do inglês Golden Retriever muscular dystrophy)
HE	Hematoxilina-eosina
Mdx	Camundongo com distrofia muscular ligado ao cromossomo x (do inglês x-linked muscular dystrophy mice)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (do inglês nuclear factor kappa B)
nNox	Óxido nítrico sintetase neuronal (do inglês neuronal nitric oxide synthase)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês phosphate buffered saline)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid)
SRD	Sem raça definida
TBST	Solução salina tris e Tween 20 (do inglês tris buffered saline and tween)
TGF- β 1	Fator transformador de crescimento betta 1 (do inglês transformin growth factor betta 1)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY (GRMD)	24
2.2	TERAPIAS PARA A DMD	28
2.3	SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA	33
2.4	NF- κ B e TGF- β 1	35
2.5	BORTEZOMIBE (PS-341)	37
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAL E MÉTODO	43
4.1	ANIMAIS	44
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46
4.4	HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	47
4.5	EXAME DE URINA	48
4.6	BIÓPSIAS	49
4.7	MICROSCOPIA DE LUZ	50
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	51
4.9	DOSAGEM E ATIVIDADE DO PROTEASSOMA	52
4.10	IMUNOHISTOQUÍMICA	53
4.11	WESTERN BLOT	54
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	57
5.1	BIOQUÍMICA SÉRICA E HEMOGRAMA	58
5.2	EXAME DE URINA	63
5.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA	64
5.4	HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO COLÁGENO	66
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	77
5.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMA	85
5.7	IMUNOHISTOQUÍMICA	92
5.8	WESTERN BLOT	97

6	DISCUSSÃO	99
6.1	BIOQUÍMICA SÉRICA E HEMOGRAMA.....	100
6.2	MANIFESTAÇÕES Clínicas.....	104
6.3	HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO COLÁGENO.....	106
6.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	109
6.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMA.....	112
6.6	IMUNOHISTOQUÍMICA E WESTERN BLOT.....	114
7	CONCLUSÕES	120
	REFERÊNCIAS	122
	APÊNDICE	145

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia genética degenerativa causada pela ausência da proteína distrofina nas fibras musculares e afeta principalmente meninos, uma vez que o gene defeituoso está localizado no cromossomo x. A DMD é geneticamente homóloga à distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever (GRMD- *Golden Retriever Muscular Dystrophy*); justificando assim, a utilização desses cães como modelos experimentais para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para os meninos doentes.

O diagnóstico da distrofia muscular pode ser realizado pela avaliação dos sinais clínicos, juntamente com a análise dos níveis da enzima creatina quinase (CK), que se encontra drasticamente aumentada em meninos e cães com distrofia muscular. Os testes moleculares não invasivos, pela análise de DNA, observa-se o sítio de deleção de síntese da distrofina, localizado no éxon 7; ou por métodos invasivos como a biopsia muscular, uma vez que permite a visualização da deficiência da distrofina na membrana das fibras musculares.

A deficiência da distrofina leva à perda da instabilidade da membrana sarcoplasmática seguida de degeneração e necrose das fibras musculares, sendo que com o avançar da doença há perda progressiva da massa e função muscular. Os meninos tendem a perder a capacidade de locomoção entre os 12 e 14 anos de idade e se tornam dependentes da cadeira de rodas, fato que agrava o quadro clínico e permite a rápida progressão da doença. Nos cães, a perda da ambulação não é tão característica como no humano devido à postura quadrúpede.

Os cães, assim como os humanos apresentam atrofia e degeneração muscular como consequência da necrose e substituição do tecido muscular funcional por tecido conjuntivo e adiposo. Histologicamente, as fibras musculares apresentam-se com diâmetro heterogêneo, com fibras atrofiadas e hipertrofiadas, núcleos centrais, e com aumento do tecido conjuntivo em perímísio e endomísio.

Embora com os avanços na terapia gênica e o transplante de células tronco que podem fornecer a cura para a DMD, resultados positivos com essas terapias podem demorar algum tempo até serem clinicamente viáveis. Neste sentido, a busca de terapias paralelas e medicamentosas que tenha por objetivo melhorar a condição vital do paciente, por retardo da progressão dos sinais clínicos, é de grande importância, uma vez que melhoram a qualidade de vida dos mesmos.

O bortezomibe (Velcade[®]), inibidor seletivo da sitio quimiotripsina-símile do proteassoma muscular, responsável por grande parte da proteólise que ocorre no interior da célula, tem apresentado resultados satisfatórios em diversas patologias, nas quais há atrofia e degeneração muscular. A utilização de inibidores do proteassoma em camundongos *mdx* (afetados pela distrofia muscular) e músculos de humanos distróficos tratados *in vitro* demonstrou surpreendente manutenção da distrofina e das proteínas associadas, uma vez que foi capaz de bloquear parte da degradação das mesmas e melhorar sua expressão muscular. Apesar do modelo murino não apresentar a mesma similaridade clínica que o modelo GRMD, os resultados surpreendentes observados no tratamento *in vitro* de músculos humanos, corrobora para que seja verificada a viabilidade da terapia no modelo canino.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária, relativamente freqüente no homem e outros mamíferos, uma vez que o gene que codifica a distrofina é extremamente grande, tornando-o alvo freqüente de mutações (HOFMAN, 1999; SHELTON; ENGVALL, 2002). Afeta aproximadamente 1 em cada 3500 meninos nascidos, e estes não apresentam nenhuma manifestação clínica até atingirem entre três a cinco anos de vida, quando se torna possível observar fraqueza progressiva nos músculos proximais (HOFFMAN; BROWN JR.; KUNKEL, 1987).

A doença se caracteriza por ser letal, progressiva, resultante da mutação no gene da distrofina, localizado no cromossomo x, mais precisamente no éxon p21 (RAY et al., 1985; BONILLA et al., 1988; THOR; TERRYBORRY, 2003). Este gene é responsável pela expressão da proteína distrofina, que se encontra ausente ou severamente diminuída na membrana sarcoplasmática de pacientes com DMD, resultando em perda da estabilidade da mesma principalmente durante a contração muscular (HOFFMAN; BROWN JR.; KUNKEL, 1987; SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989; KAMPER; RODEMAN, 1992; BARTON et al., 2002; BIGGAR, et al., 2002; CHILDERS et al., 2002; KHURANA; DAVIES, 2003).

A distrofina é uma proteína periférica da membrana plasmática de aproximadamente 426 Kd expressa em tecidos musculares e cérebro. Encontra-se associada a um grande complexo multimérico, denominado complexo distrofina-glicoproteína (DGC- *Dystrophin Glycoprotein Complex*). Este complexo é composto de dois subcomplexos: distroglicano (subunidades α , β) e sarcoglicano (subunidades α , β , γ , δ) e mais outras proteínas como sarcopanos, distrobrevinas, sintrofinas e óxido nítrico neuronal sintetase (nNox), sendo todos eles codificados por genes diferentes. A região N-terminal da distrofina interage diretamente com a proteína actina do citoesqueleto, enquanto o domínio C-terminal se liga a membrana plasmática por meio de interações com o distroglicano β . Dessa forma, a distrofina é capaz de prover uma ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular garantindo distribuição uniforme do estresse durante a atividade muscular, evitando a ruptura da membrana (ERVASTI et al., 1990; ERVASTI; CAMPBELL, 1991; MICHELLE; CAMPBELL, 2003), (Figura 1).

Fonte: Adaptado: Clemens; Eghtesad; Reay. Ann. Neurol., 66:267-70, 2009.

Figura 1 - Estrutura do complexo distrofina-glicoproteína no músculo esquelético. A distrofina se liga a actina do citoesqueleto (N-terminal), enquanto sua extremidade C-terminal encontra-se associada com proteínas intrínsecas e extrínsecas da membrana plasmática

A completa ausência da distrofina perturba a composição estrutural do complexo distrofina-glicoproteína e de seus membros, que se apresentam muito reduzidos nas fibras musculares esqueléticas de pacientes DMD e camundongos *mdx* (ERVASTI et al., 1990; CAMPBELL, 1995; COHN; CAMPBELL, 2000). Anormalidades em qualquer uma das proteínas do complexo DGC frequentemente levam à diminuição da expressão e anormalidades nas demais proteínas associadas. Dessa forma, diferentes modos de herança (autossômico recessivo ou autossômico dominante) levam à distrofia muscular, mesmo que os genes responsáveis pela expressão destas proteínas não estejam localizados no cromossomo x (SPENCE; CHEN; WINDER, 2002). Assereto et al. (2006) cita que, em humanos com DMD, a expressão de β -distroglicano e α -sarcoglicano encontram-se dramaticamente reduzidos.

A perturbação da ligação entre o citoesqueleto subsarcolemal e a matriz extracelular possivelmente é a causa da instabilidade da membrana, que por sua vez, torna as fibras musculares susceptíveis à necrose (MATSUMURA; CAMPBELL, 1991; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA et al., 1992). A ruptura da membrana sarcoplasmática possibilita o influxo de cálcio e posterior ativação de proteases endógenas por meio do estímulo da cascata inflamatória. Após a sinalização celular abundante há aumento do estresse oxidativo, seguido de isquemia muscular recorrente (PETROF, 2002; COLLINS; MORGAN, 2003; SCHATZBERG; SHELTON, 2004).

Inflamação muscular, necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo podem ocorrer como consequência da deficiência de distrofina em pacientes com DMD. Acredita-se que a extensiva fibrose endomisial resulte em prejuízo na habilidade em regenerar as fibras musculares danificadas (HOFFMAN; BROWN JR.; KUNKEL, 1987).

Normalmente, as células musculares apresentam capacidade regenerativa em resposta à injúria. Entretanto essa habilidade é perdida na DMD devido à exaustão das células satélites durante os ciclos de degeneração e regeneração. Embora a mutação na distrofina represente a causa primária da DMD, há um processo secundário envolvendo inflamação persistente e prejuízo na regeneração que exacerbam a progressão da doença (TIDBALL, 2005).

Os doentes sofrem progressiva e irreversível perda muscular (KORNEGAY, et al., 2003), principalmente da musculatura esquelética, podendo acometer músculo cardíaco e o sistema nervoso (ZATZ; FROTA-PESSOA, 1986). Os meninos afetados precocemente apresentam fraqueza muscular, hipertrofia do músculo gastrocnêmico e elevação da CK sérica (ASSERETO et al., 2006). A astenia torna os pacientes dependentes da cadeira de rodas, fato que ocorre por volta dos 12 a 14 anos de idade, com consequente progressivo declínio da função pulmonar, agravando a condição cardíaca, fato que pode ocasionar morte prematura por falência cardiorrespiratória (HOFFMAN; BROWN JR.; KUNKEL, 1987; ALMAN, 2005).

Outras proteínas musculares têm sido identificadas no envolvimento de distrofias musculares ligadas ao cromossomo x ou autossômicas; muitas delas podem estar ausentes ou alteradas, sendo classificadas de acordo com sua localização subcelular (COHN; CAMPBELL, 2000). A Distrofia Muscular de Becker (DMB) se caracteriza por ser uma forma branda da DMD, na qual a distrofina não se encontra completamente ausente, mas pode estar diminuída e estruturalmente alterada, porém parcialmente funcional (ARAHATA et al., 1991).

2.1 GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY (GRMD)

As distrofias musculares em animais formam um grupo heterogêneo de doenças degenerativas herdadas, sendo a maioria não inflamatórias caracterizadas por fraqueza e debilidade muscular (SHELTON; ENGVALL, 2002). A miopatia distrófica deve ser sempre

investigada na presença de cão ou gato (macho ou fêmea, raça pura ou mista), que apresente fraqueza e atrofia muscular persistente, anormalidades de marcha ou contraturas musculares nos primeiros meses de vida (SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989).

A distrofia muscular nos cães da raça Golden Retriever (GRMD) é uma miopatia degenerativa causada pela ausência da distrofina (COOPER et al., 1988). É geneticamente homóloga à distrofia muscular de Duchenne (DMD) que acomete seres humanos (HOFFMAN; GOROSPE, 1991), sendo considerados modelos experimentais ideais para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para meninos afetados pela doença. A similaridade entre as duas doenças é surpreendente, ambas são caracterizadas por precoce miopatia degenerativa, com progressiva necrose, fagocitose, deposição de cálcio e fibrose endomisial e perimisial (COOPER et al., 1988; VALENTINE et al., 1988; SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989; CHILDERS et al., 2002; NGUYEN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003; KHURANA; DAVIES, 2003; KORNEGAY et al., 2003; BOGDONOVICHI et al., 2004).

Outro fator relevante na escolha do modelo GRMD para estudo da DMD é a comparável massa corporal entre os cães adultos e os meninos doentes, permitindo que as terapias propostas visem à melhora de toda uma massa muscular comparável a humanos (HOWELL et al., 1997; COLLINS; MORGAN, 2003).

As lesões musculares nos cães são caracterizadas por necrose maciça, que afeta principalmente músculos da cabeça, pescoço, e membros (VALENTINE et al., 1990b). Em alguns casos, a distrofina se encontra presente, porém é estruturalmente anormal (SHELTON et al., 2001). As lesões no músculo da língua podem se iniciar ainda na vida intrauterina, já os músculos respiratórios podem não suportar a necrose terminal difusa, fato que resulta em insuficiência respiratória aguda e morte. Embora muitos filhotes possam morrer durante o período neonatal, dentre os sobreviventes, ao redor dos dois meses de idade, constata-se sinais de regeneração muscular verificável pela imaturidade do tecido muscular através de imunohistoquímica (NGUYEN et al., 2002).

Os músculos mais severamente afetados são os da língua, respiratórios (diafragmático e intercostal), músculos dos membros proximais e do tronco e pescoço (NGUYEN et al., 2002). Na histologia nota-se variação no diâmetro das fibras, fibrose endomisial e perimisial, desorganização citoplasmática proeminente e presença de núcleos centrais (VALENTINE et al. 1990b)

Ultraestruturalmente observa-se em semelhança com a DMD, presença de fibras hialinas, fibras musculares hipercontraídas, necróticas, algumas com infiltrado de macrófagos e áreas de regeneração. Aos quatro meses de idade já é possível evidenciar em alguns músculos, fibrose endomisial e perimisial (COOPER et al., 1988).

Na maioria das vezes, a GRMD é transmitida por fêmeas portadoras que podem se apresentar assintomáticas ou com raras manifestações clínicas como fraqueza em membros e alterações miopáticas na eletromiografia e biópsia muscular (SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989). As fêmeas portadoras apresentam apenas um cromossomo x afetado (recessivo), podendo transmiti-lo a sua descendência, sendo mais freqüente a existência de machos afetados, uma vez que esses, herdando o cromossomo x alterado, invariavelmente serão doentes. As fêmeas acometidas pela doença necessariamente apresentam os dois cromossomos x alterados e, na maioria das vezes, isso acontece por mutação, já que o macho afetado não se reproduz em condições naturais devido à extrema fraqueza muscular (SHELTON; ENGVALL, 2002).

No canil GRMD pertencente à Universidade de São Paulo, realiza-se inseminação artificial de fêmeas portadoras ou monta natural com cães que apresentam um fenótipo distrófico atenuado, porém com alterações histopatológicas musculares condizentes com a distrofia muscular (AMBRÓSIO et al., 2008).

Os cães afetados são diagnosticados ao primeiro dia de vida, através da análise da CK, que se encontra dramaticamente elevada na maioria dos casos, em semelhança com os humanos doentes (COOPER et al., 1988; VALENTINE et al., 1988; VALENTINE et al., 1990b; SHELTON et al., 2001; SHELTON; ENGVALL, 2005), confirmado por teste genético utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) (CHILDERS et al., 2001; 2002). O fenótipo dos cães pode ser confirmado pela imunohistoquímica da distrofina, forte expressão é observada no sarcolema das fibras musculares de cães saudáveis, enquanto nos cães distróficos há imunoreação negativa, com exceção de menos de 1% de fibras em cães com menos de dois meses de idade (NGUYEN et al., 2002).

Na análise da presença de distrofina por Western Blott, não se observa nenhuma banda correspondente a esta proteína, enquanto nas fêmeas portadoras heterozigotas, pode-se notar uma banda de menor intensidade, indicando que elas possuem um nível intermediário da proteína (COOPER et al., 1988).

Sinais clínicos resultantes da ausência da distrofina ocorrem em diversas espécies, porém, em cães, ao contrário do que ocorre em gatos e camundongos afetados, observa-se

maior semelhança de evolução da doença com a DMD (KHURANA; DAVIES, 2003). O modelo murino (*mdx*) utilizado para estudos clínicos da distrofia muscular, embora apresente necrose e regeneração das fibras musculares similares ao humano, possui pouca ou nenhuma fraqueza muscular (COOPER et al., 1988). Esta diferença pode ser devido a mecanismo compensatório, como aumento da regeneração muscular ou substituição funcional da distrofina pela urotrofina (DECONINCK et al., 1997). Os gatos distróficos por sua vez, diferem dos cães, por apresentarem hipertrofia muscular generalizada (SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989; SHELTON; ENGVALL, 2002).

Os cães doentes cansam-se com facilidade, desenvolvem marcha alternante anormal, caracterizada por passadas rígidas e curtas, podendo, ainda, apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos. A maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém, certos grupos musculares como músculos esofágicos, diafragmático e da língua apresentam-se com hipertrofia, culminando em disfagia, regurgitação e dispnéia (NGUYEN et al., 2002; WIECZORECK; GAROSI; SHELTON, 2006).

A disfunção esofágica descrita nos cães GRMD não é uma característica comum aos humanos DMD. Essa diferença ocorre porque o esôfago canino difere do humano por conter maior expressão de músculo esquelético em sua extensão (WATSON, 1973). Bem como a perda da função ambulatoria que ocorre nos pacientes DMD, não é uma característica freqüente nos cães GRMD, apesar da continua degeneração das fibras. Este fato provavelmente se deve mais a diferenças biomecânicas entre os sistemas músculo-esqueléticos humano e canino do que alterações genéticas subjacentes. Os pacientes humanos quando chegam à adolescência dependem da cadeira de rodas, agravando ainda mais contraturas e deformidades esqueléticas, com redução da amplitude respiratória, fato que freqüentemente leva o paciente a óbito por falência cardio-respiratória. Nos cães, as contraturas são menos freqüentes e a manutenção da função locomotora permite uma maior expectativa de vida aos cães doentes (VALENTINE et al., 1988).

Para Shelton et al. (2001), as manifestações clínicas podem variar entre os cães afetados, cerca de 50% apresentam deformidade em membros, marcha anormal e deformidade rotacional no tarço distal. Embora sejam qualitativamente similares dentro da ninhada, a severidade das manifestações clínicas pode variar consideravelmente entre os indivíduos afetados em diferentes ninhadas (COOPER et al., 1988). Para Hyser et al. (1987) é importante elucidar a base da variação na severidade da expressão da doença nos cães afetados, já que

pode ser relevante para entender a heterogeneidade clínica reportada em muitos pacientes DMD, sugerindo que outros fatores podem afetar a expressão fenotípica da doença em adição à natureza da mutação (COOPER et al., 1988).

Assim como a DMD, cães GRMD freqüentemente morrem de falência cardio-respiratória devido à cardiomiopatia resultante da ausência da distrofina no músculo cardíaco, embora possam sobreviver e alcançar muitos anos de vida (SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989; SHELTON et al., 2001; BIGGAR et al., 2002). O envolvimento cardíaco é mais evidente no golden retriever que nos outros modelos animais, e as complicações cardíacas muito próximas àsquelas dos pacientes DMD. A disfunção sistólica e a dilatação ventricular esquerda se tornam evidentes após diversos meses ou até mesmo, após anos de idade (MOISE et al., 1991), embora a avaliação por imagem com doppler tecidual permita a detecção de severos prejuízos nos índices sistólicos e diastólicos em cães jovens em média com um ano de idade (CHETBOUL et al., 2004).

As fêmeas afetadas apresentam variadas apresentações clínicas, incluindo fraqueza generalizada, degeneração muscular, tremores, intolerância a exercícios, anormalidades de marcha, deformidade nos membros, dentre outras alterações (SHELTON et al., 2001). A hipertrofia de diafragma pode ser observada em fêmeas afetadas de raças mistas, apresentando fraqueza muscular, intolerância ao exercício e hipertrofia muscular (SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989).

Ao contrário do que comumente ocorre com os cães afetados, a concentração de CK sérica pode estar normal ou pouco elevada nas fêmeas afetadas (SHARP; KORNEGAY; LANE, 1989). Em um estudo com cinco fêmeas afetadas, Shelton et al. (2001) verificou um animal com concentração de CK dentro do limite da normalidade, duas com aumento moderado e apenas uma com aumento semelhante ao que ocorre nos machos doentes. Contudo, as biópsias destes animais foram consistentes com a miopatia distrófica, incluindo variabilidade no diâmetro das miofibras, degeneração, regeneração e fibrose.

2.2 TERAPIAS PARA A DMD

Infelizmente, até o momento não existe cura ou tratamento específico para a distrofia muscular de qualquer origem genética. Por se tratar de uma doença de importância clínica em

medicina humana, pesquisas em todo mundo direcionam seus estudos em várias frentes de tratamento, desde terapias farmacológicas, terapias gênicas (utilizando vírus, plasmídeos e oligonucleotídeos) e, por último, a terapia celular (mioblastos e células tronco) (ANGELINI; BONIFATI, 2000; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2004; DAVIES; GROUNDS, 2006; FOSTER; FOSTER; DICKSON, 2006).

Quanto à terapia celular, experimentos clínicos utilizando transferência de mioblastos encontram menos sucesso que o observado em camundongos *mdx*, nos quais se fundiram as fibras distróficas e restaurou a distrofina. Problemas como baixa incorporação de células, baixa sobrevivência dos mioblastos e rejeição imune tem resultado em poucas fibras dos músculos injetados expressando distrofina e nenhuma diferença quanto à força muscular (LYNCH, 2001; WANG et al., 2009).

O sucesso na terapia genética depende da massiva transferência de gene da distrofina, sendo esta uma tarefa difícil devido ao seu elevado peso molecular (THIOUDELLET et al., 2002). Outra alternativa para correção do gene defeituoso seria modular sua expressão pela implementação de nucleotídeos que alteram a estabilidade do RNA, resultando na produção de uma proteína funcional. O transplante de precursores musculares de doadores saudáveis tem sido explorado como método para restauração da distrofina no músculo distrófico. Esses precursores podem se diferenciar e formar músculos que expressem a distrofina indefinidamente como parte do miótomo. Contudo, essa técnica encontra dificuldades quanto ao tratamento de grandes volumes de músculo e efeito duradouro (MORGAN; HOFFMAN; PATRIDGE, 1990).

A urotrofina é uma proteína homóloga à distrofina e normalmente expressa no sarcolema das fibras musculares esqueléticas durante o desenvolvimento fetal, restrita a junções neuromusculares e miotendíneas dos músculos esqueléticos adultos (DECONINK et al., 1997). O potencial da urotrofina direcionando a superexpressão de distrofina e melhora do fenótipo distrófico em camundongos *mdx* tem sido demonstrado por alguns experimentos utilizando transgene (TINSLEY et al., 1996) e vetores virais (GILBERT et al., 1999).

Em humanos, esteróides ou drogas imunossupressoras são empregadas com o objetivo de retardar a progressão da doença, uma vez que são efetivas no prolongamento funcional da função muscular por um aumento modesto da força muscular. No entanto não há recobrimento da função perdida, uma vez que podem adiar, mas não interromper a progressão da doença. Verifica-se que o uso desses medicamentos está intimamente relacionado a efeitos adversos, sobretudo o uso crônico, como o estabelecido para terapêutica da doença em

questão (GRIGGS et al., 1993; VANDEBROUCK et al., 1999; CONNOLLY et al., 2002; DUBOWITZ et al., 2002; MUNTONI et al., 2002; BALABAN et al., 2005; DUBOWITZ, 2005; MOXLEY et al., 2005).

O tratamento físico, por meio do acompanhamento das alterações musculares e esqueléticas que se desenvolvem em associação com a astenia muscular, é realizado freqüentemente pela fisioterapia. O objetivo é prevenir o aparecimento precoce das contraturas e deformidades ósseas, características da doença, além de retardar a perda da deambulação, responsável pela perda rápida da força muscular e aumento dos encurtamentos musculares e complicações cardiopulmonares (EAGLE, 2002).

Já se encontra em andamento a fase II para tratamento da distrofia muscular pela utilização do PTC-124. Este agente age em nível de ribossomos celulares induzindo-os a ignorar o códon alterado de uma mutação de ponto, que na DMD ocorre em cerca de 10 a 15% dos pacientes, e dessa forma há a síntese das proteínas que estariam ausentes ou diminuídas em diversas doenças hereditárias como a DMD (WELCH et al., 2007). Possui mecanismo de ação similar aos antibióticos aminoglicosídeos como a gentamicina, que, contudo, apresenta perda de potência, potencial em causar toxicidade renal e ótica e a necessidade de administração intravenosa ou intramuscular levando à limitada utilidade clínica dessa abordagem (BARTON-DAVIS et al., 1999; MANUVAKHOVA; KEELING; BEDWELL, 2000; POLITANO et al., 2003).

Outros fármacos atualmente estudados são os bloqueadores dos receptores de angiotensina II, principalmente por sua atuação sobre citocinas como o TGF- β 1 (fator transformador de crescimento) o qual, acredita-se que esteja envolvido na formação da fibrose em resposta a injúria e inflamação (GOSSELIN et al., 2004; LY et al., 2004). De acordo com Cohn et al. (2007), o losartan, que pertence ao grupo de inibidores da angiotensina II, pode melhorar a função muscular e a qualidade de vida dos pacientes DMD. No quadro 1 há um sumário de algumas terapias propostas para o tratamento da distrofia muscular e de outras desordens relacionadas a fraqueza muscular.

Contudo, é preciso cautela quanto aos resultados encontrados nos modelos animais estudados, sobretudo o *mdx*, no qual o fenótipo distrófico se caracteriza por ser mais brando com menor perda da força muscular. Terapias que se apresentaram promissoras nesses modelos (como o transplante de mioblastos) tem comumente rendido desapontamentos nos resultados de julgamentos clínicos em humanos (MILLER et al., 1997).

Quanto a terapias celulares e genéticas no modelo canino, pesquisa utilizando a transferência de células tronco hematopoiéticas não se mostrou efetiva na regeneração do músculo esquelético em cães distróficos (DELL'AGNOLA et al., 2004). Por outro lado, estudos em terapia gênica utilizando oligonucleotídeos (morpholino) têm apresentado resultados promissores quanto à expressão da distrofina muscular no modelo canino para a DMD (YOKOTA et al., 2009).

Qualquer tratamento de sucesso para as distrofias musculares requer continuidade ou repetidos ciclos de tratamento e pouco se sabe sobre a toxicidade a longo tempo no homem para a maioria das terapias que tem sido testadas no modelo murino. Entretanto, nenhum tratamento sozinho será suficiente para interromper ou reverter a progressão da doença e a combinação de terapias poderá prover algumas respostas ainda não entendidas para a doença (WELLS, 2008).

Terapia	Ação	Desvantagens
Transferência de mioblastos/Terapia com células tronco (1-3)	Reposição e reparo da distrofina	Problemas com migração, rejeição, imunossupressão
Terapia gênica (4,5)	Reposição e reparo do gene defeituoso, superexpressão da urotrofina	Transferência do gene aos músculos não otimizada, vetores com maior capacidade transportadora ainda estão em desenvolvimento
Esteróides anabólicos (6)	Aumento da fibra muscular e da força	Aumenta a susceptibilidade a injúria e exacerbar a condição distrófica
Glicocorticóides (7)	Preservação das fibras musculares e propriedades antiinflamatórias	Catabolismo muscular, hisurtismo, diminuição da densidade óssea, ganho peso
β 2- agonistas (8)	Aumento na força e no tamanho da fibra muscular, aumento da regeneração.	Tremor e palpitações, aumenta a susceptibilidade a injúria
Fator de crescimento insulina-símile (9)	Aumento na força e no tamanho da fibra muscular, aumento da regeneração	Aumenta a susceptibilidade à injúria, pode exacerbar a condição distrófica
Aminoglicosídeos (10)	Supressão da parada do códon responsável pela mutação genética	Somente pequena proporção de pacientes DMD apresenta essa alteração. Efeitos-adversos na audição e no rim
Inibidores do hormônio de crescimento (manzidol) (11)	Diminui progressão da doença	Efeitos não consistentes sobre a liberação do hormônio de crescimento após administração de manzidol
Vitamina E (12)	Antioxidante, contra radicais livres que medeiam dano muscular.	Toxico em doses altas, sem efeitos
Bloqueadores dos canais de cálcio (13)	Reduz níveis citosólicos de cálcio e previnem o mecanismo iniciador do dano muscular	Aumenta o potencial para arritmia cardíaca em alguns pacientes

1) Ragot et al. 1993, 2) Alter et al. 2006, 3) Gregorevic et al. 2008, 4) Partridge et al. 1989, 5) Sampaolesi et al. 2006, 6) Orr; Singh 2005, 7) Beenakker et al. 2005, (8) Molenaar, Chen, Parsonage 2006, (9) Barton et al. 2002, (10) Barton-Davies et al. 1999, (11) Turner et al. 1988, (12) Bäckman et al. 1988, (13) Johnson; Bhattacharya 1993.

Fonte: Adaptado de Lynch, 2001- São Paulo- 2009

Quadro 1 - Sumário de algumas terapias propostas para o tratamento da distrofia muscular e outras desordens de fraqueza muscular.

2.3 SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA

Em 2004, Awian Hershko, Aaron Ciechanover e Irwin Rose foram premiados com o Nobel de química pela descoberta da ubiquitina e do mecanismo de sua conjugação a um substrato protéico e posterior degradação dessas proteínas marcadas pelo proteassoma. No entanto, desde as primeiras descrições desse mecanismo de catalise protéica, conhecimentos nessa área tem se expandido, com identificação de milhares de proteínas que são degradadas por esse sistema e descobertas de novas funções adicionais da conjugação da ubiquitina (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006).

O proteassoma é representado por um complexo multicatalítico, dependente de ATP, de proteínas presente nas células eucariotas (MATHEWS et al., 1989), e tem por umas de suas funções, prevenir o acúmulo de proteínas anormais que podem resultar em mutações, erros de biosíntese ou lesões por radicais livres sintetizados (MATTHEWS et al., 1989; DEMARTINO; SLAUGHTER, 1999). Atua na regulação de diversas funções celulares através da degradação de proteínas específicas que desencadeiam uma ação em particular (HERSHKO, 1997; ELLIOTT; ROSS, 2001), dentre suas funções, podemos citar a rápida remoção de proteínas, regulação na transcrição de genes, controle de qualidade das proteínas sintetizadas, regulação do sistema imune e fonte de aminoácidos (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006).

Existem fortes evidências do envolvimento da via Ubiquitina-Proteassoma (Ub-P') na perda da massa muscular, uma vez que representa a principal rota não lisossomal para a degradação protéica em eucariotos (LLOVERA et al., 1998a,b). Nesta via, as proteínas são marcadas para degradação por uma adição covalente de uma cadeia de ubiquitinas – conhecida como multiubiquinação- que requer a ativação dependente de ATP, das enzimas E1 (ativadoras de Ub) e ação combinada das enzimas E2 (conjugadoras) e E3 (ligases), esta última, podendo ser formada de complexos monos ou multiméricos (JESENBERGER; JENTSCH, 2002; CIECHANOVER, 2003).

Primeiramente, a carboxila terminal da ubiquitina é ligada a uma sulfidril da E1 por uma ligação tioéster, que é acelerada por ATP. A ubiquitina ativada é transferida para uma sulfidril da E2 e, finalmente a E3 ligase transfere a ubiquitina ativada para o grupo ϵ -NH₂ do resíduo de lisina da proteína a ser degradada. Porém, para que o sinal da degradação protéica

seja amplificado, são necessários sucessivos ciclos de ubiquitinação, resultando na formação das cadeias de ubiquitina que é progressivamente construída por ligações isopeptídicas entre a lisina (geralmente a Lys48), na última ubiquitina da cadeia em crescimento, e a glicina C-terminal da ubiquitina seguinte (JESENBERGER; JENTSCH, 2002).

A proteína poliubiquitinilada é reconhecida pelas subunidades do complexo 19S do proteassoma que retira a cadeia de ubiquitina intacta através de uma isopeptidase e, se anexa à porção final do complexo 20S do proteassoma, que por sua vez, desenovela e degrada a proteína sinalizada, liberando pequenos oligopeptídeos que são rapidamente degradados em aminoácidos, por peptidases citosólicas (HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002) (Figura 2).

Embora o proteassoma tenha múltiplos sítios ativos, a inibição de todos eles não é necessária para reduzir significativamente a proteólise. A inibição do sítio quimiotripsina ou sua inibição por mutação causa grande redução deste processo (ROCK et al., 1994); ao passo que, a inativação dos sítios da tripsina e caspase apresentam pouco ou nenhuma redução na degradação de proteínas (CHEN; HOCHSTRASSER, 1996).

De forma similar a outros tecidos, o músculo esquelético possui pelo menos três diferentes rotas para a degradação protéica: 1) proteólise pela ação de proteases lisossomais representadas pelas catepsinas, 2) proteólise por proteases não lisossomais cálcio dependentes, compreendendo as calpainas e 3) proteólise por proteases não lisossomais ATP-ubiquitina-dependentes, representado pelo complexo multicatalítico de protease (ou proteassoma) (MITCH; GOLDBERG, 1996; VOISIN et al., 1996).

Pesquisas sugerem que a rápida perda muscular presente em diferentes patologias resultantes da degradação protéica está intimamente relacionada com a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (TAWA; ODESSEY; GOLDBERG, 1997; SOLOMON et al., 1998; GALBIATI et al., 2000; KUMAMOTO et al., 2000; BONUCCELLI et al., 2003; LECKER et al., 2004). Segundo Medina, Wing e Goldberg, (1995), os níveis de RNA mensageiro para a síntese de subunidades do proteassoma sofrem um aumento de duas a quatro vezes em condições de atrofia muscular por denervação ou jejum prolongado. Acredita-se que a ativação do proteassoma é fundamental para a rápida perda de proteínas musculares em indivíduos com deficiência de distrofina (ASSERETO et al., 2006). No músculo distrófico, como cita Kumamoto (2000), o aumento da atividade do proteassoma é responsável pela proteólise intracelular e degradação da fibra muscular, embora esse aumento não seja específico para a distrofia muscular.

Fonte: Kisselev; Goldberg. Chemistry & Biology, 2001.

Figura 2 - Esquema simplificado da modelo de degradação ubiquitina-proteassoma

2.4 NF- κ B E TGF- β 1

O fator nuclear Kappa- β (NF- κ B), induz a ativação de citocinas e células de adesão de moléculas que medeiam a resposta inflamatória (ELLIOT; ROSS, 2001; ELLIOT et al., 2003). O NF- κ B altera diretamente a produção de mais de 150 genes, incluindo aqueles que codificam citocinas receptores imunes e apresentadores de antígenos, resposta de fase aguda, apoptose, defesa do hospedeiro, caquexia e atrofia por desuso (PAHL, 1999). Em condições normais, o NF- κ B encontra-se inativo no citoplasma por meio de sua ligação com o inibidor de proteína endogeno da família IK β . Estimulos pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucinas resultam na fosforilação sitio-específica do IK β e sua degradação pelo 26S proteassoma. Este mecanismo permite a acumulação nuclear do NF- κ B (na forma fosforilada) e subsequente transcrição de diversos genes promotores que codificam citocinas (TNF, IL-1, IL-6), enzimas de resposta ao estresse, fatores de crescimento, proteínas anti-apoptóticas e moléculas de adesão celular (PALOMBELLA et al., 1994; READ et al., 1995; KARIN; BEM-NERIAH, 2000; BALDWIN, 2001; LAWRENCE et al., 2001). Brown

et al. (1993) relata que o NF- κ B atua como um amplificador molecular uma vez que, também controla sua própria transcrição e a transcrição de IK β .

Alguns estudo revelam elevada expressão de NF- κ B em condições de atrofia (CAI et al., 2004) e nas distrofias musculares (MONICI et al., 2003; MESSINA et al., 2006). Archaryya et al. (2007) cita que o bloqueio do NF- κ B promove a formação de novas miofibras em resposta à degeneração em camundongos *mdx*, e Bonuccelli et al. (2007) revela diminuição na expressão desse fator em músculos de camundongos *mdx* tratados com bortezomibe.

O fator transformador de crescimento-beta 1 (TGF- β 1) regula numerosas repostas celulares, é um potente modulador da inflamação, formação de fibrose e miogenese (SHULL et al., 1992; LEASK; ABRAHAM, 2004; LI et al., 2004). Estudos de Ihn (2002) evidenciam que o TGF- β 1 regula o fator tecidual de crescimento conjuntivo (CTGF), cuja função se associa ao estímulo da síntese de prócolagênio e fibronectina pelos fibroblastos.

Aumento nos níveis de mRNA para TGF- β 1 esta associado a estágios precoce de fibrose tecidual (CHEN et al., 2005). O TGF- β 1 encontra-se superexpresso no músculo de pacientes DMD (BERNASCONI et al., 1995; CHEN et al., 2005; SUN et al., 2008) e de cães GRMD (PASSERINI et al., 2002). Bernasconi refere que a proporção de tecido conjuntivo em pacientes DMD e BMD aumenta progressivamente com a idade, sendo que houve maior expressão de TGF- β 1 em pacientes entre 2 e 6 anos de idade. De acordo com Sun et al. (2008) o TGF- β 1 encontra-se intimamente relacionado com a progressão da distrofia muscular.

Sabe-se que a fibrose prejudica o suporte nutricional das miofibras, particularmente em estágios avançados da GRMD, quando as fibras se tornam fisicamente isoladas do suprimento sanguíneo pela diminuição na densidade de microveias e aumento da sua dispersão espacial. podendo criar uma barreira ente os capilares e a membrana da miofibrila (VALENTINE et al., 1988; NGUYEN et al., 2005).

Cohn et al. (2007) cita que o tratamento de camundongos *mdx* com losartan há diminuição da expressão de TGF- β 1, associado a um aumento da regeneração e força muscular. Silva (2009) tratando cães GRMD de diferentes idades com losartan, verificou menor expressão de TGF- β 1 por meio de imunohistoquímica da fibra muscular após o termino do tratamento.

Uma vez que o NF- κ B e o TGF- β 1 encontram-se intimamente associados à patogênese e progressão da distrofia muscular, a regulação de ambos é considerada alvo terapêutico que

visa à diminuição do processo inflamatório e o controle do processo fibrótico irreversível da doença .

2.5 BORTEZOMIBE (PS-341)

Os inibidores de proteassoma foram inicialmente sintetizados na tentativa de desenvolver agentes que pudessem bloquear a excessiva quebra de proteínas musculares em estágios de caquexia (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006). Dessa forma, O bortezomibe foi o primeiro inibidor proteassômico avaliado em humanos e aprovado pela FDA (*United States Food and Drug Administration*) em maio de 2003 para tratamento de pacientes com mieloma múltiplo recidivante, previamente tratados com duas ou mais terapias, sem, contudo terem apresentado qualquer regressão da doença durante a última terapia (VOOHEES, et al., 2003; PEKOL et al., 2005).

O Bortezomibe inibe a atividade “quimiotripsina-símile” do proteassoma 26S de forma reversível e dose-dependente (ELLIOTT; ROSS, 2001; SCHWARTZ; DAVIDSON, 2004) (Figura 3).

Fonte: http://www.velcade.info/bgdisplay.jhtml?itemname=product_overview2

.Figura 3 – Estrutura do 26S proteassoma. O Bortezomibe se liga especificamente e de forma reversível ao sítio quimiotripsina-símile pertencente ao complexo enzimático proteassômico

Após a administração de uma única dose, o bortezomibe é rapidamente distribuído pelos tecidos, tendo meia vida de distribuição inicial de menos de 10 minutos, seguido por uma meia-vida de eliminação de mais de 40 horas. A máxima inibição proteassômica ocorre dentro de 1 hora e restabelece após 72 a 96 horas após a administração. Metabolizado por desboronação oxidativa, sendo processado e em seguida, eliminado por via renal e biliar (SCHWARTZ; DAVIDSON, 2004). Mecanismos hepáticos modelam o metabolismo *in vivo* do bortezomibe com participação de diversas enzimas do citocromo p-450 (PEKOL et al., 2005).

De acordo com Schwartz e Davidson (2004) nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de inibição do proteassoma com a administração das doses subseqüentes nos dias 4, 8 e 11, sugerindo que, 72 horas entre cada administração é suficiente para restabelecer a função normal do proteassoma nos tecidos.

Diversas neoplasias hematológicas são altamente dependentes da atividade proteassômica para sobrevivência celular, através da ativação de fatores de transcrição nuclear e de proteínas anti-apoptóticas (HIDESHIMA et al., 2001). Essas proteínas são essenciais para a divisão celular descontrolada, característica comum às células malignas (PEKOL et al., 2005). Inibidores de proteassoma podem estabilizar muitos ciclos celulares de proteínas inibitórias e causar o término da multiplicação celular induzindo a apoptose, limitando, assim, o desenvolvimento e progressão do tumor (HERSHKO, 1997; HAMILTON et al., 2005).

As células cancerígenas parecem ser mais sensíveis que as células normais aos efeitos pró-apoptóticos dos inibidores de proteassoma, fato que explica em parte sua utilização terapêutica no tratamento de alguns tipos de câncer (ELLIOTT; ROSS, 2001; PEKOL et al., 2005). Lopes et al. (1992) cita que a alta taxa de toxicidade dos inibidores de proteassoma às células em proliferação se deve a estabilização da proteína supressora de tumor p53, uma proteína de vida curta, degradada pelo proteassoma, cujo acúmulo leva a apoptose celular.

Recentes estudos evidenciam que não só as proteases dependentes de cálcio atuam na degradação da fibra muscular na distrofia muscular, como também o complexo ubiquinina-proteassoma participa em estados catabólicos através de sua ação na proteólise da fibra muscular e, a combinação de ambos, pode potencializar essas lesões (KUMAMOTO et al., 2000). Segundo Tawa; Odssey e Goldberg (1997), o bortezomibe pode atuar inibindo ambos os processos de degradação muscular. Phillips et al. (2000) relata ação imunossupressora, bloqueio do catabolismo celular e da progressão da doença degenerativa muscular.

Krawiec et al. (2005) cita que a administração de Bortezomibe em camundongos imobilizados previniu cerca de 53% a perda da massa muscular, indicando que a atrofia muscular por desuso pode ser parcialmente retardada com a utilização de inibidores de proteassoma.

Os camundongos *mdx* tratados *in vitro* e *in vivo* com o inibidor proteassômico MG-132, apresentaram diâmetro de fibra muscular mais uniforme e não invasão de linfócitos, bloqueio da degradação da distrofina e das proteínas associadas (BONUCCELLI et al.; 2003). Dessa forma, os autores concluíram que os inibidores do proteassoma podem efetivamente bloquear a degradação da distrofina e de proteínas associadas, atenuando as alterações miopáticas comumente observados na musculatura esquelética de camundongos *mdx*.

Esse mesmo grupo de pesquisa, em 2006, encontrou resultados similares em músculos de pacientes DMD e BMD tratados *in vitro* com MG-132. Nestes, houve maior expressão da distrofina, β -dystroglicano e α -sarcoglicano na membrana plasmática das fibras musculares. Sendo que, 67% dos seis músculos de pacientes DMD apresentaram pouca a marcante expressão da distrofina e proteínas conjugadas, e 100%, dos três pacientes BMD apresentaram marcante restauração da expressão dessas proteínas. Esses achados indicam que os inibidores do proteassoma podem representar tratamento viável para pacientes portadores de distrofias musculares (ASSERETO et al., 2006). Em 2007, resultados animadores são novamente comprovados em camundongos tratados *in vivo* por meio de injeções intramusculares de Bortezomibe e MLN273; sugerindo que os inibidores de proteassoma podem efetivamente bloquear o fator de transcrição nuclear NF- κ B, atuando de forma relevante na reação inflamatória e patogênese da DMD (BONUCCELLI et al., 2007).

Até o momento, nenhum tratamento que obtivesse sucesso em pacientes DMD e BMD foi desenvolvido. A alta incidência de mutações esporádicas no gene da distrofina sugere que a terapia gênica pode não controlar de forma efetiva essa doença, dando ênfase para o desenvolvimento de terapias alternativas e indicando que o uso de inibidores de proteassoma pode representar valiosa rota para futuros tratamentos em humanos portadores da distrofia muscular (ASSERETO et al., 2006).

A primária e imediata consequência da inibição do proteassoma é a diminuição das taxas de degradação proteica nas células. A concentração de inibidor requerida para causar esse efeito varia com a linhagem celular. A mensuração da eficácia do inibidor nas células ou extratos pode ser o maior desafio experimental, e a maioria dos estudos, neste aspecto, avaliou qualitativamente a potência inibitória (KISSELEV; GOLDBERG, 2001).

A completa inibição proteassômica pode ocasionar efeitos tóxicos, uma vez que corre inibição do ciclo celular, podendo ocorrer acúmulo de proteínas anormais. Entretanto, a inibição parcial desse complexo não traz efeitos deletérios importantes, somente em tratamentos prolongados e a inibição do proteassoma pelo bortezomibe é reversível e dose dependente (TAWA; ODESSEY; GOLDBERG, 1997). Para Voohees et al. (2003), a inibição da atividade do proteassoma, sendo este responsável pela degradação de mais de 80% das proteínas celulares nos organismos eucariotos, pode bloquear o crescimento e divisão celular, levando em ultimo caso à morte celular, de forma incompatível com a vida.

Adams et al. (1999) cita que a dose limite de toxicidade em espécies animais, como no macaco, ocorre quando há aproximadamente 90% de inibição da atividade 20S do proteassoma. Os efeitos adversos mais comuns observados em humanos em tratamento para mieloma múltiplo, recebendo a dose preconizada ($1,3 \text{ mg/m}^2$) incluem: fadiga (65%), náusea (64%), diarreia (51%), trombocitopenia (43%), neuropatia periférica (37%), vômito (36%), pirexia (36%), anemia (32%), edema periférico (25%) e dispnéia (22%) (VELCADE, 2003). Segundo Schwartz e Davidson (2004) esses efeitos podem ser manejados adequadamente com tratamentos suportes, no entanto deve-se ter cautela com pacientes com trombocitopenia e insuficiência renal e hepática, uma vez que o bortezomibe é eliminado por essas vias.

Em estudo recente, Herrmann et al. (2007) cita que a inibição crônica do proteassoma está associado ao aumento do estresse oxidativo, prejuízo na vasodilatação arterial e aumento da espessura da íntima, agravando os efeitos vasculares dos fatores de risco tradicionais cardiovasculares como a hipercolesterolemia, indicando significativos mecanismos de controle da biologia e patologia vascular mediados pelo proteassoma.

Objetivos

3 OBJETIVOS

- Avaliar de forma comparativa o possível retardo na progressão das lesões musculares em cães Golden Retrievers afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao tratamento bortezomibe.
- Avaliar por parâmetros laboratoriais os cães distróficos submetidos à terapia com bortezomibe.
- Avaliar, histológica e ultraestruturalmente, os efeitos do fármaco sobre a progressão da distrofia muscular em cães Golden Retriever, uma vez que nos baseamos no pressuposto que ocorrerá diminuição da degradação protéica no interior da célula, por inibição do complexo proteassômico.
- Quantificar a inibição proteassômica em amostras sanguíneas nos cães tratados com bortezomibe.
- Estabelecer um modelo de aplicação das drogas, com vistas à transposição do tratamento para pacientes acometidos pela distrofia muscular de Duchenne.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

A colônia de cães GRMD – Brasil, localizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia – Setor de Anatomia, possui fêmeas portadoras do gene distrófico consideradas matrizes reprodutoras, machos doentes de varias idades destinados à terapias para tratamento da Distrofia Muscular.

O projeto proposto foi conduzido após avaliação e aprovação pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados cinco cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD) entre quatro a seis meses de idade. Os animais eram provenientes de duas ninhadas que foram planejadas para que os mesmos tivessem a mesma idade, sendo que a diferença entre o nascimento das duas foi de quatro dias. Os animais doentes foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene e recreação. Os diagnósticos de distrofia muscular para a seleção dos animais foram realizados pelas equipes do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB-USP) e do Canil GRMD Brasil do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, através do exame de DNA na primeira semana de vida dos animais.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em dois grupos: Dois animais (K1 e B7) receberam a injeção do bortezomibe (Grupo experimental) e três cães foram selecionados como grupo Controle para avaliação da progressão da doença (Quadro 2). Inicialmente, contávamos com três animais em cada grupo, no entanto com a morte de um animal antes do início do

experimento, restaram-nos apenas dois animais para serem tratados, uma vez que o grupo controle composto por três animais foi comum entre outros experimentos em andamento no canil GRMD- Brasil.

Animais - Tratados	Animais - Controle
B 7 ♂	K3 ♀
K1 ♀	K4 ♂
	K6 ♂

Quadro 2 - Animais utilizados nos grupos experimentais, as letras representam o nome da mãe (K= Kyra, B= Bianca) e os números a ordem do nascimento - São Paulo- 2009

Atualmente, existem poucos canis experimentais do modelo da distrofia muscular em todo mundo. Os projetos desenvolvidos com cães GRMD envolvem dedicação exclusiva de funcionários e equipe de médicos veterinários para que uma boa qualidade de vida seja mantida dentro dos centros de pesquisa. Temos verificado que há momentos críticos nos quais a taxa de mortalidade é elevada, compreendendo o período pós-natal com a dificuldade em ganho de peso dos filhotes afetados e a competição com os animais saudáveis da mesma ninhada durante o aleitamento. Ao desmame, o estresse comum a ambientes com agrupamento de animais, torna os mesmos susceptíveis a infecções oportunistas e consequente óbito. Entre os 8 a 12 meses de idade muitos cães morrem devido às alterações características da progressão da doença, como falência cardíaca e respiratória, caquexia, hérnia hiatal, entre outras.

Assim como cita Collins e Morgan (2003), os cães não são animais de laboratório ideais, as colônias são dispendiosas de manter, as espécies não são geneticamente manipuladas como no camundongo *mdx* e há maior envolvimento emocional.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um frasco ampola do produto foi utilizado em cada aplicação. O produto foi reconstituído com 3,5 mL de solução salina, sendo que a solução final continha concentração de 1 mg/mL de bortezomibe. Utilizamos cateter 22 G (BD[®]) para punção e acesso à veia cefálica, em seguida, o medicamento foi aplicado em bólus por um período de 3 a 5 segundos. Utilizamos o protocolo de aplicação recomendado pelo fabricante (dias 1, 4, 8 e 11), ou seja, nos seguintes dias da semana: segundas e quintas feiras, durante duas semanas consecutivas, sendo que na terceira semana não foi administrado o fármaco (semana de descanso). Foram realizados 3 ciclos de aplicação, compreendendo um período total de 9 semanas.

Utilizamos a dose inicial de 1,3 mg/m² do bortezomibe por se tratar da dose estipulada pelo fabricante para tratamento de pacientes humanos com mieloma (ADAMS, 2002), e também por ser segura em crianças portadoras de tumores sólidos (BLANEY et al., 2004). Antes de darmos andamento ao experimento com os cães distróficos, realizamos um projeto piloto no qual foi administrado o fármaco em um cão sadio SRD na dose estipulada, sem constatarmos efeitos adversos que pudessem interferir no protocolo terapêutico a ser implantado. A dose de 1,3 mg/m² foi instituída durante o primeiro ciclo de aplicação, e como não verificamos os efeitos adversos comumente observados nos pacientes humanos que pudessem limitar o período ou indicar a descontinuação do tratamento, aumentamos para 1,45 mg/m² no segundo ciclo e, no terceiro para 1,60 mg/m². Esse ajuste de dose se justifica pela inibição da atividade do proteassoma pelo bortezomibe ser dose-dependente e de atuação reversível sobre o sítio quimiotripsina-símile, com melhores resultados sobre a fibra muscular quando utilizado na dose máxima (BONUCCELLI et al., 2003; BONUCCELLI et al., 2007).

Os principais efeitos adversos observados em humanos estão descritos no quadro 3, para identificá-los e também com o objetivo de acompanhar a evolução da doença nos cães tratados, foi instituído exame clínico semanal de acordo com ficha clínica estipulado pelos médicos veterinários do Canil GRMD – USP (APÊNDICE B).

EFEITOS INDESEJÁVEIS	
Muito frequentes	Frequentes
Trombocitopenia, neutropenia, anemia	Leucopenia, linfopenia
Hiporexia	Pneumonia
Vômito, diarreia, náusea, constipação	Desidratação
Dispneia	Confusão, depressão
Neuropatia periférica	Tremores, polineuropatia
Parestesia	Dispneia de esforço, tosse
Mialgia	Dor abdominal, estomatite, ulceração oral
	Fraqueza muscular, artralgia
	Insuficiência renal, disúria
	Hipotensão, flebite

Quadro 3 – Os efeitos indesejáveis verificados pelo fabricante em cinco estudos clínicos em pacientes humanos portadores de mieloma múltiplo. As frequências estão definidas como: muito frequentes ($\geq 1/10$), frequentes ($\geq 1/100$, $< 1/10$) (Millennium Pharmaceuticals, data não publicada) - São Paulo - 2009

4.4 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Pela punção da veia jugular, colheu-se aproximadamente 4 mL de sangue, divididos em duas alíquotas. Uma foi acondicionada em tubo estéril contendo anticoagulante ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 7,5 % (Vacutainer[®], Becton Dickinson) para a realização de hemograma e contagem de plaquetas, sendo feita lamina de esfregaço sanguíneo com sangue *in natura* no momento da colheita. Outra alíquota foi transferida para o tubo de vidro siliconizado contendo gel separador de soro (Vacutainer SST[®], Becton Dickinson), centrifugado a 1500 g durante 15 minutos para obtenção do plasma sanguíneo, no qual foram avaliadas as demais provas laboratoriais. Todos os exames foram processados pelo Laboratório Clínico do Departamento de clínica Médica da FMVZ-USP.

Para contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas foi utilizado aparelho de uso veterinário (Contador hematológico modelo ABX Vet[®]). O exame diferencial dos leucócitos e avaliação morfológica das hemácias e leucócitos foram realizados em esfregaços de sangue

corados pelo método de Rosenfeld, observados em aumento de 500 vezes em microscópio (modelo Jenamed 2 Carl Zeiss).

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático (Liasys[®], Roche) utilizando “Kits” comerciais. Essas análises envolveram as determinações das concentrações séricas de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), gama-glutamil transferase (GGT), proteína total, albumina, cálcio, fósforo, sódio, potássio e colesterol.

Iniciamos a coleta de sangue para exames de hematologia e bioquímica sérica uma semana antes de iniciarmos a aplicação do Bortezomibe servindo de controle pré-clínico (semana 1), semanalmente durante o período estipulado de tratamento (segunda a décima semana) e na semana seguinte ao termino dos três ciclos (décima primeira semana), contabilizando um total de 11 semanas avaliadas, ou seja, 77 dias.

4.5 EXAME DE URINA

A urina foi obtida por micção espontânea, sondagem vesical ou cistocentese. Cada amostra de urina foi avaliada fisicamente quanto a cor, aspecto, odor e densidade; este ultimo em refratômetro com limite máximo de mensuração de 1,050. O exame químico foi realizado pela imersão rápida de fita reagente específica para urinálise (Combur - 10[®], Roche) e leitura contra padrão de cores estabelecido pelo fabricante, depois de ocorrido um minuto. A sedimentoscopia foi realizada após a amostra ser centrifugada a 200 g por 10 minutos (Centrifuga Excelsa Baby II[®], Fanem), segundo técnica rotineiramente empregada pelo Laboratório de Análise Clínicas do Departamento de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. No quadro 4 encontram-se especificados os parâmetros avaliados.

Parâmetros analisados	análises laboratoriais		
	Urina	Sangue	soro
Hemograma (hemo)	-	Contagem total Hemoglobina Hematócrito Diferencial de leucócitos Contagem total de plaquetas	-
Perfil Hepático	-	-	Fosfatase Alcalina Alaninaminotransferase Aspartatoaminotransferase Creatina Quinase Proteína Total Albumina Bilirrubinas
Exame de urina I	Análise físico-química Sedimentoscopia	-	-
Perfil Complementar	-	-	Ureia Creatinina Cálcio Fósforo Sódio Potássio Colesterol

Quadro 4 – Sumário dos parâmetros analisados em correspondência com as análises laboratoriais - São Paulo-2009

4.6 BIÓPSIAS

A biópsia foi coletada do ventre do músculo vasto lateral ou bíceps femoral em cada um dos cães afetados (grupo experimental e controle), antes de iniciar a terapia com o bortezomibe (tempo zero - T0) e após o termino do protocolo terapêutico (tempo um - T1). No T0 a biópsia foi coletada no membro pélvico esquerdo e no T1 no lado direito do membro pélvico. Em três cães adultos saudáveis sem raça definida (SRD) apenas uma coleta foi realizada para análise e comparação das fibras musculares com arquitetura e fisiologia preservadas.

Foi realizada biópsia do tipo aberta e retirado um fragmento de 1 x 2 cm² (Figura 3). Após canulação venosa e fluidoterapia de manutenção, os animais foram submetidos ao seguinte protocolo anestésico: associação Maleato de Acepromazina 0.05 mg/kg (Acepran[®], Univet) associado a 2 mg/kg Cloridrato de Tramadol (Tramal[®], Pfizer) por via intramuscular. Anestesia local infiltrativa à base de Cloridrato de Lidocaína 2% (Lidol 2%[®], Hipolabor

Farm) sem vasoconstrictor (7 mg/kg) para incisão de pele, divulsão de tecido subcutâneo e fáscia muscular. No momento da coleta do fragmento muscular foi administrado Propofol (Propofol[®], Eurofarma) (2,5 mg/Kg) por via intravenosa. No pós-operatório imediato foi utilizada Dipirona (D-500[®], Fort Dodge Saúde Animal) (25 mg/kg) por via intravenosa. A analgesia imediata e de manutenção foi conduzida a partir da utilização de Carprofeno (Rimadyl[®], Pfizer) (2,2 mg/kg), por via oral durante 3 a 5 dias. Foi utilizada antibioticoterapia à base de Cefalexina (Cefalexina[®] –genérico, Eurofarma) (30mg/Kg) a cada 12 horas, por 7 dias.

O fragmento muscular destinado a histologia foi fixado em paraformoldeído a 4% e pequenos fragmentos, com cerca de 0,3 cm³, foram fixados em solução de Karnovsky modificada (solução de glutaraldeído 2,5% + paraformoldeído 2% em tampão fosfato 0.1M) para processamento da microscopia eletrônica de transmissão. Uma parte do fragmento coletado foi embebido em isopentano líquido e posteriormente acondicionados em criotubo (Axigen[®]) e imersos em nitrogênio líquido, os tubos foram mantidos congelados em freezer a – 80 ° C até o momento de serem processados para técnica de Western Blot.

Figura 4 – A e B: Coleta do músculo bíceps femoral durante procedimento de biópsia muscular

4.7 MICROSCOPIA DE LUZ

Os fragmentos da biópsia foram fixados em paraformoldeído a 4% durante um período superior a 24 hora. Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol (70 a 100%) para desidratação e xilóis para diafanização, utilizando-se procedimento convencional,

para inclusão em Paraplast[®] (Leica/Germany), confeccionando-se blocos retangulares com base de 3x4 cm.

Foram realizados cortes de 5µm em micrótomo (Leica RM 2065[®]) para obtenção das lâminas, e posteriormente desparafinizados em estufa a 60°C por 2 horas. Utilizou-se a coloração de Hematoxilina-eosina (HE) para análise estrutural e das características histopatológicas do músculo distrófico, e a de Picrossírius red para quantificação do colágeno. As lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

Na quantificação do colágeno, padronizamos 13 fotos de cada corte, na lente objetiva de 40x, que possui área total de 151798 micrômetros quadrados. As fotos foram tiradas em forma de cruz, tendo 10 fotos verticais (V1 a V10), 2 fotos horizontais (H1 e H2) e 1 foto central (C), de maneira que o campo de uma foto não sobrepujasse o campo de outra foto. A imagem de cada campo foi digitalizada e tratada com luz polarizada, de forma a contrastar o colágeno da coloração de fundo por limiar de cor. Após a separação, a imagem foi binarizada e a proporção volumétrica ocupada pelas fibras colágenas em cada imagem, foi medida e analisada por um programa de morfometria específico do software Zeiss[®] KS 400. A quantidade de colágeno em cada campo foi medida em unidades de área (µm²). O valor obtido nos treze campos de cada corte foi somado e encontrado a média e o desvio padrão de cada animal. E a partir da média das áreas, foi calculada a porcentagem de colágeno em relação à área do campo (151.798 µm²).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As pequenas amostras pós fixadas em solução de Karnovsky modificada foram lavadas em tampão fosfato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (osmium tetroxide 4% w/w solution in water, Polyscience[®], Inc. USA), *overnight*. Posteriormente lavados em solução salina e imersos em acetato de uranila (Polyscience[®], Inc. USA) *overnight*. Em seguida, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 a 100%), permanecendo por 1 hora, sob agitação na mistura de 3:1 de acetona e resina (Araldite resin[®], grade 502, Polyscience, Inc. USA + DDSA, Polyscience[®], Inc. USA + DMP-30, Polyscience[®], Inc. USA), mais 1 hora na mistura de 1:1 de acetona e resina e por mais 1 hora na resina pura. Os

fragmentos foram colocados em moldes contendo resina pura e submetidos a cortes ultrafinos com cerca de 60 nanômetros, contrastados pelo acetato de uranila 2% (Polyscience[®], Inc. USA) em água destilada (5 minutos) e pelo citrato de chumbo 0,5% (Polyscience[®], Inc. USA) em água destilada (10 minutos). A observação ultraestrutural e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D - Phillips[®]).

4.9 DOSAGEM E ATIVIDADE DO PROTEASSOMA

Amostras de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas (20µl de heparina para cada 2 mL de sangue coletado) durante o primeiro, segundo e terceiro ciclo de aplicação do bortezomibe em todos os cães distróficos (controles e experimentais) no seguinte esquema: uma, quatro e vinte quatro horas após a administração do fármaco. Foram acondicionadas em eppendorfs de 0,5 mL e congeladas a -20°C até o momento de serem processadas.

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, diluídas em tampão fosfato-salino - PBS, volume de 1:1, centrifugadas a 800 g por 30 minutos a 4°C, retirado sobrenadante e adicionado 1 mL de PBS gelado ao pellet, centrifugadas a 400 g por cinco minutos a 4°C, retirado o sobrenadante. Outra lavagem foi feita com PBS, centrifugada a 6600 g por dez minutos a 4°C. Após essa última lavagem foi adicionado o EDTA (5 mM, pH: 8,0) por uma hora a 4°C e depois centrifugadas 6600 g, por 10 minutos na temperatura de 4°C. Foi realizado dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976) e adicionou-se 100 µg do extrato de proteínas ao tampão (20 mM/L HEPES; 0,5 mM/L EDTA; 0,005% duodecil sulfato de sódio – SDS) para um volume final de 200 µl para cada poço da placa em duplicata. Nos poços inferiores foi adicionando 10 µL do inibidor de proteassoma Bortezomibe a 10µM e o por último, o substrato AMC (amino-4-methylcoumarin) (Calbiochem[®] - Novabiochem) na duplicata de cada amostra. A leitura foi realizada no fluorímetro (Molecular Devices Spectra Max Gemini XS) pela liberação do AMC do tempo 0 a cada 5 minutos por 90 minutos em nível de excitação de 380 nm e emissão de 460 nm.

A taxa de inibição da atividade quimitripsina-simile foi calculada de acordo com método de Lightcap et al. (2000), seguindo a seguinte fórmula:

$$\% I = 100 \times \left[1 - \frac{A_I}{A_A} \right]$$

Onde % I é porcentagem de inibição da atividade quimiotripsina do proteassoma, A_I é a atividade quimiotripsina na presença do inibidor, e A_A é a atividade da quimiotripsina na ausência do inibidor.

4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram testados os seguintes anticorpos e diluições descritos no quadro 5. Cortes da espessura de 5µm foram fixados em laminas previamente silanizadas. As laminas foram desparafinizadas em estufa a 37°C por 24 horas, seguido de protocolo de desparafinização e desidratação em xilol e alcoóis. Foi realizado bloqueio com peroxidase a 3% em álcool etílico absoluto. Seguiu-se a uma lavagem em água destilada, e as laminas foram fervidas em tampão citrato por 15 minutos em microondas na potência de 80%. Em seguida, deixou-se que as laminas esfriassem dentro do próprio tampão e foram lavadas em água destilada sob agitação. Foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas com *Protein Block* (Dako®) por 45 minutos em câmara úmida. Retirou-se o excesso de *Protein block* e o anticorpo primário específico foi aplicado em apenas um corte *overnight*, deixando outro como controle negativo (PBS) a fim de avaliarmos a eficácia do protocolo e descartamos os testes falso-positivos. No dia seguinte, as laminas foram lavadas três vezes com PBS, e o anticorpo secundário vimentina-sptreptavidina (LSAB⁺-Dako®) foi aplicado nos dois cortes de cada lamina deixando-os reagir 45 minutos cada. A revelação foi realizada por kit DAB⁺ (Dako®), e as laminas coradas com hematoxilina e novamente desidratadas em bateria de alcoóis e xilol.

Anticorpo	Fabricante	Diluição (em PBS)
distrofina (NCL-DYS1)	Novocastra	1:10
α -dístroglicano (NCL- α -DG)	Novocastra	1:50
β -dístroglicano (NCL- β -DG)	Novocastra	1:25
phospho-NK κ B	Cell Signaling	1:50

Quadro 5 – Anticorpos utilizados nos testes imunohistoquímico, fabricante e diluição empregadas- São Paulo - 2009

4.11 WESTERN BLOT

Utilizamos a técnica descrita por Anderson e Davison (1999) para detecção de proteínas nas distrofias musculares. Cerca de 20 a 30 mg de cada amostra congelada foram rapidamente pesadas, adicionou-se 200 μ L de solução de extração (0,125mol/L Tris/HCl, pH:6,4, 10% glicerol, 4% SDS, 4 mol/L ureia, 10% mercaptoetanol, 0,001% bromofenol blue) a cada amostra. Foram homogeneizadas no Polytron de tecidos durante 30 segundos em velocidade média. Em seguida as amostras foram colocadas em fervura durante 5 minutos e centrifugadas a 9500 x g por 3 minutos. O gel de corrida foi confeccionado em gradiente de concentração, a base continha 7% poliacrilamida (30% acrilamida plus, 0,375 mol/L tris/HCL pH: 8,8, 0,2% SDS). Após a polimerização do gel de base, adicionou-se o segundo gel de corrida misturando dois géis com a ajuda de um gradiente de concentração na porcentagem de 5,5% e 4% de poliacrilamida (0,375 mol/L Tris/HCl pH: 8,8, 0,2% SDS),. Foi realizado gradiente de glicerol para ajudar na estabilidade das fases. O gel de 7% continha 10% de glicerol, o de 5,5% e de 4% continham, respectivamente, 7,5% e 3% de glicerol. O gel “stacking” foi confeccionado a 3% acrilamida, 0,125 tris/HCl, pH: 6,8, 3% glicerol e 0,2% SDS. O sobrenadante das amostras foi aplicado em cada poço do gel.e a corrida se deu na voltagem de 30 mA. Em seguida, o gel foi transferido pra membrana de nitrocelulose através do sistema “sanduíche”. A membrana foi bloqueada por 1 hora em TBST (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20) contendo 5% leite desnatado. A membrana foi incubada *overnight* em anticorpo primário NCL-DYS 1 (Novocastra[®]) e beta-actina (A5441,Sima-Aldrich[®]) na

diluição de 1/50 e 1:5000 respectivamente, em TBST/1%leite desnatado. Após três lavagens em TBST a membrana foi encubada por 40 minutos com anticorpo secundário anti-mouse conjugado à peroxidase também diluído em TBST/1% leite desnatado. As bandas de proteínas ligadas ao anticorpo foram detectadas usando o kit de detecção ECL (Pierce).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos utilizados foram não paramétricos (flexíveis às restrições), uma vez que temos um numero limitado de animais que pertencem a um canil experimental para estudo do modelo da distrofia muscular. Sendo esta uma doença rara em cães e de difícil manejo, contando com uma equipe de tratadores e veterinários treinados em cuidados e manejos específicos para com as limitações desses animais. Os testes foram considerados significativos a 5%, com $p\text{-valor} < 0,05$, todos os testes foram realizados com auxilio do programa Core Team (2008)

O teste não paramétrico de Wilcoxon, também chamado de Mann-Whitney, é uma ferramenta para testar diferenças entre dois conjuntos de amostras independentes (CAMPOS, 1974; BUSSAB; MORETTIN, 2002), ou seja, se o tratamento com bortezomibe foi estaticamente significativo para reduzir a deposição de tecido conjuntivo e fibrose muscular entre os grupos analisados. Também avaliamos por esse mesmo teste, os valores coletados semanalmente nos exames bioquímicos e hematológicos. Foram analisados estatisticamente somente os parâmetros que se encontraram alterados, ou seja, aqueles fora do limite de referência para a espécie canina.

Para os dados referentes à taxa de inibição do proteassoma, obteve-se um intervalo de confiança das médias dos cães pertencentes ao grupo controle, assim foi estipulado o limite inferior como o menor valor verificado, e, o valor máximo considerado como limite superior do intervalo de confiança. Esse intervalo de confiança representava uma média de 95%, com os possíveis valores que esperamos da média de todos os cães controle. A média de cada animal tratado foi comparada com esse intervalo de confiança, utilizando erro do tipo I com $p\text{-valor}$ igual a 0,05 (significância de 5%).

Para a análise estatística da expressão de phospho- $\text{NF}\kappa\text{B}$, 10 fotos de cada lamina histológica no aumento de 40x tiveram os núcleos corados pela reação imunohistoquímica. Os

núcleos positivos foram contados e estabelecida a porcentagem entre todos os núcleos da área. O teste “*T*” de Student foi usado na análise desses dados (significância de 5%).

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados encontrados encontram-se descritos em tópicos de acordo com a metodologia utilizada.

5.1 BIOQUÍMICA SÉRICA E HEMOGRAMA

As principais alterações no exame bioquímico foram aumento nos valores de ALT, CK e AST, observados nos cães do grupo Tratado e no grupo Controle.

Quanto à enzima ALT (alanina amino transferase) observamos picos de aumento coincidentes em ambos os grupos durante a 4^a, 6^a e 8^a semanas analisadas; os maiores valores foram de 569,4 (U/L) para o grupo Tratado e 502,5 (U/L) para Controle durante a 4^a e 11^a semanas respectivamente. Os menores valores foram de 292,3 (U/L) para o grupo Tratado e 342,6 (U/L) para o Controle durante a 10^a e 5^a semanas respectivamente. Avaliando de forma geral o gráfico, notamos uma diminuição sérica do ALT no grupo Tratado a partir da 4^a semana de tratamento, sendo que no grupo Controle os valores que até então eram semelhantes ao Grupo Tratado, tornam-se mais elevados atingindo maior elevação durante a 11^a semana analisada (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Variação da concentração média e desvio padrão de ALT (U/L) nos Grupos Tratado e Controle durante as 9 semanas de administração do Bortezomibe (Início aos 7 dias após a primeira coleta de sangue para exames pré-tratamento e termino aos 63 dias, seguida da coleta para exames pós-tratamento)- São Paulo- 2009

Assim como o ALT, o AST (aspartato amino transferase) sérico apresentou picos concomitantes nos dois grupos avaliados. O aumento mais significativo ocorreu durante a 4ª semana. Os menores valores foram de 129,5 (U/L) no grupo Tratado e 182,4 (U/L) para o grupo Controle durante a 10ª e 5ª semanas respectivamente. Os maiores valores foram de 641,2 (U/L) para o Tratado e 881,6 (U/L) para o Controle durante a 4ª semana (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Variação da concentração média e desvio padrão de AST (U/L) nos Grupos Tratado e Controle durante as 9 semanas de administração do Bortezomibe (Início aos 7 dias após a primeira coleta de sangue para exames pré-clínicos e termino aos 63 dias, seguida da coleta para exames pós-clínicos)- São Paulo- 2009

O aumento do CK (creatina quinase) acompanhou a tendência de aumento do ALT e AST durante a 4ª semana analisada em ambos os grupos. Os menores valores foram de 5652,8 (U/L) no grupo Tratado e 7766,1 (U/L) para o grupo Controle durante a 8ª e 5ª semanas respectivamente. Os maiores valores foram de 29146,2 (U/L) para o Tratado e 26893,7 (U/L) para o Controle durante a 4ª semana (Gráfico 3).

Notamos que as três enzimas analisadas acima apresentaram tendência de aumento ou diminuição em períodos semelhantes, com maior expressão por volta da 4ª semana para os dois grupos e menor expressão em torno da 10ª semana para o grupo Tratado e 5ª semana para o Controle. A magnitude do aumento do ALT, AST e CK em relação aos valores de referencia, pode ser constatada na tabela 1.

Gráfico 3 - Variação da concentração média e desvio padrão de CK (U/L) nos Grupos Tratado e Controle durante as 9 semanas de administração do Bortezomibe (Início aos 7 dias após a primeira coleta de sangue para exames pré-clínicos e termino aos 63 dias, seguida da coleta para exames pós-clínicos) - São Paulo- 2009

Tabela 1 – Magnitude de aumento (máximo e mínimo) em relação aos valores de referencia* estipulados para cães, das enzima sericas ALT, AST e CK no Grupo Tratado e Controle durante as 11 semanas de avaliação -São Paulo- 2009

Enzimas Grupos	ALT		AST		CK	
	V. min.	V. max	V. min.	V. max	V. min.	V. max
Tratado	2,9	4,6	2	9,7	28,3	134,5
Controle	3,4	4,9	2,8	13,4	38,8	134,5

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Os valores do fósforo sérico apresentaram-se elevado em todos os cães entre a 1ª e 9ª semanas avaliadas, com media variando de 7,7 a 8,8 (mg/dL), tendo como base o intervalo de 2,5 a 6,2 mg/dL como valores de referencia (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997; BUSH, 2004). Os maiores valores aconteceram por volta da 6ª semana e a partir da 9ª semana, tenderam a cair ate se estabilizaram dentro dos valores normais.

O colesterol sérico apresentou-se aumentado da 5ª a 8ª semanas analisadas nos cães K4, K6, B7. O cão K1 exibiu esse aumento apenas na 8ª semana e o K3, os valores mantiveram-se dentro da faixa de referência. Aumento do potássio sérico ocorreu durante a 3ª e 4ª semanas analisadas, em todos os cães, exceto o K4.

No leucograma, todos os cães apresentaram aumento na concentração de plaquetas, no grupo Tratado a maior expressão ocorreu durante a 1ª semana (652000) e no grupo Controle durante a 2ª semana. Os menores valores em ambos os grupos ocorreram durante a 9ª semana (Gráfico 4). Tendo como base a variação normal de 200 a 500 mil plaquetas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Gráfico 4 - Variação da concentração média e desvio padrão de plaquetas (/μL) nos Grupos Tratado e Controle durante as 9 semanas de administração do Bortezomibe (Início aos 7 dias após a primeira coleta de sangue para exames pré-clínicos e termino aos 63 dias, seguida da coleta para exames pós-clínicos) - São Paulo- 2009

Além da elevação das plaquetas observadas em todos os cães, quatro cães apresentaram linfocitose (aumento de linfócitos típicos), com maior importância nos cães K1, K3 e K6, nos quais a maior parte das semanas analisadas constatou-se esse aumento, neste mesmo animais, notou-se leucocitose em pelo menos três semanas, a neutrofilia coincidiu com a leucocitose apenas no cão K3. Quatro cães apresentaram basofilia, com valores acima de 100 por μL durante três semanas para K4 e K6, duas semanas para B7 e uma semana para

K3 (referência: 0). Nas primeiras coletas, observamos presença de anisocitose, policromasia e linfócitos reativos, em todos os cães (APÊNDICE A).

A concentração de hemácias esteve diminuída em quase todas as semanas avaliadas para três cães (K1, K3 e K4), nos outros (B7 e K6), essa diminuição ocorreu em pelo menos metade das semanas analisadas (APÊNDICE A).

Aplicando-se o teste de *Wilcoxon* ou teste de *Mann Whitney*, nos parâmetros alterados entre o grupo controle e tratado, obtivemos os p-valores para a comparação das médias dos coeficientes de inclinação. Observamos nenhuma diferença significativa a 5%. Porém, a 10% há diferença significativa em: CK, ALT, e Potássio (*). Para CK e ALT o grupo Controle apresentou maior média de coeficiente. Já no Potássio o grupo Tratado apresentou maior média de coeficiente (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise estatística dos parâmetros alterados nos exames bioquímico e hematológico. Não observamos diferenças significantes a 5% (0,05) entre as médias de coeficientes de inclinação entre os grupos controle e tratado. No entanto se aumentarmos a significância para 10% os valores de CK, ALT e potássio apresentam diferenças significantes (*) com p-valor <0,05- São Paulo-2009

Parâmetros	Tratado		Controle		p-valor 5%	p-valor 10%
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
Hemácias	0,007	0,002	0,006	0,001	1,0000	0,5
Linf típico	-10,137	17,806	4,154	37,031	0,5637	0,28185
Plaquetas	-2167,854	248,887	-3011,329	1802,046	0,5637	0,28185
CK	-142,470	5,314	-72,768	9,854	0,0833	0,04165*
AST	-2,996	1,702	-3,212	2,046	1,0000	0,5
ALT	-1,423	0,328	-0,015	0,662	0,0833	0,04165*
Potássio	-0,007	0,001	-0,013	0,004	0,0833	0,04165*

5.2 EXAME DE URINA

No exame de urina, todos os animais apresentaram proteinúria e hemoglobinúria. Sendo os cães K1, K3 e K4 os que mais apresentaram intensidade de concentração de hemoglobina no exame com fita reagente em mais da metade das semanas estudadas (APÊNDICE A). A proteinúria se caracterizou por ser de baixa intensidade (uma cruz), porém observada em pelo menos nove semanas avaliadas, indicando sua constância durante o

período analisado. Não se observou alterações quanto a presença de glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio e pigmento biliar na urina dos cães.

No exame do sedimento urinário, todos os cães apresentaram descamação das vias urinárias em todas as semanas analisadas. Dependendo do pH urinário, os cristais urinários variaram de fosfato triplo em pH alcalino e fosfato amorfo em pH mais ácido, apenas o cão K4 apresentou em um momento cristais de oxalato de cálcio.

A contagem de hemácias no sedimento urinário esteve aumentada nas fêmeas em 8 semanas analisadas (K1 e K3), os machos apresentaram menor contagem, sobretudo no K6, no qual em apenas uma ocasião a contagem foi pouco aumentada. A leucocitose foi mais significativa nas fêmeas e no macho K6. Quanto à presença de bactérias, todos os cães apresentaram pelo menos uma cruz (+) durante as onze semanas avaliadas (APÊNDICE A).

5.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Como a inibição do proteassoma se comporta de forma dose-dependente, acreditávamos não encontrar uma significativa melhora clínica dos animais durante as nove semanas de tratamento. Dessa forma, nos focamos em analisar a ação do Bortezomibe sobre a fibra muscular e restauração da distrofina. Além disso, outros artigos nos quais se utilizou inibidores de proteassoma em músculos distróficos, somente as análises morfológicas e imunológicas foram realizadas para confirmação da restauração das proteínas.

Durante o período de administração do fármaco, exames clínicos semanais foram realizados com o objetivo de identificar possíveis reações adversas (Quadro 3) descritas nos pacientes humanos tratados com Bortezomibe. Os parâmetros analisados foram organizados de acordo com ficha clínica (APÊNDICE B).

Observamos sinais clínicos progressivos da distrofia muscular em todos os cães analisados citados na tabela 3. Observamos manifestações clínicas progressivas com a idade dos cães porém variando quanto a intensidade entre os mesmos, indicando que o fenótipo pode variar entre os filhotes de uma mesma ninhada.

Tabela 3 – Principais manifestações clínicas nos cães GRMD constatadas aos quatro, cinco e seis meses de idade, ao longo do período de tratamento com o Bortezomibe - São Paulo- 2009

Idade dos cães		
4 meses	5 meses	6 meses
- Enrijecimento membros anteriores e posteriores	Sinais do 4 ^a mês adicionado a: - Rigidez do quadríceps	Sinais do 4 ^a mês adicionado a: - Sialorréia
- Locomoção rígida	- Rigidez e resistência muscular na abertura mandibular	- presença de componente abdominal pronunciado durante movimentos respiratórios
	-Atrofia muscular	- contraturas

Dentre os pontos que merecem ser destacados quanto à variação nas manifestações clínicas dos cães estudados, podemos citar: o cão B7 (tratado) durante o ultimo ciclo de tratamento com Bortezomibe apresentou conjuntivite aguda bilateral, com esclera levemente congesta, alopecia da superfície periocular associado a crostas e lacerações (Figura 5). O animal foi encaminhado ao Setor de Oftalmologia do Hospital Veterinário (FMVZ-USP) para exames complementares e acompanhamento por especialista responsável (Prof. Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros), e foi comprovada reação irritativa alérgica aguda, sugerindo que o tratamento com o fármaco poderia ter causado as lesões. No cão K1 (tratado), as lesões distróficas musculares causaram contraturas e deformações de membros a partir dos quatro meses de idade, tornando-o incapaz de apoiar os membros pélvicos e de se locomover com os quatros membros. O cão K4 (não tratado), por sua vez, apresentou progressão das manifestações clínicas a partir do oitavo mês de idade, vindo a óbito no 10º mês devido às complicações da distrofia muscular.

Figura 5 - Cão B7 tratado com após ultimo ciclo de aplicação Bortezomibe. Nota-se conjuntivite aguda com secreção purulenta e superfície periocular eritematosa e lacerada

5.4 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO COLÁGENO

Nos cortes histológicos de músculo esquelético normal (cães SRD), as fibras musculares encontraram-se uniformemente espaçadas, angulares, relativamente do mesmo tamanho, de aspecto poligonal, multinucleadas, geralmente com dois núcleos por célula, localizados na periferia das fibras (Figura 6). O citoplasma das células são acidófilos e as miofibrilas são observadas no citoplasma como grumos, pode-se ver também estriações no citoplasma. O tecido conjuntivo entre as fibras (endomísio) é delgado, e no perimísio encontra-se organizado e agrupado em feixes longitudinais (Figura 6 A e C).

Figura 6 – Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães saudáveis SRD. **A:** arquitetura muscular organizada, conjunto de fibras bem delimitadas; tecido conjuntivo delgado no perímio das fibras (►); **B, C e D:** em maior aumento pode-se observar os núcleos localizados na periferia das fibras e o formato poligonal característico, com tecido conjuntivo organizado em perímio (►). HE, Barra: **A:** 200µm, 10x; **B:** 50µm, 40x; **C:** 40µm, 60x; **D:** 20µm, 100x

Nos cortes histológicos de músculo distrófico aos 3 meses de idade (T0), a grande maioria das fibras não apresentou formas poligonais como nos músculos de cães saudáveis. As fibras musculares possuem diferentes tamanhos e formas. Observou-se fibras hipertrofiadas e também atrofiadas indicando heterogeneidade no tamanho entre as mesmas, com formato tendendo para o arredondado. Na grande maioria dos cortes, as fibras musculares apresentaram citoplasma levemente basófilo. Em alguns cortes, veem-se aglomerados de fibras de pequeno diâmetro, próximas a fibras hipertrofiadas, bastante deformadas e com citoplasma basófilo (coloração rósea), o que indica início de regeneração das fibras musculares com deposição de tecido conjuntivo e fibras colágenas (Figuras 7 A, B e C).

Muitas fibras se encontram em degeneração sendo possível identificar áreas de infiltração de células inflamatórias próximas aos capilares sanguíneos, e regiões de

regeneração de algumas fibras (Figura 7 A e B). Notou-se raras fibras apresentando núcleos centrais, não sendo observados com a frequência comumente encontrada em cães distróficos adultos.

É bastante visível o abundante tecido conjuntivo ao redor das fibras (endomísio) e dos feixes de fibras (perimísio) em comparação ao tecido muscular normal, esse fato se deve a degeneração das fibras e substituição do tecido necrosado por tecido conjuntivo fibroso (Figura 7 A, B e C)

Figura 7 – Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães distróficos aos 3 meses de idade (T0). **A, B e C:** Nota-se perda da morfologia poligonal com evidente arredondamento das fibras, presença de infiltrado inflamatório, indicando áreas de degeneração e necrose de fibras musculares (*); abundante tecido conjuntivo em endomísio e perimísio (►), o citoplasma basófilo (róseo) de algumas fibras indica estado de regeneração. Em **C:** Fibras hipertrofiadas (→) representando a variação no diâmetro das fibras. Coloração HE, Barra: 50µm, aumento: 40x

Quando comparamos a primeira biópsia (T0) com a segunda (T1) notamos que no primeiro momento, as fibras tendiam para formato arredondado, com poucas fibras hipertrofiadas e algumas de diâmetro menor, proliferação de tecido conjuntivo em endomisio e perimísio. No T1 as fibras se mostraram mais hipertrofiadas, e a infiltração de células inflamatórias foi mais evidente em áreas de periferia das fibras musculares, próximas ao perimísio, onde notou-se áreas de necrose e deposição de tecido conjuntivo (Figura 8).

As fibras musculares dos cães tratados estavam mais organizadas e com menos infiltração de células mononucleares em perimísio e endomisio em T1 que o grupo controle. No entanto, as fibras apresentaram-se mais hipertrofiadas em T1 indicando mecanismo compensatório de perda de tecido funcional muscular (Figura 8 A, B, C e D e Figura 9).

Nos cães do grupo não tratado (Controle), notou-se maior deposição de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório colonizando extensas áreas focais nas fibras, bem como distribuídos homogeneamente pelo endomisio em T1 (Figura 10 e 11). Essa característica se torna importante, uma vez que no T0, a quantidade de tecido degenerado foi semelhante nos dois grupos, indicando maior progressão da doença no grupo Controle (Figura 8 E, F, G e H). O tecido necrosado e degenerado tende a ser substituídos por tecido conjuntivo, acarretando em fibrose e atrofia muscular.

Figura 8 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães distróficos antes do tratamento (A, C, E e G) e após tratamento (B, D, F e H). Há uma evidente hipertrofia das fibras no T1 quando comparado ao T0, algumas fibras apresentaram aumento no diâmetro (→) indicando heterogeneidade entre as fibras. Infiltrado inflamatório e necrose (*) presente tanto no T0 como em T1, sendo que nos cães não tratados em T1 (F e G) foi mais significativo, indicando maior progressão da doença. Coloração: HE; Barra: 100µm, aumento: 20x

Figura 9 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães distróficos tratados em T0 (**A e C**) e T1 (**B e D**). Observa-se a hipertrofia das fibras em T1, e menor infiltração de células inflamatórias em endomísio. Os núcleos nos dois momentos se localizaram na periferia das fibras. Coloração: HE; Barra: 40 μ m, aumento: 60x

Figura 10 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães distróficos pertencentes ao grupo Controle em T0 (A, C e E) e após tratamento (B, D e F). Nota-se em T1 hipertrofia das fibras e regiões próximas ao perimísio com denso infiltrado inflamatório e áreas de necrose (*). Coloração: HE; Barra: 40μm, aumento: 60x

Figura 11 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães distróficos em T1. **A e B:** cães tratados apresentaram menor deposição de colágeno em perímio das fibras musculares (►); **C e D:** colágeno abundante em perímio das fibras musculares nos cães do grupo Controle. Coloração: HE; Barra: 200µm, aumento: 10x

Realizamos a quantificação do colágeno em quatro cães, dois do grupo Tratado e dois do Controle. Antes do tratamento, os cães controle apresentaram uma média de 4,17% de colágeno, enquanto os cães tratados tiveram uma média de 5,39% (Tabela 4).

Todos os cães que participaram do experimento tiveram um aumento na quantidade de colágeno do T0 para o T1, com exceção do cão K1 que praticamente manteve a quantidade de colágeno. Os valores encontrados em T1 estão descritos na tabela 5. Os cães do grupo controle apresentaram média de 13,42% de colágeno e os cães tratados de 7,39%. Esses dados evidenciam que ao final do experimento com o bortezomibe, a quantidade média de colágeno encontrado no músculo bíceps femoral dos cães controle foi quase o dobro da observada, no mesmo músculo, nos cães tratados com Bortezomibe. Sendo que em T0 (antes do início do tratamento) a média de colágeno era semelhante entre os grupos, até mesmo com uma média um pouco superior para o grupo que receberia o tratamento (Gráfico 5).

Tabela 4 - Quantificação do colágeno em músculos bíceps femoral dos cães distróficos pertencentes ao grupo Tratado e Controle e de cães saudáveis (SRD) avaliadas em T0. Área total objetiva 40X: $151798\mu\text{m}^2$. Medida da área (μm^2) de colágeno em cada foto, média das áreas, desvio padrão e porcentagem de colágeno. F: fêmea, M: macho, C: controle, T: tratado, GS: Golden sadio, NR: não realizado - São Paulo-2009

Animais	Valor mínimo (μm^2)	Valor máximo (μm^2)	Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)	Colágeno (%)
FC (K3)	2138,78	17944,62	8983,549	4780,914	5,92
MC (K6)	2656,41	6207,74	3678,938	1008,88	2,42
MC (K4)	NR	NR	NR	NR	NR
Total/Média	2397,595	12076,18	6331,244	-	4,17
FT (K1)	5845,54	12829,96	8734,571	1988,465	5,75
MT (B7)	2758,33	14663,55	7613,572	3446,917	5,02
Total/Média	4301,935	13746,76	8174,072	-	5,39
F (SRD)	172,43	2877,25	1031,009	872,2479	0,68
M (SRD)	1364,71	2971,57	2012,202	572,551	1,33
M (GS)	-	-	-	-	1,69
Total/Média	768,57	2924,41	1521,606	-	1,23

* Valores encontrados por Gaiad (2006) em cão sadio da raça Golden Retriever utilizado como controle.

Tabela 5 - Quantificação do colágeno em músculos bíceps femoral dos cães distróficos pertencentes ao grupo Tratado e Controle e de cães saudáveis (SRD) avaliadas em T1. Área total objetiva 40X: 151798 μm^2 . Medida da área (μm^2) de colágeno em cada foto, média das áreas, desvio padrão e porcentagem de colágeno. F: fêmea, M: macho, C: controle, T: tratado, GS: Golden sadio, NR: não realizado- São Paulo- 2009

Animais	Valor mínimo (μm^2)	Valor máximo (μm^2)	Média (μm^2)	Desvio padrão (μm^2)	Colágeno (%)
FC (K3)	8348,11	59626,34	17621,18	13519,32	11,61
MC (K6)	4927,04	65300,69	23107,49	16303,94	15,22
MC (K4)	NR	NR	NR	NR	-
Total/Média	6637,57	62463,52	20364,34	-	13,42
FT (K1)	2947,31	11611,83	8246,638	2527,579	5,43
MT (B7)	5184,61	41533,66	14179,57	11080,04	9,34
Total/Média	4065,96	26572,745	11213,104	-	7,39
F (SRD)	172,43	2877,25	1031,009	872,2479	0,68
M (SRD)	1364,71	2971,57	2012,202	572,551	1,33
M (GS)	-	-	-	-	1,69
Total/Média	768,57	2924,41	1521,606	-	1,23

* Valores encontrados por Gaiad (2006) em cão sadio da raça Golden Retriever utilizado como controle.

Gráfico 5 - Média e desvio padrão da morfometria do colágeno em músculo bíceps femoral de cães sadios e dos cães dos grupos Tratado e Controle, antes (T0) e após (T1) tratamento com Bortezomibe. Há diferença estatística ($p < 0,05$) para os cães não tratados entre T0 e T1 (*) e entre os cães tratados e não tratados em T1 (**), indicando que o tratamento com Bortezomibe reduziu a deposição de tecido conjuntivo e consequentemente a fibrose muscular - São Paulo- 2009

Comparando os valores da morfometria do colágeno em cães distróficos e sadios, notamos que em T0, o grupo Controle apresentou aumento de 3,4 vezes, e o grupo Tratado de 4, 4 vezes o valor dos cães sadios. Em T1 esses valores foram de 10,9 e 6 vezes para os grupos Controle e Tratado respectivamente, indicando que o tratamento com o Bortezomibe foi capaz de reduzir a deposição de tecido conjuntivo e consequentemente o processo fibrótico nos animais tratados.

A análise estatística e de significância dos valores encontrados em cada animal em T0 e T1 estão representados na tabela 6. Na tabela 7 está representada a correlação de significância da quantificação do colágeno entre T0 e T1 para cada grupo (Tratado e Controle).

Tabela 6 – Análise estatística do colágeno para cada animal avaliado. Observamos diferenças significantes a 5% (0,05) com p-valor 0,0266* e 0,0002* para K3 e K6 respectivamente, indicando o aumento significativo do colágeno nos cães não tratados em T1 - São Paulo- 2009

Animal	Tempo Inicial			Tempo Final			p-valor
	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mediana	Média	Desvio Padrão	
B7	7499,33	7613,57	3446,92	10349,38	14179,57	11080,04	0,0574
K1	8496,74	8734,57	1988,47	9024,57	8246,64	2527,58	0,8394
K3	9101,77	8983,55	4780,91	14336,94	17621,18	13519,32	0,0266*
K6	3426,06	3678,94	1008,88	19702,83	23107,49	16303,94	0,0002*

Tabela 7 – Análise estatística do colágeno avaliando o grupo Tratado e o Controle em T0 e T1. Notamos que para o grupo Tratado não houve diferença significativa para o colágeno de T0 para T1, enquanto o grupo Controle apresenta p-valor <0,0001* (0,05), indicando aumento da deposição do colágeno em T1 - São Paulo- 2009

Tempo	Tratado				Não Tratado			
	mediana	média	Desvio Padrão	p-valor	mediana	média	Desvio Padrão	p-valor
Inicial	8287,52	8174,07	2815,61	0,1105	4048,67	6331,24	4333,14	<0,0001*
Final	9330,15	11213,10	8434,86		16748,37	20364,33	14938,18	

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A ultraestrutura das fibras de cães saudáveis (SRDs) demonstrou homogeneidade entre as mesmas, com aspecto poligonal típico e núcleos localizados perifericamente. O espaço entre as fibras preenchido por tecido conjuntivo é delgado, sendo as mesmas bem unidas umas as outras. A membrana sarcoplasmática encontra-se bem delimitada, e não observou-se fibroblastos no endomísio das fibras. Os capilares se localizam na periferia das fibras, próximo aos núcleos, este, possuindo luz capilar evidente (Figura 12 A e B).

As principais alterações observadas na microscopia eletrônica de cães distróficos estão esquematizadas na tabela 8. As miofibrilas em alguns momentos se encontravam hipercontraídas, porém na maioria das vezes, as fibras não degeneradas, apresentavam-se organizadas de forma semelhante às observadas nos músculos de cães saudáveis (Figura 12). Em apenas um cão tratado (B7), as miofibrilas em T1 estavam mais organizadas que no T0. No cão não tratado (K6), as fibras se mostravam organizadas no T0 e pouco hipercontraídas, hipertrofiadas, porém organizadas no T1.

O infiltrado inflamatório, com presença de macrófagos e monócitos foi evidente em todos os cães, tanto em T0 como em T1 apresentaram essas alterações, porém variando na intensidade e frequência desses achados. A degeneração muscular caracterizada por fibras degeneradas com evidencia de material em apoptose, abundante vesículas e material amorfo esteve presente em todos os animais. Algumas fibras apresentavam perda da continuidade e delimitação da membrana sarcoplasmática com extravasamento do conteúdo necrótico em espaço intersticial (Figura 13). O animal que mais expressou essas alterações foi o cão K4 quando no T1 foi evidenciado uma maior degeneração das fibras, a membrana sarcoplasmática dilatada, com perda de limites na maior parte das fibras analisadas. O outro cão controle (K6) neste mesmo período, apresentou maior preservação da arquitetura das fibras, membranas bem delimitadas de forma semelhante à encontrada no cão tratado B7.

As mitocôndrias em todos os momentos (T0 e T1) apresentaram se atroficas, impossibilitando a visualização e delimitação das cristas mitocondriais. Nos cães saudáveis, essas organelas, apresentaram morfologia preservada e as cristas mitocondriais evidentes com eletrodensidade semelhante às das miofibrilas, se concentravam de forma evidente no citoplasma imediatamente abaixo da membrana sarcoplasmática e distribuídas de forma homogênea entre as miofibrilas (Figura 14).

O citoplasma celular, imediatamente abaixo da membrana sarcoplasmática encontrou-se dilatado, ou seja, de forma diferente das observadas no músculo saudável, no qual a membrana se mantinha aderida as miofibrilas ou às mitocôndrias presentes, indicando uma dilatação do retículo sarcoplasmático (Figura 15). Assim como ao padrão de hipercontração das fibras, o cão B7 tratado, que no T0 apresentou essa característica, no T1, contudo, essas alterações se constataram como pouco frequentes. Nos demais animais, os achados de dilatação sarcoplasmática foram presentes em T0 e T1.

Todos os animais tanto T0 quanto em T1, apresentaram presença de fibroblastos ativados, com retículo sarcoplasmático evidente indicando atividade de síntese, principalmente próximos às regiões de infiltrado ou áreas de necrose muscular. A deposição de tecido conjuntivo apresentou variação entre os animais, indicando degeneração e fibrose que ocorre normalmente nos músculos dos animais afetados (Figura 16). Nos cães tratados (B7 e K1) variou no T0 de pouco a moderado e no T1 de moderado no K1 a pouco a moderado no cão B7. Nos cães não tratados a deposição de tecido conjuntivo foi significativamente maior em perímio e endomísio, indicando fibrose muscular (Figura 17).

A presença de células satélites ativadas foi uma característica comum na ultraestrutura de cães distróficos, o mesmo não observado na musculatura de cães saudáveis, indicando a tentativa de regeneração e síntese de mioblastos nos músculos afetados (Figura 13 D e D; 16 C).

Tabela 8 - Principais alterações encontradas na microscopia eletrônica de transmissão em cães saudáveis (SRDs), e os cães distróficos tratados (B7 e K1) e não tratados (K4 e K6) em tempo zero (T0) e tempo 1 (T1). (+) presente; (-) ausente - São Paulo- 2009

Alterações Ani- mais	Memb. delimitada	Dilatação citoplasma subcelular	Fibras	Infiltrado inflamatório	Células em degen./ necrose	Presença de Fibroblast o	Deposição de colágeno	Mitocô- n . atróficas
SRD	+	-	Organizada s e poligonal	-	-	-	Pouco	-
B7 T0	+	Presente	Hipercont.	+	+	+	Moderado	+
B7T1	+	Pouco presente	Organizada s	+	+	+	Pouco- moderado	+
K1T0	+	Pouco presente	Hipercont.	+	+	+	Pouco a moderado	+
K1T1	+	Presente	Hipercont.	+	+	+	Moderado	-
K4T0	+	Presente	Hipercont.	+	+	+	Pouco	+
K4T1	-	Presente	Hipercontr.	+	+	+	Moderado	+
K6T0	+	Presente	Organizada s	+	+	+	Moderado	+
K6T1	+	Presente	Hipercont., organizadas	+	+	+	Moderado- intenso	+

Figura 12 - Eletromicrografia de transmissão do músculo bíceps femoral de cães SRD sadios (**A e B**) e cães distróficos (**C, D e E**). **A**: Estrutura poligonal da fibra muscular, com núcleos e capilares localizados na periferia das fibras; **B**: Núcleo (N) e capilar (C) com luz evidente e bem delimitada; **C**: Fibras hipercontraídas (HF) próximo a célula necrótica (*); **D**: Fibras hipercontraídas (HF) em maior aumento; **E**: Capilares com diminuição do diâmetro luminal em músculo distrófico. **A; C e E**: 2200 x, barra: 10 μ m; **B e D**: 5600 x, barra: 2 μ m

Figura 13 - Eletromicrografia de transmissão do músculo bíceps femoral de cães distróficos. **A:** Região de infiltrado inflamatório (IF) próximo a vaso sanguíneo (V); **B:** Fibra muscular necrótica (FN), presença de material amorfo e degenerado e macrófago (M); **C:** Fibra necrótica (FN) com degeneração de miofibras e macrófagos infiltrados; **D:** Macrófago em processo de fagocitose, presença de vacúolos, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e materiais necróticos fagocitados, fibroblasto (F) em atividade, citoplasma rico em mitocôndrias e retículo sarcoplasmático rugoso; **E:** Macrófago evidenciando em citoplasma, material necrótico fagocitado, capilar (C) com estenose luminal e célula satélite; **F:** Macrófago em maior aumento e fibras necróticas. **A e B:** 2200 x, barra: 10 μ m; **C e D:** 3500 x, barra: 5 μ m; **E:** 5600 x, barra: 2 μ m; **F:** 8900 x, barra: 2 μ m

Figura 14 - Eletromicrografia de transmissão do músculo bíceps femoral. **A e B:** Cães saudáveis; **C e D:** Cães distróficos. **A:** Concentração de mitocôndrias (*) em citoplasma subsarcolemal, (C) capilar, (N) núcleo; **B:** Mitocôndrias (*) em maior aumento abaixo da membrana sarcoplasmática e distribuídas entre as miofibrilas da fibra muscular, é possível observar a morfologia com evidência das cristas mitocondriais; **C:** Mitocôndrias atroficas (→) com padrão eletrodenso aumentado, nota-se presença de núcleo (N) central; **D:** Em maior aumento, mitocôndrias (→) escassas em citoplasma subsarcolemal. **A e C:** 5600 x, barra: 2 µm; **B e D:** 8900 x, barra: 2 µm

Figura 15 - Eletromicrografia de transmissão do músculo bíceps femoral. **A e B:** Cães saudáveis; **C e D:** Cães distróficos. **A:** Núcleo na periferia (N), capilar (C), delgado espaço intersticial (→) (endomísio) entre as fibras musculares; **B:** Em maior aumento espaço intersticial (→) delgado, mitocôndrias aderidas à membrana sarcoplasmática; **C:** Dilatação do retículo sarcoplasmático rugoso e aumento do espaço subsarcoplasmático; **D:** Proliferação do retículo sarcoplasmático rugoso ao redor de núcleo de fibra muscular. **A e C:** 5600 x, barra: 2 μ m; **B:** 8900 x, barra: 2 μ m; **D:** 7100, barra: 2 μ m

Figura 16 - Eletromicrografia de transmissão do músculo bíceps femoral de cães distrófico. **A:** Fibroblasto (F) ativados em região de perimísio; **B:** Fibroblasto e macrófago próximo a fibra em regeneração com presença de núcleo central; **C:** Fibroblasto e fibras colágenas (FC), célula satélite (CS); **D:** Maior aumento da foto A, Fibroblasto com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido indicando atividade de síntese, macrófago (M). **A:** 2200 x, barra: 10 μ m; **B:** 3500 x, barra 5 μ m; **C:** 5600 x, barra: 2 μ m; **D:** 8900 x, barra: 2 μ m

Figura 17 - Eletromicrografia de transmissão do músculo bíceps femoral de cães distrófico. **A, D e G:** Cão B7; **B, E e H:** Cão K4; **C, F e I:** Cão K1. É possível comparar as colunas da esquerda e da direita (cães tratados) com a coluna do meio (cão não tratado). **A, B e C:** Nota-se menor deposição de tecido conjuntivo em endomísio das fibras musculares nos cães tratados, porém menor variação no diâmetro das fibras no cão controle. **D, E e F:** nos cães tratados, as fibras encontram-se mais aderidas umas as outras com menor deposição de tecido conjuntivo. **G, H e I:** Aumento do tecido conjuntivo endomisial no animal não tratado em comparação aos tratados. **A, B e C:** 710 x, barra: 20 μ m; **D, E e F:** 3500 x, barra: 5 μ m; **G, H e I:** 5600 x, barra: 2 μ m

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMA

As coletas sanguíneas no início de cada ciclo de aplicação do fármaco tiveram por objetivo avaliar e quantificar a concentração de proteassoma presente na amostras sanguíneas, para tanto foi mensurada a atividade enzimática da quimiotripsina-símile, sendo este o ponto de inibição do bortezomibe.

Foram realizados 12 testes, implicando no mínimo de três e máximo de oito testes para cada ciclo. Os resultados obtidos foram analisados e uma média foi estabelecida para cada animal durante o período correspondente. Em todos os testes foram inseridos amostras controle, sendo uma delas negativa, na qual se esperava menor taxa de inibição da quimiotripsina, correspondente ao grupo de animais saudáveis e outra positiva, onde utilizamos extrato musculares de ratos caquéticos, com atividade de quimiotripsina sabidamente elevada.

No primeiro ciclo avaliado, o grupo tratado apresentou maior taxa de inibição da atividade quimiotripsina-símile mensurada durante a primeira hora após injeção do Bortezomibe, chegando atingir 72,6% no cão B7 e 66,1% para K1, nos cães não tratados a média foi de 47,6%. Após quatro horas, há uma queda na taxa de inibição no sangue, sobretudo para o cão K1, apresentando níveis semelhantes aos cães distróficos não tratados. A partir dessa hora, há uma queda progressiva e a inibição se torna inferior aos 30% (Gráfico 6).

Gráfico 6 – 1º ciclo de aplicação do Bortezomibe: Taxa (%) de inibição da quimiotripsina-símile mensurada nas amostras sanguíneas coletadas 1, 4 e 24 horas após a aplicação do bortezomibe, nos cães tratados (B7 e K1); média encontrada nos cães distróficos não tratados e controle negativo (-) representado pelos animais saudáveis - São Paulo- 2009

No 2º ciclo, aumentamos a dose para 1,45 mg/m², uma vez que acompanhamos durante o 1º ciclo o estado geral e clínico dos animais tratados, sem constataremos os efeitos adversos comumente descritos em pacientes humanos tratados com o Bortezomibe. A literatura refere inibição da atividade quimiotripsina-símile dose-dependente, dessa forma, o

aumento na dose total em 11,45% foi com o objetivo de obtermos uma melhor ação do fármaco sobre os mecanismos de degradação da fibra muscular. Notamos um aumento na taxa de inibição da atividade quimiotripsina-símile para o cão B7 na 1ª hora, de 72,6% no 1º ciclo para 80,6%. O outro cão tratado por sua vez, apresentou baixa taxa de inibição, variando entre 40,8% na 1ª hora a 36,4% na ultima hora avaliada, mantendo uma inibição relativamente constante. (Gráfico 7).

Gráfico 7 - 2º ciclo de aplicação do Bortezomibe: Taxa (%) de inibição da quimiotripsina-símile mensurada nas amostras sanguíneas coletadas 1, 4 e 24 horas após a aplicação do bortezomibe, nos cães tratados (B7 e K1); média encontrada nos cães distróficos não tratados e controle negativo (-) representado pelos animais saudáveis - São Paulo- 2009

No ultimo ciclo, de acordo com as avaliações semanais dos animais, ajustamos a dose do medicamento para $1,60 \text{ mg/m}^2$, com aumento de 23% em relação a dose inicial. Obtivemos maior inibição da quimiotripsina-símile para os cães tratados durante a 1ª hora avaliada, chegando ao percentual de 92,4% para B7 e 91% para K1. O cão B7 apresentou uma manutenção da inibição após quatro horas da aplicação do Bortezomibe, com subsequente diminuição após esse período, porem ainda, com taxa superior aos cães não tratados. A inibição para o cão K1 após a primeira hora caiu progressivamente ate atingir os valores correspondentes aos cães não tratados, ou seja cerca de 30% de inibição (Gráfico 8).

Gráfico 8 - 3º ciclo de aplicação do Bortezomibe: Taxa (%) de inibição da quimiotripsina-símile mensurada nas amostras sanguíneas coletadas 1, 4 e 24 horas após a aplicação do bortezomibe, nos cães tratados (B7 e K1); média encontrada nos cães distróficos não tratados e controle negativo (-) representado pelos animais saudáveis - São Paulo- 2009

Em relação à atividade quimiotripsina-símile através da mensuração do AMC captado pelo fluorímetro nas amostras sanguíneas, para considerarmos o teste válido, esses valores deveriam apresentar a curvatura esperada, ou seja elevada atividade para o controle positivo (ratos caquéticos) e baixa atividade para o negativo (cães saudáveis). Os gráficos 9 e 10 representam a atividade avaliada durante o último ciclo de administração do Bortezomibe para os cães tratados (B7 e K1) exemplificando a validação de um teste.

Gráfico 9 – O gráfico evidencia o 3º ciclo de aplicação do Bortezomibe: Mensuração da liberação de AMC (substrato do proteassoma) pelo fluorímetro nas amostras sanguíneas do cão tratado B7, nos cães distróficos controles e nos controles positivos e negativos, em comprimento de excitação de 355 nm e emissão de 480 nm durante 1 hora - São Paulo- 2009

Gráfico 10 - 3º ciclo de aplicação do Bortezomibe: Mensuração da liberação de AMC (substrato do proteassoma) pelo fluorímetro nas amostras sanguíneas do cão tratado K1, nos cães distróficos controles e nos controles positivos e negativos, em comprimento de excitação de 355 nm e emissão de 480 nm durante 1 hora - São Paulo- 2009

Comparando a taxa de inibição entre os três ciclos, notamos progressivo aumento na inibição do proteassoma com o aumento da dose do fármaco, com maior relevância na primeira hora avaliada. O cão B7 obteve uma inibição mais significativa, sobretudo no ultimo ciclo, quando os valores após 24 horas permaneciam acima de 50%. Os cães não tratados exibiam taxa de inibição entre 30 a 40% na maior parte do período avaliado, e nos cães sadios, a taxa de inibição foi em media 14,3% (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Comparação da atividade da quimi tripsina-símile em unidade/segundos mensurada nas amostras sanguíneas coletadas durante 1º, 2º e 3º ciclos de aplicação do bortezomibe, pela monitorização da liberação do fluoróforo AMC em comprimento de excitação de 355 nm e emissão de 480 nm durante 1 hora - São Paulo- 2009

Na análise estatística com intervalo de confiança de 95%, notou-se diferenças significativas entre os animais tratados e controle apenas na 1ª hora do 3º ciclo. Neste momento os valores de inibição de B7 e K1 foram maiores que o limite superior do intervalo de confiança dos controles (Tabela 9). No 1º ciclo, não foi possível realizar estatística, pois foi coletado sangue de apenas um animal controle.

Tabela 9 - Análise estatística da taxa (%) de inibição da quimi tripsina-símile mensurada nas amostras sanguíneas coletadas 1, 4 e 24 horas após a aplicação do bortezomibe, no 2º e 3º ciclos. Há diferença significativa (0,05) no 3º ciclo, durante a 1ª hora analisada, os valores dos cães tratados (B7 e K1) foram superiores ao limite superior dos animais controle. São Paulo, 2009.

Ciclo	Tempo	Não tratado		Tratado	
		Limite Inferior	Limite Superior	B7	K1
2º	1 H	0,00	100,00	80,6	40,8
	4 H	0,00	100,00	38,9	40
	24 H	0,00	100,00	12,9	36,4
3º	1 H	23,39	81,15	92,4*	91,0*
	4 H	0,00	100,00	90,8	31,4
	24 H	0,00	83,62	58,7	31,3

5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Antes de realizamos os testes imunohistoquímicos para detecção da distrofina muscular dos cães experimentais, vários testes utilizando diferentes diluições do anticorpo foram testadas em músculos de cães saudáveis a fim de provermos uma diluição e processamento imunohistoquímico adequados para a finalidade desempenhada. Não conseguimos ainda, padronizar um teste utilizando imunofluorescência, ou seja, com anticorpo secundário marcado com fluorescência, como frequentemente observado nos estudos nos quais se avalia a distrofina muscular. No entanto, a utilização do protocolo utilizando anticorpo secundário streptavidina-avidina e revelação com peroxidase se mostrou eficiente em marcar a distrofina nos músculos dos cães saudáveis nos testes de diluições, dessa forma, optamos por esse teste. Utilizamos o anticorpo DYS-1 nos cortes histológicos dos cães tratados e controles em T0 e T1, bem como em amostras histológicas de cães saudáveis para avaliação da validade do teste. Pelos resultados observados em T1 nos músculos dos cães distróficos, verificamos a ausência da marcação da distrofina na membrana sarcoplasmática em ambos os grupos estudados. No músculo de cães saudáveis, nota-se reação positiva, com marcação em anel contornando as fibras musculares, indicando que o teste foi válido para a marcação da distrofina (Figura 18).

Figura 18 – Imunohistoquímica para localização da distrofina utilizando o anticorpo DYS-1 em cortes transversais do músculo bíceps femoral. **A:** cão sadio, evidenciando a marcação da distrofina (em marrom) localizada na membrana sarcoplasmática das fibras musculares; **B:** cão GRMD não tratado em T1, não se observa a marcação da distrofina, indicando a sua ausência, **C e D:** cães tratados em T1, assim como nos cães não tratados não foi constatado presença da distrofina, indicando que o tratamento não restaurou essa proteína pela avaliação por imunohistoquímica. Aumento: 20x, barra: 100 μ m

Com o intuito de analisar a expressão de outras proteínas pertencentes ao complexo DGC, ou seja, associadas à distrofina, utilizamos os anticorpos contra α -dystroglicano e β -dystroglicano nos músculos dos cães distróficos coletados ao final do tratamento com Bortezomibe (T1). Os cães tratados apresentaram maior expressão dessas proteínas na membrana sarcoplasmática das fibras musculares (Figura 19), indicando que o tratamento com Bortezomibe foi capaz de restaurar e aumentar a expressão dessas proteínas que

normalmente encontram-se muito reduzidas ou ausentes nos pacientes humanos e camundongos distróficos (CAMPBELL, 1995).

Figura 19 – Imunohistoquímica para detecção de α -dístroglicano (**A e B**) e β -dístroglicano (**C e D**), proteínas pertencentes ao complexo DGC que se encontram associadas à distrofina em cortes transversais do músculo bíceps femoral em T1. **A e C**: músculos de cães distróficos não tratados nota-se algumas fibras positivas para α -dístroglicano (A) e quase nula marcação para β -dístroglicano (C). **B e D**: cães GRMD tratados nota-se maior número de fibras positivas para α -dístroglicano e β -dístroglicano indicando que o tratamento pode resgatar a expressão dessas proteínas na membrana sarcoplasmática dos animais doentes. Aumento: 40x, barra: 50 μ m

De acordo com os resultados encontrados nas reações imunohistoquímicas para α e β dístroglicano, construímos a figura 20, na qual podemos observar a localização das proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas que tiveram sua expressão aumentada após o tratamento com Bortezomibe.

Figura 20 - Estrutura da distrofina e das proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas. Em vermelho, o complexo distroglicano, com as proteínas que tiveram sua expressão aumentada após tratamento com Bortezomibe

Muitos autores citam que a ativação do NFκB encontra-se envolvida com miopatias inflamatórias e na DMD. Com o intuito de verificar se o tratamento com Bortezomibe foi capaz de inibir esse fator, secções musculares foram tratadas com o anticorpo phospho-NFκB, a forma ativa (fosforilada) de NFκB, que se encontra presente no núcleo das células. Observamos menor expressão nos cães tratados quando comparado aos cães não tratados, indicando o bloqueio do fator IκK e consequentemente do processo inflamatório (Figura 21). Observou-se maior expressão de phospho- NFκB nas fibras atroficas e em regeneração, e a análise quantitativa dos núcleos positivos foi significativamente menor nos cães tratados ($p < 0,05$) (Gráfico 12).

A expressão de TGF-β1, esta relacionado com o processo fibrótico nas fibras musculares. Nos cães saudáveis, nota-se pouca expressão de TGF-β1, se concentrando principalmente em regiões de vasos sanguíneos. Observamos diminuição da expressão dessa citocina inflamatória nos cães tratados, quando comparado aos cães não tratados no tempo final, ao termino do tratamento com Bortezomibe (Figura 22). Indicando que o tratamento com o Bortezomibe foi capaz de diminuir a deposição de tecido conjuntivo e fibrose nos animais GRMD. Esses achados confirmam os resultados obtidos na morfologia pela mensuração de tecido conjuntivo por morfometria do colágeno e da microscopia eletrônica de transmissão.

Figure 21 – Imunohistoquímica para detecção de phospho-NFκB em cortes transversais do músculo bíceps femoral em T1. **A e C:** músculos de cães não tratados evidenciando elevada expressão nuclear de phospho-NFκB, a forma ativa do NFκB. **B e D:** nos músculos de cães tratados há menos expressão de phospho-NFκB nos núcleos das fibras indicando maior atuação da inibição do proteassoma e preservação da forma inativa (NFκB) no citoplasma. Aumento: A, B: 10x, barra: 200μm; C, D: 20x, barra: 100μm

Gráfico 12 - Média e desvio padrão da porcentagem de núcleos positivos para phospho-NFκB por área contada. 10 fotos da lamina de cada animal foi fotografada no aumento de 40x, tomando-se o cuidado para que as fotos não se sobrepusessem. Os valores obtidos foram avaliados pelo teste “T” de Student, e os cães não tratados apresentaram mais núcleos positivos para phospho-NFκB ($p < 0,05$), caracterizando maior ativação da atividade do proteassoma induzindo fatores pró-apoptóticos e moléculas inflamatórias - São Paulo- 2009

Figura 22 - Imunohistoquímica para detecção de TGF- β 1 em cortes transversais do músculo bíceps femoral em T1. **A:** músculo de cão sadio nota-se baixa expressão do TGF- β 1, localizando-se preferencialmente em região de vasos e endotélio. **B:** músculo de cão GRMD não tratado observa-se expressão de TGF- β 1 em endomísio das fibras e em fibras em degeneração, no qual nota-se presença de macrófagos ($\rightarrow$) no interior das mesmas. **C e D:** músculos de cães GRMD tratados, menor expressão de TGF- β 1 quando comparado aos cães não tratados. Aumento: 40x, barra: 50 μ m

5.8 WESTERN BLOT

Apesar dos protocolos já estarem estipulados para detecção da distrofia muscular de cães, tivemos grandes dificuldades na realização destes testes e perdemos material realizando-os diversas vezes sem obtermos êxito na revelação final dos mesmos.

Durante estagio no exterior, foram realizados a técnica de Western Blot para marcação das proteínas na membrana sarcoplasmática como distrofina (DYS-1 e DYS-3), alfa-distroglicano (α -DG), beta-distroglicano (β -DG), óxido nítrico sintetase (nNox), e fosfo-NF κ B. Entretanto, trabalhamos com alíquotas com dosagens extremamente baixas de

proteínas, uma vez que para transportamos o material congelado tivemos que liofilizá-los. Esse procedimento se mostrou crítico na conservação de proteínas, que após a ressuspensão apresentaram uma diminuição na dosagem de proteínas.

Realizamos a técnica para o anticorpo distrofina (DYS-1) e beta-actina para verificação da equivalência de proteínas em cada amostra. Observamos ausência da proteína distrofina nos cães distróficos em T1, entretanto no cão K1 tratado, observamos uma delgada marcação, correspondente ao peso molecular da distrofina (Figura 23 A). Quando comparamos a banda encontrada referente à distrofina com a quantidade de beta-actina expressa no mesma membrana, verificamos expressão importante, dada a menor quantidade de proteína na amostra.

Quanto a expressão da beta-actina, verificamos não equivalência entre a quantidade de proteínas presentes em cada amostra, uma vez que observamos bandas fortemente marcadas e fracamente marcadas (Figura 23 B). O pode ter causado esse resultado foi a escolha do método utilizado, no qual foi feito a pesagem equivalente das amostras musculares e em seguida a extração das proteínas, sendo que no processo de extração, as proteínas eram diretamente aplicadas no gel após serem centrifugadas. Em outros métodos, após a extração das proteínas, realiza-se mensuração das mesmas e em seguida aplica-se no gel a mesma quantidade para cada amostra.

Figura 23 – Western Blot para detecção da distrofina e beta actina em extratos musculares de cães GRMD e sadios em T1. **A:** utilização do anticorpo contra distrofina (≈ 426 Kd), observamos marcação da banda nos animais sadios, indicando a presença dessa proteína. Em um animal tratado (K1) há presença de uma delgada banda ($\rightarrow$). **B:** utilização do anticorpo contra beta-actina (≈ 42 kd), podemos verificar a não equivalência entre a quantidade de proteína em cada amostra estudada. Notamos que o animal tratado (K1) a marcação da distrofina é importante, uma vez que no teste para beta-actina, essa amostra apresentava quantidade inferior aos outros cães GRMD estudados.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Assim como os resultados, dividimos em partes as discussões dos resultados encontrados, de acordo com os procedimentos realizados.

6.1 BIOQUÍMICA SÉRICA E HEMOGRAMA

Na bioquímica sérica, as alterações constatadas em todos os animais foi o aumento sérico das enzimas ALT, AST, CK e do fósforo sérico. Notou-se uma elevação coincidente das três enzimas durante a quarta semana avaliada, ou seja, por volta dos 4 a 5 meses de idade, quando se tornam evidentes os sinais clínicos da doença. Observamos magnitude de aumento dessas enzimas com mínimo de 28 e máximo de 134 vezes para CK, mínimo de duas e máximo de 13 vezes para AST e máximo de 5 vezes para ALT. A media desses achados concordam com as taxas comumente observadas em pacientes DMD sendo de 56 vezes para CK, nove vezes para a AST e ALT (BOYD, 1988),

O ALT é uma enzima hepato-específica para o cão e gato, e o aumento da sua atividade em geral, indica dano nos hepatócitos com liberação da enzima para a circulação sanguínea (BUSH, 2004), todos os cães apresentaram aumento desta enzima, mesmo antes da aplicação do fármaco, não podendo desta maneira, associar esta elevação como induzido pelo fármaco estudado.

Na DMD, o aumento do ALT sérico é comum (BOYD, 1988), também associado com a distrofia muscular nutricional induzida em carneiros (BOYD, 1964). Para Valentine et al. (1990a), cães distróficos de qualquer idade, há aumento da atividade sérica do CK, AST e ALT, e, apesar do aumento de ALT indicar dano hepático em cães e gatos, o exame ultraestrutural do tecido hepático não evidenciou sua degeneração nos cães distróficos. Dessa forma, acredita-se que o aumento sérico da ALT em cães distróficos se deve ao dano muscular esquelético decorrente da doença.

A enzima AST esta presente em uma ampla variedade de tecidos, sendo mais concentradas nas células do músculo cardíaco e esquelético e no fígado. A principal determinação da sua atividade é para o diagnostico de doenças musculares (BENDER, 2003; BUSH, 2004). Todos os cães em nosso estudo apresentaram elevação sérica do AST,

concordando com os achados de Valentine et al. (1990a) e de Bergman et al (2002), este ultimo em relato de caso clinico de um cão da raça Labrador Retriever com distrofia muscular, aos três meses e meio de vida.

A creatina quinase (CK) ocorre como três isoenzimas localizadas primariamente em músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro. É utilizada primariamente para diagnóstico de lesões do tecido muscular esquelético (AKTAS et al., 1993; BENDER, 2003; BUSH, 2004). Em animais a mensuração da atividade enzimática da CK é usada principalmente como marcador de dano muscular esquelético, em miopatias nutricionais e em danos musculares induzidos por exercício (AKTAS et al., 1993)

Os cães distróficos podem ser diagnosticados ao primeiro dia de vida, através da análise desta enzima que se encontra dramaticamente elevada na maioria dos casos, em semelhança com os humanos doentes (COOPER et al., 1988; KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1988, 1990a; SHELTON et al., 2001). Todos os cães, como esperado, tiveram aumento nos valores sérios de CK, fato que coincide com a extensa degeneração das fibras musculares decorrente da distrofia muscular.

De acordo com Valentine et al. (1988) por volta dos dois meses de idade os cães GRMD apresentam um aumento da CK de 100 vezes o valor normal, encontramos média de aumento entre 28 a 134 vezes o valor de referência, indicando a magnitude de lesão muscular presente nos cães nos primeiros meses de vida.

Para Sharp, Kornegay e Lane (1989), ao contrário do que comumente ocorre com os cães afetados, a concentração de creatina quinase sérica pode estar normal a pouco elevada nas fêmeas afetadas. Em um estudo com 5 fêmeas afetadas, Shelton et al. (2001) verificou um animal com concentração de CK dentro do limite da normalidade, duas com aumento moderado e uma com aumento semelhante ao que ocorre nos machos doentes. As fêmeas distróficas em nosso experimento ao contrario do que cita os trabalhos acima, apresentaram elevação de CK semelhante aos machos distróficos, ou seja, valores severamente aumentados.

O fósforo inorgânico é originado da dieta, especialmente leite e carne. É o maior constituinte dos ossos e dos dentes, um componente celular vital que atua em importantes funções de estocagem, liberação e transferência de energia e metabolismo ácido-básico (BUSH, 2004). Em nosso estudo, todos os cães apresentaram hiperfosfatemia, com pico de aumento por volta da 6ª semana avaliada, sendo esta característica um achado comum em cães com menos de um ano de idade, concordando com a idade dos cães estudados que tinham

entre 4 a 6 meses (BUSH, 2004). Bergman et al. (2002), constatou no cão distrófico que o aumento de cálcio e fósforo se referia a idade do cão aos três meses e meio de idade.

A distribuição do potássio através membrana celular representa função crítica na manutenção da excitabilidade cardíaca e neuromuscular, sendo que, alterações na sua concentração intracelular e extracelular alteram o potencial de membrana, e a hipercalemia diminui o potencial da membrana, causando hiperexcitabilidade (CARLSON, 1997).

As três principais causas de hipercalemia são falsa hipercalemia, que ocorre na hemólise, leucocitose e trombocitose; a hipercalemia devido a alteração no balanço extracelular observadas na doença de Addison, doença renal, ruptura de bexiga, obstrução uretral; e por ultimo, a hipercalemia por alteração no balanço intracelular, verificada na acidose metabólica, diabetes, necrose tecidual e exercício vigoroso (CARLSON, 1997). Degen (1986) e Lutomski e Bower (1994), citam que a liberação de potássio dos neutrófilos e plaquetas é uma causa da hipercalemia em sujeitos com elevada leucocitose e trombocitose. A trombocitose foi um achado evidente em todos os momentos analisados, indicando uma causa potencial para hipercalemia, além disso, de acordo com Carlson (1997), a hipercalemia pode ser um achado transitório em animais com massiva necrose muscular, fato comum aos cães distróficos estudados, comprovado também por Bergman et al. (2002).

O aumento do numero de plaquetas pode ocorrer em situações de excitação, pós-exercício intenso, gestação, pós-hemorragia, após traumas, fraturas, cirurgias, distúrbios inflamatórios ou infecciosos agudos ou crônicos e induzida por medicamentos como glicocorticóides, adrenalina e vincristina. Para Thrall (2006) a trombocitose é um distúrbio inespecífico, em geral não associado a sinais clínicos, podendo estar associada com a anemia por deficiência de ferro, doenças inflamatórias e alguns distúrbios mieloproliferativos.

Surpreendentemente, todos os cães apresentaram aumento no numero de plaquetas, sobretudo os tratados, fato que se contrapõe com a trombocitopenia comumente observada nos pacientes humanos tratados com bortezomibe (ORLOWSKY et al., 2002; RICHARDSON, 2003; SCHWARTZ; DAVIDSON, 2004; HAMILTON et al., 2005). Brólio (2008) avaliando parâmetros laboratoriais e clínicos de cães distróficos entre 1 e 12 meses de vida, também relata trombocitose persistente, sugerindo um achado comum em cães com distrofia muscular.

Em humanos, a trombocitose independente da sua origem, esta associada com a elevação do potássio sérico, lactato desidrogenase, fósforo, ácido úrico e zinco. (LUTOMSKI; BOWER, 1994). Em cães, a hipercalemia tem sido descrita associada à trombocitose relativa

e desordens mieloproliferativas (REIMAN; KNOWLEN; TVEDTEN, 1989). Em nossos achados a trombocitose foi um achado em 100% dos cães associada a hipercalemia.

Para Harper et al. (2003), os valores de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina encontram-se diminuídos em cães com menos de um ano de idade, porém sofrem aumento progressivo até se estabilizarem por volta dessa idade. Nossos achados coincidem com esse autor quanto à contagem de hemácias e com os resultados de Brólio (2008).

Valor de leucócitos até duas vezes os valores de referência para adultos podem ser considerados normais em filhotes lactentes e novos (MEYER; HARVEY, 1998). Em nossos achados, a elevação na taxa de leucócitos ocorreu nas primeiras semanas analisadas quando os cães apresentavam cerca de 4 meses de idade, concordando também com os achados de Brólio (2008).

A basofilia pode ser observada em quadros alérgicos, distúrbios inflamatórios purulentos localizados e hiperlipoproteinemia. Nossos cães apresentaram este quadro em semanas isoladas dentro do período analisado, sem, contudo, permanecerem com aumento contínuo destas células.

Células cromatofílicas correspondem às hemácias jovens, precocemente liberadas. São células grandes, cuja cor é mais azulada que as hemácias maduras, indicando presença de organelas (ribossomos, mitocôndrias) que ainda permanecem nas células jovens. A provável causa de sua ocorrência é a perda de sangue por destruição de hemácias, com a medula óssea compensando essa diminuição liberando precocemente novas células (THRALL, 2006).

A proteinúria observada nos cães foi suave a moderadamente elevada, de acordo com Garcia-Navarro (1996) e Bush (2004) esses resultados podem ocorrer na insuficiência renal, estresse, doenças infecciosas, amiloidose, glomerulopatias, neoplasias e na hematúria.

Na hemoglobínúria, a quantidade de pigmento sanguíneo pode ser registrada como traços, pequena, média ou grande (traço, +, ++ ou +++) e esta relacionada ao número de hemácias intactas ou ao número de hemácias que tenham liberado hemoglobina. A hematúria pode ter origem em qualquer parte do trato urinário, na inflamação grave, cálculos urinários, neoplasia e trauma (THRALL, 2006). Todos os cães apresentaram hemoglobínúria suave a moderada, nos machos esse achado pode ser explicado pelo método de colheita utilizado, ou seja, a cateterização, nas fêmeas, a forma de colheita utilizada foi a micção espontânea.

A mioglobínúria é uma complicação reconhecida de pacientes DMD submetidos a tratamento com corticosteroides (GARROOD et al., 2007). Para Bender (2003), a mioglobina

liberada pelas fibras musculares degeneradas passa facilmente pelo filtrado glomerular, uma vez que possui baixo peso molecular, e pode causar reação positiva de hemoglobinúria nos testes realizados com tiras urinárias. Esse fato vem a explicar a persistente hemoglobinúria presente em todos os animais estudados, sugerindo que a proteinúria e hemoglobinúria presentes devem ser melhor investigadas para que o diagnóstico diferencial com as enfermidades que comumente causam essas alterações sejam descartadas.

6.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Para Valentine et al. (1988) a partir de 2 meses de idade, os cães GRMD exibem progressiva fraqueza muscular e anormalidades de marcha levando à atrofia muscular exacerbada, fibrose e contraturas por volta dos seis meses. Os cães entre nove a 12 semanas de idade tornam-se progressivamente menos ativos, com os membros rígidos e marcha arrastada. A mobilidade da mandíbula encontra-se dramaticamente reduzida, a atrofia dos músculos se torna evidente, sendo mais proeminente nos músculos do tronco, quadris e região temporal, concordando com nossos achados.

Entre cinco e 14 meses de idade, nota-se que aumento progressivo das lesões ate os seis meses de idade, quando tendem a se estabilizar e em alguns casos, aumentar de forma suave. Há progressiva hipertrofia da base da língua e sinais de disfunção faringiana e esofagal levando à disfagia e regurgitação (VALENTINE et al., 1988; VALENTINE et al., 1990b; HOWELL et al., 1997; SHELTON; ENGVALL 2005). Avaliamos os cães GRMD semanalmente ate os seis meses de idade, entretanto, temos observado severa progressão da distrofia muscular entre oito a 18 meses de vida, na qual a maioria dos cães vem a óbito devido às complicações da distrofia muscular, como megaesôfago, hérnia hiatal e disfagia aliada à atrofia dos músculos mastigatórios, sialorréia e hipertrofia da língua. Em nosso experimento, um cão controle (K4) veio a óbito aos 10 meses devido à disfagia e outro cão tratado (K1) apresentou severa contratura a partir dos 6 meses resultando em deformações esqueléticas e impossibilidade de locomoção com os membros posteriores, concordando com a descrição de Shelton e Engvall (2005).

Outras manifestações clínicas descritas por Valentine et al. (1988) em cães GRMD entre cinco e 14 meses e Shelton e Engvall (2005) concordam com nossos achados quanto o

aumento da taxa respiratória e maior amplitude do componente abdominal, os animais tendem a se cansar com facilidade e apresentam salivação excessiva. Após os 6 meses os cães afetados apresentam suave a moderada cifose lombar, progredindo para a lordose por volta dos 14 meses de idade (VALENTINE et al., 1988).

Para Shelton et al. (2001), as manifestações clínicas podem variar entre os cães afetados e a severidade das manifestações clínicas pode variar consideravelmente entre os indivíduos afetados em diferentes ninhadas (COOPER et al., 1988). Em nossa pesquisa, estudamos indivíduos de uma mesma ninhada e apenas o cão B7 foi proveniente de outra ninhada, na qual todos os outros cães distróficos morreram até os dois meses de idade por complicações relativas à doença, e não tivemos como o comparar clinicamente e fenotipicamente. Entretanto, observamos variação dos fenótipos clínicos entre os cães estudados, concordando com Hyser et al. (1987) sobre a importância de se elucidar a base de variação na severidade da expressão da doença nos cães afetados. Uma vez que, pode ser relevante para entender a heterogeneidade clínica reportada em muitos pacientes DMD, sugerindo que outros fatores podem afetar a expressão fenotípica da doença em adição à natureza da mutação (COOPER et al., 1988).

Apesar do cão GRMD ser considerado modelo clínico para a DMD, temos observado nos últimos anos aumento nos casos descritos de distrofias musculares em outras raças de cães, como Labrador Retriever (BERGMAN et al., 2002; COSFORD et al., 2008), Iria Terreira (WENTINK et al., 1972), Pointer alemão de pelo curto (SCHATZBERG et al., 1999), Samoiada (PRESTHUS; NORDSTOGA, 1993), Spitz Japonês (JONES et al., 2004), Spaniel Inglês (VAN HAM; ROELS; HOORENS, 1995), Old English Sheepdog (WIECZOREK; GAROSI; SHELTON, 2006), Schnauzer miniatura (PAOLA; PODELL, SHELTON, 1993), Weimaraner (BALTZER et al., 2007), Boston Terrier (DEITZ et al., 2008), dentre outras raças (WETTERMAN et al., 2000; KLAREMBEEK et al., 2007), entretanto o fenótipo e as manifestações clínicas referentes à distrofia muscular são semelhantes.

Não observamos diferença quanto a severidade da doença entre machos e fêmeas doentes, e o aumento proporcional da enzima CK confirma a severidade da doença entre ambos. Apesar do número reduzido de animais para concluirmos essa observação, confirmamos pelos achados de Brólio (2008), que também estudou cães de ninhadas diferentes pertencentes ao canil GRMD-Brasil (USP).

Quanto aos efeitos adversos da administração do Bortezomibe, estudos em toxicologia animal apresentou dose limite de toxicidade com efeitos gastrintestinais e possivelmente cardiovasculares em doses cuja extensão e duração da inibição do proteassoma encontram-se correlacionados (ADAMS et al., 1999).

Hamilton et al. (2005) refere efeitos adversos em pacientes submetidos a dose de 1,75 mg/m² como diarreia, fadiga, neuropatia, progredindo após duas semanas da primeira aplicação do medicamento. Rosinol et al. (2005) menciona severa hepatite em uma paciente humana tratada para mieloma múltiplo. Orlowisky et al. (2002) refere trombocitopenia, efeitos gastrintestinais e fadiga. Não constatamos esses efeitos nos cães tratados, apenas o cão B7 apresentou as alterações oftálmicas descritas em 3-4% dos pacientes humanos tratados com Bortezomibe (VELCADE, 2003). Esses sintomas ocorreram quando o mesmo foi submetido à dose de 1,6 mg/m², com taxa de inibição do proteassoma de cerca de 90% na primeira hora analisada. Adams et al. (1999) cita que a dose limite de toxicidade em espécies animais, como no macaco, ocorre quando há aproximadamente 90% de inibição da atividade 20S do proteassoma. Dessa forma, a conjuntivite aguda parece estar mais uma vez associada a elevada inibição do proteassoma causado pela administração do Bortezomibe.

6.3 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO COLÁGENO

No músculo esquelético normal, as fibras musculares se apresentaram uniformemente espaçadas, angulares, relativamente do mesmo tamanho, multinucleadas, geralmente com dois núcleos por célula e localizados na periferia das fibras, assim como Bertorine et al. (1984) relata em sua pesquisa. Os citoplasmas das células são acidófilos e as miofibrilas são observadas como grumos (BANKS, 1992). O endomísio apresenta escassa população celular constituída por algumas células do conjuntivo, principalmente fibroblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Assim como relatado por Erazo-Torricelli (2004), vimos que no músculo distrófico, as fibras não apresentaram formas poligonais, encontradas no músculo esquelético normal. Neste experimento, o material coletado na primeira biópsia (T0) quando os cães tinham por volta de 3 meses de idade, as fibras tendiam para um formato mais arredondado e com concomitante

heterogeneidade no diâmetro das mesmas, concordando com relatos de Valentine et al. (1986) e Milhorat et al. (1966).

Bradley et al. (1972) expõem que, o início da regeneração das fibras musculares de humanos DMD, é reconhecido pelo pequeno diâmetro delas, pelo citoplasma basófilo rico em RNA, e pelo núcleo grande e central. Algumas dessas características como, fibras de pequeno diâmetro e citoplasma basófilo foram encontrados neste experimento. Essas fibras em processo de regeneração se dispunham em aglomerados, e apresentaram-se deformadas com deposição de tecido conjuntivo e fibras colágenas em suas proximidades. As fibras em regeneração podem apresentar pequenos diâmetros com núcleos centrais (VALENTINE et al., 1992; COZZI et al., 2001) ou maior diâmetro com núcleos localizados na periferia (COZZI et al., 2001).

Nguyen et al. (2002) cita que em cães GRMD aos dois meses de idade, a maioria dos músculos estudados apresenta fibras hialinas isoladas, fibras calcificadas, necrose com infiltração de macrófagos e núcleos centrais indicando estado tardio de regeneração, concomitante com áreas de fibrose endomisial associadas a atrofia das miofibrilas. Sendo que a hialinização das miofibras foi a alteração mais comum relatada em cães com deficiência da distrofina independente da idade dos mesmos (COZZI et al., 2001). Fibras degeneradas, presença de densas áreas necróticas e infiltrado inflamatório foram mais comuns em T1, quando os cães estavam com 6 meses de idade.

Rubenstein (1960), West (1963), Rowe e Goldspink (1968) e Valentine et al. (1986) também relatam em seus trabalhos a presença de núcleos centrais. Para Baloh et al. (1972) e Cullen e Mastaglia (1982), as fibras que apresentam núcleo central são fibras em regeneração. Braund et al. (1982) mostra em seu trabalho que o número de núcleos centrais em cães GRMD excede muito aos valores descritos em cães normais adultos (6 meses ou mais), nos quais, os núcleos centrais nunca ultrapassam 1% das fibras. De acordo com West (1963), os núcleos centrais em material biopsiado corado com HE indicam falha no processo de maturação das fibras. Em nossos achados os núcleos centrais são raramente vistos, e quando presentes aparecem em fibras de diâmetro muito grande ou de diâmetro muito pequeno.

Para Valentine (1990 b), investigações histopatológicas nos músculos de cães GRMD revelam necrose precoce de fibras e regeneração associado com fibrose endomisial e perimisial resultando em severa miopatia, similar ao processo que ocorre na DMD. Os aglomerados basófilos compostos por pequenas fibras necrosadas e células inflamatória são vistos com frequência, com a presença de macrófagos realizando fagocitose, neutrófilos e

plasmócitos, assim como Valentine et al. (1986) e Marshal, Williams, e Goldspink (1989) relatam em seus estudos. Segundo esses autores, esses aglomerados são o início da regeneração das fibras musculares, com a deposição de tecido conjuntivo e fibras colágenas. Constatamos pela histologia e mais precisamente pela análise ultraestrutural, a infiltração de macrófagos que aparecem no interior e ao redor de vasos sanguíneos e dentro das fibras musculares necrosadas, o que ilustra a penetração dessas células no tecido muscular.

Gorospe et al. (1994) sugere forte correlação entre presença de macrófagos e progressão clínica histopatológica em humanos, cães e camundongos *mdx*. O aumento substancial de macrófagos infiltrados na fibra muscular é característico da deficiência de distrofina, formando extensos agrupados necróticos nas fibras, resultados similares foram encontrados por Acharyya et al. (2007) em humanos e camundongos *mdx*. Esses achados foram constatados em nosso experimento, sobretudo nos cães não tratados no T1, com formação de áreas necróticas maciças e infiltrado inflamatório abundante.

A regeneração é prevalente durante os estágios iniciais o dano muscular e tende a declinar para níveis baixos em animais adultos. Acredita-se que esse declínio seja devido à exaustão do potencial regenerativo, seguido dos repetidos ciclos de degeneração regeneração (COZZI et al., 2001). Foidart et al.¹ (1981 apud PASSERINI et al., 2002, p.104), cita que fibras musculares esqueléticas de pacientes DMD que passam por degeneração e necrose, embora com regeneração de algumas fibras, há progressiva substituição das fibras musculares por proliferação de tecido conjuntivo endomisial e perimisial. Nos cães GRMD o aumento do tecido conjuntivo em endomisio e perimísio é uma característica comum em todas as idades, embora nos adultos esteja associado com outras alterações na arquitetura muscular e com o comprometimento clínico severo. Nos cães saudáveis, por sua vez, a proporção de tecido conjuntivo muscular permanece inalterada com o avançar da idade (PASSERINI et al., 2002). Em camundongos *mdx*, a concentração de tecido conjuntivo aumenta com a idade, e o colágeno chega a ser 250-375% superior em endomisio e perimísio quando comparado aos camundongos controle (saudáveis) (MARSHALL; WILLIAMS; GOLDSPIK, 1989).

Gaiad (2006) refere que o colágeno aumenta com a idade dos cães GRMD, sendo cerca de cinco a seis vezes a proporção encontrada nos cães saudáveis. Esses valores foram observados no nosso estudo na primeira biópsia coletada. No tempo final, observamos esse aumento de sete vezes para o grupo tratado e 13 vezes para o grupo controle.

¹ Foidart, M.; Foidart, J.; Engel, W. K. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. Archives of Neurology, v. 38, n. 3, p. 152-157, 1981.

A morfometria do colágeno revelou aumento significativo da fibrose nos animais não tratados, ou seja, houve um aumento de quase três vezes o valor inicialmente encontrado. Nos cães tratados, não houve significância entre o aumento do tecido conjuntivo do T0 para o T1. Esses achados são relevantes, uma vez que o processo de formação de fibrose nestes animais é irreversível e uma característica proeminente em GRMD e DMD, e qualquer tratamento que busque a restauração da função da distrofina em DMD é somente possível com o controle efetivo da fibrose (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987; PASSERINI et al., 2002).

Com relação a melhora do fenótipo histopatológico devido ao tratamento com Bortezomibe, Bonuccelli et al. (2003) relata melhora das alterações miópáticas e menor infiltração de células inflamatórias, resultados também observados neste estudo, no qual observamos melhora histopatológica quanto a disposição de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório nos cães submetidos ao tratamento.

6.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Em estudos de Valentine et al. (1990b), as lesões morfológicas em músculos com deficiência de proteínas sugerem que o evento inicial é a disfunção do sarcolema, com elevação do cálcio intracelular levando a hipercontração e necrose da fibra muscular resultando na dissolução completa do citoplasma. Sendo que, fibras hipercontraídas e/ou necróticas e em regeneração, com células satélites ativadas, foram presentes no músculo de cães distróficos dos 3 meses aos 6 anos de idade, associadas com fibras degeneradas e adjacentes a fibras de aparência normal. Em nossos achados observamos presença de fibras hipercontraídas em músculos distróficos, muitas vezes não acompanhada de desorganização citoplasmática. De acordo com Cozzi et al. (2001) fibras hipercontraídas são mais frequentes em animais mais jovens, sofrendo declínio com a idade, sendo comuns em cães com 15 dias de idade. As células satélites foram observadas em todos os animais, indicando a tentativa de regenerar a função perdida através da síntese de mioblastos, resultados também encontrados por Kornegay et al. (1988).

Tidball (2005) refere perda na habilidade regenerativa muscular devido à exaustão das células satélites durante os ciclos de degeneração e regeneração. Contudo, Watkins e Cullen² (1986, apud VALENTINE et al., 1990b, p.19), cita proliferação das células satélites nos músculos de pacientes DMD, e assim, a aparente falência na regeneração muscular não deve ser atribuída à depleção da população dessas células.

Valentine et al. (1990b) relata que fibras em regeneração são mais frequentes em cães aos três e quatro meses de idade, porém podem ser observadas em todas as idades. Milhorat et al. (1966) estudando músculos de humanos acometidos pela DMD, refere que no estágio precoce da doença, há degeneração focal de miofibrilas com aumento do tecido conjuntivo em endomísio, retículo sarcoplasmático desorganizado com presença de vesículas irregularmente distribuídas e células satélites ativadas próximas a fibras degeneradas.

A perda da organização e delimitação da membrana sarcoplasmática em fibras necróticas e a alteração dos constituintes citoplasmáticos são eventos comuns, particularmente em animais mais velhos, e inclui desorganização sarcomérica, formação de regiões de “núcleos”, material finamente granular dispersos no citoplasma e fibras rachadas (VALENTINE et al., 1990b). Todos os cães do experimento apresentaram presença de infiltrado inflamatório em T0 e T1, e as alterações citoplasmáticas descritas pela autora coincidem com nossos achados. Apenas em um cão não tratado, a degeneração e perda dos limites de membrana foram mais evidentes em T0 indicando maior severidade degenerativa.

Em músculos de cães normais, as mitocôndrias encontraram-se mais evidentes em região subsarcolemal e distribuídas de forma homogênea entre as miofibrilas, apresentaram morfologia preservada sendo possível identificar as cristas mitocondriais. Nos músculo de cães distróficos, Valentine et al. (1990b), cita que há proliferação dessas mitocôndrias, sobretudo em animais mais velhos, indicando um processo adaptativo para sobrevivência das fibras alteradas. Para Braund et al.³ (1978 apud VALENTINE et al., 1990b, p. 18) o músculo canino não contem fibras puramente glicolíticas podendo resultar em proeminente proliferação mitocondrial em GRMD quando comparado aos músculos de pessoas distróficas. Observamos mitocôndrias necróticas e com aumento do padrão eletrodenso, pouco concentradas próximo à membrana sarcoplasmática, sem, contudo, identificar sua proliferação. Essa diferença pode ser em parte explicada, pela utilização de animais entre três e seis meses de idade, nos quais os mecanismos compensatórios de proliferação mitocondrial

² Watkins, S. C.; Cullen, M. J. A quantitative comparison of satellite cell ultrastructure in Duchenne muscular dystrophy, polymyositis, and normal controls. *Muscle Nerve*, v. 9, p. 724-730, 1986.

³ Braund, K. G.; Hoff, E. J.; Richardson, K. E. Y. Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 39, p. 561-565, 1978.

ainda não se tornaram evidentes. Quanto ao aumento da eletrodensidade, Kornegay et al. (1990) refere que a mineralização das miofibrilas na microscopia eletrônica é inicialmente mais pronunciada nas mitocôndrias, indicando mineralização e necrose das mesmas.

Valentine et al. (1986) em análise ultraestrutural de cães GRMD aos oito meses de idade refere proeminente material granular eletrodenso, distribuído abaixo do sarcolema, espaço subsarcolema, núcleo das células satélites e disperso pelo espaço inter-miofibrilar. Esses achados descrevem nossas observações quanto ao aspecto das mitocôndrias nas fibras musculares distróficas, entretanto não constatamos essas alterações em núcleo das células satélites.

Macrófagos endomisiais contendo material degenerado e fibroblastos ativados nos quais o retículo endoplasmático rugoso encontra-se desenvolvido e evidente, estão presentes em músculos distróficos, e a deposição do colágeno endomisial aumenta de forma acentuada com a idade dos cães (VALENTINE et al., 1986, 1990b).

Observamos presença de fibroblastos e grande quantidade de tecido conjuntivo no endomisio das fibras em todos os cães, porém nos cães não tratados essa deposição foi mais significativa, comprovando os resultados obtidos pela histologia e morfometria do colágeno. Para Watkins e Cullen⁴ (1986, apud VALENTINE et al., 1990b, p. 19), o aumento do colágeno pode indicar uma falência do processo regenerativo, e seu aumento no interstício pode interferir com o metabolismo normal e resultar em defeitos regenerativos, pela diminuição da perfusão vascular, impedindo a reinervação ou por compressão mecânica.

A fibrose nos músculos esqueléticos de cães GRMD esta associada com hipertrofia de capilares, diminuição na densidade de microveias e aumento espacial da sua dispersão podendo criar uma barreira entre os capilares e a membrana da miofibrila (VALENTINE et al., 1988; NGUYEN et al., 2005). Nguyen et al., 2005 menciona que em cães GRMD mais velhos, o acúmulo de tecido conjuntivo em endomisio e perimisio pode contribuir para o prejuízo na circulação sanguínea intramuscular e a rarefação dos capilares pode, por sua vez, levar ao aumento da quantidade de tecido conjuntivo, se tornando um ciclo vicioso. Este autor cita ainda, que tratamentos utilizando transferência de genes ou oligonucleotídeos podem ficar comprometidos devido aos defeitos microvasculares no músculo distrófico, e o tratamento anti-fibrótico pode ser um pré-requisito necessário para a instituição dessas terapias.

Em cães GRMD jovens o músculo é submetido a ondas de necrose e regeneração, inicialmente com a regeneração compensando a degeneração das fibras. A fibrose se inicia em

⁴ Watkins, S. C.; Cullen, M. J. A quantitative comparison of satellite cell ultrastructure in Duchenne muscular dystrophy, polymyositis, and normal controls. *Muscle Nerve*, v. 9, p. 724-730, 1986.

torno do foco de regeneração, e, com o tempo, se desenvolve fibrose difusa endomisial e perimisial, podendo-se observar variação no diâmetro das fibras, núcleos centrais, desorganização citoplasmática e regeneração anormal (VALENTINE et al., 1990b).

A lesão ultraestrutural mais precoce parece ser a dilatação do retículo sarcoplasmático, que ocorre em fibras de aparência normal bem como nas hipercontraídas (VALENTINE et al., 1990b). Em nossos achados, muitas fibras apresentaram morfologia semelhante à de cães saudáveis, porém a primeira alteração observada tanto nessas fibras como naquelas em estado de degeneração mais avançado, foi a necrose mitocondrial e aumento de sua eletrodensidade, discordando dessa autora que refere que anormalidades estruturais das mitocôndrias são raras. Kornegay et al. (1988) refere aumento do número de mitocôndrias, sendo estas dilatadas indicando sua degeneração. Não observamos essa dilatação, no entanto áreas com aspectos de gotículas, sem nenhuma estrutura morfológica identificada, parece se referir à necrose de mitocôndrias, essas alterações estiveram presentes próximos as mitocôndrias necrosada e atroficas.

6.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMA

O proteassoma catalisa a degradação de proteínas de meia vida curta e longa (KISSILEV; GOLDBERG, 2001). Estudos usando o modelo de degradação proteassômico indicam aumento de sua atuação em situações de patologias relacionadas à perda muscular como na denervação de fibras musculares, atrofia por desuso ou imobilização e na distrofia muscular (TAWA; ODESSEY; GOLDBERG, 1997; SOLOMON et al., 1998; GALBIATI et al., 2000; KUMAMOTO et al., 2000; BONUCCELLI et al., 2003; LECKER et al., 2004). Segundo Lecker et al. (2004), os níveis de RNA mensageiro para a síntese de subunidades do proteassoma sofrem um aumento de duas a quatro vezes nas condições de atrofia muscular. No músculo distrófico, como cita Kumamoto et al. (2000), há maior expressão da atividade do proteassoma em fibras necróticas, embora esse aumento não seja específico para a distrofia muscular.

Em condições catabólicas como jejum alimentar prolongado, tratamento com dexametasona e câncer, camundongos tiveram um aumento de 30 a 200% na expressão do

gene que codifica ubiquitina, sinalizando uma maior expressão da atividade do proteassoma nessas condições (COMBARET et al., 2005).

O Bortezomibe tem habilidade de atenuar a fraqueza muscular *in vivo* resultante de estado catabólico. Em camundongos nos quais imobilizou-se o músculo gastrocnêmico, a utilização do bortezomibe reduziu em 53% a perda muscular, sugerindo que o sistema ubiquitina-proteassoma é o mecanismo efetor primário da atrofia muscular associada à imobilização (KRAWIEE et al., 2005).

A consequência imediata da inibição do proteassoma é a diminuição da taxa de degradação de diversas proteínas dentro da célula (ADAMS, 2002; VOORHEES et al., 2003). A mensuração da eficácia do inibidor nas células ou em seus extratos pode ser o maior desafio experimental, há modelos usados para mensurar essa eficácia, sendo que os inibidores *in vivo* são os que melhor fornecem guias da potencia qualitativa de inibição. A inibição da atividade “quimiotripsina-símile” não indica a atual degradação de proteínas, especialmente se o inibidor afetar a atividade do proteassoma em outros sítios (KISSELEV; GOLDBERG, 2001).

O Bortezomibe inibe a atividade “quimiotripsina-símile” do proteassoma 26S de forma reversível e dose-dependente (ELLIOTT; ROSS, 2001; SCHWARTZ; DAVIDSON, 2004). Esse bloqueio de uma das três atividades proteolíticas do proteassoma parece ser suficiente para prevenir a degradação de proteínas ubiquitinadas e consequentemente promover a utilidade biológica em múltiplos modelos animais de doenças degenerativas (ELLIOTT; ROSS, 2001).

Em nosso experimento, os cães tratados apresentaram maior inibição do sítio “quimiotripsina-símile” do proteassoma após 1 hora da administração do bortezomibe durante os três ciclos de tratamento, concordando com os estudos de Lightcap et al. (2000), Blaney et al. (2004) e Hamilton et al. (2005), que referem máxima inibição proteassômica em células sanguíneas 1 hora após aplicação do fármaco. Observamos inibição dose-dependente do proteassoma, com aumento progressivo da taxa de inibição de acordo com o aumento da dose no 2º e 3º ciclos, principalmente para o cão B7.

De acordo com Hamilton et al. (2005) doses de 1,2 mg/m², 1,45 mg/m² e 1,75 mg/m² produzem inibição do proteassoma uma hora após a administração do Bortezomibe de 60, 65 e por volta de 65-70% respectivamente, estes resultados são similares ao encontrados por Blaney et al. (2004) na dose de 1,2 e 1,6 mg/m². Nossos resultados revelam inibição de 60-70% na dose de 1,3 mg/m²; 40-80% na dose de 1,45 mg/m² e 90% na dose de 1,6 mg/m² nas amostras de sangue periférico colhidos uma hora após a administração do fármaco.

Os valores mais baixos de porcentagem de inibição do proteossoma encontrados após 24 horas de aplicação do bortezomib também estão de acordo com os achados de Blaney et al. (2004) e Hamilton et al. (2005), que variaram entre 18,1% na dose de 1,2 mg/m² a 35% na dose de 1,75 mg/m².

Segundo Kisselev e Goldberg (2001) a primária e imediata consequência da inibição do proteossoma é a diminuição das taxas de degradação proteica nas células, e a concentração de inibidor requerida para causar esse efeito varia com a linhagem celular. Em nosso experimento iniciamos aplicação com a dose estipulada pelo fabricante para uso em humanos (1,3 mg/m²), e fomos aumentando-a de ciclo para ciclo até chegarmos próximo da dose máxima tolerada em humanos (1,7 mg/m²) (HAMILTON et al., 2005), com o intuito de provermos o máximo de inibição no proteossoma muscular. Para que esse ajuste fosse possível, foi realizada avaliação clínica e laboratorial a fim de detectarmos possíveis alterações adversas condizentes com a dosagem do fármaco comumente relatadas na literatura.

6.6 IMUNOHISTOQUÍMICA E WESTERN BLOT

O complexo distrofina-glicoproteínas (DGC) está localizado no sarcolema do músculo esquelético e realiza a integração do citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular. Esse complexo realiza importante função na manutenção da integridade das fibras musculares durante a contração muscular, funcionando também como uma rede de sinalização de moléculas. Qualquer defeito em qualquer dos componentes do complexo DGC, como distrofina e sarcoglicano, ocasiona a perda da estabilidade do complexo levando a distrofias musculares. A distrofina, por sua vez, provê uma ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular garantindo distribuição uniforme do estresse durante a atividade muscular, evitando a ruptura da membrana (ERVASTI et al., 1990; ERVASTI; CAMPBELL, 1991; MICHELLE; CAMPBELL, 2003).

A distrofina nos indivíduos sadios se localiza na periferia da membrana das miofibrilas e pela imunohistoquímica é visualizada como um anel delgado e contínuo que se cora positivamente na periferia de cada fibra muscular. Anormalidades bioquímicas da distrofina na imunohistoquímica são constatadas por uma marcação desigual e descontínua na

membrana, sugerindo que as proteínas da membrana na ausência da distrofina não são capazes de criar uma sustentação entre o citoesqueleto e a membrana externa (ARAHATA et al., 1989).

De acordo com Arahata et al. (1989), a técnica de Western Blot é mais sensível que a imunofluorescência e ou imunohistoquímica para detecção de quantidades diminuídas entre 5 a 10% de distrofina. No entanto, para diagnóstico da deficiência específica de distrofina no músculo, ambas as técnicas são consideradas efetivas (VAINZOF et al., 1991). A técnica de imunohistoquímica tem se tornado uma poderosa ferramenta na detecção de diferentes distrofias musculares porque é rápido, eficiente e conta com variedade disponível de anticorpos para a distrofina e outras proteínas associadas (SHERIFFS; RAMPLING; SMITH, 2001).

Em nossos estudos utilizamos material fixado incluso em parafina, de acordo com Sheriffs et al. (2001) amostras congeladas ou fixadas são eficientes na detecção da distrofina por imunohistoquímica. Entretanto, os antígenos são melhor reconhecidos em tecidos não fixados, ou seja, congelados (SEWRY et al., 2000; SHERIFFS; RAMPLING; SMITH, 2001).

A distrofia muscular é comumente detectada precocemente em crianças, sendo diagnosticada pela biopsia muscular. O exame histológico de seções congeladas revela aumento pronunciado do tecido conjuntivo nas colorações de hematoxilina e tricromo. O diagnóstico definitivo pode ser feito por imunohistoquímica na detecção da distrofina e proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas (SHERIFFS; RAMPLING; SMITH, 2001).

Em camundongos *mdx* tratados com o inibidor MG-132, houve restauração da expressão da distrofina subcelular e das proteínas associadas à distrofina (β -dystroglicano, α -dystroglicano, α -sarcoglicano), indicando que a inibição do proteossoma esta intimamente relacionada com a patologia distrófica (BONUCELLI et al., 2003).

Nos achados de Bonuccelli et al. (2003), a distrofina migrou como uma banda de aproximadamente 115 kd na técnica de western blot, ao invés dos 426 kd como esperado na molécula completa de distrofina. Como se sabe, o camundongo *mdx* não expressa a distrofina devido a uma prematura parada no códon no gene que a codifica. Como resultado, a distrofina pode ser produzida como uma proteína truncada que, entretanto retém o domínio N-terminal, e é esperado que migre com aproximadamente 120 kd (SICINSKI et al., 1989).

Assereto et al (2006) refere resultados similares com restauração da distrofina subcelular em músculos de humanos afetados pela DMD e BMD, tratados *in vitro* com o inibidor MG-132. Esse mesmo grupo de pesquisa em 2007 (BONUCELLI et al., 2007),

utiliza os inibidores Bortezomibe e MLN273 em tratamento *in vivo* em camundongos *mdx* por meio de injeções intramusculares, e resultados animadores são novamente comprovados. Nesses estudos, foram avaliadas outras proteínas associadas à distrofina, como α e β -dystroglicano e α -sarcoglicano, as quais tiveram sua expressão aumentada nos músculos de *mdx* e humanos DMD. Em nosso estudo, de acordo com a terapia proposta, ou seja, aplicações intra-venosas semanais seguidas de uma semana de descanso, não constatamos presença da distrofina nos cortes histológicos dos animais tratados bem como nos controles. No entanto, os cães tratados apresentaram maior expressão na imunohistoquímica das proteínas α e β -dystroglicano quando comparados ao grupo controle, indicando que o tratamento com o Bortezomibe foi capaz de restaurar proteínas do complexo distrofina-glicoproteína.

A deficiência de α -sarcoglicano representa a forma mais comum de sarcoglicanopatia nas distrofias musculares autossômicas recessivas de cinturas (LGMD- Limb-Girdle Muscular Dystrophy). Gastadello et al. (2008) analisando a atuação dos inibidores de proteassoma Bortezomibe e MG-132 em modelo de cultura celular onde a proteína α -sarcoglicano encontrava expressa sob sua forma mutante, verificou resgate na expressão dessa proteína, prevenindo sua degradação e direcionando a união e localização funcional das outras proteínas do complexo sarcoglicano dentro da membrana sarcoplasmática. Estes resultados se assemelham aos nossos quanto ao resgate e aumento da expressão de outras proteínas do complexo DGC após o tratamento com Bortezomibe, sendo que em nosso caso as proteínas resgatadas pertenciam ao complexo dystroglicano.

Nos estudos de Bonuccelli et al. (2003), Assereto et al. (2006) e Bonuccelli (2007) melhores resultados quanto restauração da distrofina e proteínas associadas nas fibras musculares tratadas com inibidores de proteassoma ocorreu de forma dose-dependente, ou seja, melhores alterações na integridade da fibra muscular quando administradas maiores doses do inibidor. Em nosso estudo, apesar de termos aumentado a dose a cada ciclo de administração, essa comparação não foi possível, uma vez que realizamos duas biópsias musculares, uma antes do tratamento e após o mesmo (T1).

Sabe-se que o fator NF- κ B tem função importante na resposta imune inflamatória pela regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento, indução de enzimas como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintetase (iNOS) (PALOMBELLA et al., 1994; READ et al., 1995; KARIN; BEM-NERIAH, 2000; LAWRENCE et al., 2001; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001; ELLIOT et al., 2003).

Alguns estudos revelam elevada expressão de NF- κ B em condições de atrofia e fraqueza muscular (PAHL, 1999; Cai et al., 2004) e nas distrofias musculares (MONICI et al., 2003; MESSINA et al., 2006). Archaryya et al. (2007) cita que o bloqueio do NF- κ B promove a formação de novas miofibras em resposta à degeneração em camundongos *mdx*, e Bonuccelli et al. (2007) revela diminuição na expressão desse fator em músculos de camundongos *mdx* tratados com bortezomibe.

Intensa reação imunohistoquímica para phospho- NF-K β foi observado em fibras atroficas, necróticas e em regeneração, aparecendo primariamente em áreas de infiltrado inflamatório. Ate mesmo em miopatias inflamatórias, a presença de células inflamatórias induz a ativação da proteólise intracelular através do mecanismo ubiquitina-proteassoma, bem como pela atuação de catepsinas lisossomais e calpaínas resultando na degradação da fibra muscular (KUMAMOTO et al., 1997).

Significante diminuição de fatores pro-inflamatorios pela inibição da atividade do NF-K β foram observados em ratos com artrite reumatoide tratados com Bortezomibe (PALOMBELLA et al., 1998). Acredita-se que os efeitos anti-inflamatórios dos inibidores de proteassoma se devam ao bloqueio da aderência de leucócitos, sua ativação e migração transendotelial (READ et al., 1995). Nossos resultados confirmam esses achados uma vez que observamos menor infiltração de células inflamatórias nos cães tratados bem como menor expressão do NF-K β indicando que a inibição desse fator pode estar associada à diminuição da inflamação.

A inibição do NF-K β em estágios precoces da distrofia muscular podem reduzir a inflamação e diminuir a exaustão inicial da capacidade regenerativa no músculo distrófico e a inibição sustentada do NF-K β pode permitir a recuperação e inicio do reparo muscular em fases tardias da doença (ACHARYYA et al., 2007). De acordo com esse autor, a regulação do NF-K β mantém um delicado balanço entre sobrevivência celular e apoptose, desempenhando importante função na defesa do organismo. Dessa forma, e especificidade e duração da inibição do NF-K β torna-se altamente relevante no desenvolvimento de terapias farmacológicas efetivas contra doenças crônicas.

A degeneração muscular secundaria a ausência da distrofina é seguida por necrose de miofibras e inflamação, com liberação de TGF- β 1 e outras citocinas fibrogênicas. O TGF- β 1 liberado pode desencadear a ativação da matriz extracelular levando a proliferação do tecido conjuntivo comprometendo a regeneração muscular devido ao processo fibrótico instalado (BERNASCONI et al., 1995).

A imunohistoquímica positiva para TGF- β 1 em pacientes DMD há marcação delgada em ramos de tecido conjuntivo fibroso em perímio e endomíio, enquanto nos músculos normais não foi observado marcação positiva (BERNASCONI et al., 1995). Em nossos resultados observamos resultados semelhantes nos cães saudáveis, com maior expressão de TGF- β 1 em região de vasos sanguíneos, marcando o endotélio vascular.

Tratamentos com anticorpo neutralizante de TGF- β 1 ou losartan melhoram a regeneração muscular e diminuem a fibrose em camundongos *mdx* quando comparados ao grupo controle. O tratamento com losartan não diminuiu a atividade enzimática da CK em camundongos *mdx*, nem tampouco restaurou a expressão de distrofina, no entanto, houve um aumento na habilidade regenerativa muscular e aumentou a força muscular em membros pélvicos e torácicos após 6 meses de tratamento (COHN et al., 2007). Resultados similares foram observados por Silva (2009), em cães GRMD tratados com losartan. Nestes, houve menor expressão de TGF- β 1 nos músculos ao final do tratamento quando comparadas com a biópsia muscular coletada antes do tratamento, sem, contudo, haver diminuição dos valores de CK sérico. Esses achados terapêuticos coincidem com os nossos, uma vez que os cães GRMD tratados com Bortezomibe também não apresentam diminuição da CK e restauração da distrofina, indicando a progressão degenerativa muscular.

Quanto aos resultados de Western Blot, obtivemos apenas resultados quanto à expressão da distrofina e da beta-actina nos músculos de cães saudáveis e GRMDs em T1. Verificamos fraca banda expressa para o cão tratado K1. Contudo, torna-se relevante mencionar que este mesmo animal após o término do tratamento, apresentou progressão das manifestações clínicas com contraturas severas e deformações músculo-esqueléticas importantes. Dessa forma, a avaliação da eficácia do tratamento deve abranger a análise dos resultados em fibra muscular (histologia, morfometria, imunohistoquímica), bem como a condição clínica apresentada pelos animais tratados.

Qualquer tratamento de sucesso para as distrofias musculares requer continuidade ou repetidos ciclos de tratamento. Entretanto, nenhum tratamento sozinho será suficiente para interromper ou reverter a progressão da doença e a combinação de terapias poderá prover algumas respostas ainda não entendidas para a doença (WELLS, 2008).

O tratamento das distrofias musculares com inibidores de proteassoma tem se mostrado efetivos na melhora do fenótipo histopatológico e no resgate da expressão de proteínas que se encontravam ausentes ou severamente diminuídas no complexo DGC, demonstrando que a utilização desses fármacos deve ser considerada na terapia da DMD

(BONUCCELLI et al., 2003; ASSERETO et al., 2006; BONUCCELLI et al., 2007; GASTADELLO et al., 2008). Observamos resultados importantes na terapia proposta, contudo, o tempo de tratamento foi curto para que alterações mais consistentes fossem observadas quanto à preservação das proteínas estruturais da membrana sarcoplasmática. A terapêutica de aplicação do bortezomibe instituída em nossa pesquisa também foi adaptada, porem seguindo o esquema de aplicação estipulado para o tratamento de tumores em humanos. Ao final dessa pesquisa restam-nos perguntas, como por exemplo: o tratamento contínuo por períodos prolongados e aplicações menos espaçadas com inibidores de proteassoma poderia ser efetivo no controle da distrofia muscular?

Resposta para essa questão seria a utilização de inibidores de proteassoma de uso oral e diário, que permitissem um uso prolongado e de fácil administração. Uma boa notícia é que essa proposição pode estar bem próxima de acontecer, uma vez que a companhia farmacêutica Proteolix vem desenvolvendo inibidores de proteassoma menos tóxicos, com maior seletividade sobre o sítio quimiotripsina símile do proteasoma, apresentando menos reações cruzadas com outros sítios catalíticos. O Carfilzomib (PR-171) representa esta nova classe de inibidores de proteassoma, de uso oral, podendo ser administrado diariamente (KUHN et al., 2007). Essa comodidade de uso, abre caminhos para que novas pesquisas sejam realizadas, adaptando o protocolo estipulado pelo fabricante para uso em doenças degenerativas crônicas, como as distrofias musculares.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

1. Em todos os animais distróficos estudados houve progressão da distrofia muscular com necrose e inflamação muscular, constatadas pelo aumento das enzimas séricas ALT, AST e CK.
2. A trombocitopenia e hiperfosfatemia séricas estão associadas e condizentes com a doença crônica representada pela distrofia muscular.
3. Todos os cães distróficos apresentaram proteinúria e hemoglobinúria renal que precisam ser melhor investigadas a fim de serem constatadas alterações iniciadoras de uma insuficiência renal não detectada pelas análises tradicionais da ureia e creatinina séricas.
4. Os cães tratados apresentaram uma melhora quanto à preservação da arquitetura das fibras musculares e menor infiltração de células inflamatórias, indicando menor necrose e degeneração das fibras.
5. A degeneração e necrose mitocondrial parece constituir um dos fatores primários para a necrose das miofibras.
6. A deposição de tecido colágeno e expressão do TGF- β 1 foram menores nos cães tratados, indicando menor fibrose e substituição de tecido funcional.
7. O fármaco foi capaz de inibir acima de 50% da atividade do proteassoma nos animais tratados, com maior taxa de inibição uma hora após a administração do bortezomibe, constatou-se também, que a inibição se comportou de forma dose-dependente. A inibição do proteassoma pelo Bortezomibe diminuiu a expressão de phospho- NF κ B e consequentemente os estímulos pró-inflamatórios presentes na condição de distrofia muscular.
1. Pela imunohistoquímica apesar de não haver restauração da distrofina como no *mdx*, o tratamento com Bortezomibe aumentou a expressão de outras proteínas da membrana sarcoplasmática dos cães tratados, indicando que a utilização de inibidores de proteassoma poderá constituir em um tratamento futuro para pacientes com distrofias musculares.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. Development of the proteasome Inhibitor PS-341. **The Oncologist**, v. 7, p. 9-16, 2002.

ADAMS, J.; PALOMBELLA, V. J.; SAUSVILLE, E. A.; JOHNSON, J.; DESTREE, A.; LAZARUS, D. D.; MAAS, J.; PIEN, C. S.; PRAKASH, S.; ELLIOTT, P. J. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. **Cancer Research**, v. 59, p. 2615-2622, 1999.

AKTAS, M.; AUGUSTE, D.; LEFEBVRE, H. P.; TOUTAIN, P. L.; BRAUN, J. P. Creatine kinase in the dog. Review. **Veterinary Research Communication**, v. 17, p. 353-360, 1993.

ALMAN, B. A. Duchenne Muscular Dystrophy and steroids: pharmacologic treatment in the absence of effective gene therapy. **Journal of Pediatric Orthopedics**, v. 25, n. 4, p. 554-556, 2005.

ALTER, J.; LOU, F.; RABINOWITZ, A.; YIN, H.; ROSENFELD, J.; WILTON, S. D.; PARTRIDGE, T. A.; LU, Q. L. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression body wide and improves dystrophic pathology. **Nature Medicine**, v. 12, p. 175-177, 2006.

AMBRÓSIO, C. E.; VALADARES, M. C.; ZUCCONI, E.; CABRAL, R.; PEARSON, P. L.; GAIAD, T. P.; CANOVAS, M.; VAINZOF, M.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. (Clinical Casebook). **Neuromuscular Disorders**, v.18, p. 892-893, 2008.

ANGELINI, C.; BONIFATI, D. M. New therapies in muscular dystrophy. **Neurological Science**, v. 21, p. 919-924, 2000. Supplement.

ANDERSON, L. V. B.; DAVISON, K. Multiplex Western Blotting System for the Analysis of Muscular Dystrophy Proteins. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 4, p. 1017-1022, 1999.

ARAHATA, K.; BEGGS, A. H.; HONDA, H.; ITO, S.; ISHIURA, S.; TSUKAHARA, T.; ISHIGURO, T.; EGUCHI, C.; ORIMO, S.; ARIKAWA, E. Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule. **Journal Neurology Science**, v. 101, p. 148-156, 1991.

ARCHARYYA, S.; VILLALTA, A.; BAKKAR, N.; BUPHA-INTR, T.; JANSSEN, P. M. L.; CARATHERS, M.; LI, Z.; BEG, A. A.; GHOSH, S.; SAHENK, Z.; WEINSTEIN, M.; GARDNER, K. L.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; KARIN, M.; TIDBALL, J. G.; BALDWIN, A. S.; GUTTRIDGE, D. C. Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 889-901, 2007.

ASSERETO, S.; STRINGARA, S.; STOGIA, F.; BONUCCELLI, G.; BROCCOLINI, A.; PEDEMONTE, M.; TRAVERSO, M.; BIANCHERI, R.; ZARA, F.; BRUNO, C.; LISANTI, M. P.; MINETTI, C. Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 290, p. 577-582, 2006.

BÄCKMAN, E.; NYLANDER, E.; JOHANSSON, I.; HENRIKSSON, K. G.; TAGESSON, C. Selenium and vitamin E treatment of Duchenne muscular dystrophy: no effect on muscle function. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 78, n. 5, p. 429-35, 1988.

BALABAN, B.; MATTHEWS, D. J.; CLAYTON, G. H.; CARRY, T. Corticosteroid treatment and Functional Improvement in Duchenne muscular Dystrophy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 84, n. 11, p. 843-850, 2005.

BALDWIN, JR. A. S. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 107, p. 3-6, 2001.

BALOH, R.; CANCELLA, P. A.; KALYANARAMAN, K.; MUNSAT, T.; PEARSON, C. M.; RICH, R. Regeneration of human muscle: a morphologic and histochemical study of normal and dystrophic muscle after injury. **Laboratory Investigation**, v. 26, p. 319-328, 1972.

BALTZERS, W. I.; CALISE, D. V.; LEVINE, J. M.; SHELTON, G. D.; EDWARDS, J. F.; STEINER, J. M. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in Weimaraner. **Journal of the American Hospital Association**, v. 43, p. 227-232, 2007

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 87-218.

BARTON-DAVIS, E. R.; CORDIER, L.; SHOTURMA, D. I.; LELAND, S. E.; SWEENEY, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. **Journal for Clinical Investigation**, v. 104, n. 4, p. 375-381, 1999.

BARTON, E. R.; MORRIS, M.; MUSARO, A.; ROSENTHAL, N.; SWEENEY, H. L. Muscle-specific expression of insulin-simile growth factor I counters muscle decline in mdx mice. **The journal of Cell Biology**, v. 157, n. 1, p. 137-147, 2002.

BEENAKKER, E. A. C.; FOCK, J. M.; VAN TOL, M. J.; MAURITS, N. M.; KOOPMAN, H. M.; BROUWER, O. F.; VAN DER HOEVEN, J. H. Intermittent Prednisone Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. **Archivies Neuronal**, v. 62, p. 128-132, 2005.

BENDER, H. S. Muscle. In: LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. **Veterinary laboratory medicine-clinical pathology**. 4. ed. Iowa: Blackwell, 2003. p. 260-269.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in Labrador retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 255-261, 2002.

BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERE, P.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MORANDI, L.; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor beta 1 in dystrophic patient muscle correlates with fibrosis, pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. **Journal Clinical Investigation**, v. 96, p. 1137-1144, 1995.

BERTORINI, T. E.; CORNELIO, F.; BHATTACHARYA, S. K.; PALMIERI, G. M. A.; DONES, I.; DWORZAK, F.; BRAMBATI, B. Calcium and magnesium content in fetuses at risk and pre necrotic Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 34, p. 1436-1440, 1984.

BIGGAR, W. D.; KLAMUT, H. J.; DEMACIO, P. C.; STEVENS, D. J.; RAY, P. N. Duchenne Muscular Dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 401, p. 88-106, 2002.

BLANEY, S. M.; BERNSTEIN, M.; NEVILLE, K.; GINSBERG, J.; KITCHEN, B.; HORTON, T.; BERG, S. L.; KRAILO, M.; ADAMSON, P. C. Phase I study of the proteasome inhibitor bortezomib in pediatric with refractory solid tumors: a children's oncology group study (ADVL0015). **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 23, p. 4804-4809, 2004.

BOGDONOVICHI, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics of Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, p. 102-115, 2004.

- 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**, v. 54, p. 447-452, 1988.
- BONUCCELLI, G.; SOTGIA, F.; CAPOZZA, F.; GAZERRO, E.; MINETTI, C.; LISANTI, M. P. Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks He degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. **Cell Cycle**, v. 6, n. 10, p. 1242-1248, 2007.
- BONUCCELLI, G.; SOTGIA, F.; SCHUBERT, W.; PARK, D. S.; FRANK, P. G.; WOODMAN, S. E.; INSABATO, L.; CAMMER, M.; MINETTI, C.; LISANTI, M. P. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of *mdx* mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1663-1675, 2003.
- BOYD, J. W. Serum enzymes changes in lambs with experimentally-induced acute muscular dystrophy. **Research Veterinary Science**, v. 5, p. 419-433, 1964.
- BOYD, J. W. Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. **Journal Comparative Pathology**, v. 98, p. 381-404, 1988.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, W. G.; HUDGSON, P.; LARSON, P. F.; PAPAPETROPOULOS, T. A.; JENKISON, M. Structural changes in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 35, p. 451-455, 1972.
- BRAUND, K. G.; MCGUIRE, J. A.; LINCOLN, C. E. Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: a cytochemical, histochemical, and morphometric study. **Veterinary Pathology**, v. 19, p. 577-595, 1982.
- BROLIO, M. P. **Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD)**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BROWN, K.; PARK, S.; KANNO, T.; FRANZOSO, G.; SIEBENLIST, U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 2532-2536, 1993.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1. ed., São Paulo: Roca. 2004, 376 p.

BUSSAB, W.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2002. 526p.

CAI, D.; FRANTZ, J. D.; TAWA, N. E.; MELENDEZ, P. A.; OH, B.; LIDOV, H. G. W.; HASSELGREN, P.; FRONTERA, W. R.; LEE, J.; GLASS, D. J.; SCHOELSON, S. E. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, v. 119, p. 285-298, 2004.

CAMPBELL, K. P. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton – extracellular matrix linkage. **Cell**, v. 80, p. 675-679, 1995.

CAMPOS, H. **Testes não paramétricos**. Piracicaba: S.N., 1974

CARLSON, G. P. Fluid, electrolyte, and acid-base balance. In KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 1. ed. London: Academic Press, 1997. p. 485-516.

CHEN, Y. M.; NAGARAJU, K.; BAKAY, M.; MCINTYRE, O.; RAWAT, R.; SHI, R.; HOFFMAN, E. P. Early onset of inflammation and later involvement of TGF β in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, p. 826–834, 2005.

CHEN, P.; HOCHSTRASSER, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20 S proteasome to completion of assembly. **Cell**, v. 86, p. 961-972, 1996.

CHETBOULA, V.; ESCRIOUB, C.; TESSIERA, D.; RICHARD, V.; POUCHELONA, J. L.; THIBAUT, H.; LALLEMAND, F.; THUILLEZ, C.; BLOT, S.; DERUMEAU, G. Tissue Doppler imaging detects early asymptomatic myocardial abnormalities in a dog model of Duchenne's cardiomyopathy. **European Heart Journal**, v. 25, p. 1934–1939, 2004.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contraction injury in dystrophic canine muscle. **Archives Physical Medicine Rehabilitation**, v. 83, p. 1572-1578, 2002.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY, J. N. Myofiber injury and regeneration in a Canine Homologue of Duchenne Muscular Dystrophy **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 80, n. 3, p. 175-181, 2001.

- CIECHANOVER, A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 474-481, 2003.
- CLEMENS, P. R.; EGHTEHAD, S.; REAY, D. P. Gene therapy for muscular dystrophy reaches human clinical trial. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 3, p. 267-70, 2009.
- COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 23, p. 1456-1471, 2000.
- COHN, R. D.; VAN ERP, C.; HABASHI, J. P.; SOLEIMANI, A. A.; KLEIN, E. C.; LISI, M. T.; GAMRADT, M.; RHYS, C. M.; HOLM, T. M.; LOEYS, B. L.; RAMIREZ, F.; JUDGE, D. P.; WARD, C. W.; DIETZ, H. C. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. **Nature Medicine**, v. 13, p. 1-7, 2007.
- COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165-172, 2003.
- COMBARET, L.; ADEGOKE, O. A. J.; BEDARD, N.; BARACOS, V.; ATTAIX, D.; WING, S. S. USP19 is an ubiquitin-specific protease in rat skeletal muscle during catabolic states. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. E693-E700, 2005.
- CONNOLLY, A. M.; SCHIERBECKER, J.; RENNA, R.; FLORENCE, J. High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchene muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 917-925, 2002.
- COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKELL, L. M.; SCOTT, M.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AVERY, R. J.; WILLIAMS, J. R.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 154-156, 1988.
- RFOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R**: A language and environment for statistical computing. The R development core team. Vienna, Austria: R Foundation for statistical computing, 2008. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 20/02/2009.

COSFORD, K. L.; TAYLOR, S. M.; THOMPSON, L.; SHELTON, G. D. A possible new inherited myopathy in young Labrador retriever. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, p. 393-397, 2008.

COZZI, F.; CERLETTI, M.; LUVONI, G. C.; LOMBARDO, R.; BRAMBILLA, P. G.; FAVERZANI, S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M. Development of muscle pathology in canine x-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathology**, v. 101, p. 469-478, 2001.

CULLEN, M. J.; MASTAGLIA, F. L. Pathological reactions of skeletal muscle. In: MASTAGLIA F. L., WALTON J. (eds) **Skeletal muscle pathology**. New York: Churchill Livingstone, 1982, p. 88-139.

DAVIES, K. E.; GROUNDS, M. D. Treating Muscular Dystrophy with stem cells? **Cell**, v. 127, n. 7, p. 1304-1306, 2006.

DECONINCK, A. E.; RAFAEL, J. A.; SKINNER, J. A.; BROWN, S. C.; POTTER, A. C.; METZINGER, L.; WATT, D. J.; DICKSON, J. G.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E. Urotrofin-dystrophin deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 90, p. 717-727, 1997.

DEGEN, M. A. Correlation of spurious elevation and platelet count in dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 15, n. 3, p. 20-22, 1986.

DEITZ, K.; MORRISON, J. A.; KLINE, K.; GUO, L. T.; SHELTON, D. D. Sarcoglycan-deficient muscular dystrophy in Boston Terrier. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 476-480, 2008.

DELL'AGNOLA, C.; WANG, Z.; STORB, R.; TAPSCOTT, S. J.; KUHR, C. S.; HAUSCHKA, S. D.; LEE, R. S.; SALE, G. E.; ZELLMER, E.; GISBURNE, S.; BOGAN, J.; KORNEGAY, J. N.; COOPER, B. J.; GOOLEY, T. A.; LITTLE, M. T. Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. **Blood**, v. 104, p. 4311-4318, 2004.

DEMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22123-22126, 1999.

DUBOWITZ, V.; KINALI, M.; MAIN, M.; MERCURI, M.; MUNTONI, F. Remission of clinical signs in early Duchenne muscular dystrophy on intermittent low-dosage prednisolone therapy. **European Journal Pediatrics Neurology**, v. 6, p. 153-159, 2002.

DUBOWITZ, V. Prednisone for Duchenne muscular dystrophy. **The Lancet – Neurology**, v. 4, p. 264. 2005

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

ELLIOTT, P. J.; ROSS, J. F. The proteasome. **American Journal Clinical Pathology**, v. 116, p. 637-646, 2001.

ELLIOT, P. J.; ZOLLNER, T. M.; BOEHNCKE, V. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, p. 235-245, 2003.

ERAZO –TORRICELLI, R. Actualization em distrofias musculares. **Revista de Neurologia**, v. 39, n. 9, p. 860-871, 2004.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. Membrane organization of the dystrophin glycoprotein complex. **Cell**, v. 66, p. 1121-1131, 1991.

ERVASTI, J. M.; OHLENDIECK, K.; KAHL, S. D.; GAVER, M. G.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**, v. 345, p. 315-319, 1990.

FOSTER, K.; FOSTER, H.; DICKSON, J. G. Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. **Gene Therapy**, v.13, p. 1677–1685, 2006

GAIAD, T. P. **Influências da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GALBIATI, F.; VOLONTE, D.; MINETTI, C.; BREGMAN, D. B.; LISANTI, M. P. Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37702-37711, 2000.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de urinálise veterinária**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996.

GARROOD, P.; EAGLE, M.; JARDINE, P. E.; BUSHBY, K.; STRAUB, V. Myoglobinuria in boys with Duchenne muscular dystrophy on corticosteroid therapy. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, p. 71-73, 2007.

GASTADELLO, S.; D'ANGELO, S.; FRANZOSO, S.; FANIN, M.; ANGELINI, C.; BETTO, R.; SANDONA, D. Inhibition of proteasome activity promotes the correct localization of disease-causing α -sarcoglycan mutants in HEK-293 cells constitutively expressing β , γ , and δ -sarcoglycan. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 1, p. 170-181, 2008.

GILBERT, R.; NALBANTOGLU, J.; PETROF, B. J.; EBIHARA, S.; GUIBINGA, G.; TINSLEY, J. M.; KAMEN, A.; MASSIE, B.; DAVIES, K. E.; KARPATI, G. **Human Gene Therapy**, v. 10, n. 8, p. 1299-1310, 1999.

GOSSELIN, L. E.; WILLIAMS, J. E.; DEERING, M.; BRAZEAU, D.; KOURY, S.; MARTINEZ, D. A. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve**, v. 30, p. 645-653, 2004.

GREGOREVIC, P.; BLANKINSHIP, M. J.; ALLEN, J. M.; CHAMBERLAIN, J. S. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic *mdx* mice. **Molecular Therapy**, v. 16, p. 657-664, 2008.

GRIGGS, R. C.; MENDELL, J. R.; FENICHEL, G. M.; BROOKE, M. H.; PESTRONK, A.; MILLER, J. P.; CWIK, V. A.; PANDYA, S.; ROBISON, J. Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). **Neurology**, v. 43, p. 520-527, 1993.

GOROSPE, J. R.; THARP, M. D.; HINCKLEY, J.; KORNEGAY, J. N.; HOFFMAN, E. P. A role of mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlation in dystrophin-deficient humans, dogs and mice. **Journal of Neurology Science**, v. 122, n. 1, p. 44-56, 1994.

HAMILTON, A. L.; EDER, J. P.; PAVLICK, A. C.; CLARK, J. W.; LIEBES, L.; GARCIA-CARBONERO, R.; CHACHOUA, A.; RYAN, D. P.; SOMA, V.; FARREL, K.; KINCHLA, N.; BOYDEN, J.; YEE, H.; ZELENIUUCH-JACQUOTTE, A.; WRIGHT, J.; ELLIOT, P.; ADAMS, J.; MUGGIA, F. M. Proteasome inhibition with Bortezomib (PS-341): a phase I study pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 25, p. 6107-6116, 2005.

HARPER, E. J.; HACKETT, R. M.; WILKINSON, J.; HEATON, P. R. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 10, p. 1436-1442, 2003.

HASSELGREN, P.; WRAY, C.; MAMMEN, J. Molecular Regulation Of Muscle Cachexia: It May Be More Than The Proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 1-10, 2002.

HERRMANN, J.; SAGUNER, A. M.; VERSARI, D.; PETERSON, T. E.; CHADE, A.; OLSON, M.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Chronic Proteasome Inhibition Contributes to Coronary Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 101, p. 865-874, 2007.

HERSHKO, A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 788-799, 1997.

HIDESHIMA, T.; RICHARDSON, P.; CHAUHAN, D.; PALOMBELLA, V. J.; ELLIOT, P. J. ADAMS, J.; ANDERSON, K. C. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 3071-3076, 2001.

HOFFMAN, E. P. Muscular dystrophy. Identification and use of genes for diagnostics and therapeutics. **Archives of Pathology & laboratory Medicine**, v. 123, p. 1050-1052, 1999.

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

HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: Windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. **Current Topical Membrane**, v. 38, p. 113-154, 1991.

HOWELL, O. M.; FLETCHER, S.; KAKULOS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARIPATI, G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorder**, v. 7, p. 325-328, 1997.

HYSER, C. L.; PRIVINCE, M.; GRIGGS, R. C.; MENDELL, J. R.; FENICHEL, G. M.; BROOKE, M. H.; MILLER, J. P. Genetic heterogeneity in Duchenne dystrophy. **Annals of Neurology**, v. 22, p. 553-555, 1987.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O.; ERVASTI, J. M.; LEVEILLE, C. J.; SLAUGHTER, C. A.; SERNETT, S. W.; CAMPBELL, K. P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**, v. 355, p. 696-702, 1992.

IHN, H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-[beta] and CTGF. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 14, p. 681-685, 2002.

JESENBERGER, V.; JENTSCH, S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. **Nature Reviews**, v. 3, p. 112-121, 2002

JOHNSON, P. L.; BHATTACHARYA, S. K. Regulation of membrane-mediated chronic muscle degeneration in dystrophic hamsters by calcium-channel blockers: diltiazem, nifedipine and verapamil. **Journal Neurology Science**, v. 115, p. 76-90, 1993.

JONES, B. R.; BRENNAN, S.; MOONEY, C. T.; CALLANAN, J. J.; MCALLISTER, H.; GUO, L. T.; MARTIN, P. T.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese spitz dogs. **Journal of Neurological Science**, v. 217, p. 143-149, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004, 540 p.

KAMPER, A.; RODEMAN, H. P. Alterations of protein degradation and 2-D-protein pattern in muscle cells of mdx and DMD origin. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 189, p. 1484-1490, 1992.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 1. ed., London: Academic Press, 1997. 930 p.

KARIN, M.; BEM-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 621-663, 2000.

KHURANA, T. S.; DAVIES, K. E. Pharmacological Strategies for Muscular Dystrophy. **Nature Reviews**, v. 2, p. 379-390, 2003.

KISSELEV, A. F.; GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. Review. **Chemistry & Biology**, v. 8, p. 739-758, 2001.

- KLARENBEEK, S.; GERRITZEN-BRUNING, M. J.; ROZEMULLER, A. J. M.; VAN DER LUGT, J. J. Canine X-linked muscular dystrophy in a family of Grand Basset Griffon Vendéen dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 249-252, 2007.
- KORNEGAY, J. N.; CUNDIFF, D. D.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; OKAMURA, C. S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 493-500, 2003.
- KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MILLER, D. M.; LEVESAUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle nerve**, v. 11, p. 1056-1064, 1988.
- KRAWIEC, B. J.; FROST, R. A.; VARY, T. C.; JEFFERSON, L. S.; LANG, C. H. Hind limb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. E969-E980, 2005.
- KUHN, D. J.; CHEN, Q.; VOORHEES, P. M.; STRADER, J. S.; SHENK, K. D.; SUN, C. M.; DEMO, S. D.; BENNETT, M. K.; VAN LEEUWEN, F. W. B.; CHANAN-KHAN, A. A.; ORLOWSKI, R. Z. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. **Blood**, v. 110, p. 3281-3290, 2007.
- KUMAMOTO, T.; FUJIMOTO, S.; ITO, T.; HORINOUCI, H.; UEYAMA, H.; TSUDA, T. Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. **Acta Neuropathologica**, v. 100, p. 595-602, 2000.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLOUGHBY, D. A. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. **Nature Medicine**, v. 7, p. 1291 – 1297, 2001.
- LEASK, A.; ABRAHAM, D. J. TGF- β signaling and the fibrotic response. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 816-827, 2004.
- LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal American Society of Nephrology**, v. 17, p. 1807-1819, 2006.
- LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S. R.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 39-51, 2004.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 164, p. 1007–1019, 2004.

LIGHTCAP, E. S.; MCCORMACK, T. A.; PIEN, C. S.; CHAU, V.; ADAMS, J.; ELLIOTT, P. Proteasome inhibition measurements: clinical application. **Drug Monitoring and Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 673-683, 2000.

LLOVERA, M.; CARBO, N.; LOPEZ-SORIANO, J.; GARCIA-MARTINEZ, C.; BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; AGELL, N.; COSTELLI, P.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; CELADA, A.; ARGILES, J. M. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. **Cancer Letters**, v. 133, p. 83–87, 1998a.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; ANGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; AUTHIER, F. J.; GHERARDI, R. K.; ARGILES, J. M. Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 69-73, 1988 b.

LOPES, V. G.; ERHARDT, P.; YAO, R.; COOPER, G. M. P53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 12893-12896, 1992.

LUTOMSKI, D. M.; BOWER, R. H. The effect of trombocytosis on serum potassium and phosphorus concentration. **American Journal Medicine Science**, v. 307, p. 255-258, 1994.

LY, I.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Transforming growth factor-beta 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 164, p. 1007-1019, 2004.

LYNCH, G. S. Novel therapies for muscular dystrophy and other muscle wasting conditions. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 11, p. 587-601, 2001.

MANUVAKHOVA, M.; KEELING, K.; BEDWELL, D. M. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codon in mammalian translation system. **RNA**, v. 6, n. 7, p. 1044-1055, 2000.

- MARSHALL, P. A.; WILLIAMS, P. E.; GOLDSPIK, G. Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. **Muscle & Nerve**, v. 12, p. 528-537, 1989.
- MATSUMURA, K.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of dystrophin-associated proteins: a common mechanism leading to muscle cell necrosis in severe childhood muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorders**, v. 3, p. 109-118, 1993.
- MATTHEWS, M.; DRISCOLL, J.; TANAKA, K.; ICHIHARA, A.; GOLDBERG, A. L. Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 2597-2601, 1989.
- MEDINA, R.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. **Biochemical Journal**, v. 307, p. 631-637, 1995.
- MEYER, D. J.; HARVEY, D. J. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. 373 p.
- MICHELLE, D. E.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 15457-15460, 2003.
- MILLER, R. G.; SHARMA, K. R.; PAVLATH, G. K.; GUSSONI, E.; MYNHIER, M.; YU, P.; LANCTOT, A. M.; GRECO, C. M.; STEINMAN, L.; BLAU, H. M. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco Study. **Muscle & Nerve**, v. 20, 469-478, 1997.
- MILHORAT, A. T.; SHAFIQ, S. A.; GOLDSTONE, L. Changes in muscle structure in dystrophic patients, carriers, and normal siblings seen by electron microscopy: correlation with levels of serum creatinephosphokinase (CPK). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 138, p. 246-292, 1966.
- MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Mechanisms of muscle wasting — The Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1897-1905, 1996.
- MOISE, N. S.; VALENTINE, B. A.; BROWN, C. A.; ERB, H. N.; BECK, K. A.; COOPER, B. J.; GILMOUR, R. F. Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic

and echocardiographic studies. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 17, p. 812-820, 1991.

MOLENAAR, P.; CHEN, L.; PARSONAGE, W. A. Cardiac implications for the use of β 2-adrenoceptor agonists for the management of muscle wasting. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 583-586, 2006.

MONICI, M. C.; AGUENNOUZ, M.; MAZZEO, A.; MESSINA, C.; VITA, G. Activation of nuclear factor Kappa β in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 60, p. 993-97, 2003.

MORGAN, J. E.; HOFFMAN, E. P.; PATRIDGE, T. A. Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles in mdx mouse. **Journal Cell Biology**, v. 111, p. 2437-2449, 1990.

MOXLEY, R. T.; ASHWAL, S.; PANDYA, S.; CONNOLLY, A.; FLORENCE, J.; MATHEWS, K.; BAUMBACH, L.; MCDONALD, C.; SUSSMAN, M.; WADE, C. Practice Parameter: Corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy. **Neurology**, v. 64, p. 13-20, 2005.

MUNTONI, F.; FISHER, I.; MORGAN, J. E.; ABRAHAM, D. Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 162-165, 2002. Supplement.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal of Compendium Pathology**, v. 126, p. 100-108, 2002.

NGUYEN, F.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M.; CHEREL, Y. Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 154-163, 2005.

ORLOWSKY, R. Z.; STINCHCOMBE, T. E.; MITCHELL, B. S.; SHEA, T. C.; BALDWIN, A. S.; STAHL, S.; ADAMS, J.; ESSELTINE, D.; ELLIOTT, P. J.; PIEN, C. S.; GUERCIOLINI, R.; ANDERSON, J. K.; DEPCIK-SMITH, N. D.; BHAGAT, R.; LEHMAN, M. J.; NOVICK, S. C.; O'CONNOR, O. A.; SOIGNET, S. L. Phase I Trial of the Proteasome Inhibitor PS-341 in Patients With Refractory Hematologic Malignancies. **Journal Clinical Oncology**, v. 20, p. 4420-4427, 2002.

ORR, R.; FIATARONE SINGH, M. The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders: review of efficacy and safety. **Drugs**, v. 64, p. 725–750, 2005.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, p. 6853–6866, 1999.

PALOMBELLA, V. J.; RANDO, O. J.; GOLDBERG, A. L.; MANIATIS, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. **Cell**, v. 78, p. 773-785, 1994.

PALOMBELLA, V. J.; CONNER, E. M.; FUSELER, J. W.; DESTREE, A.; DAVIS, J. M.; LAROUX, F. S.; WOLF, R. E.; HUANG, J.; BRAND, S.; ELLIOTT, P. J.; LAZARUS, D.; MCCORMACK, T.; PARENT, L.; STEIN, R.; ADAMS, J.; GRISHAM, M. B. Role of the proteasome and NF-kB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v 95, p. 15671-15676, 1998.

PAOLA, J. P.; PODELL, M.; SHELTON, G. D. Muscular dystrophy in a miniature Schnauzer. **Progress in Veterinary Neurology**, v. 4, p. 14-18, 1993

PARTRIDGE, T. A.; MORGAN, J. E.; COULTON, G. R.; HOFFMAN, E. P.; KUNKE, L. M. Conversion of mdx myofibers from dystrophin negative to positive by injection of normal myoblasts. **Nature**, v. 337, p. 176–179, 1989.

PASSERINI, L.; BERNASCONI, P.; BAGGI, F.; CONFALONIERI P.; COZZI, F.; CORNELIO, F.; MANTEGAZZA, R. Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 828-835, 2002.

PEKOL, T.; DANIELS, J. S.; LABUTTI, J.; PARSONS, I.; NIX, D.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; GAN, L.; MIWA, G. Human metabolism of the proteasome inhibitor bortezomibe: identification of circulating metabolites. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 33, n. 6, p. 771-777, 2005.

PETROF, B. J. Molecular Pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, p. 162-174, 2002. Supplement.

PHILLIPS, J. B.; WILLIAMS, A. J.; ADAMS, J.; ELLIOTT, P. J.; TORTELLA, F. C. Proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia editorial comment. **Stroke**, v. 31, p. 1686-1693, 2000.

POLITANO, L.; NIGRO, G.; NIGRO, V.; PILUSO, G.; PAPPARELLA, S.; PACIELLO, O.; COMI, L. I. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop códon. Preliminary results. **Acta Myologica**, v. 22, n. 1, p. 15-21, 2003.

PRESTHUS, J.; NORDSTOGA, K. Congenital myopathy in a litter of Samoyed dogs. **Progress in Veterinary Neurology**, v. 4, p. 37-40, 1993.

RAGOT, T.; VINCENT, N.; CHAFEY, F.; VIGNE, E.; GILGENKRANTZ, H.; COUTONT, D.; CARTAUD, J.; BRIAND, P.; KAPLANT, J.; PERRICAUDE, M.; KAHN, K. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. **Nature**, v. 361, p. 647-650, 1993.

RAY, P. N.; BELFALL, B.; DUFF, C.; LOGAN, C.; KEAN, V.; THOMPSON, M. W.; SYLVESTER, J. E.; GORSKI, J. L.; SCHMICKEL, R. D.; WORTON, R. G. Cloning of the breakpoint of an Up 21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v. 318, p. 672-675, 1985.

READ, M. A.; NEISH, A. S.; LUSCINSKAS, F. W.; PALOMBELLA, V. J.; MANIATIS, T.; COLLINS, T. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. **Immunity**, v. 2, p. 493-506, 1995.

REIMAN, K. A.; KNOWLEN, G. G.; TVEDTEN, H. W. Factitious hyperkalemia in dogs with trombocytosis. The effect of platelets on serum potassium concentration. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 3, p. 47-52, 1989.

RICHARDSON, P. Clinical update: proteasome inhibitors in hematologic malignancies. **Cancer treatment Reviews**, v. 29, p. 33-39, 2003. Supplement, 1.

ROCK, K. L.; GRAMM, C.; ROTHSTEIN, L.; CLARK, K.; STEIN, R.; DICK, L.; HWANG, D.; GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome block the degeneration of most proteins and the generation of peptides presented in MHC class I molecules. **Cell**, v. 78, p. 761-771, 1994.

ROSINOL, L.; MONTOTO, S.; CIBEIRA, M. T.; BLADÉ, J. Bortezomib-induced severe hepatitis in multiple myeloma. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 464-465, 2005.

ROWE, R. W. D.; GOLDSPIK, G. The growth and development of muscle fibers in normal and dystrophic mice, In: SYMPOSIUM OF MUSCLE DYSTROPHY GROUP, 4., 1968, London. Proceedings... London: Pitman Medical, 1968, p 116-218.

RUBENSTEIN, L. J. Age changes in muscle, in: Bourne G. H. (ed): **Structure and Function of Muscle**. New York, Academic Press, v. 2, p. 209-226, 1960.

SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI, A.; MOGNOL, P.; THIBAUD, J. L.; GALVEZ, B. G.; BARTHELEMY, I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; CUSELLA DE ANGELIS, M. G.; TORRENTE, Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. **Nature**, v. 444, p. 574-579, 2006.

SCHATZBERG, S. J.; OLBY, N. J.; BREEN, M.; ANDERSON, L. V. B.; LANGFORD, C. F.; DICKENS, H. F.; WILTON, S. D.; ZEISS, C. J.; BINNS, M. M.; KORNEGAY, J. N.; MORRIS, G. E.; SHARP, N. J. H. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p. 289-295, 1999.

SCHWARTZ, R.; DAVIDSON, T. Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomibe. **Oncology**, v. 18, n. 14, p. 14-21, 2004. Supplement.

SEWRY, C. A. Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy. **Microscopy research and Technique**, v. 48, p. 142-154, 2000.

SHARP, N. J. H.; KORNEGAY, J. N.; LANE S. B. The muscular dystrophies. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal)**, v. 4, p. 133-140, 1989.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases **Neuromuscular Disorders**, v. 15, n. 2, p. 127-138, 2005.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Muscular dystrophies and other inherited myopathies. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 32, n. 1, p. 103-124, 2002.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 240-244, 2001.

- SHERIFFS, I. N.; RAMPLING, D.; SMITH, V. V. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 517-520, 2001.
- SHULL, M. M.; ORMSBY, I.; KIER, A. B.; PAWLOWSKI, S.; DIEBOLD, R. J.; YIN, M.; ALLEN, R.; SIDMAN, C.; PROETZEL, G.; CALVIN, D.; ANNUNZIATA, N.; DOETSCHMAN, T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p. 693-699, 1992.
- SICINSKI, P.; GENG, Y.; REYDER-COOK, A. S.; BARNARD, E. A.; DARLISON, M. G.; BARNARD, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. **Science**, v. 244, p. 1578-1580, 1989.
- SILVA, M. B. O. **Efeito do Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica?** 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SOLOMON, V.; BARACOS, V.; SARRAF, P.; GOLDBERG, A. L. Rates of ubiquitin conjugation increase when muscle atrophy, largely through activation of the N-end rule pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 12602-12607, 1998.
- SPENCE, H.; CHEN, Y.; WINDER, S. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. **BioEssays**, p. 542-552, 2002.
- SUN, G.; HAGINOYA, K.; WU, Y.; CHIBA, Y.; NAKANISHI, T.; ONUMA, A.; SATO, Y.; TAKIGAWA, M.; IINUMA, K.; TSUCHIYA, S. Connective tissue growth in muscles of human muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 267, p. 48-56, 2008.
- TAWA, N. E.; ODESSEY, R.; GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerate proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. **Journal Clinics Investigation**, v. 100, n. 1, p. 197-203, 1997.
- THIOUDELLET, C.; BLOT, C.; SQUIBAN, P.; FARDEU, M.; BRAUN, S. Current protocol of research phase 1 clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorder**, v. 12, p. 49-51, 2002. Supplement.
- THOR, G.; TERRYBORRY, J. Muscular Dystrophy: Recent Milestones. **Drug & Market Development**, v. 14, n. 4, p. 115-123, 2003.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006, 582 p.

TIDBALL, J. G. Inflammatory process in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. R345-R353, 2005.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Involving therapeutic strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: targeting downstream events. **Pediatric Research**, v. 56, n. 6, p. 831-841, 2004.

TINSLEY, J. M.; POTTER, A. C.; PHELPS, S. R.; FISHER, R.; TRICKETT, J. I.; DAVIES, K. A. Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated urotrophin transgene. **Nature**, v. 384, p. 349-353, 1996.

TURNER, J. D.; ROTWEIN, P.; NOVAKOFSKI, J.; BECHTEL, P. J. Induction of mRNA for IGF-I and-II during growth hormone-stimulated muscle hypertrophy. **The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 255, p. E513–E517, 1988.

VAINZOF, M.; PAVANELLO, R. C. M.; PAVANELLO FILHO, J.; PASSOS-BUENO, M. R.; RAPAPORT, D.; HIS, C. T.; LEVY, J. A.; CARVALHO, M.; SALUM, P. N.; ZATZ, M. Estudo imuno-histoquímico da distrofina em músculo de afetados por distrofias musculares progressivas. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n. 3, p. 799-812, 1991.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increase Serum Alanine Aminotransferase Activity Associated with Muscle Necrosis in the Dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 140-143, 1990a.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DELAHUNTA, A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. **Acta Neuropathologica**, v. 71, p. 301-310, 1986.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, AL. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of the Neurological Science**, v. 97, p. 1-23, 1990b.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine x-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: **Clinical studies. Journal of neurological Science**, v. 88, p. 69-81, 1988.

VALENTINE, B. A.; WINAND, N. J.; PRADHAN, D.; MOISE, N. S.; LAHUNTA, A.; KORNEGAY, J. N.; COOPER, B. J. Canine x-linked muscular dystrophy. **American Journal Medicine and Genetics**, v. 42, p. 352-256, 1992.

VANDEBROUCK, C.; IMBERT, N.; DUPORT, G.; COGNARD, C.; RAYMOND, G. The effect of methylprednisolone on intracellular calcium of normal and dystrophic human skeletal muscle cells. **Neuroscience Letters**, v. 269, p. 110-114, 1999.

VAN HAM, L. M. L.; ROELS, S. L. M. F.; HOORENS, F. K. Congenital dystrophy like myopathy in a Brittany spaniel puppy. **Progress in Veterinary Neurology**, v. 6, p. 135-138, 1995.

VELCADE [bula inclusa]. Cambridge, Mass, **Millenium Pharmacauticals**. In., 2003.

VOISIN, L.; BREUILLE, D.; COMBARET, L.; POUYET, C.; TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; OBLED, C.; ATTAIX, D. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways **Journal Clinical Investigation**, v. 97, p. 1610-1617, 1996.

VOORHEES, P. M.; DEES, E. C.; O'NEIL, B.; ORLOWSKI, R. C. The proteasome as a target of cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 6316-6325, 2003.

WANG, Z.; CHAMBERLAIN, J. S.; TAPSCOTT, S. J.; STORB, R. Gene Therapy in Large Animal Models of Muscular Dystrophy. **Research Council, Institute of Laboratory Animal**, v. 50, n. 2, p. 187-98, 2009.

WATSON, A. G. Structure of the canine esophagus. **New Zeeland Journal**, v. 21, p. 195-200, 1973.

WELCH, E. M.; BARTON, E. R.; ZHUO, J.; TOMIZAWA, Y.; FRIESEN, W. J.; TRIFILLIS, P.; PAUSHKIN, S.; PATEL, M.; TROTTA, C. R.; HWANG, S.; WILDE, R. G.; KARP, G.; TAKASUGI, J.; CHEN, G.; JONES, S.; REN, H.; MOON, Y.; CORSON, D.; TURPOFF, A. A.; CAMPBELL, J. A.; CONN, M. M.; KHAN, A.; ALMSTEAD, N. G.; HEDRICK, J.; MOLLIN, A.; RISHER, N.; WEETALL, M.; YEH, S.; BRANSTROM, A. A.; COLACINO, J. M.; BABIAK, J.; JU, W. D.; HIRAWAT, S.; NORTH CUTT, V. J.; MILLER, L. L.; SPATRICK, P.; HE, F.; KAWANA, M.; FENG, M.; JACOBSON, A.; PELTZ, A. W.; SWEENEY, H. L. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. **Nature**, v. 447, n. 3, p. 87-93, 2007

WELLS, D. J. Increased treatment options for Duchenne and related muscular dystrophies. **Gene therapy**, v. 15, p. 1077-1078, 2008.

WENTINK, G.; LINDE-SIPMAN, J. S.; VAN DER MEIJER, A. E. F. H. Myopathy with a possible recessive X-linked inheritance in a litter of Irish terriers. **Veterinary Pathology**, v. 9, p. 328-349, 1972.

WEST, W. T. Muscular dystrophy of vitamin E deficiency, In: BOURNE, G. H.; GOLARZ, M. N. 1. ed. **Muscular Dystrophy in man and animals**. New York: Basel Karger, 1963. p. 368-407.

WETTERMAN, C. A.; HARKIN, K. R.; CASH, W. C.; NIETFIELD, J. C.; SHELTON, G. Hypertrophic muscular dystrophy in a young dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 216, p. 878-881, 2000.

WIECZOREK, L. A.; GAROSI L. S.; SHELTON G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in an Old English sheepdog. **Veterinary Record**, v. 158, p. 270-273, 2006.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-K β pathway in the treatment of inflammation and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 135-142, 2001.

YOKOTA, T.; LU, Q.; PARTRIDGE, T.; KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, A.; TAKEDA, S.; HOFFMAN, E. Efficacy of systemic morpholino exon- skipping in Duchenne dystrophy dogs. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 6, p. 667-676, 2009.

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

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A - Exames laboratoriais dos animais K1, K3, K4, K6 e B7.

Animal K1 – Exames laboratoriais: Bioquímica sérica, leucograma, eritrograma, exame de urina tipo 1.

Tabela 1 - Avaliação bioquímica do cão K1 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Creatinina (Creat.), proteínas totais (Ptns. t.), Albumina (Album.), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (k), colesterol (Col.)

Sema- nas	Bioquímico												
	Ureia (mg/dL)	Creat. (mg/d L)	Ptns t. (g/dL)	Album (g/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	CK (UI/L)	AST (UI/L)	Ca (mg/d L)	P (mg/d L)	Na (mEq/ L)	K (mEq/ L)	Col. (mg/dL)
0	35,4	0,7	5,8	3,6	475,2	23,2	26452,4	414,6	12,3	9,3	140,7	5,3	242,0
1	39,0	0,8	5,9	3,6	465,0	24,7	13358,4	336,4	11,7	9,3	146,8	4,5	253,0
2	42,2	0,8	6,3	3,7	364,5	24,0	13150,4	176,0	14,0	11,5	154,0	6,1	228,5
3	41,2	0,8	6,4	3,6	471,7	21,7	39254,0	733,0	11,7	9,7	145,0	6,1	228,3
4	29,6	0,8	5,9	3,6	374,9	19,3	20218,0	505,7	10,7	9,0	143,7	5,1	232,0
5	29,0	0,7	6,2	3,6	400	18,0	10088,5	187,0	10	11,4	141,4	5,4	245,0
6	24,0	0,8	6,3	3,6	446,3	21,2	10100	236,0	11,4	8,1	144,6	5,0	315,8
7	25	0,79	6	3,3	409,5	17,2	10256,6	215	11,3	8,3	144,2	4,5	280,5
8	23	0,8	6	3,2	372,7	20,4	14321	236	12,3	5,6	142,3	5,2	204,7
9	31,0	0,8	6,5	3,4	344,5	18,0	11709,4	137	11,0	5,2	144,8	5,1	214,5
10	23,4	0,8	6,4	3,5	383	18,8	12637,6	281,4	11,6	4,7	142	5,3	225
média	31,16	0,77	6,15	3,52	409,7	20,59	16567,6	314,3	11,6	8,37	144,5	5,2	242,6
Desvpad	7,25	0,04	0,24	0,15	47,13	2,58	8982,6	176,7	1,03	2,3	3,63	0,52	31,56
Valores normais *	15-40	0,5-1,5	5-6,5	2,6-3,3	2-102	20-156	1,5-28,4	23-66	8-12	2,5- 6,2	141- 152	3,6-5,8	100- 300

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 2 - Leucograma e contagem de plaquetas do cão K1 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Leucócitos (Leu.), neutrófilos (Neut.), segmentados (Segm.), eosinófilos (Eos.), linfócitos típicos (Linf tip.), linfócitos atípicos (linf atip.), monócitos (Mon.), anisocitose (anisoc.), linf reativos (linfócitos reativos)

Semanas	Leucograma							Plaquetas	Outros
	Leuc. (μL)	Neut. (μL)	Segm. (μL)	Eos. (μL)	Bas. (μL)	linf tip. (μL)	linf atip. (μL)	Mon. (μL)	
0	14600	10074	10074	00	0	4234	0	292	582000
1	13200	4884	4884	924	0	7128	0	264	649000
2	20600	10300	10300	824	0	9064	0	412	629000
3	20000	11600	11600	0	0	8200	0	200	534000
4	19800	7938	7938	189	0	10206	0	567	670000
5	14900	7301	7301	447	0	7003	0	149	633000
6	17300	6920	6920	173	0	9688	0	519	611000
7	15100	6191	6191	453	0	7701	0	755	591000
8	13800	4692	4692	138	0	8556	0	414	415000
9	13400,0	4556,0	4556	0	0	8174	0	670	587000
10	12200,0	4514,0	7179	374,91	0	6466	0	244	595000
média	15900,00	7179,09	2544,3	378,01	0	7856,36	0	407,82	590545,45
desvpad	3017,28	2544,32	2514,9	338,5	0	1675,1	0	199,53	68955,59
Valores	8000-	3000-	3000-	100-		1000-		150-	200.000-
normais*	17000	11500	11500	1250	0	4800	0	1350	500.000

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 3 – Eritrograma do cão K1 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm.), hematócrito (Ht.), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Semanas	Eritrograma					
	Hm (x 10 ⁶ μl)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (μm ³)	HCM (μm ³)	CHCM (%)
0	4,90	35,00	11,10	71,43	22,65	31,71
1	4,80	35,00	11,80	72,92	24,58	33,71
2	4,9	35	12,1	71,43	24,69	34,57
3	4,9	35	11,6	71,43	23,67	33,14
4	5,2	36	12,3	69,23	23,65	34,17
5	5,1	36	11,6	70,59	22,75	32,22
6	5,2	37	11,9	71,15	22,88	32,16
7	5	37	11,9	74	23,8	32,16
8	4,8	33	10,5	68,75	21,88	31,82
9	5,4	38,0	12,2	70,4	22,6	32,1
10	5,3	39,0	12,6	73,6	23,8	32,3
média	5,05	36,00	11,78	71,35	23,36	32,73
desvpad	0,21	1,67	0,58	1,65	0,88	1,00
Valores						
normais*	5,5-7,0	34-40	11-15,5	65-78	20-24	30-35

*Valores de referencia para cães entre 3 a 6 meses de idade. Fonte:

http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/laboratorioclinico/valores_referencia.pdf
(acesso: jan/08)

Tabela 4 - Exame de urina tipo I do cão K1 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Densidade (Densid.), proteínas (Ptns), corpos cetônicos (Corp cet.), urobilinogênio (Urobilin.), pigmento biliar (pig biliar), hemoglobina (Hb)

Exame de urina											
Semanas	Odor	Aspecto	Cor	pH	Densid.	Ptns.	Glicose	Corp cet.	Urobilin.	pig biliar	Hb
0	su gen	turvo	amar citrin	6	1044	+	-	-	-	-	+++
1	aliaceo	lig turvo	amar citrin	5,5	1043	+	-	-	-	-	++
2	sui gen	lig turvo	amar citrin	7	1036	+	-	-	-	'-	'++
3	sui gen	lig turvo	amar citrin	8,5	1039	'+	'-	'-	'-	'-	'-
4	sui gen	turvo	amar citrin	5,5	1050	'+	'-	'-	'-	'+	'++++
5	sui gen	turvo	amar ouro	8	1050	'+	-	-	-	-	+++
6	sui gen	turvo	amar citrin	6	1047	-	-	-	-	-	-
7	sui gen	lig turvo	amar citrin	6	1050	-	-	-	-	-	++
8	sui gen	turvo	amar citri	7	1050	+	-	-	-	-	+++
9	sui gen	turvo	amar citr	5	1047	+	-	-	-	-	++
10	sui gen	lig turvo	amar citr	6	1035	+	-	-	-	-	++

Tabela 5 - Exame de sedimento urinário do cão K1 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm), leucócitos (Leuc.), epitélio renal (ept ren.), pelve renal (Pelv ren.), descamação de vias urinárias (Desc v. u.), transição da bexiga (Trans bex.), cilindros granulados (Gran.), cilindros hialinos (Hial.), cilindros céreos (Cer.), bactérias (Bact.)

Sedimento urinário											
Semanas	Hm	Leuc.	Ept ren.	Pelv ren.	Desc v. u.	Trans bex.	Cristais	Gran.	Hial.	Cer.	Bact.
0	20-25	8-10	-	-	++	-	-	-	+	-	+
1	8-10	2-4	-	-	+	-	-	0-1	-	-	raras
2	8-10	8-10	-	-	+	-	-	-	-	-	raras
3	0-2	8-10	'-	'-	'+	'-	fos triplo ++	'-	'-	'-	'+
4	13-17	20-25	'-	'-	'+	'-	urato amorfo ++	'+			'++
5	13-17	20-25	-	-	+	-	fosf triplo+++	-	-	-	+
6	0-2	30-35	-	-	+	-	-	+	-	-	+
7	8-10	13-17	-	-	+	-	-	-	-	-	+
8	13-17	25-30	-	-	+	-	-	-	+	-	+
9	8-10	20-25	-	-	+	-	-	+	+	-	+
10	4 a 6	13-17	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Animal K3 - Exames laboratoriais: Bioquímica sérica, leucograma, eritrograma, exame de urina tipo 1.

Tabela 1 - Avaliação bioquímica do cão K3 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Creatinina (Creat.), proteínas totais (Ptns. t.), Albumina (Album.), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K), colesterol (Col.)

Semana s	Bioquímico												
	Urei a (mg/ dL)	Creat. (mg/dL)	Ptns t. (g/dL)	Album (g/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	CK (UI/L)	AST (UI/ L)	Ca (mg/d L)	P (mg/d L)	Na (mEq/L)	K (mEq /L)	Col. (mg/d L)
0	46,4	0,7	5,7	3,5	489,6	33,7	17669,2	861,1	11,2	11,0	143,6	5,3	216,0
1	23,8	0,7	6,1	3,7	522,7	34,3	13490	324,2	12,0	7,9	144,5	5,4	217,7
2	34,5	0,7	5,5	3,5	427,0	33,9	14776,4	284,7	11,2	9,3	154,0	6,2	219,0
3	30,9	0,8	6,4	3,6	484,9	28,7	27476,4	708,1	11,5	9,6	141,0	5,9	187,0
4	29,5	0,8	6,5	3,7	416,9	29,8	7787,2	204,8	11,3	7,0	145,0	5,7	236,0
5	21,0	0,7	6,2	3,5	645,2	25,7	17427,0	482,8	11,2	9,6	142,9	5,6	239,7
6	22,5	0,8	6,0	3,5	520,5	28,0	11626,8	301,1	12,7	7,2	143,0	5,1	289,6
7	32,7	0,7	6,1	3,4	552,8	24,3	9963,6	320,1	11,3	8,0	144,4	4,8	262,8
8	34	0,79	6,2	3,4	467,3	28,5	14144,2	270	11,6	6	143,2	5,9	196
9	31	0,83	6,2	3,2	491	26,5	13234	237,6	11,3	5,1	142,9	5	202,5
10	25	0,74	6,4	3,4	539,4	25,4	12758,6	401	12,2	4,3	143	5	218
média	30,1	0,8	6,1	3,5	505,2	29,0	14577,6	399,6	11,6	7,7	144,3	5,4	225,8
Desvpa d	7,2	0,0	0,3	0,1	63,1	3,6	5164,2	207,6	0,5	2,1	3,4	0,5	29,9
Valores normais *	15- 40	0,5-1,5	5-6,5	2,6-3,3	2-102	20-156	1,5-28,4	23- 66	8-12	2,5- 6,2	141-152	3,6- 5,8	100- 300

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 2 - Leucograma e contagem de plaquetas do cão K3 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Leucócitos (Leu.), neutrófilos (Neut.), segmentados (Segm.), eosinófilos (Eos.), linfócitos típicos (Linf tip.), linfócitos atípicos (linf atíp.), monócitos (Mon.), anisocitose (anisoc.), linf reativos (linfócitos reativos)

Semanas	Leucograma								Plaquetas	Outros
	Leuc. (µL)	Neut. (µL)	Segm. (µL)	Eos. (µL)	Bas. (µL)	linf tip. (µL)	linf atíp. (µL)	Mon. (µL)		
0	18200	12194,0	12194	182	0	5460	0	364	547000	linf reat +, mon reat +
1	15800	8374,0	8374	790	0	6004	0	632	573000	
2	21400	13054,0	13054	0	0	7918	0	428	478000	Anisc +, policroma +
3	20800	11648,0	11648	208	208	8320	0	416	538000	
4	14700	3234,0	3234	441	0	10878	0	147	574000	
5	16600	8134,0	8134	332	0	7968	0	166	522000	anisoc +
6	15500	7750	7750	620	0	6665	0	465	574000	
7	13900	7089,0	7089	556	0	6116	0	139	531000	
8	12800	4352	4352	640	0	7424	0	384	413000	
9	11200	5712	5712	112	0	5040	0	336	492000	
10	12500	7375	7375	125	0	4575	0	125	481000	
média	15763,6	8083,3	8083,3	364,2	18,9	6942,5	0	327,5	520272	
desvpad	3297,1	3147,4	3147,4	260,3	62,7	1807,9	0	164,1	50335	
Valores	8.000-	3000-	3000-	100-		1000-		150-	200.000-	
normais*	17.000	11500	11500	1250	0	4800	0	1350	500.000	

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 3 – Eritrograma do cão K3 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm.), hematócrito (Ht.), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Eritrograma						
Semanas	Hm (x 10 ⁶ µl)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (µm ³)	HCM (µm ³)	CHCM (%)
0	5,1	36,0	11,5	70,6	22,6	31,9
1	5,0	37,0	12,1	74,0	24,0	32,7
2	4,8	35,0	11,8	72,9	24,6	33,7
3	5,2	35,0	11,9	67,3	22,9	34,0
4	5,1	36,0	12,2	70,6	23,9	33,9
5	5,1	36,0	11,5	70,6	22,6	31,9
6	5,3	37,0	11,8	69,8	22,3	31,9
7	5,2	36,0	11,9	69,2	22,9	33,1
8	5,1	35	11,2	68,63	21,96	32
9	5,3	36	11,7	67,92	22,08	32,5
10	5	35	11,6	70	23,2	33,14
média	5,1	35,8	11,7	70,1	23,0	32,8
desvpad	0,1	0,8	0,3	2,0	0,9	0,8
Valores						
normais*	5,5-7,0	34-40	11-15,5	65-78	20-24	30-35

*Valores de referencia para cães entre 3 a 6 meses de idade. Fonte:

http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/laboratorioclinico/valores_referencia.pdf (acesso: jan/08)

Tabela 4 - Exame de urina tipo I do cão K3 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Densidade (Densid.), proteínas (Ptns), corpos cetônicos (Corp cet.), urobilinogênio (Urobilin.), pigmento biliar (pig biliar), hemoglobina (Hb)

Exame de urina											
Semanas	Odor	Aspecto	Cor	pH	Densid.	Ptns.	Glicose	Corp cet.	Urobilin.	pig biliar	Hb
0	sui gene	lig turvo	amar citrin	6	1026	+	-	-	-	-	++++
1	sui gene	lig turvo	amar citrin	6	1044	+	-	-	-	-	+++
2	sui gene	lig turv	amar citrin	6	1037	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+
3	sui gene	lig turv	amar citrin	8	1034	‘-	‘-	‘-	‘-	‘-	‘-
4	sui gene	turvo	ouro amaar	6	1043	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘++++
5	sui gene	turvo	citr	8,5	1043	+	-	-	-	-	+++
6	sui gene	turvo	amar citrin	7	1046	+	-	-	-	-	++
7	sui gene	lig turv	amar citrin	7	1042	+	-	-	-	-	+++
8	sui gene	turvo	amar citrin	5,5	1029	+	-	-	-	-	+++
9	sui gene	turvo	amar citrin	5	1050	+	-	-	-	+	++
10	sui gene	turvo	amar citrin	5	1020	+	-	-	-	-	+++

Tabela 5 - Exame de sedimento urinário do cão K3 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm), leucócitos (Leuc.), epitélio renal (ept ren.), pelve renal (Pelv ren.), descamação de vias urinárias (Desc v. u.), transição da bexiga (Trans bex.), cilindros granulosos (Gran.), cilindros hialinos (Hial.), cilindros céreos (Cer.), bactérias (Bact.)

Sedimento urinário											
Semanas	Hm	Leuc.	Ept ren.	Pelv ren.	Desc v. u.	Trans bex.	Cristais	Gran.	Hial.	Cer.	Bact.
0	15-20	20-25	-	-	+	-	-	-	+	-	+
1	6 a 8	10-15	-	-	+	-	-	-	-	-	raras
2	6 a 8	8-10	‘-	‘-	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘-	raras
3	0-2	0-2	‘-	‘-	‘+	‘-	fosf tripl + urato	‘-	‘-	‘-	‘+
4	20-25	13-17			‘+		amorfo + fosf tripl	‘+	‘+		‘++
5	13-17	4-6			+	-	+++ fosf tripl				+
6	8 a 10	8-10	-	-	+	-	++	-	-	-	+
7	13-17	15-20	-	-	+	-	-	+	-	-	+
8	13-17	30-35	-	-	+	-	-	-	-	-	+
9	13-17	50-60	-	-	+	-	-	-	+	-	+
10	13-17	40-50	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Animal K4 – Exames laboratoriais: Bioquímica sérica, leucograma, eritrograma, exame de urina tipo 1.

Tabela 1 - Avaliação bioquímica do cão K4 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Creatinina (Creat.), proteínas totais (Ptns. t.), Albumina (Album.), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K), colesterol (Col.)

Semana s	Bioquímico												
	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	Ptns t. (g/dL)	Album (g/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	CK (UI/L)	AST (UI/L)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Col. (mg/dL)
0	44,3	0,7	5,0	2,8	364,5	35,9	26562,8	540,9	11,9	12,0	142,9	5,3	268,7
1	24,9	0,7	5,9	3,2	403,8	37,8	14326,4	387,4	11,7	9,7	142,8	4,8	282,0
2	45,7	0,8	5,0	3,2	335,0	30,2	11303,2	194,5	11,4	10,6	156,0	6,6	241,9
3	39,3	0,7	6,0	3,2	522,1	33,5	35156,8	1494,2	11,4	10,2	143,9	5,7	255,7
4	25,3	0,8	5,9	3,2	377,1	34,0	8876,0	199,0	11,3	8,7	143,0	5,7	302,0
5	27,4	0,7	5,6	3,0	494,7	28,2	13731,4	335,7	9,8	11,9	141,4	5,3	300,9
6	22,4	0,7	5,5	3,1	402,2	30	12337,4	321,3	10,9	8,4	141,6	5,2	335,3
7	34,9	0,8	5,7	3,1	461,8	26,9	10540,8	327,4	10,3	8,6	143,1	4,9	319,5
8	30,7	0,75	5,8	3,1	416,2	30,3	16901,2	292,5	12,8	6,8	141,9	5,4	253
9	30	0,76	5,8	2,9	369,9	28,4	13335	202,3	11,2	5,7	141,5	5,2	255,6
10	23,4	0,67	5,7	2,9	508	28,4	12767	429,5	10,9	4,7	142,7	4,9	254
média	31,7	0,7	5,6	3,1	423,2	31,2	15985,3	429,5	11,2	8,8	143,7	5,4	279,0
Desvpad	8,3	0,0	0,3	0,1	63,7	3,5	7879,7	368,4	0,8	2,4	4,2	0,5	31,1
Valores normais*	15-40	0,5-1,5	5-6,5	2,6-3,3	2-102	20-156	1,5-28,4	23-66	8-12	2,5-6,2	141-152	3,6-5,8	100-300

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 2 - Leucograma e contagem de plaquetas do cão K4 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Leucócitos (Leu.), neutrófilos (Neut.), segmentados (Segm.), eosinófilos (Eos.), linfócitos típicos (Linf tip.), linfócitos atípicos (linf atip.), monócitos (Mon.), anisocitose (anisoc.), linf reativos (linfócitos reativos)

Semanas	Leucograma								Plaquetas	Outros
	Leuc. (μL)	Neut. (μL)	Segm. (μL)	Eos. (μL)	Bas. (μL)	linf tip. (μL)	linf atip. (μL)	Mon. (μL)		
0	13200	7260	7260	528,0	0	5280	0	132,0	537000	
1	11600	6496	6496,0	812,0	0	4176,0	0	116,0	651000	anisoci + anisoc +, poliocr +
2	12300	7011	7011,0	615,0	123,0	4059,0	0	492,0	645000	
3	15900	11289	11289,0	0	0	4452,0	0	159,0	522000	
4	9600	4320	4320	480	0	4800	0	0	565000	
5	12200	6588	6588,0	610	122,0	4636,0	0	244,0	410000	
6	12600	7182	7182,0	126,0	126,0	4914,0	0	252,0	578000	
7	13600	7752	7752,0	408,0	0	5168,0	0	272,0	508000	
8	9300	4092	4092	279	0	4464	0	465	376000	
9	11000	6270	6270	330	0	4290	0	110	359000	
10	11800	5900	5900	472	0	4838	0	590	455000	
média	12100,0	6741,8	6741,8	423,6	33,7	4643,4	0	257,5	509636	
desvpad	1839,6	1900,9	1900,9	231,6	57,8	396,2	0	185,1	100206	
Valores normais*	8000-17000	3000-11500	3000-11500	100-1250	0	1000-4800	0	150-1350	200.000-500.000	

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 3 – Eritrograma do cão K4 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm.), hematócrito (Ht.), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Eritrograma						
Semanas	Hm (x 10 ⁶ μl)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (μm ³)	HCM (μm ³)	CHCM (%)
0	4,9	35,0	11,1	71,4	22,7	31,7
1	4,8	34,0	11,7	70,8	24,4	34,4
2	4,8	36,0	11,9	75,0	24,8	33,1
3	5,2	36,0	12,1	69,2	23,3	33,6
4	5,1	38,0	12,3	74,5	24,1	32,4
5	5,3	36,0	12,1	67,9	22,8	33,6
6	5,2	36,0	11,9	69,2	22,9	33,1
7	5,1	35,0	11,5	68,6	22,6	32,9
8	5	34	11,1	68	22,2	32,65
9	5,3	38	12,1	71,7	22,83	31,84
10	5,7	40	12,6	70,18	22,11	31,5
média	5,1	36,2	11,9	70,6	23,1	32,8
desvpad	0,3	1,8	0,5	2,4	0,9	0,9
Valores normais*	5,5-7,0	34-40	11-15,5	65-78	20-24	30-35

*Valores de referencia para cães entre 3 a 6 meses de idade. Fonte:

http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/laboratorioclinico/valores_referencia.pdf
(acesso: jan/08)

Tabela 4 - Exame de urina tipo I do cão K4 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Densidade (Densid.), proteínas (Ptns), corpos cetônicos (Corp cet.), urobilinogênio (Urobilin.), pigmento biliar (pig biliar), hemoglobina (Hb)

Exame de urina											
Semanas	Odor	Aspecto	Cor	pH	Densid.	Ptns.	Glicose	Corp cet.	Urobilin.	pig biliar	Hb
0	sui gen	lig turv	amar citr	5,5	1045	+	-	-	-	-	+++
1	sui gen	lig turv	amar citr	8	1048	+++	-	-	-	-	+++
2	sui gen	lig turv	amar citr	7	1045	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+
3	sui gen	lig turv	amar citr	8	1035	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+++
4	sui gen	turvo	amar citr	7,5	1048	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+++
5	sui gen	lig turv	amar citr	5	1034	+	-	-	-	-	-
6	sui gen	lig turv	amar citr	5	1046	+	-	-	-	-	-
7	sui gen	turvo	amar citr	7,5	1050	+	-	-	-	-	++
8	sui gen	lig turv	amar citr	5	1047	+	-	-	-	-	-
9	sui gen	lig turv	amar citr	6	1041	+	-	-	-	-	-
10	sui gen	lig turv	amar ouro	6	1050	+	-	-	-	+	+++

Tabela 5 - Exame de sedimento urinário do cão K4 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm), leucócitos (Leuc.), epitélio renal (ept ren.), pelve renal (Pelv ren.), descamação de vias urinárias (Desc v. u.), transição da bexiga (Trans bex.), cilindros granulosos (Gran.), cilindros hialinos (Hial.), cilindros céreos (Cer.), bactérias (Bact.)

Sedimento urinário											
Semanas	Hm	Leuc.	Ept ren.	Pelv ren.	Desc v. u.	Trans bex.	Cristais	Gran.	Hial.	Cer.	Bact.
0	13-17	2-4	-	-	+	-	-	+	+	-	+
1	4-6	0-2	-	+	raras	+	-	-	-	raros	raras
2	6-8	2-4	‘-	‘-	raras	‘-	‘-	‘-	‘-	raros	‘+
3	8-10	4-6	‘-	‘-	‘+	‘-	fosf tripl + fosf tripl +, fosfato amorfo +	‘-	‘-	‘-	‘+
4	13-17	8-10	‘-	‘+	‘+	‘-	-	-	+	-	‘+
5	0-2	2-4	-	-	+	-	-	-	+	-	+
6	0-2	0-2	-	-	+	-	oxalat calcio ++	-	-	-	+
7	13-17	20-25	+	++	+	-	fosf tripl+	-	-	-	++
8	0-2	2-4	-	-	+	-	-	+	-	-	+
9	0-2	2-4	-	+	+	-	-	-	-	-	+
10	8 a 10	0-2	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Animal K6 – Exames laboratoriais: Bioquímica sérica, leucograma, eritrograma, exame de urina tipo 1.

Tabela 1 - Avaliação bioquímica do cão K6 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Creatinina (Creat.), proteínas totais (Ptns. t.), Albumina (Album.), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K), colesterol (Col.)

Semana s	Uré ia (mg /dL)	Bioquímico											Col. (mg/d L)
		Creat. (mg/dL)	Ptns t. (g/dL)	Album (g/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	CK (UI/L)	AST (UI/ L)	Ca (mg/d L)	P (mg/d L)	Na (mEq/L)	K (mEq/ L)	
0	46	0,69	5,6	3,1	285	42	19004,8	306,0	10,9	11,4	146,9	5,3	218,9
1	24,5	0,7	6,4	3,6	340,4	38,5	11129,2	214,2	12,0	8,4	145,2	5,3	230,9
2	42	0,75	6	3,3	286	33,2	7218,6	130,5	10,3	11,2	154,0	7,4	242,6
3	32,3	0,76	6,4	3,4	350,7	31,4	18047,8	442,6	11,6	10,1	145,8	7,0	247,0
4	25,8	0,76	6,4	3,6	233,7	36,4	6635,2	143,3	10,9	7,3	142,7	5,6	301,6
5	29	0,68	5,9	3,4	337,2	27,8	6738,2	172,0	8,7	12,4	142,0	5,6	301,8
6	21	0,74	6,1	3,3	335,9	30,3	5829,4	156,8	10,6	8,3	142,0	5,5	375,8
7	32,4	0,77	6	3,2	350,7	28,6	6346,6	206,2	10,9	8,6	143,8	5,1	340,9
8	25,0	0,8	6,2	3,3	218,0	33,5	6455,0	110,9	12,3	6,4	141,7	6,0	282,0
9	27,9	0,8	6,3	3,3	286,5	30,5	8213,8	141,0	11,0	5,4	142,0	5,5	247,0
10	27,7	0,8	6,2	3,3	460,2	30,4	12296,0	312,4	11,5	5,3	145,9	5,2	256,0
média	30,33	0,74	6,14	3,35	316,75	32,96	9810,42	212,3	10,97	8,62	144,73	5,77	276,77
Desvpad	7,58	0,04	0,25	0,15	66,14	4,39	4777,04	101,6	0,96	2,43	3,60	0,75	49,00
Valores normais *	15-40	0,5-1,5	5-6,5	2,6-3,3	2-102	20-156	1,5-200	23-66	8-12	2,5-6,2	141-152	3,6-5,8	100-300

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 2 - Leucograma e contagem de plaquetas do cão K6 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Leucócitos (Leu.), neutrófilos (Neut.), segmentados (Segm.), eosinófilos (Eos.), linfócitos típicos (Linf tip.), linfócitos atípicos (linf atip.), monócitos (Mon.), anisocitose (anisoc.), linf reativos (linfócitos reativos)

Semanas	Leucograma								Plaquetas	Outros
	Leuc. (μL)	Neut. (μL)	Segm. (μL)	Eos. (μL)	Bas. (μL)	linf tip. (μL)	linf atip. (μL)	Mon. (μL)		
0	16700	10187	10187,0	334,0	0	5678,0	0	501,0	738000	
1	13200	6600	6600	396,0	0	5016,0	0	1188,0	825000	
2	18900	10395	10395,0	189,0	0	7371,0	0	945,0	808000	
3	17100	9234	9234,0	171,0	171,0	7353,0	0	171,0	718000	
4	13800	5520	5520	414,0	0	6900	0	966,0	673000	
5	14200	7526	7526,0	142,0	142,0	5822,0	0	568,0	762000	
6	24000	13440	13440	960	240	8160	0	1200	756000	
7	16900	7774	7774,0	676,0	0	7774,0	0	676,0	690000	
8	13700,0	4521,0	4521,0	548,0	0	7553,0	0	1096,0	451000,0	
9	16600,0	7304,0	7304,0	332,0	0	8466,0	0	498,0	775000,0	
10	15400,0	8162,0	8162,0	462,0	0,0	6160,0	0	616,0	495000,0	
média	16409,09	8242,09	8242,09	420,3	50,27	6932,0	0	765,91	699181,82	
desvpad	3082,35	2489,80	2489,80	241,5	89,00	1113,4	0	333,66	121041,17	
Valores normais*	8000-17000	3000-11500	3000-11500	100-1250	0	1000-4800	0	150-1350	200.000-500.000	

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 3 – Eritrograma do cão K6 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm.), hematócrito (Ht.), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Eritrograma						
Semanas	Hm (x 10 ⁶ μl)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (μm ³)	HCM (μm ³)	CHCM (%)
0	5,0	34,0	11,7	68,0	23,4	34,4
1	5,1	37,0	12,7	72,6	24,9	34,3
2	5,1	39,0	12,8	76,5	25,1	32,8
3	5,3	36,0	12,3	67,9	23,2	34,2
4	5,6	38,0	12,4	67,9	22,1	32,6
5	5,5	38,0	12,3	69,1	22,4	32,4
6	5,6	39,0	12,5	69,6	22,3	32,1
7	5,3	35,0	12,1	66,0	22,8	34,6
8	5,3	36,0	11,9	67,9	22,5	33,1
9	5,7	40,0	13,3	70,2	23,3	33,3
10	5,4	35,0	12,0	64,8	22,2	34,3
média	5,35	37,00	12,36	69,13	23,11	33,45
desvpad	0,23	1,95	0,45	3,18	1,04	0,92
Valores normais*	5,5-7,0	34-40	11-15,5	65-78	20-24	30-35

*Valores de referencia para cães entre 3 a 6 meses de idade. Fonte:

http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/laboratorioclinico/valores_referencia.pdf (acesso: jan/08)

Tabela 4 - Exame de urina tipo I do cão K6 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Densidade (Densid.), proteínas (Ptns), corpos cetônicos (Corp cet.), urobilinogênio (Urobilin.), pigmento biliar (pig biliar), hemoglobina (Hb)

Exame de urina											
Semanas	Odor	Aspecto	Cor	pH	Densid.	Ptns.	Glicose	Corp cet.	Urobilin.	pig biliar	Hb
0	sui gen	lig turv	amar citr	5,5	1045	+	-	-	-	-	+++
1	sui gen	lig turv	amar citr	8	1048	+++	-	-	-	-	+++
2	sui gen	lig turv	amar citr	7	1045	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+
3	sui gen	lig turv	amar citr	8	1035	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+++
4	sui gen	turvo	amar citr	7,5	1048	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+++
5	sui gen	lig turv	amar citr	5	1034	+	-	-	-	-	-
6	sui gen	lig turv	amar citr	5	1046	+	-	-	-	-	-
7	sui gen	turvo	amar citr	7,5	1050	+	-	-	-	-	++
8	sui gen	lig turv	amar citr	5	1047	+	-	-	-	-	-
9	sui gen	lig turv	amar citr	6	1041	+	-	-	-	-	-
10	sui gen	lig turv	amar ouro	6	1050	+	-	-	-	+	+++

Tabela 5 - Exame de sedimento urinário do cão K6 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm), leucócitos (Leuc.), epitélio renal (ept ren.), pelve renal (Pelv ren.), descamação de vias urinárias (Desc v. u.), transição da bexiga (Trans bex.), cilindros granulosos (Gran.), cilindros hialinos (Hial.), cilindros céreos (Cer.), bactérias (Bact.)

Sedimento urinário											
Semanas	Hm	Leuc.	Ept ren.	Pelv ren.	Desc v. u.	Trans bex.	Cristais	Gran.	Hial.	Cer.	Bact.
0	2-4	13-17	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1	4-6	2-3	-	+	+	-	fosf triplo +	-	-	-	raras
2	2-4	8-10	‘-	‘-	‘+	‘-	fosf triplo ++	‘-	‘-	‘-	‘+
3	0-2	8-10	‘-	‘-	‘+	‘-	fosf tripl + fosf tripl	‘-	‘-	‘-	‘+
4	8-10	2-4	‘+	‘-	‘+	‘-	++ fosf triplo	-	-	-	‘+
5	0-2	6-8	-	-	+	-	++	-	-	-	+
6	0-2	8-10	-	-	+	-	- fosf tripl	-	-	-	+
7	0-2	20-25	-	-	+	-	+++	-	+	-	+
8	0-2	30-35	+	-	+	-	-	+	-	-	+
9	0-2	13-17	+	+	+	-	-	-	-	-	+
10	0-2	0-2	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Animal B7– Exames laboratoriais: Bioquímica sérica, leucograma, eritrograma, exame de urina tipo 1.

Tabela 1 - Avaliação bioquímica do cão B7 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Creatinina (Creat.), proteínas totais (Ptns. t.), Albumina (Album.), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (k), colesterol (Col.)

Semana s	Bioquímico												
	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	Ptns t. (g/dL)	Album (g/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	CK (UI/L)	AST (UI/L)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Col. (mg/dL)
0	41,9	0,7	5,6	3,2	375,0	27,3	21744,4	340,5	12,0	10,4	187,4	5,8	196,6
1	33,0	0,7	5,0	3,3	278,0	36,6	8293,4	189,0	10,4	8,3	145,8	5,6	295,0
2	38,0	0,7	5,0	3,2	352,4	28,8	14382,8	274,4	11,6	10,9	150	5,8	246,0
3	26,0	0,8	6,3	3,1	467,0	30,8	19038,4	549,3	10,8	9,5	144,7	6,3	289,9
4	23,9	0,7	5,7	3,0	317,0	29,8	4593,6	126,0	10,6	7,9	141,4	5,1	300
5	31,7	0,7	5,7	2,9	315,0	31,3	8888,6	254,9	9,8	12,2	141,2	5,7	330,4
6	19,3	0,8	5,7	3,0	205,6	24,5	8441,8	128,3	10,9	8,1	144,2	5,3	389,8
7	32,5	0,8	6,1	3,0	371,3	23,0	1048,9	323,7	11,9	9,0	142,6	5,3	326,8
8	30,2	0,74	5,9	3,1	254,5	27,3	10094	233,7	12,3	7	142,3	5,8	250,8
9	20,5	0,81	7,3	3,4	240	35,7	4232,4	122	10,5	4,9	142,5	5,3	303,5
10	23,9	0,63	6	3	244,3	28	11699,2	314,5	11,3	5,2	143,2	5	242
Média	29,2	0,7	5,8	3,1	310,9	29,4	10223,4	259,7	11,1	8,5	147,8	5,5	288,3
Desvpad	7,2	0,1	0,6	0,2	76,6	4,2	6248,0	125,5	0,8	2,3	13,4	0,4	52,7
Valores normais*	15-40	0,5-1,5	5-6,5	2,6-3,3	2-102	20-156	1,5-28,4	23-66	8-12	2,5-6,2	141-152	3,6-5,8	100-300

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 2 - Leucograma e contagem de plaquetas do cão B7 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Leucócitos (Leu.), neutrófilos (Neut.), segmentados (Segm.), eosinófilos (Eos.), linfócitos típicos (Linf tip.), linfócitos atípicos (linf atip.), monócitos (Mon.), anisocitose (anisoc.), linf reativos (linfócitos reativos)

Semanas	Leucograma							Plaquetas (μL)	Outros
	Leuc. (μL)	Neut. (μL)	Segm. (μL)	Eos. (μL)	Bas. (μL)	linf tip. (μL)	linf atip. (μL)		
0	16200	11664,0	11664,0	486,0	0	3726,0	0	324,0	722000
1	10400	4888,0	4888,0	416,0	0	4992,0	0	104,0	595000
2	11600	6148,0	6148,0	232,0	116,0	4988,0	0	116,0	560000
3	13000	8060	8060	0	0	4810	0	130	763000
4	10900	5668,0	5668,0	763,0	0	4469,0	0	0	556000
5	9200	4784,0	4784,0	276,0	0	4048,0	0	92,0	550000
6	9400	4042,0	4042,0	188,0	282,0	4606,0	0	282,0	514000
7	13100	8384,0	8384,0	262,0	0	4454,0	0	0	495000
8	9400	5546	5546	282	0	3290	0	282	505000
9	10000	5100	5100	0	0	4000	0	900	515000
10	12100	8712	8712	121	0	2783	0	484	563000
média	11390,9	6636,0	6636,0	275,1	36,2	4196,9	0	246,7	576181,8
desvpad	2122,9	2293,7	2293,7	220,7	88,6	710,3	0	262,4	87928,2
Valores normais*	8000-17000	3000-11500	3000-11500	100-1250	0	1000-4800	0	150-1350	200.000-500.000

*Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Busch 2004

Tabela 3 – Eritrograma do cão B7 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezomibe. Hemácias (Hm.), hematócrito (Ht.), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Semanas	Eritrograma					
	Hm ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (μm^3)	HCM (μm^3)	CHCM (%)
0	5,2	36,0	11,5	69,2	22,1	31,9
1	4,9	37,0	12,3	75,5	25,1	33,2
2	4,9	35,0	12,1	71,4	24,7	34,6
3	6,1	39,0	13,5	63,9	22,1	34,6
4	5,3	38,0	12,2	71,7	23,0	32,1
5	5,8	39,0	12,7	67,2	21,9	32,6
6	5,7	38,0	12,5	66,7	21,9	32,9
7	5,5	37,0	11,8	67,3	21,5	31,9
8	5,1	35	11,3	68,63	22,16	32,29
9	5,7	38	12,3	66,67	21,58	32,37
10	5,1	34	11,4	66,67	22,35	33,53
média	5,4	36,9	12,1	68,6	22,6	32,9
desvpad	0,4	1,7	0,6	3,2	1,2	1,0
Valores normais*	5,5-7,0	34-40	11-15,5	65-78	20-24	30-35

*Valores de referência para cães entre 3 a 6 meses de idade. Fonte:

http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/laboratorioclinico/valores_referencia.pdf (acesso: jan/08)

Tabela 4 - Exame de urina tipo I do cão B7 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezumibe. Densidade (Densid.), proteínas (Ptns), corpos cetônicos (Corp cet.), urobilinogênio (Urobilin.), pigmento biliar (pig biliar), hemoglobina (Hb)

Exame de urina											
Semanas	Odor	Aspecto	Cor	pH	Densid.	Ptns.	Glicose	Corp cet.	Urobilin.	pig biliar	Hb
0	sui gen	lig turvo	amar citri	6	1037	+	-	-	-	-	+++
1	sui gen	lig turv	amar citri	6	1031	+	-	-	-	-	++
2	aliaceo	lig turv	amar citri	6	1037	+	-	-	-	-	++
3	sui gen	lig turv	amar citri	8	1025	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+
4	sui gen	lig turv	amar citri	7	1015	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+
5	sui gen	lig turv	amar palha	7	1016	+	-	-	-	-	-
6	sui gen	limpido	amar citri	5,5	1021	-	-	-	-	-	-
7	sui gen	lig turv	amar citri	8	1043	+	-	-	-	-	-
8	sui gen	lig turv	amar citri	7,5	1038	+	-	-	-	-	-
9	sui gen	lig turv	amar citri	5,5	1037	+	-	-	-	-	+
10	sui gen	lig turv	amar ouro	6	1047	+	-	-	-	++	+

Tabela 5 - Exame de sedimento urinário do cão B7 de acordo com as semanas de tratamento com o bortezumibe. Hemácias (Hm), leucócitos (Leuc.), epitélio renal (ept ren.), pelve renal (Pelv ren.), descamação de vias urinárias (Desc v. u.), transição da bexiga (Trans bex.), cilindros granulosos (Gran.), cilindros hialinos (Hial.), cilindros céreos (Cer.), bactérias (Bact.)

Sedimento urinário											
Semanas	Hm	Leuc.	Ept ren.	Pelv ren.	Desc v. u.	Trans bex.	Cristais	Gran.	Hial.	Cer.	Bact.
0	13-17	4-6	+	-	+	-	-	-	-	-	+
1	8-10	0-2	-	-	raras	-	-	-	-	-	raras
2	25-30	4-6	-	-	raras	-	-	-	-	-	raras
3	6- 8	8-10	‘+	‘+	‘+	‘-	‘-	‘-	‘-	‘-	‘+
4	2-4	0-2	‘+	-	‘+	-	-	-	-	-	‘+
5	0-2	0-2	-	+	+	-	-	-	+	-	+
6	0-2	0-2	-	-	+	-	-	-	-	-	raras
7	0-2	8-10	-	+	+	-	fosf tripl ++	-	-	-	+
8	0-2	8-10	+	+	+	-	fosf triplo +	-	-	-	+
9	2-4	8-10	+	+	+	-	-	-	-	-	+
10	2 a 4	4 a 6	+	+	+	-	-	-	-	-	+

APÊNDICE B – Ficha clínica utilizada para avaliação semanal dos animais K1, K3, K4, K6 e B7.

Canil GRMD - USP

Ficha de Avaliação Clínica

Nome do animal: _____	Data: ____/____/____	
Data de nasc.: _____	Idade: ____	Peso: ____ Kg

FC: ____ bpm	FR: ____ rpm	T: ____ °C	TPC: ____ s
Pulso femoral:	Normal ()	Filiforme ()	

Estado geral:	normal ()	regular ()	mal ()
Consciência:	alerta ()	apático ()	letárgico ()

Mucosas:	Hidratação:	Linfonodos:	Apetite:
() Normais	() Normal	Sub-mand.: _____	() Normorexia
() Pálidas	() 4%	Supra-escap.: _____	() Hiporexia
() Congestas	() 6%	Axilares: _____	() Polifagia
() Cianóticas	() 8%	Poplíteos: _____	() Anorexia
() Ictérica	() 10%	Inguinais: _____	

☐ 1. Digestivo
☐ 2. Respiratório
☐ 3. cardiovascular
☐ 4. Nervoso
☐ 5. Urinário
☐ 6. Reprodutivo
☐ 7. Oftálmico
☐ 8. Auricular
☐ 9. Músculo-esquelético
☐ 10. Pele e anexos
☐ 11. Abdômen
☐ 12. Odontológico

Avaliação por sistemas – Observações

Diagnósticos diferenciais:

Exames complementares:

Diagnóstico definitivo:

Tratamento: