DILAYLA KELLY DE ABREU

Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça golden retriever sadios e afetados pela distrofia muscular

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DILAYLA KELLY DE ABREU

**Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça
golden retriever sadios e afetados
pela distrofia muscular**

São Paulo
2014

DILAYLA KELLY DE ABREU

**Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça
golden retriever sadios e afetados
pela 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

2014

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.3022
FMVZ

Abreu, Dilayla Kelly de
Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça golden
retriever sadios e afetados pela distrofia muscular / Dilayla Kelly de Abreu. -- 2014.
146 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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. Imunomodulação. 2. Terapia celular. 3. GRMD. 4. Processo inflamatório. 5. Sistema
imune. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Imunomodulação in vitro das células tronco mesenquimais em cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular", protocolado sob o nº 2512/2011, utilizando 12 (doze) cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Immunomodulation in vitro of mesenchymal stem cells in healthy and affected by muscular dystrophy dogs Golden Retriever", protocol number 2512/2011, utilizing 12 (twelve) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ABREU, Dilayla Kelly de

Título: **Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça golden retriever sadios e afetados pela 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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

"Mas se desejarmos fortemente o melhor e,
principalmente, lutarmos pelo melhor... O melhor
vai se instalar em nossa vida. Porque sou do
tamanho daquilo que vejo ..."

Carlos Drummond de Andrade

Dedico,

Aos meus pais,

Marlene de Abreu e Carlos Alberto de Abreu,

Esta tese é de vocês, este título é para vocês ...

Dedico essa tese a vocês por estarem sempre ao meu lado, todos os dias, todas as horas ... em todos os momentos. Por acreditarem em meus sonhos e sempre me encherem de força e determinação.

Vocês são a minha luz !!!

Obrigada por me ensinarem os verdadeiros princípios da vida, o valor de um estudo, a importância de trabalhar com competência e ser sempre fiel à ética e a moral.

Obrigada por sempre acreditarem em meus sonhos, por me levantarem nas horas em que o cansaço foi maior e nas situações mais difíceis. Obrigada por estarem sempre dispostos a me ouvir e a me aconselhar.

Muito obrigada por serem os meus melhores Amigos!

Ao meu irmão Sandro Rogério de Abreu,

Você me faz tanta falta ... mas sei que a sua luz me ilumina me dando forças para continuar ... sempre.

Te amo e penso em você todos os dias da minha vida ...

Muito obrigada pelos momentos felizes ... pelos sorrisos ... por tantas boas lembranças que eu carrego comigo e até mesmo ... pela saudade ... por que até mesmo a saudade te torna presente em minha vida ...

Sei que está aqui ... participando desta conquista ...

"Olhos fechados
Pra te encontrar
Não estou ao seu lado
Mas posso sonhar
Aonde quer que eu vá
Levo você no olhar..."
(Paulo Sérgio Valle e Hbert Vianna)

Ao meu amor Oscar Emperador ...

Anjo, você surgiu inesperadamente ... e de forma surpreendente
foi ganhando espaço nos meus dias, nos meus pensamentos, nos
meus sonhos, nos meus planos, nas minhas vontades ... foi
entrando e ficando na minha vida de uma forma apaixonante ...
hoje ... tudo tem você ...

Obrigada amor pela companheirismo, pelo apoio nas noites de
estudo, pelas palavras de incentivo.

Obrigada por fazer parte de tudo isso ... é maravilhoso poder
ter você nessa conquista ...

Te amo

Obrigada a toda a família Emperador de Las Navas
Palazuelos Del Rio ...

Minha sogra "Maria do Rosário" tão doce, inteligente,
encantadora ... a "Mama".

Que família linda, iluminada, apaixonante ... cheia de crianças
que me encheram a minha vida de sorrisos, risadas, abraços
gostosos e sinceros ...

A toda a minha família ... aos meus tios, meus primos e primas, a minha avó ... todos que sempre torceram pelo meu sucesso ...

Dedico a todos os paciente com Distrofia Muscular ... exemplos de vida e força

Aos meus filhos "peludos" ... por me ensinarem todos os dias que o amor não tem nome, tamanho, cor ... que simplesmente é amor ... sempre ronronando ou com os "rabos" abanando ... me fazem rir e entender como é simples ser feliz ...

A todos os meus pacientes ...

Aos amados cães GRMD ...

Com vocês eu aprendi o verdadeiro valor da vida, aprendi a respeitar e entender a importância da pesquisa e o quanto devemos trabalhar com respeito, ética e dedicação. Vocês possuem um "dom" muito maior ... uma passagem muito mais significativa... vieram para tentar salvar ... para tentar trazer sorriso a famílias que muitas vezes já não tem esperanças ... Foi uma honra muito grande poder ter convivido com cada um de vocês ... muito obrigada por me tornarem um "ser humano" melhor ...

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus passos. Por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas que acreditaram em mim e me deram auxílio durante esta jornada.

Obrigada Pai.

À FAPESP por todo apoio financeiro e científico que me foi dado.

(FAPESP no 2011/13030-0).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor e amigo

Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

Primeiramente, por que foi meu mestre quem me deu esta oportunidade.

Nada disso estaria acontecendo se não fosse por você professor ... Me lembro claramente do primeiro dia em que fui a USP ... e você, sem saber nada sobre mim, me proporcionou a oportunidade de um estágio ... onde, após alguns meses, eu teria a oportunidade de plantar história, amigos, aprendizados que mudariam a minha vida para sempre ...

Muito obrigada por toda confiança depositada em mim, por sempre me apoiar, por todos os ensinamentos e dedicação. Espero, de verdade, ter alcançado suas expectativas como aluna, orientada e pessoa ... Muito obrigada por toda fraternidade e amizade, obrigada por me guiar nesta jornada, me mostrando sempre os melhores caminhos e assim me dando a oportunidade de crescer cada vez mais.

Hoje, o título que recebo ... é nosso ...

Gratidão eterna ...

AGRADECIMENTOS

A professora Cristina Massoco ... me faltam palavras ...

Quanta honra em ter sido coorientada por você professora. Quanto aprendizado me foi proporcionado ... Me recebeu de braços abertos, com todo o carinho, cuidado, atenção. Me acolheu, pegou em minhas mãos e me ensinou todos os protocolos que hoje compõem esta tese ... me ensinou a estudar imunologia, a entender e correlacionar, a "pensar" em ciência e como "fazer" ciência. E foi esse conjunto de ensinamentos que me permitiu construir esta tese...

Muito obrigada Cris ...

A professora Maria Angélica Miglino por ter me recebido e me proporcionado a oportunidade de cursar o mestrado e doutorado. Muito obrigada pela confiança em mim depositada. Fico muito feliz em saber que a senhora acredita e confia no meu trabalho ... isso me torna uma profissional mais confiante. A professora é meu exemplo de força e determinação.

Ao meu querido professor e amigo Dr. Áureo Evangelista Santana (UNESP-Jaboticabal), que me mostrou a "beleza" da pesquisa e a importância da ética na profissão. Carrego seus ensinamentos sempre comigo: "Nunca passe por um lugar sem que as pessoas te percebam".

Ao meu querido professor e amigo Dr. José Jurandir Fagliari (UNESP-Jaboticabal), que me ensinou o sentido de se trabalhar com amor e dedicação, da importância da determinação, contribuindo diretamente na minha formação profissional e pessoal.

A Dra. Nicole do Departamento de Patologia, por toda paciência e boa vontade em me ensinar e me ajudar durante as análises.

AGRADECIMENTOS

Ao queridíssimo professor Dr. David Feder, sempre tão presente em nosso canil. Muito obrigada professor por todo apoio!

A professora Dr. Patrícia Braga Baleeiro Beltrão e sua equipe por toda ajuda e ensinamento. Obrigada pela oportunidade de aprender com você e com sua equipe ... muito obrigada!!!

Aos professores Dr. Daniele Martins, Dr. Francisco Assis, Dr. José Roberto Kfoury, Dr. Felipe Perecin, Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, Dr. Flavio Vieira Meirelles, Dra. Paula de Carvalho Papa, Dr. Pedro Primo Bombonato.

A Dra Rose por todo auxílio em meu doutorado ... Ro, obrigada pela parceria no desenvolvimento deste projeto.

A toda a equipe do Hospital Veterinário da FMVZ-USP sempre pronta a nos auxiliar com os cães do canil GRMD- Brasil.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, por me proporcionar o melhor aprendizado durante o doutorado e a oportunidade da realização desta pesquisa, sempre amparada por excelentes profissionais.

AGRADECIMENTOS

**"... Amigo é coisa para se guardar
Debaixo de sete chaves
Dentro do coração ..."
(Fernando Brant e Milton Nascimento)**

Aqui plantei amigos ...

**nasceram árvores com raízae fortes, frutos doces, que me fazem
bem ... me enchem a alma de paz. Amigos que levarei para
sempre dentro do coração amizades que nem a distancia
poderá destruir ...**

Minha irmã Fabiele ... obrigada amiga ... e a você eu não agradeço apenas o auxílio na tese, mas a sua presença na minha vida ... sabemos que a nossa ligação é eterna, é espiritual ... amizade para todas as vidas ... somos unidas e nada pode abalar essa união. Muito obrigada amiga por todo apoio, força, aprendizado que me proporcionou ... por me ajudar nas horas mais difíceis ... é muito bom aprender com você ... muito obrigada minha amiga ...

Minha irmã Renata ... amiga ... nossa amizade vai além de qualquer barreira ... somos unidas e isso basta ... muito obrigada por toda a força que você me deu nesta jornada, e eu não falo apenas do doutorado ... e sim desde o dia em que eu entrei na USP e você me recebeu no canil com todo carinho. Ali, começava uma amizade eterna ... nos tornamos irmãs de coração e parceiras de trabalho. Parabéns pelo "ser humano" fantástico que você é, pela família linda que você o Luiz construíram e que hoje ... eu posso fazer parte ...

Ao meu amigo Marcos ... Marcão ... MVMS (segundo nossa amiga Re kkkkk) ou simplesmente Isauro. Meu parceiro ... você foi um irmão que Deus colocou na minha vida. Algumas pessoas chegam nas nossas vidas e se tornam importantes demais para ir embora, para serem esquecidas ... e você é assim para mim amigo. Muito obrigada por tudo ... pela paciência, pelos conselhos, pelos ouvidos emprestados kkkkk, pelas boas risadas que partilhamos em todos os momentos. Quando eu achava que ia chorar ... lá vinha você para me fazer dar risada ... obrigada amigo!!! Amigos para sempre ...

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo Luiz ... cunhado muito obrigada por toda a força que me deram, obrigada por me acolherem nos momentos difíceis, por estarem sempre de braços abertos quando precisei ... muito obrigada!!!

A minha parceira de longa data ... Aline ... Japa muito obrigada ... se não fosse sua compreensão e parceria ... esse meu sonho não estaria sendo realizado. Você faz parte de tudo isso e disso ... eu nunca me esquecerei ... sou eternamente grata a você ... muito obrigadaaa

A minha querida amiga Janaina Monteiro ... nunca esqueço de você ... Você foi a idealizadora de grande parte deste projeto ... sempre me ajudando, me orientando nas situações mais difíceis ... mostrando caminhos e colocando pessoas maravilhosas na minha vida ... muito obrigada ...

A minha amiga Francesliusa, ou simplesmente Natal kkkkk. Amiga muito obrigada por toda ajuda... pela parceria durante as longas noites de experimento ... você sempre disposta a me ajudar. Muito obrigada por ter sido minha amiga "do lar" kkkkkk. Parabéns pela pessoa fantástica que você é, inteligente, esforçada e competente!

A minha amiga Daniela ... Bragança kkkkk. Braguis obrigada por todo auxílio nas coletas amiga!!! Obrigada pela amizade e por sempre me ajudar nos momentos de sufoco no canil!!!

Aos meus amigos João e Leandro ... obrigada por toda ajuda no laboratório, por me auxiliar nas coletas. João muito obrigada pelos dias que você ficou até mais tarde na USP só para não me deixar sozinha no laboratório ... coisas que não tem como esquecer kkkk ... muito obrigada!

A minha amiga Thais ... Blessa kkkkk. Você é um dos maiores exemplos de organização e determinação que eu conheci miga. Focada, esforçada, competente ... enfim ... só tenho que

AGRADECIMENTOS

agradecer pela oportunidade de aprender com você!!! Amiga obrigada por toda ajuda ... você teve participação direta no desenvolvimento deste projeto. Além disso, nossa parceria rendeu bons frutos, artigos, resultados, aprendizados ... muito obrigada!!! Você é um sucesso!!!

A minha amiga Isabela... Isa obrigada por todo companheirismo nesta jornada ... obrigada por me ensinar e me ajudar no laboratório, por me apoiar e me incentivar em cada experimento ...

A minha mais nova amiga Kátia kkkkk Ka, muito obrigada pelo apoio nos momentos difíceis ... obrigada pelo incentivo!!!

A minha amiga Graciela Pignatari ... Gra obrigada por todo apoio no laboratório, pelas palavras de força e sabedoria ... obrigada pelos ensinamentos ...

A minha amiga Soninha ... por toda parceria, apoio ... você foi muito importante no desenvolvimento desse projeto

As minhas amigas Mariah, Maria Angélica-MA, Paulo, Jéssica, Rafael, Valdir, Márcio, Lara, Carol, Paula Fratini, Dayane, André, César e todos outros parceiro da pós!

Aos meus queridíssimos amigos Vanessa e João ... Van e Jonhy ... obrigada pela amizade ... é muito tê-los em minha vida nesta fase tão importante ... Van você é uma mulher fantástica, lutadora, inteligente e isso só me serviu de exemplo para lutar e conquistar!!!

Aos queridos amigos Marcelo, João Vitor e Adriana !!!

AGRADECIMENTOS

A toda minha família Vivaz: Aline, Ana, Sandra, Camila Bispo, Tatiane, Fabrícia, Daniele Miron, Daniele Akemi, Fabiana, André Held, Erick, Tarso, Patrícia, Eduardo, Camila Guerneli, Flávio, Bia, Camila, Pamela, Guilerme, Marcelo, Eliana ...

As minha querida tia Léo e família ... minha família do coração ... Obrigada por tudo tia !!!

As minha queridíssimas Rosa Helena e Silvia Lobo

Aos técnicos Ronaldo, Ednaldo (Índio), Diogo Palermo, Herculano, sempre dispostos a me auxiliar.

Ao meu querido Augusto ... obrigada por tudo Augusto, por todo cuidado e carinho que você tem pelos nossos cães do canil.

As minhas queridas Jaqueline Martins, Cláudia (pós-graduação) e Elza Fanquim (biblioteca) por todo auxílio, por me socorrem nas horas de desespero. Parabéns pela competência e profissionalismo.

A minha amiga Marina Moreira ... você me ajudou a dar o meu "primeiro passo". Muito obrigada!

A minha tia Miriam e minha amiga Paulinha ... vocês são muito especiais! Amo vocês!

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e da contribuíram para minha formação profissional, talvez aqui não citados, mas não esquecidos.

Muito obrigada!

RESUMO

ABREU, D. K. de. **Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça golden retriever sadios e afetados pela distrofia muscular.** [Immunomodulation *in vitro* of mesenchymal stem cells in dogs breed golden retriever healthy and affected by muscular dystrophy]. 2014. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma alteração neuromuscular hereditária e progressiva que afeta humanos do sexo masculino. O modelo canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) é considerado modelo experimental para estudos de novas propostas terapêuticas e melhor entendimento da fisiopatogênica da DMD. O processo progressivo da distrofia está relacionado com alterações nas populações celulares que compõe o sistema imune dos pacientes, pois devido a ausência da proteína distrofina na membrana sarcoplasmática, o músculo fica mais susceptível à lesões, ocorrendo liberação de citocinas, que recrutam e estimulam células do sistema imune, principalmente macrófagos e linfócitos T. A longo prazo, essa resposta inflamatória contínua e persistente, leva a uma série de reações que culminam com danos cada vez maiores, a ponto de ocorrer um esgotamento de células satélites e fibrose do tecido muscular. Uma das propriedades mais estudadas das células tronco mesenquimais (MSCs) é sua capacidade imunomoduladora, fazendo com que essas células se tornem promissoras na utilização da terapia celular. Neste contexto, esta ferramenta imunomoduladora pode atuar como uma estratégia interessante na manipulação do sistema imune. O estudo proposto foi elaborado com a finalidade de trazer subsídios para viabilização de experimentos de terapia celular na distrofia muscular, por meio do conhecimento sobre a imunomodulação durante o tratamento *in vitro*, contribuindo para uma possível aplicação terapêutica em humanos. Para tanto, foram estudados dois grupos de cães, um grupo controle (GR; n=5) e um grupo de cães afetados (GRMD; n=9), compostos por machos e fêmeas. O estudo consistiu na avaliação da proliferação de linfócitos na presença de MSC em diferentes concentrações, bem como da proliferação de linfócitos específicos como o Tauxiliar (CD4⁺FoxP3⁻) e Tregulatórios (CD4⁺FoxP3⁺) com as MSCs. Adicionalmente, realizamos a dosagem de nitrito com o intuito de quantificar a produção de óxido nítrico (NO) através do cocultivo de macrófagos com as MSCs. Neste estudo foi possível observar que as MSCs estimularam a proliferação significativa de linfócitos T

regulatórios. Adicionalmente, essa porcentagem de divisão aumentou em cocultivos que utilizaram maiores concentrações de MSC. Maior concentração de nitrito também foi encontrada no cocultivos de MSC e macrófagos estimulado com LPS. Estas informações geram incrementos no entendimento de como as MSCs podem agir no organismo distrófico e como poderemos explorar essa fonte para promover um retardamento no processo inflamatório e consequentemente melhorar a qualidade de vida do paciente.

Palavras-chave: Imunomodulação. Terapia celular. GRMD. Processo inflamatório. Sistema imune.

ABSTRACT

ABREU, D. K. de. **Immunomodulation *in vitro* of mesenchymal stem cells in dogs breed golden retriever healthy and affected by muscular dystrophy.** [Imunomodulação *in vitro* das células tronco mesenquimais em cães da raça golden retriever sadios e afetados pela distrofia muscular]. 2014. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive hereditary neuromuscular disorder that affects human males. The canine model Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) is considered experimental model for studies of new therapies and better understanding of the DMD. The process of progressive dystrophy is related to changes in cell populations that comprise the immune system of patients, because due to the absence of the protein dystrophin in the sarcoplasmic membrane, the muscle is more susceptible to injury, occurring release of cytokines that recruit and stimulate cell immune, mainly macrophages and T lymphocytes in the long term, this continuous and persistent inflammatory response, the system takes a series of reactions that culminate with increasing damage to the point of exhaustion of satellite cells of muscle tissue and fibrosis occur. One of the most studied properties of mesenchymal stem cells (MSCs) is their immunomodulatory capacity, making these cells become promising in the use of cell therapy. In this context, this immunomodulatory can act as an interesting strategy in manipulating the immune system. The proposed study was designed in order to provide support for the feasibility of cell therapy trials in muscular dystrophy, through the knowledge of immunomodulation during treatment *in vitro*, contributing to a possible therapeutic application in humans. In this purpose, two groups were studied, a group of affected dog (GRMD, n=9) and a control group (GR, n=5 GR). The study consisted of rating of lymphocyte proliferation in the presence of MSCs in different concentrations as well as the proliferation of specific lymphocytes as Thelper (CD4⁺FoxP3⁻) and Tregulatory (CD4⁺FoxP3⁺) to MSCs. In addition, the dosage of nitrite performed in order to quantify the production of nitric oxide (NO) by coculture with macrophages MSCs. In this study we observed that MSCs stimulated significant proliferation of regulatory T lymphocytes. Additionally, this percentage split increased cocultivos that used higher concentrations of MSC. Highest concentration of nitrite was also found in cocultivos of MSC and macrophages stimulated with LPS. This information generates

increments in understanding how MSCs may act in the body dystrophic and how we exploit this source to promote a delay in the inflammatory process and consequently improve the quality of life of patients.

Keywords: Immunomodulation. Cell therapy. GRMD. Inflammatory response. Immune system.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos experimentais utilizados no experimento	55
Quadro 2 - Identificação dos animais que participaram do experimento	55
Quadro 3 - Análises realizadas	57
Quadro 4 - Anticorpos primários e secundários utilizados para caracterizar as células tronco obtidas da medula óssea fetal canina.....	60
Quadro 5 - Anticorpos utilizados para a caracterização das células tronco mesenquimais através da citometria de fluxo.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Heredograma representando as possibilidades de nascimento oriundo de uma mulher portadora do gene causador da distrofia muscular e um homem normal.....	37
Figura 2 - Desenho esquemático representando o complexo distrofina-glicoproteínas.....	38
Figura 3 - Heredograma representando as possibilidades de nascimento oriundo de uma cadela portadora do gene causador da distrofia muscular.....	41
Figura 4 - Esquema representativo da fisiopatogenia da DMD	50
Figura 5 - Coleta da medula óssea de fetos caninos	58
Figura 6 - Demonstração do protocolo de linfoproliferação com o CFSE	66
Figura 7 - Esquema representativo do protocolo de linfoproliferação na presença das células tronco mesenquimais	67
Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de cocultivo dos macrófagos na presença de células tronco mesenquimais.....	69
Figura 9 - Esquema representativo da placa well utilizada para o teste de Griess	70
Figura 10 - Fotomicrografia do cultivo celular das células oriundas da medula óssea de feto canino	74
Figura 11 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência dos diferentes tipos de proteínas de filamento presentes nas células progenitoras da medula óssea	75
Figura 12 - Gráfico de histograma referente a caracterização das células tronco mesenquimais.....	76
Figura 13 - Gráfico de histograma referente a pluripotencia das células tronco mesenquimais	77
Figura 14 - Imagens referentes ao exame de ecocardiograma nos animais pertencentes ao estudo	87
Figura 15 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD com (A, C e E) e sem luz polarizada (B, D e F)	89

Figura 16 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD	90
Figura 17 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD	91
Figura 18 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD.	92
Figura 19 - Fotomicrografia de corte longitudinal (em A e B) e transversais (C, D, E e F) de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD	93
Figura 20 - Microscopia eletrônica de transmissão em corte longitudinal de músculo estriado.....	94
Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão em cortes longitudinais do músculo estriado de animais pertencentes aos grupos GR (A e B), GRMD (C, D, E, F, G, H)	95
Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão de animais pertencentes aos grupos GRMD.....	96
Figura 23 - O gráfico de Dot plot	97
Figura 24 - O gráfico de Dot plot	98
Figura 25 - O gráfico A demonstra o gate de linfócitos que proliferaram, e em B, está representado o histograma referente à linfoproliferação.....	100
Figura 26 - Gráfico de histograma de células mononucleares do sangue periférico representativa dos linfócitos cultivados por 72 horas com concanavalina A e fitohemaglutinina (A e A').....	101
Figura 27 - Gráfico de dot plot da proliferação de células mononucleares	103
Figura 28 - Perfil das amostras marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo. Picos representando as gerações referente a linfoproliferação. Cada geração representa uma divisão celular.....	104
Figura 29 - Fotomicrografia do cocultivo celular das MSC com os linfócitos.....	105
Figura 30 - Fotomicrografia do cocultivo celular das MSC com os macrófagos .	108
Figura 31 - Curva padrão referente a concentração de nitrito	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores referentes a proliferação celular durante as passagens.....	78
Tabela 2 - Eritrograma e leucograma do grupo GR - São Paulo - 2014.....	79
Tabela 3 - Análises bioquímicas do grupo GR - São Paulo - 2014	80
Tabela 4 - Eritrograma e leucograma do grupo GRMD - São Paulo - 2014	81
Tabela 5 - Análises bioquímicas do grupo GRMD - São Paulo - 2014.....	81
Tabela 6 - Valores encontrados no exame ecocardiográfico dos animais pertencentes ao grupo GRMD.....	85
Tabela 7 - Valores encontrados no exame ecocardiográfico dos animais pertencentes ao grupo GR	86
Tabela 8 - Valores médios da porcentagem, desvio-padrão (DP), valores máximos (Vmáx) e mínimos (Vmín) referentes aos linfócitos regulatórios (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺) do sangue periférico dos grupos GR e GRMD	98
Tabela 9 - Valores médios referentes a proliferação dos linfócitos obtidas sem estímulo, com concanavalina A (ConcA) e com fitohemaglutinina (PHA). DP – desvio padrão	101
Tabela 10 - Índice de divisão linfocitária (x100), nos grupos estudados, analisados pelo programa FlowJo.....	104
Tabela 11 - Valores médios $\pm$ DP, referentes a porcentagem de divisão linfocitária (%) dos animais pertencentes ao grupo GR, analisados pelo programa FlowJo.....	106
Tabela 12 - Valores médios $\pm$ DP, referentes a porcentagem de divisão linfocitária (%) dos animais pertencentes ao grupo GRMD, analisados pelo programa FlowJo.....	106
Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão, referentes a dosagem de nitrito (uM) no sobrenadante dos cultivos.....	109

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Gráfico de barras representando os valores médios para os marcadores pluripotência expressos nas células de medula óssea canina (OCT $\frac{3}{4}$, SSEA 4, STRO-1 e NANOG) e para caracterização das células como mesenquimais (CD44, CD117, CD90, CD105, CD45 e CD34)	77
Gráfico 2 -	Proliferação das MSCs (células x 10^5) da medula óssea de fetos de cães durante 4 passagens	78
Gráfico 3 -	Concentrações médias dos leucócitos (/uL) dos cães pertencentes aos grupos GR e GRMD.....	82
Gráfico 4 -	Concentrações médias séricas da ALT e AST (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GR e GRMD.....	82
Gráfico 5 -	Concentrações médias séricas da CK (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GRI, GRII, GRMDI e GRMD II	83
Gráfico 6 -	Representação gráfica dos valores médios referentes a fração de encurtamento obtida pelo exame de ecocardiograma no animais pertencentes aos grupos GR e GRMD	87
Gráfico 7 -	Gráfico representativo das concentrações médias das subpopulações linfocitárias CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ dos cães pertencentes aos grupos GR e GRMD.....	99
Gráfico 8 -	Gráficos representando os valores médios das proliferação de todos os linfócitos (A), dos linfócitos CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ (B) e dos CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ (C) dos cães pertencentes aos grupo GR e GRMD	107
Gráfico 9 -	Gráfico referente as concentrações medias e desvio padrão das concentrações em uM nos sobreadantes analisados.....	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	REVISÃO DE LITERATURA	37
4.1	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD).....	37
4.2	MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DAS DISTROFIAS MUSCULARES.....	39
4.3	SISTEMA IMUNE E INFLAMAÇÃO MUSCULAR.....	43
4.4	INFLAMAÇÃO MUSCULAR E TERAPIA CELULAR	48
5	MATERIAL E MÉTODO	54
5.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	54
5.2	COLETA DE AMOSTRAS	55
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	56
5.4	ANÁLISES	56
5.4.1	ETAPA 1 - Cultivo e caracterização das células tronco mesenquimais	57
5.4.1.1	Coleta de células da medula óssea de feto canino	58
5.4.1.2	Cultivo celular das células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea	59
5.4.1.3	Caracterização das células tronco.....	60
5.4.1.3.1	<i>Imunocitoquímica das células tronco mesenquimais</i>	60
5.4.1.3.2	<i>Citometria de Fluxo das células tronco mesenquimais</i>	60
5.4.1.4	Curva de crescimento e análise microscópica das células tronco mesenquimais	62

5.4.2	ETAPA 2 - Avaliação clínica dos animais	61
5.4.2.1	Hemograma.....	62
5.4.2.2	Bioquímicos séricos.....	62
5.4.2.3	Função cardíaca.....	63
5.4.2.4	Análise microscópica da musculatura	64
5.4.2.4.1	<i>Microscopia de luz</i>	60
5.4.2.4.2	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	60
5.4.3	ETAPA 3 - Avaliação da resposta imunológica in vitro	64
5.4.3.1	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	65
5.4.3.2	Imunofenotipagem linfocitária CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ do sangue periférico	65
5.4.3.3	Estudo da linfoproliferação	66
5.4.3.3.1	<i>Protocolo de linfoproliferação na presença de células tronco mesenquimais</i>	60
5.4.3.3.2	<i>Imunofenotipagem dos linfócitos que proliferaram durante o cocultivo com as MSCs</i>	60
5.4.3.3	Cocultivo dos macrófagos com as MSCs in vitro.....	69
5.4.3.4	Cocultivo dos macrófagos com as MSCs in vitro.....	69
5.4.3.4.1	<i>Cocultivo in vitro de macrófagos na presença das MSCs</i>	69
5.4.3.4.2	<i>Dosagem do nitrito no sobrenadante dos cocultivos</i>	71
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	71
6	RESULTADOS	73
6.1	ETAPA 1 – 6.1 CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE FETO CANINO	73
6.1.1	Coleta de células da medula óssea de feto canino normal e cultivo celular das MSCs	73
6.1.2	Caracterização das MSCs	76
6.1.2.1	Ensaio imunocitoquímico das MSCs	76

6.1.2.2	Ensaio por citometria de fluxo das células tronco mesenquimais.....	76
6.1.3	Ensaio de curva de crescimento	76
6.2	ETAPA 2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS.....	79
6.2.1	Hemograma e Bioquímicos séricos	83
6.2.2	Função cardíaca	83
6.2.3	Análise microscópica da musculatura	83
6.2.3.1	Microscopia de luz.....	83
6.2.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	95
6.3	ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA IN VITRO.....	96
6.3.1	Imunofenotipagem e quantificação linfocitária CD4⁺FoxP3⁺ do sangue periférico	96
6.3.2	Estudo da proliferação linfocitária <i>in vitro</i>	100
6.3.2.1	Protocolo de linfoproliferação com CFSE (5, 6- carboxifluoresceína diacetato succimidil éster) sem a presença de MSCs.....	100
6.3.2.2	Estudo da proliferação linfocitária <i>in vitro</i> - Protocolo de linfoproliferação com CFSE (5, 6- carboxifluoresceína diacetato succimidil éster) com a presença de células tronco mesenquimais - piloto.....	103
6.3.2.2.1	<i>Proliferação dos linfócitos totais, CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3</i>	106
6.4	COCULTIVO DOS MACRÓFAGOS COM AS MCSS IN VITRO.....	107
6.4.1	Avaliação do sobrenadante do cocultivo dos macrófagos com as MSCs – dosagem de nitrito	108
7	DISCUSSÃO	112
8	CONCLUSÕES	124
	REFERENCIAS	126

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma alteração neuromuscular, podendo ser hereditária em humanos, com herança ligada ao cromossomo X, que afeta, aproximadamente, um em cada 3.500 a 6.000 indivíduos do sexo masculino (HOFFMAN et al., 1988; SUSSMAN, 2002; BEYTIA; VRY; KIRSCHNER, 2012). É de caráter recessivo, sendo causada pela ausência ou disfunção da distrofina, proteína encontrada numa variedade de tecidos, principalmente nas musculaturas esquelética e cardíaca, nervos e regiões específicas do sistema nervoso central (HOWELL et al., 1997).

O modelo canino *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD) é o modelo animal mais similar a DMD humana. Por ser geneticamente homólogo a ela, compartilha seu quadro de miopatia severa e desenvolvimento clínico letal, sendo considerado o melhor modelo experimental para estudos de novas propostas terapêuticas e melhor entendimento da fisiopatogenia da doença (HAINSEY et al., 2003; VAINZOF et al., 2008; AMBRÓSIO et al., 2009). Clinicamente, caracteriza-se por severa alteração na musculatura esquelética, resultando em morte precoce do indivíduo acometido (VAINZOF et al., 2008).

A ausência de distrofina desencadeia a ruptura da membrana sarcoplasmática, causando o influxo de cálcio e posterior ativação de protease endógena com a ativação da cascata inflamatória (COLLINS; MORGAN, 2003). O evento inflamatório tem por função destruir ou reduzir o agente lesivo, restaurando a função do tecido lesado. Entretanto, em algumas condições o processo inflamatório pode se cronificar e promover a perda da função, onde há alterações e destruição dos tecidos subjacentes (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; MELLO, LAURINDO 2000). Conseqüentemente, ocorrem necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo (KORNEGAY et al., 2003).

Estudo de nosso grupo revelou alterações sanguíneas com relação às populações linfocitárias e as concentrações séricas das proteínas de fase aguda de cães GRMD, evidenciando as alterações imunológicas sofridas durante o processo inflamatório frente à lesão muscular (ABREU, 2010).

Até o momento, se desconhece uma terapia efetiva que possa bloquear ou reverter a progressão da distrofia muscular. Assim, a busca de terapias que possam

melhorar a qualidade de vida do paciente, retardando a progressão da doença, é de grande valia (COHN et al., 2007).

As células tronco mesenquimais (MSCs) apresentam capacidade imunomoduladora (RASMUSSEN, 2006; UCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2006; REN et al., 2012), podendo atuar na proliferação linfocitária e na resposta imunológica frente a lesão muscular. Entretanto, sua ação imunomoduladora sobre a inflamação que ocorre na distrofia muscular é pouco estudada. Adicionalmente, a literatura referente à utilização das células tronco nos modelos animais, nos permite questionar se as MSCs promoveriam uma imunossupressão ou imunoestimulação neste modelo, e quais seriam as subpopulações linfocitárias mais alteradas, deduzindo desta forma se, após a injeção de células tronco mesenquimais, ocorreria um retardo na degeneração muscular e conseqüentemente, melhora na qualidade de vida do paciente distrófico.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador *in vitro* das células tronco mesenquimais nas subpopulações linfocitárias do sangue periférico de cães da raça Golden Retriever normais e afetados pela distrofia muscular, bem como o comportamento dos macrófagos, na presença dessas células tronco através da dosagem de nitrito no sobrenadante do cocultivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e certificar os padrões clínicos dos cães GRMD.
- Coletar, cultivar e caracterizar as células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de feto canino.
- Avaliar a capacidade linfoproliferativa dos linfócitos T de cães afetados e normais, tratados *in vitro* com as células tronco mesenquimais.
- Avaliar a capacidade linfoproliferativa dos linfócitos T CD4⁺ FoxP3⁺ de cães afetados e normais, tratados *in vitro* com as células tronco mesenquimais.
- Avaliar a capacidade linfoproliferativa dos linfócitos T CD4⁺FoxP3⁻ de cães afetados e normais, tratados *in vitro* com as células tronco mesenquimais.
- Avaliar a produção de nitrito por macrófagos na presença das células tronco mesenquimais.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

O uso das células tronco como aplicação terapêutica tem sido um campo emergente nas atualidades, visto que as mesmas tem se mostrado extremamente promissoras para o tratamento de diversas doenças. Além disso, as MSCs apresentam a interessante capacidade de serem imunomoduladoras, podendo atuar na proliferação linfocitária e na resposta imunológica frente a injúrias. Considerando este contexto e o fato de sua ação imunomoduladora sobre a inflamação que ocorre na distrofia muscular ser pouco estudada, acreditamos que essas células possam causar algum efeito retardatório no processo de degeneração muscular através da proliferação de linfócitos T regulatórios e da interação com macrófagos. Desta forma, essa ferramenta imunomodulatória poderá ser uma estratégia interessante na manipulação do sistema imune.

REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

As doenças neuromusculares são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações nos genes codificadores de proteínas musculares sarcolêmicas, sarcoméricas, e citosólicas, resultando em degeneração progressiva, regeneração limitada, fibrose de miofibrilas e consequentemente perda progressiva da capacidade motora (BERGMAN et al., 2002; VAINZOF et al., 2008).

Figura 1 - Heredograma representando as possibilidades de nascimento oriundo de uma mulher portadora do gene causador da distrofia muscular e um homem normal

Fonte: ABREU, D.K. 2013.

Notas: Sendo X*(vermelho) cromossomo feminino com mutação genética.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum desordem neuromuscular recessiva em humanos associada ao cromossomo "X" (Figura 1). Trata-se de uma enfermidade letal e progressiva, relacionada a uma mutação no gene responsável pela expressão da proteína distrofina (THOR; TERRYBORRY, 2003). A distrofina é uma proteína periférica da membrana plasmática expressa em tecidos musculares e cérebro, que se encontra associada ao complexo distrofina-

glicoproteína (DGC- *Dystrophyn 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). 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 (Figura 2) (ERVASTI et al., 1990; ERVASTI; CAMPBELL, 1991).

Figura 2 – Desenho esquemático representando o complexo distrofina-glicoproteínas

Pacientes com DMD apresentam distrofina ausente ou severamente diminuída na membrana sarcoplasmática, tornando-a mais instável, principalmente durante a contração (BEENAKKER, 2005). De acordo com Valentine et al. (1990), o músculo sem a distrofina fica mais susceptível a lesões induzidas pelo exercício, evidenciada pelo rápido influxo de enzimas musculares. Como consequência pode ocorrer inflamação muscular, necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo, resultando em perda muscular progressiva, não apenas da musculatura esquelética, mas também de músculo cardíaco e sistema nervoso (VALENTINE et al., 1990).

Na maioria dos casos de DMD, o diagnóstico pode ser estabelecido através do histórico familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos, podendo ser utilizados eventualmente, exames eletrofisiológicos e histológicos. Os níveis enzimáticos, principalmente de creatina quinase (CK), biópsia muscular e análise de DNA são amplamente explorados na caracterização da doença (CAROMANO, 1999).

Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de buscar melhoras clínicas nos pacientes DMD (REUTENAUER et al., 2008; FERNANDES, 2012; ARAÚJO et al., 2013). Embora o defeito na DMD seja conhecido, as funções exatas da distrofina não são totalmente entendidas, e a seqüência de eventos moleculares que levam a lesão celular ainda não foi completamente elucidada (MARQUES, 2004).

4.2 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DAS DISTROFIAS MUSCULARES

As formas de distrofias musculares associadas ao cromossomo X onde há ausência de distrofina, foram descritas em humanos e outras espécies como camundongos *mdx*, cães e gatos (HOFFMAN; GOROSPE, 1991). Além disso, um maior número de organismos geneticamente manipulados para distrofia muscular tem sido gerado. Esses animais geralmente apresentam alterações fisiológicas freqüentemente observadas em pacientes humanos e podem ser usados como instrumentos importantes para a genética, clínica, e os estudos histopatológicos, fornecendo pistas importantes para a compreensão da patogênese desses transtornos (VAINZOF et al., 2008). Assim, o uso de modelos animais em doenças genéticas constitui um instrumento valioso para a elucidação dos mecanismos de doenças e de tratamentos experimentais.

O *mdx*, um modelo muito utilizado, apresenta vantagens para o estudo da DMD, visto que são animais de fácil manejo, relação custo benefício vantajosa, permite a utilização de um “n” maior, além da ausência de afetividade com relação aos animais. Entretanto, se pensarmos no modelo canino, o primeiro ponto a ser considerado é a extrema semelhança clínica no desenvolvimento da doença além do

peso do animal, muitas vezes semelhante ao de uma criança com DMD. Este fato se torna muito interessante se considerarmos estudos com injeção de célula tronco e o tempo de migração das mesmas para o nicho, bem como o estudo medicamentoso e seu efeito metabólico.

Desde as primeiras descrições, a mutação do gene da distrofina no GRMD tem sido identificada e então, este modelo tem sido reconhecido e amplamente utilizado nas avaliações experimentais de novos tratamentos previamente aos estudos clínicos em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2005; MCCLOREY et al., 2006; KERKIS et al., 2008; YANG et al., 2012; SHIN et al., 2012).

A obtenção deste modelo experimental é feita mediante o cruzamento de uma fêmea portadora do gene causador da distrofia com um macho afetado (GRMD), gerando machos normais, fêmeas portadoras e machos e fêmeas afetados (Figura 3) (NGUYEN et al., 2002). Ainda é possível confecção da colônia mediante o cruzamento de um macho normal com uma fêmea portadora, entretanto, neste caso não haverá a possibilidade do nascimento de fêmeas afetadas.

Figura 3 – Heredograma representando as possibilidades de nascimento oriundo de uma cadela portadora do gene causador da distrofia muscular

Fonte: ABREU, D.K. 2013.

Legenda: (X*X) e um cão macho normal (XY) ou um macho afetado (X*Y). Sendo X*(vermelho) cromossomo feminino com mutação genética.

A patogênese do GRMD se manifesta intra-útero e pode ser identificada a partir do nascimento, progredindo rapidamente entre os três e seis meses de idade (KORNEGAY et al., 1994; COLLINS; MORGAN, 2003).

O estágio inicial da doença é caracterizado pela presença de grupos focais de miofibrilas necrosadas, hipertrofia muscular e altos níveis de CK. No primeiro dia de vida, os cães afetados já são diagnosticados através da dosagem de CK, que se encontra acentuadamente elevada na maioria dos casos (VALENTINE et al., 1990; CHILDERS et al., 2001, 2002; ABREU, 2010; FERNANDES, 2012).

Embora muitos filhotes possam morrer durante o período neonatal, dentre os sobreviventes, ao redor dos dois meses de idade, podem ser constatados sinais de regeneração muscular verificável pela imaturidade do tecido muscular através de imunohistoquímica (NGUYEN et al., 2002). Com a progressão da doença, repetidos ciclos de degeneração diminuem a capacidade de regeneração das células satélites e mecanismos fibróticos causam o progressivo depósito de tecido fibroso e adiposo.

As lesões musculares se caracterizam por necrose maciça, que afeta principalmente os músculos da cabeça, pescoço e membros. Os cães afetados desenvolvem marcha compensatória, caracterizada por passadas rígidas e curtas, resultantes do desequilíbrio dos músculos agonistas e antagonistas da marcha, ou ainda uma marcha típica descrita como “salto do coelho. Podem ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos, além de se cansarem facilmente. A maior parte da musculatura esquelética torna-se atrófica, porém, certos grupos musculares e a língua apresentam-se com hipertrofia, justificando o quadro de disfagia, sialorréia e regurgitação (VALENTINE et al., 1986; COOPER et al., 1988; NGUYEN et al., 2002). De acordo com Valentine et al. (1990), as lesões no músculo da língua podem se iniciar ainda na vida intra-uterina. Abreu (2010) relatou alteração nos níveis séricos da proteína de fase aguda Proteína C-reativa já no sangue do cordão umbilical.

Adicionalmente, outros sistemas possuidores de órgãos musculares e não musculares também podem estar alterados em humanos e animais distróficos. Estudos realizados discorreram sobre aumentos de tensão observados na veia porta hepática, bem como flacidez da parede da vesícula biliar ocasionada pela ausência do gene da distrofina em camundongos *mdx* (BRAZEAU; MATHEW; ENTRIKIN, 1992). Além disso, também relataram síndrome de má absorção e processos diarreicos atribuídos à disfunção pancreática em humanos e alterações estruturais e/ou funcionais em outros órgãos nos demais modelos de estudo (NOWAK; IONASESCU; ANURAS, 1982; BAROHN et al., 1988; MIYATAKE et al., 1989;

GRANDO et al., 2009; ABREU et al., 2012). Gatti (2007) relatou a presença de hepatomegalia, esplenomegalia, nefromegalia, efusão peritoneal, mineralização das glândulas adrenais, espessamento da porção muscular do diafragma, hipoecogenicidade do parênquima hepático e hiperecogenicidade da cortical e medular renal em GRMD.

De forma semelhante aos humanos com DMD, os cães GRMD apresentam comprometimento da função respiratória e cardíaca (BIGGAR et al., 2002; AMBRÓSIO et al., 2009; LESSA et al., 2014 No prelo¹). Frequentemente, esses animais morrem de falência cardio-respiratória, embora possam alcançar muitos anos de vida (BIGGAR et al., 2002; AMBRÓSIO et al., 2009).

4.3 SISTEMA IMUNE E INFLAMAÇÃO MUSCULAR

A função fisiológica do sistema imune é prevenir e/ou erradicar infecções e responder a injúrias que o organismo possa sofrer. Adicionalmente, sua importância para a vida pode ser ilustrada pela observação de que indivíduos imunologicamente comprometidos são susceptíveis à variadas infecções, que podem colocar em risco a vida do paciente. Desta forma, o sistema imune deve agir rapidamente através do processo inflamatório agudo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TIZARD, 2008).

O processo inflamatório também altera populações celulares mediante a ativação e a migração direcionada de variadas células, principalmente neutrófilos e macrófagos, da corrente sanguínea para os locais lesionados, garantindo que as células e as moléculas defensivas concentrem-se rapidamente na lesão tecidual (TIZARD, 2008; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A inflamação é desencadeada quando o organismo percebe que está sendo invadido por um patógeno ou está ocorrendo morte celular devido a lesões teciduais. Assim, o sistema imune inato deve reconhecer não apenas padrões moleculares associados à patógenos, mas também moléculas liberadas de tecidos lesionados, como as citocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

¹ LESSA, T. B.; ABREU, D. K.; RODRIGUES, M. N.; BRÓLIO, M. P.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Morphological and ultrastructural evaluation of the golden retriever muscular dystrophy trachea, lungs, and diaphragm muscle. **Microscopy Research Technique**, 2014. Aug 1. doi: 10.1002/jemt.22408.

Muitos estudos tem demonstrado o aumento considerável da expressão de genes envolvidos com a resposta inflamatória em músculos distróficos (PORTER et al 2001, 2003), bem como aumento de citocinas e moléculas de adesão (KUMAR; BORIEK, 2003; WEHLING-HENRICKS; LEE; TIDBALL, 2004; CHEN et al., 2005; ACHARYYA et al., 2007; VIDAL et al., 2008).

A liberação de citocinas ocorre principalmente, por células do sistema imune que atuam no processo inflamatório que ocorre durante a injúria muscular (EVANS et al., 2009a). Neste contexto, recebem destaques células como macrófagos e linfócitos que se infiltram no músculo distrófico (McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990; SPENCER et al., 2001; WEHLING et al., 2001; EVANS et al., 2009b). Vários estudos tem demonstrado que macrófagos e linfócitos T CD4⁺ são as principais células do sistema imune que se infiltram no músculo ditrófico em crianças com idade entre 2 e 8 anos (ARAHATA; ENGEL, 1988a,b; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990; GOROSPE et al., 1994;. CONFALONIERI et al., 2003; PINTO-MARIZ et al., 2010).

Os macrófagos apresentam uma resposta bimodal (TROIDL et al., 2009). Inicialmente temos a ativação de macrófagos pró inflamatórios ou M1, que atuam na lise muscular, mediante a produção de NO e citocinas como IL-1b, IL-6 e TNF alpha (WEHLING et al., 2001; VILLALTA et al., 2009). Em um segundo estágio, inicia-se a fase de remodelamento através da ativação de macrófagos anti-inflamatórios ou M2. Um processo de imunorregulação se inicia através da expressão de IL-10, TGFbeta e VEGF estimulação de proliferação de células satélites (MARTINEZ et al., 2006; NAHRENDORF et al., 2007; BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008; LAMBERT; LOPEZ; LINDSEY, 2008; TIDBALL; VILLALTA, 2010).

Assim, neste estágios, os macrófagos controlam a inflamação e contribuem diretamente para a reparação dos tecidos lesionados (CHAZAUD et al., 2003; ARNOLD et al., 2007; ICHIM et al., 2010; BERG et al., 2011; BRACK; RANDO, 2012). Estudos em camundongos mostram que os M1 estão associados com necrose muscular, enquanto que, os M2 estão associados com regeneração das miofibras (ST PIERRE; TIDBALL, 1994; VILLALTA et al., 2009).

Desta forma, M1 produzem moléculas efetoras e citocinas inflamatórias, participando como células indutoras e efetoras na resposta dos linfócitos T auxiliar 1. Enquanto que M2 participam das reações de polarização dos linfócitos T auxiliar 2 e

estão envolvidos na “cura” ou regeneração, apresentando funções imunomoduladoras (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007; VILLALTA et al., 2011).

Assim, os macrófagos apresentam um papel crucial no tecido lesionado, com sua dupla habilidade, onde, durante o processo de inflamação muscular, a resposta tecidual sofre alterações, passando de um processo de destruição dos miócitos para um processo de reparação (WANG et al., 2004; TIZARD, 2008; POLLARD, 2010; KHARRAZ et al., 2013).

No entanto, como no musculo distrófico a lesão é constante, esta resposta inflamatória é contínua, contribuindo para a progressão da doença. Isso se explica pelo fato de que em estágios posteriores às lesões, citocinas produzidas pelas células musculares também podem contribuir para a ativação prolongada de macrófagos (TIDBALL; VILLALTA, 2010). Segundo Kumar e Sharma (2010) e Tidball e Villalta (2010), tanto as células musculares como os macrófagos produzem TNF alpha e IFN gama, e desta forma, o aumento da produção destas citocinas, resulta na ativação dos M1 e redução da transição de M1 para M2. Villalta et al., em um estudo realizado em 2011 evidenciaram que IFN ainda atenua a proliferação de células satélites. Destarte, IL10 estimulam a produção de M2 no musculo mdx, atuando assim, como citocinas antiinflamatórias (VILLALTA et al., 2009, VILLALTA et al. 2011).

Segundo Wehling et al. (2001), depleção de macrófagos em camundongos mdx promovem uma redução acentuada das fibras musculares lesionadas, sugerindo o papel crucial destas células na progressão das lesões.

Uma das moléculas de sinalização que ganham destaque na homeostase do músculo esquelético é NO, um mensageiro gasoso gerado pela atividade catalítica das sintases de óxido nítrico (NOS), dos quais existem três isoformas: a isoforma I ou neuronal (nNOS) (presente no cérebro), a isoforma II ou induzível (iNOS) (sendo induzida nos macrófagos e outras células mediante o estímulo de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) ou citocinas e a isoforma III ou endotelial (eNOS) (presente em células endoteliais) (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). A isoforma I e III são reguladas por mensageiros e a isoforma II é induzível pelas citocinas e produtos de origem bacteriana (ROVERE-QUERINI et al., 2013). Como mediador, o NO atua na vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão, entendimento e formação de memória, além de atividades anti-tumoral e anti-infecciosas (DUSSE;

VIEIRA; CARVALHO, 2003). Assim, tem grande relevância na neurotransmissão, na atividade anti-inflamatória e nos processos de dilatação vascular (RICART-JANÉ et al., 2002). NO reage com moléculas biológicas e oxigênio, gerando uma variedade de produtos como o nitrito e nitrato que podem ser mensurados quantitativamente (ROMITELLI et al., 2007).

O músculo esquelético expressa todas estas isoformas, sendo que a nNOS é a mais abundante em fibras musculares e interage diretamente com o complexo ditrofina-glicoproteínas (DE PALMA; CLEMENTI, 2012).

Em organismos distróficos, a nNOS está ausente do sarcolema, e transferida para o citosol, evidenciando o papel crucial do NO na função muscular (BRENMAN et al., 1995; CHANG et al., 1996). Além disso, a ação da NO na respostas inflamatórias, tem sido intensivamente investigada devido a sua complexidade de ação (TRIPATHI; KASHYAP; SINGH, 2007).

O NO controla muitas vias e eventos de sinalização no reparo muscular e a deficiência em gerar NO é um dos eventos chave nas distrofias musculares (BUONO et al., 2012; RIGAMONTI et al., 2013; ZORDAN et al., 2013). Além disso, a restauração da produção de NO melhora o fenótipo distrófico (WEHLING et al., 2001; WEHLING-HENRICKS; TIDBALL, 2011).

Farini et al. (2007) em seu estudo com *mdx*, conseguiram correlacionar a ausência de linfócitos T e B, com a perda de fibrose e redução de TGF-beta1 (Transforming Growth Factor), sugerindo a importância da modulação do sistema imune na DMD. Assim, a observação que os linfócitos T se infiltram nos músculos, bem como suas acentuadas variações séricas na distrofia, tem aumentado o interesse sobre o seu papel neste processo (GUSSONI et al., 1994; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2005; ABREU, 2010).

Os linfócitos são células arredondadas com um grande núcleo que desempenham um papel muito importante na defesa do organismo, podendo ser encontrados nos órgãos linfóides, no sangue e espalhados sob as superfícies mucosas (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Existem três principais tipos de linfócitos: as células natural killer (NK) que atuam na imunidade inata e representam de 5 a 10% dos linfócitos sanguíneos; os linfócitos B que são responsáveis pela imunidade humoral mediante a produção de anticorpos e representam de 10 a 40% dos linfócitos sanguíneos e os linfócitos T que regulam a imunidade adquirida sendo

responsáveis pela imunidade celular e correspondem de 60 a 80% dos linfócitos sanguíneos. Adicionalmente, existem diversas subpopulações linfocitárias com diferentes características e funções. Essas subpopulações podem ser identificadas por meio de suas moléculas de superfície características cujo padrão é denominado imunofenótipo. Normalmente cada molécula apresenta uma denominação, sendo que o sistema de nomenclatura CD (cluster of Designation – denominação de grupamento) fornece números sequenciais para cada molécula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TIZARD, 2008; MARINARO et al., 2010).

Entre os linfócitos T, os linfócitos CD4⁺ mais comumente encontrados são chamados de linfócitos T *helper* ou auxiliares porque produzem citocinas que estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos e estimulam as células fagocitárias a agirem. Dentre os linfócitos T CD4⁺, temos os linfócitos que inibem a resposta imune, agindo como reguladores, denominados linfócitos Treg ou reguladores (WEGIENKA et al., 2009). Já os linfócitos T CD8⁺ ou T citotóxicos promovem a lise de células infectadas por agentes infecciosos intracelulares (NOKAZI et al., 2006; TIZARD, 2008).

O balanço entre imunidade e tolerância é importante para manter a homeostase do sistema imune. Diferentes tipos de células reguladoras têm sido descritas, incluindo os linfócitos T CD4⁺CD25⁺*foxP3* (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; FONTENOT et al., 2005). Os Treg ativados podem suprimir linfócitos T de maneira antígeno não-específico. Os efeitos supressivos dessas células não são restritos ao sistema imune adaptativo (linfócitos T e B), mas podem também influenciar a ativação e a função de células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos, células dendríticas). Os linfócitos Treg adaptativos são induzidos por antígenos e exercem sua função através da secreção de citocinas inibitórias (como IL-10 e TGF- β) (MALOY; POWRIE, 2001).

Vários estudos tem demonstrado que respostas dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ melhoraram após a remoção da cultura de linfócitos T reg (AANDAHL et al., 2004; KINTER et al., 2007). Outro estudo mostra uma positiva correlação entre a frequência de linfócitos T reg e não progressão da doença, argumentando que os linfócitos T reg suprimem a redução da resposta inflamatória e a replicação e propagação viral (ANDERSSON et al., 2005; APOIL et al., 2005).

A distribuição das subpopulações linfocitárias caninas varia com a idade, sendo que a porcentagem de linfócitos T aumenta com a mesma (FALDYNA et al., 2003; HOGENESCH et al., 2004; REIS et al., 2005). Byrne et al. (2000), em um estudo realizado com sangue de cordão umbilical (SCU) de cães da raça Beagle com 18 meses de idade, observaram que o valor médio de CD4 (45%) foi maior do que o CD8 (28,8%).

De fato, linfócitos T CD4⁺ possuem uma função central na proteção imune. Depressão na circulação de linfócitos T CD4⁺, embora transitório, afetam tanto a imunidade humoral como a mediada por células, comprometendo assim a geração ou manutenção da resposta imune efetiva (ZHU; PAUL, 2008; BLUESTONE et al., 2009).

Abreu (2010) observou o aumento das subpopulações linfocitárias CD4⁺ e CD5⁺, bem como a presença de maior concentração sérica das proteínas de fase aguda em cães com distrofia muscular, evidenciando o caráter inflamatório progressivo e severo da doença.

Muitas pesquisas começaram a fornecer discernimento sobre o complexo “células inflamatórias e músculo esquelético” após dano muscular agudo (BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008; VILLALTA et al., 2009; SHIN et al., 2013; CHO et al., 2014)(No prelo)². Antígenos específicos de linfócitos T e B também desempenham um papel crítico nas miopatias inflamatórias progressivas. Estudos futuros nas diferentes populações celulares e os fatores que elas produzem, serão cruciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e aprimoramento dos tratamentos de doenças musculares degenerativas, sozinhas ou em combinação com terapia celular.

4.4 INFLAMAÇÃO MUSCULAR E TERAPIA CELULAR

O catabolismo do músculo esquelético adulto é lento (SCHMALBRUCH; LEWIS; CHIR, 2000). No entanto, estabilidade da musculatura esquelética muda

² CHO, D. I.; KIM, M. R.; JEONG, H. Y.; JEONG, M. H. YOON, S. H.; KIM, Y. S.; AHN, Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1-M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. **Experimental & Molecular Medicine**, doi:10.1038/emmm.2013.135, 2014.

rapidamente após uma lesão. A “recuperação” muscular após injúria é caracterizada por duas fases: degeneração e regeneração. Se a injúria muscular for induzida por trauma direto, atividade física intensa ou defeito genético, o processo é caracterizado por dano no sarcolema da miofibrila, resultando em aumento da permeabilidade da mesma. É bem sabido que a fase degenerativa do músculo esquelético pode ser detectada pelo aumento dos níveis séricos das proteínas musculares como a creatinaquinase e outras proteínas restritas ao citoplasma da miofibrila (SORICHTER et al., 2001). Outro processo da fase de degeneração é a infiltração de leucócitos na região lesionada (LEFAUCHEUR; SEBILLE, 1995; NGUYEN; TIDBALL, 2003; TIDBALL, 2005).

As células musculares apresentam capacidade regenerativa em resposta à injúria tecidual através da participação ativa das células satélites (HAWKE; GARRY, 2001; COLLINS et al., 2005). Entretanto, essa habilidade é perdida na DMD devido à exaustão das mesmas durante os ciclos repetitivos de degeneração e regeneração. Embora a mutação na distrofina represente a causa primária da DMD, há um processo secundário envolvendo uma inflamação persistente e prejuízo na regeneração, exacerbando a progressão da doença (Figura 4) (TIDBALL, 2005).

Figura 4 – Esquema representativo da fisiopatogenia da DMD

Alterações na ativação, proliferação ou diferenciação das células satélites, bem como situações de lesões musculares progressivas, podem prejudicar a capacidade de regeneração muscular (VILLALTA et al., 2009; TIDBALL; VILLALTA, 2010; BERG et al., 2011; BRACK; RANDO, 2012; NITAHARA-KASAHARA et al., 2012).

O interesse no estudo das células tronco (SC) está relacionado com as possibilidades que as mesmas oferecem para a medicina regenerativa, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual, podendo ser aplicadas em terapias para diversas doenças. O objetivo da medicina regenerativa é a de substituir ou restaurar a função normal das células, tecidos e órgãos que estão danificados por alguma doença.

As SC apresentam a propriedade de auto renovação, ou seja, capacidade de originar outra SC com características idênticas, a habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular e a capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002). Assim, as SC são células indiferenciadas capazes de se diferenciar originando

progenitores maduros, bem como células efetoras completamente diferenciadas (LEMOLI et al., 2005).

As MSCs são células tronco adultas, progenitoras de origem estromal isoladas da medula óssea e outros tecidos adultos como tecido adiposo, rim, fígado, tecido papilar (GÖTHERSTRÖM et al., 2003; INT' ANKER et al., 2004; MEIRELLES; NARDI, 2006) e tecidos fetais como cordão umbilical e placenta (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; IGURA et al., 2004). Essas células são capazes de aderência, auto renovação e potencial de diferenciação de multilinhagens em adipócitos, condrócitos, mioblastos e osteócitos (DOMINICI et al., 2006).

Adicionalmente, grupos de pesquisadores evidenciaram que as células extraídas de medula óssea podem tornar-se precursores de células neurais e hepáticas, além dos três tipos de músculos – cardíaco, esquelético e liso (FERRARI et al., 1998; BONILLA et al., 2005).

As propriedades imunomodulatórias das MSCs tem se tornado foco de estudo para muitas doenças, visto que podem desempenhar funções importantes na tolerância à transplantes, autoimunidade, invasão tumoral, assim como, tolerância materno fetal (DI NICOLA et al., 2002; LIU et al., 2004; XUAN; WATSON; MENG, 2005; ZAPPIA et al., 2005; RASMUSSEN, 2006; UCCELLI, 2006; COMOLI et al., 2007; DJOUAD; PLENCE; BONY, 2007; MANOCHANTR et al., 2012; REN et al., 2012).

Uma explicação relevante para a regeneração tecidual após aplicação de SC é a liberação de citocinas e fatores tróficos no local da lesão. Como a maioria das SC são capazes de identificar e migrar até o local lesionado, é clara sua capacidade de responder a fatores quimiotáticos, liberados pelo tecido lesionado. Há ainda evidências de que estas células, por sua vez, podem ser capazes de liberar outras moléculas em resposta aos estímulos recebidos (FALLON et al., 2000; ZAPPIA et al., 2005).

Há varias hipóteses quanto às supostas funções de tais fatores na lesão, dentre elas: liberação de moléculas que previnem a morte celular, recrutamento de SC adjacentes do próprio tecido (com subsequente diferenciação), interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual (modulando a resposta do sistema imune) e suporte de moléculas ou enzimas que suprem defeitos metabólicos (FALLON et al., 2000; KERR et al., 2003; KELLY, 2004; MUÑOZ-ELIAS et al., 2004).

As MSCs expressam marcadores CD44, CD29, CD105, CD73, CD 90 e CD166 e não expressam marcadores de superfície celular de células tronco hematopoiéticas (CD45 e CD34), de monócitos (CD14) e nem de linfócitos (CD3 e CD45) (PITTENGER et al., 1999). Entretanto, independente de sua origem, possuem certo padrão de positividade para variadas moléculas como M-CSF (Colony Stimulating Factor-1 in Macrophages), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IFN (interferon), IL-6 (interleucina-6), IL-3 (interleucina-3), IL-4 (interleucina-4) e IL-11 (interleucina-11) (HAYNESWORTH; BABER; CAPLAN, 1996). Assim, as MSCs apresentam função imune bimodal indicando suas habilidades para exercer efeitos imunomoestimulatórios ou imunossupressivos (RASMUSSEN et al., 2007; REN et al., 2012).

As MSCs regulam a atividade das funções linfocíticas. Esses efeitos podem, por exemplo, incluir a inibição da proliferação dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, com reduzida expressão de marcadores de ativação (LE BLANC et al., 2004; ZAPPIA et al., 2005) ou ainda inibição da proliferação e diferenciação de linfócitos B (CORCIONE et al., 2006).

Vários estudos tem demonstrado que sob estímulos, as MSCs podem induzir o aumento da produção de IL-10 e TGF-beta (NASEF et al., 2007; COMOLI et al., 2007; KLYUSHNENKOVA et al., 2005), IL-6 (COMOLI et al., 2007) e IFN-gama (KLYUSHNENKOVA et al., 2005) e diminuição da produção de IL-5 (COMOLI et al., 2007), além de TNF-alfa (KLYUSHNENKOVA et al., 2005). Neste contexto, vale ressaltar que o TGF-beta possui efeito regulador, podendo por exemplo, induzir e estabilizar a expressão de foxP3⁺ em células Treg (TANG; BLUESTONE, 2008).

O grande interesse no estudo desta propriedade das MSCs e no benefício que a mesma pode trazer em determinadas doenças, principalmente as relacionadas, direta ou indiretamente, com o sistema imune, tem aumentando o número de pesquisas na área e nos faz questionar como essa terapia promoveria alterações na resposta inflamatória do paciente distrófico e de que forma poderia melhorar a qualidade de vida dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

O projeto proposto foi conduzido após aprovação pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) – Processo n. 2512/2011.

5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A proposta consiste no estudo de dois grupos de cães da raça Golden Retriever, um grupo de cães saudáveis (grupo controle - GR) e um grupo de cães afetados pela distrofia muscular (grupo GRMD).

Para os grupos GR e GRMD foram avaliados 5 e 9 animais respectivamente, incluindo machos e fêmeas (Quadro 1).

Os cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular (GRMD) são pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil localizado no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, coordenado pela Profa. Dra. Maria Angélica Miglino. Os diagnósticos de distrofia muscular foram realizados pela equipe do Canil GRMD Brasil do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, através da genotipagem de acordo com Bartlett et al. (1996).

Os cães normais, da raça Golden Retriever, são oriundos de proprietários que se dispuseram a participar do projeto.

Todos os animais envolvidos no experimento foram mensalmente avaliados para garantir que se encontravam dentro dos parâmetros de saúde preconizados, bem como assegurar que não houvesse nenhum distúrbio que pudesse interferir no estudo. Estes animais foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene e recreação.

Quadro 1 - Grupos experimentais utilizados no experimento

Animais	Grupos	N
Controle	GR	5
Afetado	GRMD	9

Os animais foram identificados pela letra A (afetados) e C (controle), de acordo com o quadro 2.

Quadro 2 - Identificação dos animais que participaram do experimento

GR	GRMD
C1 (Taylor)	A1 (Bis)
C2 (Bento)	A2 (Zezinho)
C3 (Max)	A3 (Balú)
C4 (Luna)	A4 (Liz)
C5 (Calvin)	A5 (Mousse)
	A6 (Bis)
	A7 (Totó)
	A8 (Vanderléia)
	A9 (Ana Maria)

5.2 COLETA DE AMOSTRAS

Para os grupos estudados foi realizado a coleta de sangue por intermédio da punção da veia cefálica ou jugular de cada animal. O volume total foi dividido em dois tubos, um sem anticoagulante e outro com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético dissódico 10% - EDTA).

As biópsias dos fragmentos musculares foram realizadas no músculo vasto lateral ou bíceps femoral nos cães afetados e controle, com o auxílio de punch 5mm. 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 e anestesia local infiltrativa à base de Cloridrato de Lidocaína 2% (Lidol 2%®, Hipolabor) (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. Para a medicação pós operatória foi utilizado Meloxicam (Maxican®, Fort Dogde) (0,1 mg/kg), por via oral durante 3 dias e Cefalexina (Cefalexina® –genérico, Eurofarma) (30mg/Kg) a cada 12 horas por 7 dias. O fragmento muscular destinado a histologia e a imunohistoquímica foram fixados em paraformaldeído a 4% e pequenos fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído para processamento da microscopia eletrônica de transmissão.

As anestесias foram realizadas pelo médico veterinário Greyson Esper e o procedimento cirúrgico pela médica veterinária Dilayla Kelly de Abreu.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi dividido em três etapas:

1. **Etapa 1.** Coleta da medula óssea de fetos caninos, isolamento e cultivo das MSCs oriundas da medula óssea, bem como caracterização destas células.
2. **Etapa 2.** Avaliação clínica dos animais utilizados no experimento, mediante realização de hemograma, bioquímicos séricos, análises musculares e avaliação cardíaca
3. **Etapa 3.** Avaliação da resposta imunológica in vitro por meio do estudo da linfoproliferação durante o cocultivo com as MSC e da dosagem de nitrito durante o cocultivo dos macrófagos de animais afetados e controles com as MSC.

5.4 ANÁLISES

As análises laboratoriais realizadas estão listadas no quadro 3.

Quadro 3 – Análises realizadas

Etapas	Etapas	Análises
Etapa 1	MSC	Coleta, cultivo e caracterização
Etapa 2	Avaliação clínica dos cães	Exame físico periódico
		Hemograma e bioquímicos séricos
		Avaliação microscópica da musculatura: coloração He, AT, PS, MET
		Ecocardiograma
Etapa 3	Avaliação da reposta imunológica <i>in vitro</i>	Linfoproliferação com CFSE: linfócitos T, linfócitos CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , linfócitos CD4 ⁺ FoxP3 ⁻
		Análise de nitrito no sobrenadante do cocultivo dos macrófagos com as MSCs

Legenda: He - Coloração hematoxilina-eosina; AT - Coloração Azul de Toluidina; PS - Coloração Picro-sírius; MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão; MSC – Célula tronco mesenquimal; NO – Óxido nítrico.

5.4.1 ETAPA 1 - Cultivo e caracterização das células tronco mesenquimais

5.4.1.1 Coleta de células da medula óssea de feto canino

Para a coleta da medula óssea fetal canina, foram utilizados úteros de fêmeas caninas grávidas oriundas de campanhas de castração, efetuadas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de São Paulo. Os úteros foram coletados mediante a realização de ovariectomia nas fêmeas devidamente sedadas com 0,1 mg/Kg de acepromazina (Acepran, Univet), 0,5 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands) e 20 mg/Kg de quetamina (Dopalen, Vetbrands).

O material coletado foi armazenado e transportado em gelo para o Laboratório de Célula Tronco - LCT. Os úteros foram seccionados para a remoção dos fetos. Para o isolamento das células da medula óssea foi realizado, primeiramente a coleta de medula óssea mediante a dissecação do membro pélvico e torácico. Após remoção do fêmur, tibia, úmero, rádio e ulna, foram removidas as epífises distais e proximais e o canal medular foi lavado com auxílio de seringa contendo meio DMEM-High e estreptomicina a 1% (Figura 5). A solução obtida foi

centrifugada 1800 rpm, durante 5 minutos. O pellet de celular foi ressuspendido em meio de cultura e as células foram plaqueadas em cultivadas em meio de cultura composto por DMEM High Glucose [4,5 g/L], com L-Glutamina [4,00 mM], suplementado com 0,1% de piruvato de sódio [CH₃COCO₂Na], 1% aminoácido não essencial NEAA, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (streptomicina, penicilina e anfotericina).

Figura 5 - Coleta da medula óssea de fetos caninos

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Em A, separação dos ossos do feto e lavagem em solução de PBS com antibiótico. Em B, lavagem do canal medular com meio DMEM-High e antibiótico, com o intuito de extrair todo o conteúdo medular.

5.4.1.2 Cultivo celular das células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea

O pellet celular obtido da medula óssea foi cultivado em placas de cultivos de 30mm de diâmetro. Após 24 horas de cultivo, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, com o intuito de remover as células mortas e debris celulares, permanecendo na placa apenas as células aderentes. As células foram incubadas e cultivadas a 37,0° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

O repique celular foi realizado utilizando a enzima tripsina (0,25%), quando as células atingiam uma confluência de aproximadamente 80%. Para este procedimento as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas na tripsina por cinco minutos a 37,0° C. Após estes processo as células em suspensão foram

centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e o pellet obtido foi ressuspensionado em meio de cultura completo descrito anteriormente. Em seguida, foi realizada a contagem das células viáveis utilizando o azul de trypan. Após, as células eram plaquadas e cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

A caracterização das células utilizando ensaios imunocitoquímicos e citometria de fluxo foram realizados quando as células atingiram a quarta passagem. Neste momento, as células foram criopreservadas no nitrogênio líquido utilizando um meio composto por 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO.

5.4.1.3 Caracterização das células tronco

5.4.1.3.1 *Imunocitoquímica das células tronco mesenquimais*

Aproximadamente 1×10^4 células provenientes do cultivo celular primário foram cultivadas em placas com 24 poços de cultivo, sob lamínula de vidro. Após 24 horas, as células foram lavadas com solução de PBS por três vezes durante 5 minutos. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por uma hora em geladeira. Após fixação as células foram lavadas 3 vezes em solução de TBS (20mM Tris-HCl, 0,15 M, NaCl e Tween-20 a 0,05%) e as células foram permeabilizadas com Triton X-100 à 0,1% por 15 minutos. Em seguida foi realizado o bloqueio utilizando 5% de solução de BSA por 30 minutos.

Após esse período o anticorpo primário foi incubado overnight à 4°C. Terminado este período, as células foram lavadas em TBS por mais três vezes e incubadas com anticorpos secundários por 40 minutos em câmara escura em temperatura ambiente. Para finalizar as células foram lavadas novamente e as lamínulas foram montadas utilizando a solução de montagem Vectashield com DAPI. As análises dos resultados foram feitas através do microscópio de fluorescência. Esse experimento foi realizado em duplicatas e os anticorpos primários e secundários utilizados estão especificados no quadro 4.

Quadro 4 - Anticorpos primários e secundários utilizados para caracterizar as células tronco obtidas da medula óssea fetal canina

ANTICORPO	CARACTERÍSTICAS	
Nestina (N)	Nestin (Rat-401): sc-33677	Santa Cruz Biotechnology
Vimentin (M+)	Vimentin (o.N.602):sc-73259	Santa Cruz Biotechnology
CK18 (E)	CYTOKERATIN 18 (RGE53): sc-32329	Santa Cruz Biotechnology
CD34 (M-)	antihCD34 Phycoerythrin conjugated mouse IgG1	RD Systems
CD90 (M+)	antihCD90/Thy-1 Phycoerythrin conjugated mouse IgG2A	RD Systems
PCNA	PCNA (PC10): sc56	Santa Cruz Biotechnology
anti-Mouse	anti-Mouse IgG –FITC	Amersham Biosciences
anti-Goat	anti-Gouti IgG- FITC CONJUGATED (SC2356)	Santa Cruz Biotechnology

Legenda: (N) – neuronal; (M+) - mesenquimal; (M-) - negativo para mesenquimal; (E) – epitelial

5.4.1.3.2 Citometria de Fluxo das células tronco mesenquimais

Após cultivo e expansão as células foram tripsinizadas, inativadas com soro fetal bovino e colocada em tubos de 15 mL em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e UV durante 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado à 1000rpm durante 10 minutos para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e ressuspendido em 5 mL solução salina 0,9% para lavagem, centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o tampão FACS Flow foi acrescentado, a suspensão de células tumorais foram transferidas para tubos de citometria, e 1µl de anticorpos primário citados na tabela 1 (CD44, CD45, CD34, CD105, CD117, SSEA, OCT 3/4, NANOG, Stro-1, CD90) foram adicionados, uma incubação de 2 horas a 4°C foi realizada. Após esse procedimento 1µl de anticorpo secundário específico foi adicionado. As análises de expressão foram realizadas no Citômetro de Fluxo FACS Calibur em 10.000 eventos, e as aquisições analisadas pelo programa Flow Jo. A expressão de marcadores foi determinada pela

comparação com um isotipo controle marcado com o fluorocromo Alexa flúor 488 FITC ou PE inespecífico (Quadro 5).

Quadro 5 - Anticorpos utilizados para a caracterização das células tronco mesenquimais através da citometria de fluxo

Anticorpo	Fafricante
OCT 4	Abcam®
NANOG	Abcam®
CD34	Abcam®
CD44	Abcam®
CD90	Abcam®
CD45	Abcam®
CD117	Abcam®
CD105	Abcam®
STRO-1	Abcam®
SSEA	Abcam®

5.4.1.4 Curva de crescimento e análise microscópica das células tronco mesenquimais

Foi realizada a avaliação do crescimento celular através da curva de crescimento com a finalidade de avaliar a capacidade de expansão e replicação celular. A contagem foi realizada a cada 24 horas entre cada tripsinização.

5.4.2 ETAPA 2 - Avaliação clínica dos animais

Considerando que o comportamento do sistema imune pode variar constantemente devido a fatores externos ou mesmo internos, como ocorrência de infecções secundárias e outras patologias, os animais pertencentes ao estudo foram avaliados clinica e laboratorialmente durante as coletas.

5.4.2.1 Hemograma

As análises hematimétricas e leucométricas foram realizadas no laboratório Hemovet situado na Rua José Macedo, 98 no Parque São Lucas em São Paulo.

Para realização de hemograma, foi utilizado o ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10% como anticoagulante. As amostras de sangue foram avaliadas pelo método de diluição e contagem manual em câmara de Neubauer (Câmara de Neubauer ImprovedBrightLine) que foi examinada à luz da microscopia óptica, utilizando-se microscópio (Nikon Eclipse E-200) com aumento de 400x para contagem de hemácias e com aumento de 100x para contagem de leucócitos. Esfregaços de sangue foram preparados e corados pelo corante Wright, para estudo dos elementos figurados do sangue. Em seguida, as preparações citoscópicas foram examinadas à luz da microscopia óptica, utilizando-se microscópio com aumento 1000x (imersor) para diferenciação e contagem dos leucócitos. O volume globular foi avaliado pela técnica do microhematócrito.

5.4.2.2 Bioquímicos séricos

As análises bioquímicas séricas foram realizadas no laboratório Hemovet situado na Rua José Macedo, 98 no Parque São Lucas em São Paulo. As análises bioquímicas séricas foram feitas em amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado. Utilizando o sistema Labtest (LABTEST Diagnostica S.A. – Lagoa Santa) para diagnóstico, alíquotas das amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método de Jaffé modificado - Método do picrato alcalino); uréia (UV-cinética – pelo método do diacetil modificado); proteína total (Biureto); albumina (Verde de Bromocresol); fosfatase alcalina (Roy modificado); alaninaminotransferase (UV – cinético); cálcio (Labtest); fósforo (Daly e Ertingshausen); bilirrubina (Sins-hom); colesterol (Labtest); e creatinina quinase (UV-cinético).

5.4.2.3 Função cardíaca

Os animais afetados foram analisados pelo Dr Kaleizu Teodoro Rosa, CRMV 9054, no canil GRDM – Brasil, enquanto que os animais controle foram avaliados pelo Dr André Held, CRMV 22935, na Clínica Veterinária Vivaz 24 horas Ltda.

Para a realização do exame ecocardiográfico, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo com o transdutor sobre o tórax, para a obtenção das imagens através da janela paraesternal direita e paraesternal esquerda cranial e caudal. Uma grossa camada de gel era aplicada entre a pele do animal e o transdutor, para diminuir a interferência que o ar exerce no exame ultra-sonográfico.

5.4.2.4 Análise microscópica da musculatura

5.4.2.4.1 *Microscopia de luz*

Os fragmentos da biópsia foram fixados em paraformoldeído a 4% por 24 horas. Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol (70 a 100%) e xilóis para diafanização, utilizando-se procedimento convencional, para inclusão em parafina.

Foram realizados cortes de 3 mm em micrótomo (Leica RM 2065®) para obtenção das lâminas. Foram utilizadas as colorações de Hematoxilina-eosina (HE) e Azul de Toluidina para análise estrutural e das características histopatológicas do músculo distrófico e a de Picrossírius para quantificação do colágeno. As lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

Na quantificação do colágeno serão padronizados fotos de cada corte, na lente objetiva de 40x. A imagem de cada campo será digitalizada e tratada com luz polarizada, de forma a contrastar o colágeno da coloração de fundo por limiar de cor.

Foi realizado a biópsia muscular em todos os animais pertencentes ao estudo.

5.4.2.4.2 *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

As amostras pós fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% 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*. Após, foram lavados em solução salina e imersos em acetato de uranila (Polyscience®, Inc. USA)

overnight. Em seguida, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e resina e foram 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 foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D - Phillips).

5.4.3 ETAPA 3 - Avaliação da resposta imunológica in vitro

5.4.3.1 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue foi coletado pela veia cefálica por meio de seringa contendo heparina. Após esse procedimento, o sangue foi diluído em PBS (phosphate buffer solution) na mesma proporção e depositado lentamente sob o Ficoll-Paque em um tubo falcon na proporção de 2:1. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 20 minutos e as células mononucleares foram coletadas na interface 1077 com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. As células coletadas foram lavadas em PBS, ressuspensas em volume conhecido de RPMI 1640 e contadas com Azul de trypan.

5.4.3.2 Imunofenotipagem linfocitária CD4⁺FoxP3⁺ do sangue periférico

Após a separação das células mononucleares pelo Ficoll-Paque, as mesmas eram lavadas três vezes com PBS durante 5 minutos a 2000 rpm. Após a última lavagem, o sobrenadante era descartado e o pellet de células ressuspensas em 100 µL de PBS. Os tubos eram separados adequadamente para a incubação com os anticorpos conjugados CD4 e FoxP3. Assim, os tubos cujas células fossem marcadas pelo anticorpo CD4 (APC) eram incubados com 5 µL do mesmo durante 30 minutos no escuro.

Após a incubação, foi realizado uma nova lavagem com PBS e os pellets que deveriam ser incubados com o anticorpo FoxP3 (PE) foram ressuspensos em uma solução fix/perm na proporção de 1:3 durante 3 horas, para permitir a incubação posterior durante 30 minutos. Em seguida, foi realizado 3 lavagens com o buffer na proporção 1:3 de água destilada. O pellet foi ressuspensionado em 300 μ L de PSB para aquisição no citometro.

5.4.3.3 Estudo da linfoproliferação

Para a avaliação da linfoproliferação, utilizamos o método de incorporação de CarboxyFluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE), no qual as células marcadas podem ser cultivadas e a proliferação avaliada.

O CFSE se liga de forma covalente a moléculas intracelulares através da carboxifluoresceína, um corante fluorescente. Portanto, quando uma célula marcada com CFSE entra em divisão, a sua progênie carrega metade do número de moléculas marcadas com carboxifluoresceína e desta forma cada divisão celular consegue ser avaliada medindo-se a diminuição correspondente da fluorescência emitida por cada célula e a técnica de citometria de fluxo.

O protocolo de linfoproliferação foi realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada, com a colaboração da Profa Dra Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

Após a contagem das células mononucleares, estas foram incubadas em 3 μ L de carboxifluoresceína Vybrant (Invitrogen) a 37°C, durante 30 minutos. Em seguida a reação foi interrompida com a adição de RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibiótico (1%). Foi adicionado 190 μ L desse meio em cada poço da placa (placa well de 96 poços). O experimento foi realizado em triplicata. Para cada amostra foram utilizados 9 poços: 3 poços apenas com células, 3 poços com células e 10 μ L de concanavalina A e 3 poços com células e 10 μ L de fitohemaglutinina,

com o intuito de comparar a ação da concanavalina A (5 μ g/mL) e fitohemaglutinina (10 μ g/mL) no nosso modelo de estudo (Figura 6).

As amostras foram distribuídas na seguinte ordem:

1. linfócito
2. linfócito com CFSE
3. linfócito com concanavalina A
4. linfócito com fitohemaglutinina

Figura 6 - Demonstração do protocolo de linfoproliferação com o CFSE

ABREU, D.K., 2013

Notas: Em A, observar a nuvem de células mononucleares (seta vermelha), pertencentes a interface 1077, obtidas após a centrifugação do sangue periférico. Em B, notar o pellet de células mononucleares da interface 1077 (seta rosa). Em C, após a incubação com o CFSE, observar a coloração verde fluorescente que é conferida ao pellet de células (seta rosa). Em D, a redistribuição dos linfócitos ressuspensos em meio RPMI completo nos poços da placa. Após 36 horas de cultivo, os linfócitos eram adquiridos pelo citômetro e avaliados pelo programa Flow Jo (E).

5.4.3.3.1 Protocolo de linfoproliferação na presença de células tronco mesenquimais

Para avaliar o linfoproliferação, foram plaqueadas (placas de 24 "wells"), duas concentrações diferentes de MSC, sendo 1×10^4 e 5×10^4 . Após 24 horas, foi realizado a coleta do sangue periférico com posterior isolamento das células mononucleares previamente marcadas com o CFSE. Em seguida, 5×10^4 de mononucleares foram depositadas sobre os poços com as MSCs. Após 72 horas o sobrenadante foi coletado e adquirido no citômetro para avaliação linfoproliferativa (Figura 7). Foram realizadas quatro tipos de cultivos diferentes (além dos controles negativos):

1. apenas linfócito
2. linfócito com PHA
3. linfócitos com MSCs $1,0 \times 10^4$
4. linfócitos com MSCs $5,0 \times 10^4$

As análises foram realizadas no programa Flow Jo.

Figura 7 - Esquema representativo do protocolo de linfoproliferação na presença das células tronco mesenquimais

ABREU, D.K., 2013

5.4.3.3.2 *Imunofenotipagem dos linfócitos que proliferaram durante o cocultivo com as MSCs*

Após 72 horas do cocultivo, os sobrenadantes eram coletados e centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensionado em 100 µL de PBS. Os tubos eram separados adequadamente para a incubação com os anticorpos conjugados CD4 e FoxP3. Os tubos cujas células fossem marcadas pelo anticorpo CD4 (APC) eram incubados com 5 µL do mesmo durante 30 minutos no escuro.

Após a incubação, foi realizada uma nova lavagem com PBS e os pellets que deveriam ser incubados com o anticorpo FoxP3 (PE) foram ressuspensionados em uma solução fix/perm na proporção de 1:3 durante 3 horas, para permitir a incubação posterior durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada 3 lavagens com o buffer na proporção 1:3 de água destilada. O pellet foi ressuspensionado em 300 µL de PSB para aquisição no citômetro.

5.4.3.4 Cocultivo dos macrófagos com as MSCs in vitro

5.4.3.4.1 *Cocultivo in vitro de macrófagos na presença das MSCs*

O sangue foi coletado pela veia cefálica por meio de seringa contendo heparina. Após esse procedimento, o sangue foi diluído em PBS (phosphate buffer solution) na mesma proporção e depositado lentamente sob o *Ficoll-Paque* (1077g/dL) em um tubo falcon na proporção de 2:1. As células foram centrifugadas a 2000 rpm durante 20 minutos e as células mononucleares foram coletadas na interface 1077 com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. As células coletadas foram lavadas em PBS, ressuspensionadas em volume conhecido de DMEM-HIGH suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico e foi realizada a contagem na câmara de Neubauer. Foram plaqueadas $2,0 \times 10^6$ células mononucleadas em 24 wells com 500 microlitros de meio em cada poço e colocadas

em cultivo na estufa por 5 horas. Após, o sobrenadante com as células em suspensão (linfócitos) foram descartados com o intuito de permanecer apenas as células que aderiram, os monócitos. Em seguida, foram adicionados novamente 500 uL de meio DMEM-HIGH suplementado, sendo que metade dos poços recebeu LPS na concentração de 1ug/uL. As células foram mantidas em cultivo por 5 dias para que os monócitos se transformem em macrófagos (Figura 8).

Após os 5 dias, aproximadamente $5,0 \times 10^4$ MSCs foram plaqueadas. Após 12 e 24 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20C para posterior análise de nitrito.

Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de cocultivo dos macrófagos na presença de células tronco mesenquimais

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Para tanto o experimento foi realizado em duplicata e em quatro diferentes condições:

1. Macrófago
2. Macrófago com MSC
3. Macrófago com LPS
4. Macrófago com LPS e MSC

5.4.3.4.2 Dosagem do nitrito no sobrenadante dos cocultivos

Foi utilizado a reação de Griess composta por uma mistura de sulfanilamida 2% e NED 0,2%. Sulfanilamida reage com o nitrito da amostra para formar um sal que reage com o NED para produzir o “purple-azo-dye” com pico de absorbância de 540nm (RICART-JANÉ et al., 2002; TATSCH et al., 2011). Os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e armazenados em eppendorf a -20C.

Para as análises do NO, as aliquotas eram descongeladas. O experimento foi realizado em placa de 96 “wells” de fundo chato. Todo as amostras foram testadas em duplicata. Para a confecção da curva padrão, foi colocado 1 uL de nitrite standard em 1000 uL de meio DMEM. Foi adicionado 100 uL desta solução em duplicata e em outros poços adicionados 50 uL de DMEM também em duplicata. A partir dos poços com a solução diluída, foi-se redistribuindo 50 uL para os poços sucessivos, fazendo desta forma, uma diluição seriada (Figura 9).

Nos demais “wells”, foram adicionados 50 uL do sobrenadante e 50 uL da solução de sulfanilamida mantendo 5 minutos no escuro. Após, foi adicionado 50 uL de NED e aguardado mais 5 minutos. A leitura foi realizada com uma absorbância de 520 n.

Figura 9 - Esquema representativo da placa well utilizada para o teste de Griess

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Legenda: A coluna 1 e 2 foram utilizadas para a construção da curva padrão em diluição seriada.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises foram realizadas por comparação de médias através do teste t de student e Teste de Tukey e o sistema utilizado foi o Statistical Analysis System (SAS).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 ETAPA 1 – 6.1 CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE FETO CANINO

6.1.1 Coleta de células da medula óssea de feto canino normal e cultivo celular das MSCs

As células tronco utilizadas no experimento foram obtidas através da coleta da medula óssea de fetos normais. Vinte e quatro horas após o cultivo primário observamos grande quantidade de células mortas em suspensão na placa (Figura 10A). Portanto, a cultura foi lavada com PBS 1x para eliminar estas células mortas e debris celulares, mantendo na placa somente as células aderentes, ou seja, vivas.

Após 3 dias do cultivo primário observamos células com morfologias variadas, desde fusiformes até estreladas. Entretanto, as células apresentavam predominantemente formato fibroblastóide, sendo fusiformes alongadas e regulares, com ou sem prolongamentos citoplasmáticos. Já as células estreladas eram irregulares e achatadas. Adicionalmente, observamos grânulos em seu citoplasma e núcleo ovóide. Após 5 dias do cultivo as células apresentavam confluência adequada para a realização da primeira passagem.

A criopreservação das MSC oriundas da medula óssea de feto canino foi realizada após a quarta passagem, onde observamos células mais estáveis. As tripsinizações eram necessárias a cada 3 dias, onde as células atingiam uma confluência de 80%. (Figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografia do cultivo celular das células oriundas da medula óssea de feto canino

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Em A, notar a presença de células em suspensão, não aderidas à placa células Em B notar a predominância de células em formato fusiforme (seta vermelha). Em C e D, intensa confluência celular. Em E, notar a presença de células fusiformes e estreladas com prolongamentos citoplasmáticos.

6.1.2 Caracterização das MSCs

6.1.2.1 Ensaio imunocitoquímico das MSCs

As células oriundas da medula óssea isoladas do aspirado medular fetal, foram submetidas aos ensaios de fluorescência para caracterização imunofenotípica. Podemos observar a imunopositividade para a vimentina citoqueratina-18, nestina, PCNA, CD 90, CD 34 (Figura 11). Essas análises foram confirmadas também por meio da citometria de fluxo.

Figura 11 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência dos diferentes tipos de proteínas de filamento presentes nas células progenitoras da medula óssea

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Observar a imunopositividade no citoplasma das células para o anticorpo vimentina (A), CK 18 (B), PCNA (C), Nestina (D), CD 90 (E), CD34 (F), Em verde – citoplasma, em azul – núcleo.

6.1.2.2 Ensaio por citometria de fluxo das células tronco mesenquimais

Ensaio de citometria de fluxo para alguns marcadores de MSC foram testados nas células provenientes da medula óssea de feto canino. Neste experimento observamos uma expressão de 43,4% para CD44, 44,4% para CD105, 45,6% para CD90 e uma baixa expressão para marcadores de células de origem hematopoiéticas com resultados de apenas 6,59% para CD45, 3,3% para CD34 e 8,91% para CD117 (Figura 12 e Gráfico 1).

As linhagens de células tronco de medula óssea utilizadas em nosso experimento, apresentaram boa expressão para os marcadores de pluripotência com 48,1% para OCT 3/4, 42,3% para SSEA, 44,1 % para STRO-1 e 44,5% para NANOG (Figura 13 e Gráfico 1).

Figura 12 - Gráfico de histograma referente a caracterização das células tronco mesenquimais

Figura 13 - Gráfico de histograma referente a pluripotência das células tronco mesenquimais

Gráfico 1 - Gráfico de barras representando os valores médios para os marcadores pluripotência expressos nas células de medula óssea canina (OCT 3/4, SSEA 4, STRO-1 e NANOG) e para caracterização das células como mesenquimais (CD44, CD117, CD90, CD105, CD45 e CD34)

6.1.3 Ensaio de curva de crescimento

Durante o cultivo das células mesenquimais de medula óssea, foi realizado um ensaio de curva de crescimento com o intuito de avaliar a proliferação e viabilidade celular durante as passagens. Cinco dias após a cultura primária, iniciou-se o protocolo, onde as células foram tripsinizadas a cada 3 dias durante 4 passagens. Inicialmente foi realizado um plaqueamento de $1,0 \times 10^5$ células por placa (Tabela 1). No gráfico 2, podemos observar uma proliferação celular características das células mesenquimais.

Tabela 1 - Valores referentes a proliferação celular durante as passagens

Passagem	Contagem
P1	$1,0 \times 10^5$
P2	$2,6 \times 10^5$
P3	$4,4 \times 10^5$
P4	$8,3 \times 10^5$

Gráfico 2 - Proliferação das MSCs (células $\times 10^5$) da medula óssea de fetos de cães durante 4 passagens

6.2 ETAPA 2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

6.2.1 Hemograma e Bioquímicos séricos

A tabela 2 expressa os resultados eritroleucométricos e trombotométricos obtidos para os cães pertencentes ao grupo GR. Ainda que não indicado nas tabelas, não foram encontrados hemoparasitas em nenhum dos animais avaliados. Ademais, pelos valores explicitados, verifica-se que as médias encontram-se dentro dos valores da normalidade. Na tabela 3 estão apresentados, os resultados bioquímicos séricos dos mesmos grupos, cujos valores enquadram-se dentro dos limites de normalidade.

Tabela 2 - Eritrograma e leucograma do grupo GR - São Paulo - 2014

Parâmetros	Unidade	NORMAL	Média	DP	Vmax	Vmin
He	X 10 ⁶ /uL	5,5 - 8,5	6,65	0,51	7,20	5,90
Ht	%	37 - 55	45,16	6,21	53,00	38,00
Hb	g/dL	12 - 18	13,50	1,87	16,00	11,00
VCM	u ³	60 - 77	67,50	5,24	76,00	63,00
HCM	Pg	19 - 24	24,95	2,01	28,00	22,90
CHCM	g/dL	31 - 36	34,92	1,85	37	32,65
Le	/uL	6000 - 17000	9.705,50	9705,5	13.485,00	6573,00
NB	/uL	0 - 300	-	-	-	-
NS	/uL	3000 - 12000	7.016,83	2.965,87	10.986	3564
Eos	/uL	150 - 1500	321,16	120,58	476	189
Bas	/uL	RAROS	-	-	-	-
LT	/uL	1000 - 4900	2.748,66	809,20	3.562,00	1239
LA	/uL	RAROS	-	-	-	-
Mon	/uL	150 - 1500	458,34	246,68	846	231
PT	g/dL	5,5 - 8,5	7,08	0,95	8,2	5,8
Plaq	10 ³ /uL	200 - 500	330,16	78,445	432	210

Legenda: Médias, desvios-padrão (DP) e valores máximos (Vmax) e valores mínimos (Vmin) referentes à contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), teor de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), leucócitos (Le), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), eosinófilos (Eos), basófilos (Bas), linfócitos típicos (LT), linfócitos atípicos (LA), monócitos (Mon), plaquetas (Plaq), proteína total (PT) do grupo GR.

Tabela 3 - Análises bioquímicas do grupo GR - São Paulo - 2014

Parâmetros	unidade	NORMAL	Média	DP	Vmin	Vmax
Uréia	mg/dL	10 – 56	37,4	14,60	51	14
Creatinina	mg/dL	0,5 – 1,5	0,96	0,38	1,4	0,5
Amilase	(U/L)	371 – 1220	1026	111,73	869	1120
Lipase	(U/L)	15 – 250	94,83	35,27	48,5	134
Albumina	g/dL	2,7 - 4,6	3,62	0,68	4,4	2,8
AST	U/L	7 – 92	56,4	18,76	82	34
ALT	U/L	10 – 88	53,4	22,63	73	15
ALP	U/L	20 – 150	63,4	18,87	75	30
GGT	U/L	1,2 – 6,4	3,58	1,75	6,2	1,5
Triglicérides	mg/dL	50 – 100	75,4	15,06	94	60
Colesterol	mg/dL	100 -300	196	70,18	273	129
Sódio	mEq/L	141 – 153,2	146,556	5,10	152,9	142,38
Potássio	mEq/L	3,9 - 5,65	4,556	0,59	5,25	3,92
CK	U/L	20 – 220	47	31,18	89	23

Legenda: Médias desvios-padrão (DP) e valores máximos (VMAX) e valores mínimos (VMIN) referentes à dosagem sérica de uréia, creatinina, amilase, lipase, albumina, (AST), (ALT), (ALP), (GGT), triglicérides, colesterol, sódio, potássio, cálcio, creatina quinase (CK) dos animais pertencentes ao grupo GR.

A tabela 4 expressa os resultados dos hemogramas obtidos para os cães pertencentes ao grupo GRMD. Assim como para os animais controle, não foram encontrados hemoparasitas em nenhum dos animais avaliados. Ademais, pelos valores explicitados, os parâmetros que se mostraram aumentados foram a contagem de leucócitos e plaquetas para alguns dos animais afetados. Entretanto, sem a presença de desvio a esquerda.

Na tabela 5 está apresentado os resultados bioquímicos séricos do mesmo grupo, cujos valores de ALT, AST e CK apresentam-se acima dos valores de normalidade para todos os animais afetados. Nos gráficos 3, 4, 5 e 6 estão ilustrados, comparativamente, os valores médios dos parâmetros que diferiram entre os grupos.

Tabela 4 - Eritrograma e leucograma do grupo GRMD - São Paulo - 2014

Parâmetros	Unidade	NORMAL	Média	DP	Vmax	Vmin
He	X 10 ⁶ /uL	5,5 - 8,5	6,86	0,964	8,3	5,6
Ht	%	37 - 55	47,16	7,19	55	38
Hb	g/dL	12 - 18	13,66	1,63	16	12
VCM	u ³	60 - 77	65,33	6,77	75	60
HCM	Pg	19 - 24	22,08	4,84	27	13
CHCM	g/dL	31 - 36	33,16	1,47	35	31
Le	/uL	6000 - 17000	17053,83	2572,66	19827	13894
NB	/uL	0 - 300	0	0	0	0
NS	/uL	3000 - 12000	11538,83	2745,26	14792	7628
Eos	/uL	150 - 1500	901,5	598,13	1478	256
Bas	/uL	RAROS	0	0	0	0
LT	/uL	1000 - 4900	2681,66	930,00	3672	1467
LA	/uL	RAROS	0	0	0	0
Mon	/uL	150 - 1500	596,66	516,06	1273	167
PT	g/dL	5,5 - 8,5	6,63	0,53	7,2	5,8
Plaq	10 ³ /uL	200 - 500	487,16	183,73	762	237

Legenda - Médias, desvios-padrão (DP) e valores máximos (Vmax) e valores mínimos (Vmin) referentes à contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), teor de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), leucócitos (Le), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmenados (NS), eosinófilos (Eos), basófilos (Bas), linfócitos típicos (LT), linfócitos atípicos (LA), monócitos (Mon), plaquetas (Plaq), proteína total (PT) do grupo GRMD.

Tabela 5 - Análises bioquímicas do grupo GRMD - São Paulo - 2014

Parâmetros	Unidade	NORMAL	Média	DP	Vmin	Vmax
Uréia	mg/dL	10 - 56	43,8	15,31	54	17
Creatinina	mg/dL	0,5 - 1,5	1,3	0,23	1,5	0,9
Amilase	(U/L)	371 - 1220	1389	314,10	997	1764
Lipase	(U/L)	15 - 250	106,26	33,32	64,80	146,40
Albumina	g/dL	2,7 - 4,6	3,92	0,61	4,4	2,9
AST	U/L	7 - 92	226,2	33,08	256	189
ALT	U/L	10 - 88	267	68,93	378	189
ALP	U/L	20 - 150	126,4	41,37	172	78
GGT	U/L	1,2 - 6,4	5,26	1,19	6,2	3,2
Triglicérides	mg/dL	50 - 100	91,6	6,188	102	86
Colesterol	mg/dL	100 - 300	259	38,03	300	198
Sódio	mEq/L	141 - 153,2	149,5	4,04	153,2	143,2
Potássio	mEq/L	3,9 - 5,65	5,04	0,56	5,6	4,3
CK	U/L	20 - 220	13657	4198,36	17836	7836

Legenda: Médias, desvios-padrão (DP) e valores máximos (VMAX) e valores mínimos (VMIN) referentes à dosagem sérica de uréia, creatinina, amilase, lipase, albumina, (AST), (ALT), (ALP), (GGT), triglicérides, colesterol, sódio, potássio, cálcio, creatina quinase (CK) dos animais pertencentes ao grupo GRMD.

Gráfico 3 - Concentrações médias dos leucócitos (/uL) dos cães pertencentes aos grupos GR e GRMD

Gráfico 4 - Concentrações médias séricas da ALT e AST (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GR e GRMD

Gráfico 5 - Concentrações médias séricas da CK (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GRI, GRII, GRMDI e GRMD II

6.2.2 Função cardíaca

Todos os animais pertencentes aos grupos GR e GRMD foram submetidos à avaliação cardíaca pelo exame de ecocardiograma. Os animais afetados foram avaliados pelo Ecocardiógrafo Sonosite Titan com sondas 3,5 – 5 mHz e/ou 5,5 – 7,5 mHz, pelo Dr Kaleizu Teodoro Rosa, CRMV-SP 9054, no próprio canil GRMD. Os animais pertencentes ao grupo controle foram avaliados no APARELHO, pelo Dr André L.G.Held, CRMV-SP 22935, na Vivaz Clínica Veterinária 24 horas Ltda., situada na cidade de Guarulhos.

Os parâmetros encontrados nos animais pertencentes ao grupo GRMD estão expressos na tabela 6. Nestes grupos, todos os animais, apesar de alguns serem assintomáticos, apresentaram algum tipo de alteração cardíaca durante o exame.

O animal A1 apresenta déficit de contratilidade discreto e disfunção diastólica discreta, não sendo observado dilatação de câmaras cardíacas. O animal A2 apresenta hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo moderada, déficit de contratilidade, insuficiência da valva mitral discreta sem repercussão hemodinâmica. Alterações estas, compatíveis com quadro inicial de cardiomiopatia dilatada.

O animal A3 apresenta contratilidade e relaxamento do ventrículo esquerdo normais, não sendo observado dilatação de câmaras. O animal A4 apresentou aumento biventricular de grau moderado, aumento atrial esquerdo de grau leve, discreto escape valvar mitral, hipocinesia difusa do ventrículo esquerdo de grau moderado e alterações de fluxo compatíveis com déficit diastólico.

O animal A5 apresentou aumento global do coração, hipocinesia difusa do ventrículo esquerdo de grau moderado, insuficiência valvar mitral de grau moderado e aumento da ecogenicidade do folheto septal, compatível com calcificação valvar. Já no animal A6, notamos o aumento global do coração, hipocinesia difusa do ventrículo esquerdo de grau moderado, insuficiência valvar mitral de grau leve e alterações de fluxo compatíveis com déficit diastólico.

Adicionalmente, no animal A7 observamos aumento global do coração, hipocinesia difusa do ventrículo esquerdo de grau moderado e insuficiência valvar aórtica de grau leve. O animal A8 e A9 apresentaram aumento global do coração, hipocinesia difusa do ventrículo esquerdo.

Desta forma, é possível observar a piora, no aspecto cardíaco estrutural e funcional, com a progressão da idade nos animais afetados.

Tabela 6 - Valores encontrados no exame ecocardiográfico dos animais pertencentes ao grupo GRMD

Parâmetros	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
Diâmetro diastólico final (cm)	4,82	3,87	4,92	3,82	4,66	4,15	3,99	4,23	4,80
Diâmetro sistólico final (cm)	3,43	3,97	3,86	3,32	4,08	3,61	3,41	3,52	3,49
% de encurtamento sistólico (%)	20,4	12,6	21,5	13,1	12,4	13	14,5	13,8	13,2
Fração de ejeção (%)	43	30	44	29	27	28	31	27	27
Volume diastólico final (mL)	115,3	64	113,9	62,7	100,3	76,4	69,6	73,4	73,2
Volume sistólico final (mL)	62,3	46	64,3	44,8	73,4	54,8	47,8	55,4	54,4
Espessura diastólica do septo (cm)	0,51	0,49	0,53	0,50	0,37	0,5	0,62	0,63	0,62
Espessura sistólica do septo (cm)	0,89	0,73	0,9	0,71	0,53	0,71	0,79	0,74	0,77
Espessura diastólica da P. Post. (cm)	0,55	0,57	0,53	0,58	0,53	0,5	0,62	0,58	0,59
Espessura sistólica da P. Post. (cm)	1,02	0,95	1,01	0,91	1,01	0,87	0,75	0,86	0,87
Relação septo/parede	1,0	0,91	1,0	0,86	0,70	1,0	1,0	0,86	0,86
Diâmetro da aorta (cm)	1,99	1,77	2,01	1,74	2,12	2,08	1,95	1,98	1,97
Válvula aórtica	N	C	N	C	N	N	IL	N	N
Diâmetro do átrio esquerdo	2,35	2,01	2,33	2,08	2,22	2,41	2,04	2,01	2,02
Válvula mitral	IL	IL	IL	IM	ED	IL	IL	IL	IL
Átrio esquerdo	AL	A	A	A	AL	A	A	AL	AL
Relação átrio esquerdo /aorta	1,18	1,13	1,16	1,2	1,05	1,16	1,05	1,2	1,1
Válvula tricúspede	N	N	N	IL	N	N	N	N	N
Válvula pulmonar	N	N	N	N	IL	N	N	N	N
Ventrículo e átrio direito	AL	A	A	A	A	A	A	AL	AL
Pericárdio	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: N- normal; C- calcificação; IL- insuficiência leve; IM – insuficiência moderada; ED- escape discreto; A- aumentado; AL- aumento leve.

Os animais pertencentes aos grupos GR apresentaram todos os parâmetros cardíacos dentro da normalidade, sem evidências de alterações (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores encontrados no exame ecocardiográfico dos animais pertencentes ao grupo GR

Parâmetros	C1	C2	C3	C4	C5
Diâmetro diastólico final (cm)	3,98	3,50	3,63	3,62	3,71
Diâmetro sistólico final (cm)	2,19	2,24	2,30	2,18	2,35
% de encurtamento sistólico (%)	41	42	43	42	40
Fração de ejeção (%)	65	63	70	73	69
Volume diastólico final (mL)	78,3	77,3	78,1	78,9	76,4
Volume sistólico final (mL)	45	47	49,3	41	54,8
Espessura diastólica do septo (cm)	0,82	0,77	0,68	0,8	0,74
Espessura sistólica do septo (cm)	1,12	1,04	1,33	1,13	1,01
Espessura diastólica da P Post. (cm)	0,68	0,63	0,65	0,79	0,69
Espessura sistólica da P. Post. (cm)	1,42	1,3	1,25	1,41	1,01
Relação septo/parede	1,15	1,12	1,0	1,10	1,0
Diâmetro da aorta (cm)	2,34	2,25	1,9	2,28	2,08
Válvula aórtica	N	N	N	N	N
Diâmetro do átrio esquerdo				2,37	2,28
Válvula mitral	N	N	N	N	N
Átrio esquerdo	N	N	N	N	N
Relação átrio esquerdo /aorta	0,90	0,87	0,88	0,86	0,92
Válvula tricúspede	N	N	N	N	N
Válvula pulmonar	N	N	N	N	N
Ventrículo e átrio direito	N	N	N	N	N
Pericárdio	N	N	N	N	N

Legenda: N- normal

Na figura 14 podemos observar, comparativamente, as alterações cardíacas entre os grupos estudados. Notar que o ventrículo esquerdo apresenta-se dilatado nos animais pertencentes ao grupo GRMD. É importante as alterações referentes a contratilidade do ventrículo esquerdo que está de moderada a acentuadamente comprometida nos animais pertencentes ao grupo GRMD. Essas alterações evidenciadas nos animais afetados são compatíveis com o quadro de

cardiomiopatia dilatada, devido as lesões progressivas que a musculatura cardíaca vem sofrendo durante o curso da doença.

Figura 14 - Imagens referentes ao exame de ecocardiograma nos animais pertencentes ao estudo

ABREU, D.K., 2013

Notas: Em A, A' e A'' animal pertencente ao grupo GRMD. Em B, B' e B'' GR.

No gráfico 6, podemos evidenciar as alterações relacionadas a fração de encurtamento nos animais estudados e notamos a acentuada redução nos animais afetados, principalmente nos animais mais velhos.

Gráfico 6 - Representação gráfica dos valores médios referentes a fração de encurtamento obtida pelo exame de ecocardiograma no animais pertencentes aos grupos GR e GRMD

6.2.3 Análise microscópica da musculatura

6.2.3.1 Microscopia de luz

Na análise de Picrossírius sob luz polarizada do músculo dos cães pertencentes ao grupo GRMD, observamos, através da birrefringência do tecido, diferentes intensidades de cores. Podemos observar a presença de abundante tecido conjuntivo ao redor das fibras, na região de endomísio, e dos feixes das fibras, o perimísio. Notamos a predominância de fibras de colágeno mais espessas, características do tipo I (alaranjado ao vermelho) e em menor quantidade da fibra de colágeno tipo III, as fibras reticulares, que são mais finas e pouco compactadas (esverdeado) (Figura 15).

Adicionalmente, o grupo GRMD, na coloração hematoxilina-eosina e azul de toluidina, nos cortes histológicos avaliados, revelou a intensa desorganização das fibras musculares, com tamanhos e formas variadas, evidenciando a heterogeneidade entre as fibras hipertrofiadas e atrofiadas (Figuras 16, 17, 18 e 19). Em alguns cortes notamos a presença de células inflamatórias na proximidade dos capilares sanguíneos (Figura 16).

Foi possível observar fibras hipertrofiadas próximas a fibras de menor diâmetro, indicando o processo de regeneração das fibras musculares com deposição de tecido conjuntivo e fibras colágenas. A maioria das fibras apresentam núcleo periférico, entretanto, algumas fibras possuem núcleo central. Notamos a presença de splint em algumas fibras e fibras com degeneração intensa nos músculos dos animais pertencentes ao grupo GRMD (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Figura 15 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD com (A, C e E) e sem luz polarizada (B, D e F)

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Notar a predominância de fibras de colágeno mais espessas, do tipo I (vermelha) e em menor quantidade fibras de colágeno do tipo III (verde). Em B, observar a intensa desorganização das fibras (círculo verde), a presença de fibras de tamanhos variados (Aumentadas – cabeça de seta preta e diminuídas – cabeça de seta azul). Ainda em B, notar o perímio envolvendo os feixes de fibras (p) e o endomísio (asterisco preto) envolvendo as fibras (A, C e E) e após tratamento (B, D e, F). Coloração: Picrosírius; Aumento: 10x (A, B), 20x (C, D) e 40x (E, F).

Figura 16 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Notar a heterogenicidade entre o tamanho das fibras musculares (cabeça de seta preta e azul), a presença de um denso perimísio revestindo os feixes de fibras (p) e o epimísio (*) revestindo as fibras. Em A, C e E notar a presença de infiltrado inflamatório (asterisco azul). Em F, presença de fibras com núcleo central (asterisco amarelo). Coloração: Hematoxilina-eosina; Aumento: 10x (A), 20x (B, C) e 40x (D, F).

Figura 17 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Notar a heterogenicidade entre o tamanho das fibras musculares (cabeça de seta vermelha e verde), a presença de um denso perímio revestindo os feixes de fibras (p). Em A e B, notar a vascularização (asterisco vermelha). Em E e F, notar as áreas em processo de degeneração inicial (círculo verde e azul, respectivamente). Coloração: Azul de Toluidina; Aumento: 20x e 40x.

Figura 18 - Fotomicrografia de corte transversal de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD.

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Notas: Em A, notar a presença de áreas claras e escuras dentro da fibra evidenciando fibras em processo inicial de degeneração. Em B, presença de fibras musculares heterogeneas (cabeça de seta preta e verde) e áreas de intensa degeneração (círculo verde). Em C, notar a heterogenicidade entre o tamanho das fibras musculares e a presença de colágeno entre as fibras (asterisco amarelo). Coloração: Hematoxilina-eosina; Aumento: 20x (C) e 40x (A, B).

Figura 19 - Fotomicrografia de corte longitudinal (em A e B) e transversais (C, D, E e F) de bíceps femoral de cães afetados pertencentes ao grupo GRMD

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Nota: Em A e B notar a presença de fibras em degeneração (seta vermelha). Em C, D e F notar o depósito de colágeno entre as fibras. Em E, splint de uma fibra muscular. Coloração: Azul de Toluidina; Aumento: 20x (A, B e C), 40x (D e F) e 100 X (E).

6.2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O material foi preparado conforme descrito no item Material e Métodos e fotografado no microscópio Morgagni 268D-Philips. Pela microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar, em todos os grupos estudados, o sarcomero ou faixa A, compartmentalizado entre duas linhas Z, que é a unidade básica estrutural das fibras. Em um músculo saudável (grupo GR) as linhas Z apresentam-se alinhadas entre as fibras. Foi possível observar em todos os grupos estudados, a zona H no centro das faixas A e a linha M no centro do sarcômero. Adicionalmente podemos observar a faixa H e I (Figura 20).

Figura 20 - Microscopia eletrônica de transmissão em corte longitudinal de músculo estriado

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Nota: Em A, observar a linha Z (cabeça de seta laranja), a linha M (cabeça de seta azul) e o sarcomero ou faixa A está representado pela linha vermelha. Em B, notar as faixas H e I.

Quando comparamos os animais pertencentes ao grupo GR com os animais pertencentes ao grupo GRMD, notamos o desalinhamento da linha Z nos músculos dos animais afetados. Da mesma forma, podemos observar um maior número de

mitocôndrias, desorganizadas, de tamanhos variados e algumas em degeneração. Adicionalmente, evidenciamos que os animais pertencentes ao grupo GRMD possuem uma maior degeneração das fibras musculares, com frouxidão acentuada entre as fibras e maior ruptura das mesmas (Figura 21).

Nos grupos dos animais afetados notamos acentuada presença de colágeno entre as fibras. Foi observado a presença de células satélites. Ainda para este grupo observamos a formação de cordão de células satélites tentando regenerar a fibra (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão em cortes longitudinais do músculo estriado de animais pertencentes aos grupos GR (A e B), GRMD (C, D, E, F, G, H)

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Nota: Em A, observar o alinhamento da linha Z entre as fibras e a uniformidade entre as mitocôndrias. Em C, podemos observar o desalinhamento entre as linhas Z (seta rosa), a presença de colágeno entre as fibras (asterisco rosa) e a desorganização das mitocôndrias (seta verde). Observar a presença de células satélites na tentativa de formarem um cordão de mioblastos. Em D, áreas de degeneração (círculo amarelo) e a presença de mitocôndrias em degeneração (cabeça de seta amarela). Observar a deposição de colágeno e o afastamento entre as fibras. Notar em F uma maior frouxidão entre as fibras, com depósito de colágeno. Observar a ruptura das fibras (círculo vermelho) e a presença de células satélites. Em G, o sistema T (T) e a deposição de colágeno. Em H, podemos observar ruptura acentuada entre as fibras com a desorganização mitocondrial e deposição de colágeno.

Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão de animais pertencentes aos grupos GRMD

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Nota: Em A, canto direito, corte transversal evidenciando intensa área em degeneração. Ainda em A notar o afastamento entre as fibras. Em B, presença de célula satélite (s). Em C, notar fibras normais (mais escuras) e fibras em degeneração (mais claras). Em D, notar afastamento entre as fibras com presença de colágeno (asterisco rosa) e em E a desorganização das mitocôndrias. Em F, afastamento mais acentuado entre as fibras e a presença de splint na fibra (canto superior esquerdo). Em G, depósito intenso de colágeno (asterisco rosa). Em H, fibras com intensa degeneração. Em I, desorganização acentuada devido a intensa degeneração e em J ruptura entre as fibras (asterisco vermelho).

6.3 ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN VITRO*

6.3.1 Imunofenotipagem e quantificação linfocitária CD4⁺FoxP3⁺ do sangue periférico

A imunofenotipagem e quantificação linfocitária foi realizada no sangue fresco dos animais pertencentes ao projeto. Todos os cães estudados apresentaram concentração linfocitária dentro dos limites de normalidade de acordo com o leucograma.

Na figura 23 de *Dot plot*, demonstramos o “gate” referente à população de linfócitos do sangue periférico de cães pela técnica de citometria de fluxo selecionados para a imunofenotipagem e quantificação linfocitária CD4⁺FoxP3⁺.

Figura 23 – O gráfico de Dot plot

Notas: (A) demonstra o gate de monócitos (círculo vermelho) e o gate de linfócitos (círculo preto) do sangue periférico canino pela técnica de citometria de fluxo selecionado para a imunofenotipagem linfocitária. Em B podemos observar o histograma referente à presença das células linfocitárias não marcadas.

Na figura 24 podemos evidenciar a marcação dos anticorpos CD4 e FoxP3, pela técnica de citometria de fluxo.

Figura 24 – O gráfico de Dot plot

Notas: (A) demonstra o gate de linfócitos do sangue periférico canino pela técnica de citometria de fluxo selecionado para a imunofenotipagem linfocitária. Em B e C podemos observar a curva referente à presença das células linfocitárias não marcadas. Em D e E, observamos os controles negativos para CD4 e Fox P3 respectivamente.

A tabela 8 expressa os resultados descritos em porcentagem da imunofenotipagem da população linfocitária $CD4^+FoxP3^+$. Apesar do valor médio referente aos cães controles (6,74%) ser maior em relação aos cães afetados (4,62%), não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Gráfico 7).

Tabela 8 - Valores médios da porcentagem, desvio-padrão (DP), valores máximos (Vmáx) e mínimos (Vmín) referentes aos linfócitos regulatórios ($CD4^+FoxP3^+$) do sangue periférico dos grupos GR e GRMD

	GR	GRMD
Média	6,744	4,626
DP	2,086	0,9595
Vmáx	9,36	6,74
Vmín	4,35	3,86

Gráfico 7 – Gráfico representativo das concentrações médias das subpopulações linfocitárias CD4⁺FoxP3⁺ dos cães pertencentes aos grupos GR e GRMD

Notas: Notamos a representação gráfica dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da porcentagem de linfócitos. Teste *t*, *p*<0,05.

6.3.2 Estudo da proliferação linfocitária *in vitro*

6.3.2.1 Protocolo de linfoproliferação com CFSE (5, 6- carboxifluoresceína diacetato succimidil éster) sem a presença de MSCs

Inicialmente, realizamos um estudo para padronizar a técnica e avaliar o comportamento dos linfócitos na presença de diferentes estímulos. No protocolo de linfoproliferação com o CFSE, a figura 25 demonstra a região referente a proliferação linfocitária de um cão afetado após 3 dias em cultivo *in vitro*.

Inicialmente realizamos uma análise comparativa entre a fitohemaglutinina e a concanavalina A, fatores de estímulo para a proliferação linfocitária. As análises foram realizadas em triplicata em alguns animais pertencentes aos grupos GRMD (Tabela 9). O intuito nesta etapa experimental foi padronizar a técnica e testar os fatores de estímulo. As análises foram realizadas pelo programa *FlowJo*.

Figura 25 – O gráfico A demonstra o gate de linfócitos que proliferaram, e em B, está representado o histograma referente à linfoproliferação

Todos os animais avaliados apresentaram proliferação mais acentuada na presença dos estímulos (Tabela 10 e Gráfico 9). Na figura 26 podemos observar o comportamento dos histogramas de proliferação na presença da concanavalina A e da fitohemaglutinina.

Figura 26 - Gráfico de histograma de células mononucleares do sangue periférico representativa dos linfócitos cultivados por 72 horas com concanavalina A e fitohemaglutinina (A e A')

Notas: Em B e B', histograma de proliferação da região de linfócitos no *dot plot*

Os animais avaliados pertencentes ao grupo GRMD apresentaram valor médio de proliferação sem estímulo de 49,54 e com os estímulo de ConcA e PHA, de 60,56 e 69,91 respectivamente. Já os animais pertencentes ao grupo GR apresentaram valores médios de 51,78, 61,17 e 61,44 sem estímulo, com estímulo de ConcA e de PHA respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios referentes a proliferação dos linfócitos obtidas sem estímulo, com concanavalina A (ConcA) e com fitohemaglutinina (PHA). DP – desvio padrão

-	GRMD MÉDIA	DP	GR MÉDIA	DP
Sem estímulo	49,54	10,64	51,78	2,39
ConcA	60,56	4,47	61,17	3,68
PHA	69,91	4,61	61,44	1,19

Considerando os resultados obtidos, optamos por trabalhar com a PHA para o controle dos linfócitos sem as MSC.

6.3.2.2 Estudo da proliferação linfocitária *in vitro* - Protocolo de linfoproliferação com CFSE (5, 6- carboxifluoresceína diacetato succimidil éster) com a presença de células tronco mesenquimais - piloto

Na segunda etapa de padronização da técnica, podemos observar, pela análise da citometria que, de forma geral, ocorreu um aumento da linfoproliferação quando os linfócitos foram cultivados na presença das células tronco, aumento este, proporcional a concentração destas células (Figura 27). Nesta etapa utilizamos três concentrações de células tronco: $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 e 2×10^4 .

Figura 27 - Gráfico de dot plot da proliferação de células mononucleares

Notas: Em A, cultivo de linfócitos com fitohemaglutinina, sem as MSC. Em B, C e D cultivo de linfócitos, sem fitohemaglutinina, com MSC na concentração de $0,5$, 1 e 2×10^4 , respectivamente.

Através do programa FlowJo foi possível obter os índices utilizados para a avaliação da proliferação linfocitária, onde consideramos o índice de proliferação. O índice de divisão celular é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que não dividiram, ou seja permaneceram na geração 0.

Figura 28 - Perfil das amostras marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo. Picos representando as gerações referente a linfoproliferação. Cada geração representa uma divisão celular

Na tabela 10 podemos observar que o valor médio referente a linfoproliferação nos animais afetados (GRMD), foi maior no cocultivo dos linfócitos com 2×10^4 MSC por poço, a maior concentração de células tronco estabelecida no estudo. Ou seja, nos animais avaliados até o momento, observamos que, quanto a maior concentração de MSC, maior a proliferação linfocitária. Isso nos permite inferir, que as células tronco mesenquimais promoveram uma imunoestimulação *in vitro*.

Tabela 10 - Índice de divisão linfocitária (x100), nos grupos estudados, analisados pelo programa FlowJo

Grupos	Concentração MSC	Índice de divisão X 100 (Média)
GR11 (n=2)	$0,5 \times 10^4$	11
	$1,0 \times 10^4$	15
	$2,0 \times 10^4$	26
GRMDI (n=3)	$0,5 \times 10^4$	18
	$1,0 \times 10^4$	23
	$2,0 \times 10^4$	28

Legenda: n= numeros de animais avaliados até o momento

6.3.2.2.1 Proliferação dos linfócitos totais, $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

As tabelas 11 e 12 expressam a porcentagem de divisão dos linfócitos cultivados sem estímulo (PHA) e dos cocultivos com 1×10^4 e 5×10^4 MSC, nos grupos GR e GRMD respectivamente. É possível observar a linfoproliferação significativa na presença das MSC em comparação ao cultivo sem as MSCs e sem o estímulo da PHA. Da mesma forma, podemos observar, para todos os cães estudados, que os linfócitos $CD4^+FoxP3^+$, apresentaram valores médios de proliferação maiores quando comparados aos linfócitos $CD4^+FoxP3^-$, para os grupos GR e GRMD.

Na figura 29 podemos observar o aspecto do cocultivo, onde as MSCs ficam aderidas à placa de cultivo e os linfócitos ficam em suspensão.

Figura 29 - Fotomicrografia do cocultivo celular das MSC com os linfócitos

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Nota: Em A, notar a presença de MSC na placa. Em B cultivo de linfócitos (12hs). Notar a presença de células em suspensão. Em C, cocultivo das MSC com os linfócitos.

Tabela 11 - Valores médios $\pm$ DP, referentes a porcentagem de divisão linfocitária (%) dos animais pertencentes ao grupo GR, analisados pelo programa FlowJo

GR	Sem PHA	MSC 1×10^4	MSC 5×10^4
Todos linfócitos	6,774 $\pm$ 2,67	14,47 $\pm$ 2,694	30,37 $\pm$ 5,775
CD4⁺FoxP3⁺	4,866 $\pm$ 1,226	15,51 $\pm$ 2,435	29,38 $\pm$ 4,648
CD4⁺FoxP3⁻	5,388 $\pm$ 0,541	7,392 $\pm$ 1,031	6,992 $\pm$ 0,707

Tabela 12 - Valores médios $\pm$ DP, referentes a porcentagem de divisão linfocitária (%) dos animais pertencentes ao grupo GRMD, analisados pelo programa FlowJo

GRMD	Sem PHA	MSC 1×10^4	MSC 5×10^4
Todos linfócitos	4,563 $\pm$ 1,236	16,09 $\pm$ 3,217	34,19 $\pm$ 4,552
CD4⁺FoxP3⁺	3,621 $\pm$ 1,664	19,67 $\pm$ 3,221	27,42 $\pm$ 4,089
CD4⁺FoxP3⁻	5,440 $\pm$ 1,031	6,643 $\pm$ 1,289	6,472 $\pm$ 0,944

O gráfico 8 expressa os valores médios juntamente com a análise estatística de todos os linfócitos, e das subpopulações CD4⁺FoxP3⁺ e dos CD4⁺FoxP3⁻.

Considerando a proliferação geral de linfócitos, observamos valores médios significativamente maiores para os cocultivos com 5×10^4 MSC quando comparados aos cocultivos com 1×10^4 MSC. Não observamos diferenças significativas entre os grupos GR e GRMD.

Adicionalmente, podemos observar que essa diferença foi significativa quando comparamos a porcentagem de CD4⁺FoxP3⁺ no cocultivo de 1×10^4 para 5×10^4 MSCs. Para os CD4⁺FoxP3⁻, essa diferença não foi significativa, sendo que valores médios de proliferação foram os menores observados nos cocultivos, com baixo índice de proliferação.

Gráfico 8 - Gráficos representando os valores médios das proliferação de todos os linfócitos (A), dos linfócitos CD4⁺FoxP3⁺ (B) e dos CD4⁺FoxP3⁻ (C) dos cães pertencentes aos grupo GR e GRMD

Legenda: Teste Tukey – letras diferentes apresentam diferença estatística significativa

6.4 COCULTIVO DOS MACRÓFAGOS COM AS MCSS *IN VITRO*

6.4.1 Avaliação do sobrenadante do cocultivo dos macrófagos com as MSCs – dosagem de nitrito

Após 5 horas de cultivo, os monócitos aderiram à placa e os linfócitos permaneceram em suspensão. Desta forma, ao retirarmos o sobrenadante, permaneceu na placa apenas os monócitos que após 7 dias de cultivo apresentaram morfologia semelhante aos macrófagos. Os sobrenadantes foram coletados 24 e 48 horas após o plaqueamento das MSCs.

A concentração de NO foi estimada pela dosagem de nitrito pelo sistema de reagentes de Griess. A absorbância foi mensurada através da leitura da placa com

um filtro dentre 520 a 550nm. Na figura 30 podemos observar os imagens referentes ao cocultivo dos linfócitos com as MSC. A figura 31 representa a curva padrão referente a concentração de nitrito.

Figura 30 - Fotomicrografia do cocultivo celular das MSC com os macrófagos

Fonte: (ABREU, D. K., 2013).

Nota: Em A e B, macrófagos em cultivo há 7 dias. Em C cultivo de macrófagos (3 dias). Em D e E, cocultivo as MSC com macrófagos.

Figura 31 - Curva padrão referente a concentração de nitrito

A tabela 13 expressa os valores em uM da concentração de nitrito obtidas nos cultivos e cocultivos de 24 e 48 horas dos macrófagos.

Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão, referentes a dosagem de nitrito (uM) no sobrenadante dos cultivos

	GR T1	GRMD T1	GR T2	GRMD T2
MO	4,26 ± 0,41	3,71 ± 0,64	4,59 ± 1,01	4,16 ± 1,01
MO + MSC	5,28 ± 0,85	4,91 ± 1,78	5,76 ± 0,77	5,93 ± 1,46
MO + LPS	13,05 ± 0,76	11,24 ± 1,32	17,17 ± 0,69	15,61 ± 0,90
MO + LPS + MSC	14,61 ± 1,34	12,29 ± 1,32	19,72 ± 1,93	18,84 ± 2,28

Legenda: Cultivos - macrófagos (cultivo 1 - MO), macrófagos e células tronco mesenquimais (cultivo 2 - MO+MSC), macrófagos e LPS (cultivo 3 - MO+LPS) e macrófagos, LPS e células tronco mesenquimais (cultivo 4 - MO+LPS+MSC), durante 24 horas (T1) e 48 horas (T2).

No gráfico 9 podemos evidenciar as diferenças na concentração de nitrito entre os grupos e cultivos. Podemos observar que não houve diferença significativa entre os cultivos 1 e 2, para os grupos GR e GRMD. Entretanto, esses cultivos diferiram significativamente dos cultivos 3 e 4.

Os maiores valores médios de nitrito foram observados no T2 do cultivo 4. Entretanto, para os grupo GR e GRMD, essa média não diferiu significativamente do cultivo 3 no T2. Da mesma forma, apesar dos valores médios do cultivo 4 no T1 serem maiores quando comparados ao cultivo 3 no T1, não foi observado uma

diferença significativa.

Adicionalmente, podemos notar que no cultivo 4, ocorreu um aumento da produção de nitrito comparável a produção estimulada pela presença apenas do LPS (cultivo 3). No T2 dos cultivos 3 e 4, os valores de nitrito aumentaram significativamente quando comparados aos cultivos 3 e 4 no T1. Entretanto, não notamos diferenças significativas ao comparar os cães pertencentes ao grupo controle com os afetados.

Cocultivo de macrófagos apenas com MSCs, não produziu nitrito em concentração significativamente diferente quando comparados apenas as culturas com macrófagos.

Gráfico 9 - Gráfico referente as concentrações medias e desvio padrão das concentrações em uM nos sobrebadantes analisados

Legenda: MO-macrófagos; MSC-células tronco mesenquimais; LPS-lipopolysaccharide-induced; T1- 24 horas de cultivo; T2- 48 horas de cultivo.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSAO

A presença de leucocitose sem desvio a esquerda pode ocorrer, por exemplo, em processos inflamatórios (SOLTER et al., 1991; MEYER; COLES; RICH, 1995; NELSON; COUTO, 2006), o que justifica tais alterações encontradas em nosso estudo no modelo GRMD (VALENTINE et al., 1990; KERKIS et al., 2008; ARAÚJO, 2009; ABREU, 2010). A ocorrência de trombocitose, também evidenciada por Araújo (2009) e Abreu (2010), pode ser resultado de processo inflamatório agudo ou crônico (BUSH, 2004) e ou mesmo como resultado da concentração de colágeno no tecido muscular (MEYER; COLES; RICH, 1995).

A ALT e AST são encontradas no tecido hepático e muscular e a CK está localizada em músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro (BUSH, 2004). Ao primeiro dia de vida, os cães distróficos podem ser diagnosticados através da análise da CK, servindo como um importante parâmetro para auxiliar no diagnóstico. O mesmo ocorre com a DMD. Assim, nossos resultados corroboram com estudos anteriores que relatam o aumento sérico dessa enzima em qualquer estágio da doença (KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1990; SHELTON et al., 2001; ARAÚJO, 2009; ABREU, 2010; FERNANDES, 2012). Valentine et al. (1986) relataram que, 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 da lesão muscular presente nos cães.

Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram com Valentine et al. (1990) e Bergman et al. (2002), que afirmam que, cães distróficos de qualquer idade, apresentam aumento de CK, AST e ALT.

Em humanos com distrofia, o miocárdio sofre muitas alterações devido à sobrecarga de pressão e geralmente acabam desenvolvendo cardiomiopatia dilatada e hipertensão arterial (KAMOGAWA et al., 2001; NOLAN et al., 2003). Cziner e Levin (1993) relataram que no modelo canino GRMD, a cardiomiopatia é caracterizada por fibrose progressiva no epicárdio e miocárdio. Assim como observado em nosso estudo, Moise et al. (1991), relataram anormalidades na função diastólica e lesões

hiperecóicas que correspondem à calcificação do miocárdio.

Pellegrino et al. (2007) realizaram um estudos com o intuito de padronizar o perfil ecocardiográfico de cães da raça Golden Retriever saudáveis, com resultados semelhantes aos relatados em nosso estudo para cães saudáveis.

Segundo Bertorine et al. (1982); Junqueira e Carneiro (2004) e Araújo et al. (2013) o músculo esquelético normal possui fibras musculares uniformemente espaçadas, com tamanhos aproximados, multinucleadas, geralmente com dois núcleos por célula e localizados na periferia das fibras, com escassa população celular no endomísio, constituída por algumas células do conjuntivo, principalmente fibroblastos. A mesma conformação foi observada em nosso estudo na análise de MET do músculo de Golden Retriever normal.

Constatamos, pela histologia do músculo distrófico, infiltrados de células 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. Segundo Valentine et al. (1990); Fernandes (2012) e Araújo et al. (2013), os músculos de cães GRMD revelam histologicamente, 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).

Gorospe et al. (1994); Wang et al. (2009) e Evans et al. (2009a) sugerem forte correlação entre presença de macrófagos e progressão clínica histopatológica das distrofias musculares. O aumento substancial de macrófagos e linfócitos infiltrados na fibra muscular ocorre da deficiência de distrofina, formando extensos agrupados necróticos nas fibras, como foi observado em nosso estudo.

Inicialmente ocorre o processo de regeneração que tende a se reduzir devido à exaustão do potencial regenerativo, seguido dos repetidos ciclos de degeneração-regeneração (COZZI et al., 2001). Segundo Passerini et al. (2012), nos cães GRMD o aumento do tecido conjuntivo em endomísio 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. Essa alteração foi observada em nosso estudo. Fibras em degeneração também são facilmente visualizadas assim como o acentuado depósito de colágeno como relatado por Gaiad (2006) e evidenciado em nosso estudo.

O Golden Retriever tem-se tornado bastante comum no Brasil, inclusive em canis experimentais, assim, o conhecimento dos parâmetros clínicos, nesta raça é imprescindível para que os mesmos possam ser utilizados como modelo de estudo de doenças, como por exemplo a distrofia muscular.

Nossas células tronco mesenquimais apresentaram expressão positiva para CD44, CD105, CD90 e expressão negativa para marcadores de células de origem hematopoiéticas CD45 e CD34, CD117. Segundo Le Blanc et al. (2005); Dominici et al. (2006); Gang et al. (2007) e Greco et al. (2007) as MSCs são positivas para CD105 e CD90 e moléculas de adesão CD44, CD106, CD29. Nos trabalhos de Conget e Minguell (1999); Pitterger et al. (1999); Yoshimura et al. (2007); Traktuev et al. (2008) e Panetta et al. (2009) foram negativos para marcadores de células hematopoiéticas tais como CD14, CD45 e CD34 e CD117. Corroborando com os estudos de Pittenger e Martin (2004), que demonstraram que a cultura de células MSCs forma negativas para para esses marcadores.

Di Nicola et al. (2002); Krampera et al., (2003); Liu et al. (2004); Xuan, Watson e Meng (2005); Rasmusson (2006); Ucelli, Moretta e Pistoia (2006); Van Laar e Tyndall (2006); Comoli et al. (2007); Djouad, Plence e Bony (2007); Rasmunsson et al. (2007); Martinet et al. (2009); François et al. (2012); Manochantr et al. (2012); Nakajima et al. (2012); Ren et al. (2012) e Freytes et al. (2013) já haviam demonstrado a capacidade imunomoduladora in vitro das MSCs e a capacidade funcional entre as MSCs e células do sistema imune, como linfócitos e macrófagos. Assim como foi observado em nosso estudo, essas células tronco apresentam efeito não apenas nos linfócitos T, mas também em outras células do sistema imune (MEIRELLES et al., 2009). As MSCs podem inibir (CORCIONE et al., 2006) ou promover (TRAGGIAI et al., 2008) proliferação de linfócitos B de acordo com o estímulo, suprimir a proliferação de células natural killer (SOTIROPOULOU et al., 2006) e atuar sobre macrófagos (NÉMETH et al., 2009) e células dendríticas (AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

Os macrófagos são um componente chave da imunidade inata. Eles se diferenciam dos monócitos do sangue periférico após a migração para os tecidos com o intuito de substituir outros macrófagos ou em resposta a lesões (GORDON, 2007). Para investigar a produção de NO por macrófagos, realizamos cultivo de monócitos do sangue periférico durante 7 dias inicialmente sem estímulo. Esses macrófagos correspondem ao estado estacionário de monócitos do sangue periférico (MARTINEZ et al., 2006; KIM; HEMATTI, 2009).

Estudos tem demonstrado que a patofisiologia das distrofias musculares estão correlacionadas com a síntese inadequada de NO (DE PALMA; CLEMENTI, 2012), e que o uso de NO atua no reparo do dano muscular através da sobrevivência, ativação e diferenciação das células satélites (FILIPPI et al., 2009; BUONO et al., 2012).

Os macrófagos apresentam uma resposta bimodal (TROIDL et al., 2009). Inicialmente temos a ativação de macrófagos pró inflamatórios ou também classificados como M1, que atuam na lise muscular, mediante a produção de NO e citocinas como IL-1b, IL-6 e TNF alpha e em um segundo estágio a ativação de macrófagos M2 com ação antiinflamatória (WEHLING et al., 2001; VILLALTA et al., 2009).

Cho et al. (2014)(No prelo)³ comprovaram através de um estudo de cocultivo de MSC com macrófagos em modelo de infarto, a relação entre as MSCs sobre os fenótipos dos macrófagos de camundongos. Nos cocultivos, eles observaram que ocorreu uma resposta inibitória dos M1 e estimulatória para os M2. Adicionalmente eles avaliaram iNOS (que representa o fenótipo de M1) e Arg-1 (que representa o fenótipo de M2), que utilizam a L-arginina como um substrato comum. Conseguiram observar que a expressão de iNOS quando induzido por IFN-gama e LPS, foi marcadamente reduzida, enquanto que a Arg-1 foi fortemente induzida pelo IFN-gama e LPS. Eles observaram que no cocultivo a taxa de NO foi menor do que na cultura apenas com macrófago estimulado, ao contrário dos resultados encontrados em nosso experimento.

³ CHO, D. I.; KIM, M. R.; JEONG, H. Y.; JEONG, M. H. YOON, S. H.; KIM, Y. S.; AHN, Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1-M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. **Experimental & Molecular Medicine**, doi:10.1038/emmm.2013.135, 2014.

Freytes et al. (2013) em um estudo *in vitro* com modelo de infarto, realizou cocultivo de macrófagos com MSC na presença de fatores de polarização como LPS e citocinas específicas para as linhagem de macrófagos M1 e M2, com o intuito de avaliar o comportamento das MSC na presença dessas células imune. Eles observaram que ao ativarem macrófagos M1, desencadeavam a inflamação e criavam um ambiente desfavorável para a proliferação das MSC, ou seja, um ambiente antiinflamatório é mais favorável para a ação das células tronco. Em nosso estudo, utilizamos o LPS como estímulo de ativação para os macrófagos produzirem NO. Desta forma, o estudo citado nos faz inferir que estimulamos a transformação de macrófagos inflamatórios (M1), que podem ter interferido no crescimento das MSC presentes nas placas. De qualquer forma, em nosso estudo, a presença das células tronco e sob o estímulo de LPS, ocorreu um aumento da produção de NO por parte dos macrófagos, o que realmente é esperado pelos macrófagos M1. Essa diferença foi maior quando utilizamos um tempo de 48 horas em cultivo. Comparando com cultivos com e sem MSC na presença de LPS, apesar da diferença na produção de nitrito não ter sido significativa, vale ressaltar que todos os valores de nitrito para o tempo citado acima foram maiores no cocultivo com MSC e LPS, quando comparados na cultura apenas com LPS. Esta informação é muito interessante e nos faz questionar se, utilizar a terapia celular, não poderia promover, juntamente com fatores de estímulos, um aumento na concentração de NO.

Kim e Hematti (2009), realizaram um estudo em humanos através do cocultivo dos macrófagos com as MSCs com o intuito de avaliar a interação entre essas células. Para tanto, cultivaram macrófagos na concentração de $0,5$ a 1×10^6 monócitos oriundos do sangue periférico durante 7 dias. Após, cocultivaram com 2×10^5 MSCs derivadas da medula óssea. Como resultado, observaram que os macrófagos cultivados apresentaram uma alta expressão de M2, e que os mesmos expressavam alto teor de IL-10 e baixo de IL-12. Entretanto, também observaram que os mesmos macrófagos apresentavam expressão considerável de IL-6 e baixo TNF- α . Desta forma, conseguiram demonstrar que as MSCs não apenas atuaram sobre a cultura de macrófagos, mas que esses macrófagos apresentaram um comportamento diferente do que é observado. Esses resultados nos fazem sugerir que, estudos complementares serão necessários no intuito de compreender qual foi o real comportamento dos macrófagos que cocultivamos.

Adicionalmente, Maggini et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência das MSCs na função dos macrófagos através de cocultivo. Assim como em nosso experimento, eles utilizaram varias situações diferentes no cocultivo: só macrófagos, só MSC, macrófago com MSC, macrófago estimulado com LPS, macrófago com MSC estimulados com LPS. Eles observaram que as MSCs suprimiram a produção de citocinas inflamatórias TNF-alpha, IL-6 e interferon-gama enquanto aumentou a produção de IL-10. Desta forma, concluíram que as MSCs modularam os macrófagos com um perfil de baixa produção de citocinas inflamatórias e alta habilidade para atividade fagocítica. A priori, podemos sugerir que nossos resultados diferem dos relatados pela pesquisa citada, visto que o NO é produzido pelo M1, e ocorreu alta produção de IL-10, que ocorre principalmente pelos macrófagos M2.

Ooi et al. (2010) realizaram um estudo com o intuito de avaliar os efeitos modulatórios das MSCs na proliferação das células da microglia BV2, na produção de NO e na expressão de CD40. Para tanto, foi realizado o cocultivo das células ativadas com LPS. Foi observado um efeito antiproliferativo nas BV2 e um aumento na produção de NO. Adicionalmente, a MSC suprimiu significativamente a proliferação da BV2 em cultura com e sem o estímulo do LPS. Eles utilizaram diferentes concentrações de MSC e observaram que isso afetou diretamente a produção de NO, ou seja, quanto maior a concentração de MSC, maior foi a produção de NO. Em nosso estudo, não alteramos a concentração das MSCs, mas na concentração utilizada observamos que os valores médios das concentrações de nitrito foram maiores quando comparados aos demais cocultivos que utilizamos. Assim, nos vale questionar se em maior concentração de MSCs, a produção de NO não teria sido maior.

Vários outros estudos foram realizados com o intuito de promover uma maior liberação de NO em músculos distróficos. Rovere-Querini et al. (2013), em um estudo sobre a interação do NO e da reparação muscular, ressaltou a importância da ação do NO nas fibras musculares de organismos distróficos. Além disso, o NO tem mostrado uma melhora na reparação do músculo danificado através da ativação e diferenciação de células satélites por diferentes vias de sinalização (BUONO et al., 2012). Rigamonti et al. (2013) relata uma melhor resposta de proteção a lesão, através de uma homeostase no músculo de ratos lesionados.

Como a deficiência de NO é um evento patogênico chave em distrofias musculares, o uso de doadores de NO como alternativa terapêutica tem sido explorado em muitas pesquisas. Em 2013, Zordan et al., realizaram um estudo com o uso de uma droga doadora de NO, a molsidomine, que modula efetivamente a resposta inflamatória em *mdx*, proporcionando um maior potencial na cicatrização de tecidos durante a lesão muscular crônica. Este conceito permite inferir que a patofisiologia das distrofias musculares pode estar correlacionada também com a síntese alterada de NO.

Outros grupos de pesquisa tem avaliado a eficácia da terapia baseada na administração de NO em modelo *mdx*. Em 2001, Wehling et al., sugeriram que o NO poderia constituir uma possível e viável abordagem terapêutica através de um estudo realizado em *mdx*, onde conseguiu promover um resgate na função utrofina/distrofina, mostrando que o doador de NO é suficiente para promover efeitos benéficos.

Outra alternativa que vem sendo estudada é o uso de doadores de NO com drogas anti-inflamatórias. A associação de prednisona com doador de NO promoveu melhoras morfológicas e bioquímicas na musculatura de *mdx* (ARCHER; VARGAS; ANDERSON, 2006). O uso de doadores de NO com antiinflamatorios não esteroidais também foi relatado, mostrando efeitos terapêuticos significativos em *mdx*, além de não terem observado efeitos colaterais relevantes ou sinais de toxicidade (WALLACE; VIAPPIANI; BOLLA, 2009). Esses estudos nos direciona a pensar que o estímulo de liberação e ou produção de NO é uma alternativa terapêutica interessante de ser utilizada na distrofia muscular.

É fato que a ação do NO nas respostas inflamatórias tem sido intensivamente investigada devido a sua complexa ação (TRIPATHI; KASHYAP; SINGH, 2007). De acordo com McCafferty et al. (1997), NO derivado da iNOS, pode regular a resposta à injúria pela redução da infiltração de leucócitos. Além disso, Rigamonti et al. (2013) relataram que o NO derivado da iNOS, promove uma homeostase inflamatória na músculo esquelético lesionado.

A liberação de citocinas ocorre principalmente, por células do sistema imune que atuam no processo inflamatório que ocorre durante a injúria muscular (EVANS et al., 2009a). Neste contexto, recebem destaques células como macrófagos e

linfócitos que se infiltram no músculo distrófico (ARAHATA; ENGEL, 1984; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990; SPENCER et al., 2001; WEHLING et al., 2001; EVANS et al., 2009b). Varios estudos tem demonstrado que macrófagos e linfócitos T CD4⁺ são as principais células do sistema imune que se infiltram no músculo ditrófico (ARAHATA; ENGEL, 1988a,b; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990; GOROSPE et al., 1994; CONFALONIERI et al., 2003; PINTO-MARIZ et al., 2010).

A existência de linfócitos T regulatório canino tem sido suposta há muitos anos em estudos de mielopatias progressivas de cães da raça German Sheperd (WAXMAN et al., 1980) e nos estudos de drogas utilizadas em artrites (KAPLAN et al., 1993).

Pinheiro et al. (2010) realizaram um estudo com cães da raça beagles, saudáveis e com idade variando de 12 a 30 meses. Observaram, através da citometria de fluxo, que 4,3% de todos os linfócitos oriundos do sangue periférico foram CD4⁺FoxP3⁺. Em nosso achados, para o sangue periférico, os valores médios que encontramos para cães saudáveis foram de 6,74 % e para cães afetados foi de 4,62%. Apesar dos valores médios para os cães afetados ser menor, não foi observado diferença significativa entre os grupos.

Em nosso estudo nós confirmamos os efeitos estimulatórios das MSCs sobre a proliferação de linfócitos T regulatórios. O grau de estímulo apresentou valores médios maiores significativamente para os cocultivos com maior concentração de MSCs. Esta alteração foi observada para os cães saudáveis e afetados, não havendo diferença significativa entre eles. Quando observamos os resultados obtidos para T auxiliares, também observamos uma proliferação, entretanto em proporção muito menor quando comparado aos linfocitos T regulatórios e não significativa.

Assim, em nosso estudo, comprovamos que os efeitos das MSCs no sistema imune podem não ser sempre supressivos, mas também estimular a proliferação de algumas células. Em 2004, Le Blanck et al. já observaram que baixos números de MSCs podem levar a uma ativação dos linfócitos T, ao passo que, altas quantidades de MSCs podem gerar efeitos opostos.

Zhou et al. (2008) observaram que MSCs oriundas da medula óssea de ratos quando cultivados com linfócitos T CD3⁺ na presença de PHA promoveram um efeito imunossupressivo que pareceu estar relacionado com a geração de linfócitos T

regulatorios e fatores solúveis. Neste estudo, eles utilizaram várias proporções de CD3⁺ e observaram que quanto maior a concentração de MSCs, maior foi proliferação de linfócitos T regulatórios. Quando utilizaram a proporção de 1000 para 1 (CD3⁺ para MSC), notaram um índice de proliferação de 8,3%, enquanto que para a proporção de 2:1 esse índice passou para 22,4%, visto que o valor de T regulatórias para o grupo controle foi em torno de 5%. Em nosso estudo, observamos que na proporção 2,5:1 (linfócitos:MSC) a proliferação foi de 15,51% e 19,67% para os grupos GR e GRMD respectivamente. Já na proporção 1:1, esta proliferação foi significativamente maior, sendo de 29,38 para o grupo GR e 27,42% para o grupos GRMD.

Cipriani et al. (2013), realizaram um estudo em humanos com esclerose múltipla comparado a humanos saudáveis, com intuito de avaliar a habilidade imunomodulatória que as MSCs possuem sobre os linfócitos T regulatórios durante o cocultivo com células mononucleares do sangue periférico. Para tanto, utilizaram a proporção de 1:5 (linfócitos CD4: MSCs) e observaram uma proliferação acentuada de linfócitos T regulatórios na presença das MSCs quando comparado às culturas sem MSCs. Em nossos resultados observamos, na proporção de cocultivo de 5:1 (linfócitos:MSC), uma taxa de proliferação de 15,51% e 19,67% de linfócitos regulatórios para os grupos GR e GRMD respectivamente. Já para a proporção de 1:1, observamos proliferação de 29,38% para grupo GR e 27,42% para o grupo GRMD. Da mesma forma que nosso experimento, não foi observado diferença significativa entre os grupos saudável e doente.

Spencer et al. (2001), em um estudo com *mdx*, afirma que os linfócitos T auxiliares, atuam na progressão da patologia nesse modelo de estudo. Da mesma forma, Pinto-Mariz et al. (2010), em um estudo com DMD, relata que os linfócitos T atuam em nichos no músculo, contribuindo para o dano tecidual e fibrose no músculo destes pacientes. Uma revisão de Evans et al. (2009a) referente as lesões musculares em *mdx* e pacientes DMD descreve que são resultados de mecanismos imuno-mediados que são regulados por sinalizadores inflamatórios.

As MSCs modulam a produção de citocinas pelas células dendríticas e subpopulações de linfócitos T (AGGARWAL; PITTENGER, 2005) e, assim como observado em nosso estudo, aumentam a proporção de linfócitos CD4⁺FoxP3⁺ nas reações linfocíticas (AUGELLO et al., 2007). Estes achados referentes aos linfócitos

T regulatórios, nos permite inferir que estas reações *in vitro* caracterizam as MSCs como imunossupressoras, pois apesar de estimularem a proliferação de linfócitos em nosso estudo, foi observado que os linfócitos que proliferaram foram os T regulatórios, que regulam a resposta inflamatória.

Os linfócitos T regulatórios (CD4⁺FoxP3⁺) são uma subpopulação linfocitária que produz citocinas regulatórias como IL-10 e TGF-beta, com a habilidade de suprimir a proliferação dos linfócitos auxiliares (CD4⁺FoxP3⁻). As células CD4⁺FoxP3⁺ secretam TGF-beta e em experimentos *in vitro*, em combinação com a IL-2 diferenciam linfócitos T em T regulatórios (ITO et al., 2008; CHEN; KONKEL, 2010; SINGER; CAPLAN 2011; GOODMAN; COOPER; MCCORMICK, 2012). Elas possuem um papel indispensável na manutenção da homeostase imune e prevenção de autoimunidade (SAKAGUCHI, 2005; SAKAGUCHI et al., 2010). Com estas afirmações podemos questionar se a proliferação de linfócitos T regulatórios, induzidas pelas MSC durante o cocultivo *in vitro*, não acabou inibindo maior proliferação de linfócitos T auxiliares.

Muitos estudos em humanos comprovam que os CD4⁺FoxP3⁺ possuem alta capacidade de reverter ou bloquear doenças relacionadas ao sistema imune (IIKUNI et al., 2009; BRUSKO; PUTNAM; BLUESTONE, 2008; WRIGHT; STAUSS; EHRENSTEIN, 2011; CIPRIANI et al., 2013; SHIN; PETERSON, 2013). As evidências de que linfócitos T regulatórios podem ser induzidos quando linfócitos T são cocultivados *in vitro* com MSCs (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; MACCARIO et al., 2005; NAUTA; FIBBE, 2007; PREVOSTO et al., 2007; ZHAO et al., 2008; KONG et al., 2009; AKIYAMA et al., 2012; CIPRIANI et al., 2013), sugerem esta interação como uma terapia futura em potencial para doenças relacionadas com o sistema imune, inclusive na distrofia muscular.

Há muitos anos, vários estudos tem demonstrado a acentuada relação do sistema imune com o processo progressivo da distrofia muscular e da ação importante dos linfócitos e macrófagos nesse quadro. (SPENCER et al., 2001; PORTER et al., 2001, 2003; CONFALONIERI et al., 2003; KUMAR; BORIEK, 2003; WEHLING-HENRICKS; LEE; TIDBALL, 2004; CHEN et al., 2005; TIDBALL, 2005; ACHARYYA et al., 2007; VIDAL et al., 2008; EVANS et al., 2009b; PINTO-MARIZ et al., 2010).

A possibilidade de modular a resposta inflamatória é de importância fundamental em doenças degenerativas e crônicas, onde a atividade inflamatória

pode ser mais prejudicial do que benéfica, com o intuito de limitar as ações nocivas de células inflamatórias que agravam os danos.

Todos estes estudos nos fazem pensar que os nossos resultados podem ser favoráveis ao organismo distrófico e nos permite inferir que a terapia com MSC no modelo distrófico possa, através do seu efeito imunomodulador, promover uma melhora no organismo que sofre de um processo inflamatório progressivo e crônico.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que:

- Cães afetados pela distrofia possuem concentração de linfócitos T regulatórios no sangue periférico semelhante à cães normais.
- As MSCs estimulam a linfoproliferação durante cocultivo *in vitro*.
- Quanto maior a concentração de MSCs no cocultivo, maior a linfoproliferação.
- As MSCs estimulam a proliferação de linfócitos T regulatórios (CD4⁺FoxP3⁺) durante cocultivo *in vitro*.
- Quanto maior a concentração de MSCs no cocultivo, maior a proliferação de linfócitos T regulatórios (CD4⁺FoxP3⁺).
- As MSCs estimulam discretamente a proliferação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺FoxP3⁻) durante cocultivo *in vitro* e esta proliferação não diferiu significativamente quando aumentamos a concentração de MSC.
- Cocultivos de MSCs com macrófagos, sem fatores de estímulo (como por exemplo LPS), não produzem aumento na produção de nitrito.
- Cocultivos de MSCs com macrófagos e com LPS, produzem discreto aumento na produção de nitrito quando comparamos com o cultivo de macrófagos com LPS.
- As MSCs possuem capacidade imunomoduladora e interagem, *in vitro*, com macrófagos e linfócitos, promovendo principalmente uma maior proliferação de linfócitos T regulatórios que desempenham um papel importante no controle da resposta inflamatória.

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS

- AANDAHL, E. M.; MICHAELSSON, J.; MORETTO, W. J.; HECHT, F. M.; NIXON, D. F. Human CD4+CD25+regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. **Journal Virology**, v. 78, n. 5, p. 2454–2459, 2004.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 207-234.
- ABREU, D. K. **Padronização do perfil hematológico, bioquímico sérico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**. 2010. 158 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ABREU, D. K.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; ALCÂNTARA, D.; RODRIGUES, E. A. F.; ARAÚJO, K. P. C.; MAIORKA, P. C.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Morphofunctional study in kidneys of Golden Retriever dogs affected by muscular dystrophy (GRMD). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1067-1072, 2012.
- ACHARYYA, S.; VILLALTA, S. A.; BAKKAR, N.; BUPHA-INTR, T.; JANSSEN, P. M.; CARATHERS, M.; LI, Z.W.; 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-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 889–901, 2007.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- AKIYAMA, K.; CHEN, C.; WANG, D.; XU, X.; QU, C.; YAMAZA, T.; CAI, T.; CHEN, W.; SUN, L.; SHI, S. Mesenchymal-stem-cell induced immunoregulation involves FAS-ligand/FAS-mediated T cell apoptosis. **Stem Cell**, v.10, p.544- 549, 2012.
- AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAUJO, K. P.; ZUCCONI, E.; BROPLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in Golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.
- ANDERSSON, J.; BOASSO, A.; NILSSON, J.; ZHANG, R.; SHIRE, N. J.; LINDBACK, S.; SHEARER, G. M.; CHOUGNET, C. A. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. **Journal Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3143–3147, 2005.

APOIL, P. A.; PUISSANT, B.; ROUBINET, F.; ABBAL, M.; MASSIP, P.; BLANCHER, A. FOXP3mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4+ lymphocytes from HIV-positive patients. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 39, n. 4, p. 381-385, 2005.

ARAHATA, K.; ENGEL, A. G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. **Annals of Neurology**, v. 16, p. 193-208, 1984.

ARAHATA, K.; ENGEL, A. G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. **Annals of Neurology**, v. 23, p. 168–173, 1988a.

ARAHATA, K.; ENGEL, A. G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. V: identification and quantitation of T8+ cytotoxic and T8+ sup-pressor cells. **Annals of Neurology**, v. 2, p. 493–499, 1988b.

ARAÚJO, K. **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**. 2009. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ARAÚJO, K. P. C.; BONUCCELLI, G.; DUARTE, C. N.; GAIAD, T. P.; MOREIRA, D. F.; FEDER, D.; BELIZARIO, J. E.; MIGLINO, M. A.; LISANTI, M. P.; AMBROSIO, C. E. Bortezomib (PS-341) Treatment decreases inflammation and partially rescues the expression of the dystrophin-glycoprotein complex in GRMD dogs. **Plos one**, v. 8, n. 4, 2013.

ARCHER, J. D.; VARGAS, C. C.; ANDERSON, J. E. Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. **FASEB Journal**, v. 20, p. 738–740, 2006.

ARNOLD, L.; HENRY, A.; PORON, F.; BABA-AMER, Y.; VAN ROOIJEN, N.; PLONQUER, A.; GHERARDI, R. K.; CHAZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **Journal Experimental Medicine**, v. 204, p. 1057-1069, 2007.

AUGELLO, A.; TASSO, R.; NEGRINI, S. M.; CANCEDDA, R.; PENNESI, G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 56, p. 1175–1186, 2007.

BAROHN, R. J.; LEVINE, E. J.; OLSON, J. O.; MENDELL, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 15-18, 1988.

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. **Archives Neuronal**, v. 62, p. 128-132, 2005.

BERG, Z.; BEFFA, L. R.; COOK, D. P.; CORNELISON, D. D. W. Muscle satellite cells from GRMD dystrophic dogs are not phenotypically distinguishable from wild type satellite cells in ex vivo culture. **Neuromuscular Disorders**, v. 11, p. 282-290, 2011.

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 a Labrador Retriever. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 255-261, 2002.

BERTORINE, T. E.; BHATTACHARYA, S. K.; PALMIERI, G. M. A.; CHESNEY, C. M.; PIFER, D. Muscle calcium and magnesium content in DMD. **Neurology**, v. 132, p. 1088-1092, 1982.

BEYTIA, M. L. A.; VRY, J.; KIRSCHNER, J. Drug treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: available evidence and perspectives. **Acta Myologica**, v. 31, n. 1, p. 4-8, 2012.

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**, n. 401, p. 88-106, 2002. Abstract.

BLUESTONE, J. A.; MACKAY, C. R.; O'SHEA, J. J.; STOCKINGER, B. The functional plasticity of T cell subsets. **National Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 811-816, 2009.

BONILLA, F. A.; BERNSTEIN, I. L.; KHAN, D. A.; BALLAS, Z. K.; CHINEN, J.; FRANK, M. M.; KOBRYNSKI, L. J.; LEVINSON, A. I.; MAZER, B.; NELSON, R. P.; ORANGE, J. S.; ROUTES, J. M.; SHEARER, W. T.; SORENSEN, R. U. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. **Annals Allergy Asthma Immunology**, v. 96, n. 3, p. 504, 2005.

BRACK, A.; RANDO, T. A. A Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 504-514, 2012.
doi10.1016/j.stem.2012.04.001. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193459091200166X>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

BRAZEAU, G. A.; MATHEW, M.; ENTRIKIN, R. K. Serum and organ indices of the mdx dystrophic mouse. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 179-189, 1992.

BRENMAN, J. E.; CHAO, D. S.; XIA, H.; ALDAPE, K.; BREDT, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 82, p. 743-752, 1995.

BRUNELLI, S.; ROVERE-QUERINI, P. The immune system and the repair of skeletal muscle. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 117-121, 2008.

BRUSKO, T. M.; PUTNAM, A. L.; BLUESTONE, J. A. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. **Immunological Reviews**, v. 223, p. 371-390, 2008.

BUONO, R.; VANTAGGIATO, C.; PISA, V.; AZZONI, E.; BASSI, M. T.; BRUNELLI, S.; SCIORATI, C.; CLEMENTI, E. Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP. **Stem Cells**, v. 30, p. 197–209, 2012

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínico de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 368-372.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CAROMANO, F. A. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (DMD). **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 3, p. 211-218, 1999.

CHANG, W. J.; IANNACCONE, S. T.; LAU, K. S.; MASTERS, B. S.; MCCABE, T. J.; MCMILLAN, K.; PADRE, R. C.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G.; STULL, J. T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 93, p. 9142–9147, 1996.

CHAZAUD, B.; SONNET, C.; LAFUSTE, P.; BASSEZ, G.; RIMANIOL, A. C.; PORON, F.; AUTHIER, F. J.; DREYFUS, P. A.; GHERARDI, R. K. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, p. 1133-1143, 2003.

CHEN, W.; KONKEL, J. E. TGF- β and 'adaptive' Foxp3+ regulatory T cells. **Journal Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 30–36, 2010.

CHEN, Y. W.; 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.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contractin injury in dystrophic canine muscle. **Archives of Physical Medicine and 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 and Rehabilitation**, v. 80, p. 175-181, 2001.

CIPRIANI, P.; DI BENEDETTO, P.; LIAKOULI, V.; DEL PAPA, P.; DI PADOVA, M.; DI IANNI, M.; MARRELLI, A.; ALESSEAND, E.; GIACOMELLI, R. Mesenchymal stem cells (MSCs) from scleroderma patients (SSc) preserve their immunomodulatory properties although senescent and normally induce T regulatory cells (Tregs) with a functional phenotype: implications for cellular-based therapy. British Society for Immunology, **Clinical and Experimental Immunology**, v. 173, p. 195–206, 2013.

COHN, B. A.; WOLFF, M. S.; CIRILLO, P.; SHOLTZ, R. I. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. **Environmental Health Perspectives**, v.115, p.1406–1414, 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.

COLLINS, C. A.; OLSEN, I.; ZAMMIT, P. S.; HESLOP, L.; PETRIE, A.; PARTRIDGE, T. A.; AND MORGAN, J. E. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**, v. 122, p. 289–301, 2005.

COMOLI, P.; BASSO, S.; ZECCA, M.; PAGLIARA, D.; BALDANTI, F.; BERNARDO, M. E.; BARBERI, W.; MORETTA, A.; LABIRIO, M.; PAULLI, M.; FURIONE, M.; MACCARIO, R.; LOCATELLI, F. Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. **American Journal Transplantation**, v. 7, n. 6, p. 1648-1655, 2007.

CONFALONIERI, P.; OLIVA, L.; ANDREETTA, F.; LORENZONI, R.; DASSI, P.; MARIANI, E.; MORANDI, L.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MANTEGAZZA, R. Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study, **Journal Neuroimmunology**, v. 142, p. 130–136, 2003.

CONGET, P. A.; MINGUELL, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **Journal Cell Physiology. Supplement**, v. 181, n. 1, p. 67-73, 1999.

COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNNEL, L. M.; SCOTT, M. O.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AAVERY, R. J. The homologue of the Duchenne locus is defective in X- linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 154-156, 1988.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; RISSO, M.; GUALANDI, F.; MANCARDI, G. L.; PISTOIA, V.; UCCELLI, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins**: patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

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. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathology**, v. 101, p. 469-478, 2001.

CZINER, D. G.; LEVIN, R. I. The cardiomyopathy of Duchenne's muscular dystrophy and the function of dystrophin. **Medicine Hypotheses**, v. 40, p. 169-173, 1993.

DE PALMA, C.; CLEMENTI, E. Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. **Molecular Neurobiology**, v. 46, p. 682–692, 2012.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, p. 3838-3843, 2002.

DJOUAD, F.; PLENCE, P.; BONY, C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**, v. 102, p. 3837, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DONG-IM, C.; MI RA, K.; HYE-YUN, J.; HAE, C. J.; MYUNG, H. J.; SUNG, H. Y.; YONG, S. K.; YOUNGKEUN, A. Mesenchymal stem cells reciprocally regulated the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 46, p. 1-9, 2014.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. Review on nitric oxide. **Jornal Brasileiro Patologia Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-349, 2003.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal Haematology**, v. 109, n. 1, p. 235-242, 2000.

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 a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**, v. 345, p. 315–319, 1990.

EVANS, N. P.; MISYAK, S. A.; ROBERTSON, J. L.; BASSAGANYA-RIERA, J.; GRANGE, R. W. Immune mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. **PM&R**, v. 1, p. 755–768, 2009a.

EVANS, N. P.; MISYASK, S. A.; BASSAGANYA-RIERA, J.; GRANGE, R. W. Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. **American Journal Physical Medicine Rehabilitation**, v. 88, n. 6, p. 502–522, 2009b.

FALDYNA, M.; SINKORA, J.; KNOTIGOVA, P.; REHAKOVA, Z.; MORAVKOVA, A.; TOMAN, M. Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 3-4, p.165-176, 2003.

FALLON, J.; REID, S.; KINYAMU, R.; OPOLE, I.; OPOLE, R.; BARATTA, J.; KORC, M.; ENDO, T. L.; DUONG, A.; NGUYEN, G.; KARKEHABADHI, M.; TWARDZIK, D.; PATEL, S.; LOUGHLIN, S. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in adult mammalian brain. **Proceedings National Academy Science**, v. 97, p. 14686-14691, 2000.

FARINI, A.; MEREGALLI, M.; BELICCHI, M.; BATTISTELLI, M.; PAROLINI, D.; D'ANTONA, G.; GAVINA, M.; OTTOBONI, L.; CONSTANTIN, G.; BOTTINELLI, R.; TORRENTE, Y. T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. **Journal of Pathology**, v. 213, p. 229-238, 2007.

FERNANDES, R. A. **Estudo de longo prazo do tratamento farmacológico com multi-fármacos das alterações patofisiológicas do modelo canino de distrofia muscular (GRMD)**. 2012. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STOR-NAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAURILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, p. 1528–1530, 1988.

FILIPPI, G. M.; BRUNETTI, O.; BOTTI, F. M.; PANICHI, R.; ROSCINI, M.; CAMEROTA, F.; CESARI, M.; PETTOROSSO, V. E. Improvement of stance control and muscle performance induced by focal muscle vibration in young-elderly women: a randomized controlled trial. **Archives Physical Medicine Rehabilitation**, v. 90, n. 12, p. 2019-2025, 2009.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Medica Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265-2671, 2000.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 330-336, 2003.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; WILLIAMS, L. M.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. **Immunity**, v. 22, p. 329-341, 2005.

FRANÇOIS, S.; D'ORLANDO, C.; FATONE, T.; TOUVIER, T.; PESSINA, P.; MENEVERI, R.; BRUNELLI, S. Necdin enhances myoblasts survival by facilitating the degradation of the mediator of apoptosis CCAR1/CARP1. **Plos ONE**, v. 7, n. 8, Sec. 1, 2012. e43335. doi:10.1371/journal.pone.0043335. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0043335>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

FREYTES, D. O.; KANG, J. W.; MARCOS-CAMPOS, I.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. **Journal Cell Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 220-229, 2013. doi: 10.1002/jcb.24357.

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.

GANG, E. J.; BOSNAKOVSKI, D.; FIGUEIREDO, C. A.; VISSER, J. W.; PERLINGEIRO, R. C. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. **Blood**, v. 109, p. 1743–1751, 2007.

GATTI, A. **Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GOODMAN, W. A.; COOPER, K. D.; MCCORMICK, T. S. Regulation generation: the suppressive functions of human regulatory T cells. **Critical Reviews Immunology**, v. 32, p. 65–79, 2012.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **European Journal Immunology**, v. 37, p. 9–17, 2007.

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

GÖTHERSTRÖM, C.; RINGDÉN, O.; WESTGREN, M.; TAMMIK, C.; LE BLANC, K. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. **Bone Marrow Transplant**, v. 32, n. 3, p. 265–272, 2003.

GRANDO, A. P.; MARIANA, A. N. B.; MIGLINO, M. A.; STREMAN, F. A.; ZATZ, M.; KANAYAMA, L. M.; FEITOSA, M. L. Y.; MARTINS, D. S.; MORINI, A. C.; SANTOS, J. P. A.; FADEL, L.; ALVES, F. R.; AMBROSIO, C. Ultra-sonografia abdominal e pélvica em cães da raça golden retriever sadios, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 123–128, 2009.

GRECO, S. J.; RAMESHWAR, P. Enhancing effect of IL-1 alpha on neurogenesis from adult human mesenchymal stem cells: implication for inflammatory mediators in regenerative medicine. **Journal Immunology**, v. 179, p. 3342–3350, 2007.

GROH, M. E.; MAITRA, B.; SZEKEL, Y. E.; KOC, O. N. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 928–934, 2005.

GROUND, M. D.; TORRISI, J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **FASEBJ**, v. 18, p. 676–682, 2004.

GUSSONI, E.; PAVLATH, G. K.; MILLER, R. G.; PANZARA, M. A.; POWELL, M.; BLAU, H. M.; STEINMAN, L. Specific T cell receptor gene rearrangements at the site of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 4798–4805, 1994.

HAINSEY, T. A.; SENAPATI, S.; KUHN, D. E.; RAFAEL, J. A. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, n. 4, p. 294-302, 2003.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal Applied Physiology**, v. 91, p. 534–551, 2001.

HAYNESWORTH, S. E.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. **Journal Cell Physiology**, v. 166, n. 3, p. 585-592, 1996.

HICKEY, M. J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. **Clinical Science**, v. 100, p. 1–12, 2001.

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.

HOFFMAN, E. P.; FISCHBECK, K. H.; BROWN, R. H.; JOHNSON, M.; MEDORI, R.; LOIKE, J. D.; HARRIS, J. B.; WATERSTON, R.; BROOKE, M. H.; SPECHT, L.; KUPSKY, W.; CHAMBERLAIN, J. S.; CASKEY, C. T.; SHAPIRO, F.; KUNKEL, L. M. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. **New England Journal Medicine**, v. 318, p. 1363-1368, 1988.

HOGENESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A.; CEDDIA, M.; HAYEK, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 77-85, 2004.

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

ICHIM, T. E.; ALEXANDRESCU, D. T.; SOLANO, F.; LARA, F.; CAMPION, R. D. N.; PARIS, E.; WOODS, E. J.; MURPHY, M. P.; DASANU, C. A.; PATEL, A. N.; MARLEAU, A. M.; LEAL, A.; RIORDAN, N. H. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cellular Immunology**, v. 260, p. 75-82, 2010.

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.; TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v. 6, n. 6, p. 543-553, 2004.

IHKUNI, N.; LOURENÇO, E. V.; HAHN, B. H.; LA CAVA, A. Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. **Journal Immunology**, v. 183, p. 1518–122, 2009.

IN 'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G. M.; CLAAS, F. H.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, p. 1338-1345, 2004.

ITO, T.; HANABUCHI, S.; WANG, Y. H.; PARK, W. R.; ARIMA, K.; BOVER, L. I.; QIN, F. X.; GILLIET, M.; LIU, Y. J. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. **Immunity**, v. 28, p. 870–880, 2008.

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

KAMOGAWA, Y.; BIRO, S.; MAEDA, M.; SETOGUCHI, M.; HIRAKAWA, T.; YOSHIDA H.; TEI, C. Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload in vivo. **Cardiovascular Research**, v. 50, p. 509-515, 2001.

KAPLAN, J. M.; BADGER, A. M.; RUGGIERI, E. V.; SWIFT, B. A.; BUGELSKI, P. J. Effects of SK&F 105685, a novel anti-arthritic agent, on immune function in the dog. **International Journal Immunopharmacology**, v. 15, p. 113–123, 1993.

KELLY, S. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. **Proceedings National Academy Science**, v. 101, p. 11839-11844, 2004.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCONI, E.; FONSECA, S. A. S.; CABRAL, R. M.; MARANDUCA, C. M. C.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 6, p. 35, 2008.

KERR, D. A.; LLADÓ, J.; SHAMLOTT, M. J.; MARAGAKIS, N. J.; IRANI, D. N.; CRAWFORD, T. O.; KRISHNAN, C.; DIKE, S.; GEARHART, J. D.; ROTHSTEIN, J. D. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse diffuse motor neuron injury. **Journal Neuroscience**, v. 23, p. 5131-5140, 2003.

KHARRAZ, Y.; GUERRA, J.; MANN, C. J.; SERRANO, A. L.; MUNÓZ-CÁNOVES, P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators of inflammation*, 2013. doi.org/10.1155/2013/491497. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/491497/>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

KIM, J.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 12, p. 1445-1453, 2009.

KINTER, A.; MCNALLY, J.; RIGGIN, L.; JACKSON, R.; ROBY, G.; FAUCI, A. S. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3390-3395, 2007.

- KLYUSHNENKOVA E.; MOSCA, J. D.; ZERNETKINA, V.; MAJUMDAR, M. K.; BEGGS, K. J.; SIMONETTI, D. W.; DEANS, R. J.; MCINTOSH, K. R. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. **Journal Biomed Science**, v. 12, n. 1, p. 47-57, 2005.
- KONG, Q. F.; SUN, B.; BAI, S. S.; ZHAI, D. X.; WANG, G. Y.; LIU, Y. M.; ZHANG, S. J.; LI, R.; ZHAO, W.; SUN, Y. Y.; LI, N.; WANG, Q.; PENG, H. S.; JIN, L. H.; LI, H. L. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGFbeta. **Journal Neuroimmunology**, v. 207, p. 83–91, 2009.
- 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.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden Retriever dogs. **Muscle Nerve**, v. 8, p. 1042-1052, 1988.
- KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J.; BOGAN, D. J.; VAN CAMP, S. D.; METCALF, J. R.; SCHUELER, R. O. Contraction tension and kinetics of the peroneus longus muscle in golden retriever muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 123, p. 100–107, 1994.
- KRAMPERA, M.; VITALE, A.; VINCENZI, C.; PERBELLINI, O.; GUARINI, A.; ANNINO, L.; TODESCHINI, G.; CAMERA, A.; FABBIANO, F.; FIORITONI, G.; NOBILE, F.; SZYDLO, R.; MANDELLI, F.; FOÀ, R.; PIZZOLO, G. Outcome prediction by immunophenotypic minimal residual disease detection in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal Haematology**, v. 120, n. 1, p. 74-79, 2003.
- KUMAR, A.; BORIEK, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **FASEB Journal**, v. 17, p. 386–396, 2003.
- KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1325-1334, 2010, doi:10.1016/j.intimp.2010.08.012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828640>>. Acesso em: 13 nov. 2013.
- LAMBERT, J. M.; LOPEZ, E. F.; LINDSEY, M. L. Macrophage roles following myocardial infarction. **International Journal Cardiology**, v. 130, p. 147–158, 2008.
- LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, GÖTHERSTRÖM C, HASSAN M, UZUNEL M, RINGDÉN O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-1441, 2004.

LE BLANC, K.; GÖTHERSTRÖM, C.; RINGDÉN, O.; HASSAN, M.; MCMAHON, R.; HORWITZ, E.; ANNEREN, G.; AXELSSON, O.; NUNN, J.; EWALD, U.; NORDÉN-LINDEBERG, S.; JANSSON, M.; DALTON, A.; ASTRÖM, E.; WESTGREN, M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. **Transplantation**, v. 79, n. 11, p. 1607-1614, 2005.

LEFAUCHEUR, J. P.; SEBILLE, A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. **Neuromuscular Disorder** v. 5, n. 6, p. 501-509, 1995.

LEMOLI, R. M.; BERTOLINI, F.; CANCEDDA, R.; DE LUCA, M.; DEL SANTO, A.; FERRARI, G.; FERRARI, S.; MARTINO, G.; MAVILIO, F. AND TURA, S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? **Haematologica**, v. 90, n. 3, p. 360-381, 2005.

LIU, H.; LIU, F. Y.; PENG, Y. M.; YUAN, F.; LIU, Y. H. Inhibition of TGFbeta1 expression in human peritoneal mesothelial cells by pcDU6 vector mediated TGFbeta1 shRNA. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ba**, v. 29, n. 5, p. 552-557, 2004.

MACCARIO, R.; PODESTÀ, M.; MORETT, A. A.; COMET, A. A.; COMOLI, P.; MONTAGNA, D.; DAUDT, L.; IBATICI, A.; PIAGGIO, G.; POZZI, S.; FRASSONI, F.; LOCATELLI, F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. **Haematologica**, v. 90, p. 516–525, 2005.

MAGGINI, J.; MIRKIN, G.; BOGNANNI, I.; HOLMBERG, J.; PIAZZON, I. M.; NEPOMNASCHY, I.; COSTA, H.; CAÑONES, C.; RAIDEN, S.; VERMEULEN, M.; GEFFNER, J. R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9252, 2010.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, v. 2, n. 9, p. 816-822, 2001.

MANOCHANTR, S.; U-PRATYA, Y.; KHEOLAMAI, P.; ROJPHISAN, S.; CHAYOSUMRIT, M.; TANTRAWATPAN, C.; SUPOKAWAJ, A.; ISSARAGRISIL, S. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. **Internal Medicine Journal**, v. 43, n. 4, p. 430-439. 2012

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 14-16, 2007.

MARINARO, M.; MARI, V.; BELLACICCO, A. L.; TARSITANO, E.; ELIA, G.; LOSURDO, M.; REZZA, G.; BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N. Prolonged depletion of circulating CD4+ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs. **Virus Research**, v. 152, p. 73-78, 2010.

MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian Journal of Morphology and Science**, v. 21, p. 145-152, 2004.

MARTINET, L.; FLEURY-CAPPELLESSO, S.; GADELORGE, M.; DIETRICH, G.; BOURIN, P.; FOURNIÉ, J. J.; POUPOT, R. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 752-762, 2009.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression. **Journal Immunology**, v. 177, p. 7303–7311, 2006.

MCCAFFERTY, D. M.; MUDGETT, J. S.; SWAIN, M. G.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1022–1027, 1997.

MCCLOREY, G.; MOULTON, H. M.; IVERSEN, P. L.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. **Gene Therapy**, v. 13, p. 1373-1381, 2006.

MCDOUALL, R. M.; DUNN, M. J.; DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 99, p. 199–217, 1990.

MEIRELLES, L. D. A. S.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor**, v. 20, n. 5, p. 419-427, 2009.

MEIRELLES, L. S.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213. 2006.

MELLO, S. B. V.; LAURINDO, I. M. M. A resposta inflamatória. In: YOSHINARI, N. H.; BONFA, E.S.D.O. **Reumatologia para o clínico**. São Paulo: Roca, 2000.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária – interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995.

MIYATAKE, M.; MIIKE, T.; ZHAO, J.; YOSHIOKA, K.; UCHINO, M.; USUKU, G. Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 93, p.11-17, 1989.

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 American College of Cardiology**, v. 17, n. 3, p. 812-820, 1991.

MUÑOZ-ELIAS, G.; MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. **Journal Neuroscience**, v. 24, p. 4585-4595, 2004.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 908 p.

MUSARO, A.; MCCULLAGH, K.; PAUL, A.; HOUGHTON, L.; DOBROWOLNY, G.; MOLINARO, M.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L.; ROSENTHAL, N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. **Nature Genetics**, v. 27, p. 195-200, 2001.

NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K.; AIKAWA, E.; STANGENBERG, L.; WURDINGER, T.; FIGUEIREDO, J. L.; LIBBY, P.; WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. **Journal Experimental Medicine**, v. 204, p. 3037–3047, 2007.

NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; GUERRERO, A. R.; WATANABE, S.; SUGITA, D.; TAKEURA, N.; YOSHIDA, A.; LONG, G.; WRIGHT, K. T.; JOHNSON, W. E.; BABA, H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. **Journal Neurotrauma**, v. 29, p. 1614-1625, 2012.

NASEF, A.; CHAPEL, A.; MAZURIER, C.; BOUCHET, S.; LOPEZ, M.; MATHIEU, N.; SENSEBÉ, L.; ZHANG, Y.; GORIN, N.C.; THIERRY, D.; FOUILLARD, L. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. **Gene Expression**, v. 13, n. 4-5, p. 217-26, 2007.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499–3506, 2007.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Elsevier, 2006.

NÉMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S.; MAYER, B.; PARMELEE, A.; DOI, K.; ROBEY, P. G.; LEELAHAVANICHKUL, K.; KOLLER, B. H.; BROWN, J. M.; HU, X.; JELINEK, I.; STAR, R. A.; MEZEY, E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 462-469, 2009.

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

NGUYEN, H. X.; TIDBALL, J. G. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use. **The Journal of Physiology**, v. 550, n. 2, p. 347-356, 2003.

NITAHARA-KASAHARA, Y.; HAYASHITA-KINIH, H.; OHSHIMA-HOSOYAMA, S.; OKADA, H.; WADA-MAEDA, M.; NAKAMURA, A.; OKADA, T.; TAKEDA, S. Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne Muscular Dystrophy. **The American Society of Gene & Cell Therapy**, v.20, n.1, p. 168-177, 2012.

NOKAZI, S.; SASAKI, K.; ANDO, M.; KADOTA, K. Natural killer-like T-cell lymphoma in a calf. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 46-51, 2006.

NOLAN, M. A.; JONES, O. D.; PEDERSEN, R. L.; JOHNSTON, H. M. Cardiac assessment in childhood carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorders**, v.13, p.129-132, 2003.

NOWAK, T. V.; IONASESCU, V.; ANURAS, S. Gastrointestinal manifestations of the muscular dystrophies. **Gastroenterology**, v. 82, p. 800-810, 1982.

OOI, Y. Y.; RAMASAMY, R.; RAHMAT, Z.; SUBRAMAIAM, H.; TAN, S. W.; ABDULLAH, M.; ISRAF, D. A.; VIDYADARAN, S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate BV2 microglia responses to lipopolysaccharide. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1532–1540, 2010.

PANETTA, N. J.; GUPTA, D. M.; LONGAKER, M. T. Bone tissue engineering scaffolds of today and tomorrow. **Journal Craniofacial Surgery**, v. 20, n. 5, p. 1531-1532, 2009.

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.

PELLEGRINO, A.; PETRUS, L. C.; PEREIRA, G. G.; SOARES, E. C.; YAMATO, R. J.; FERNANDEZ, E. L.; LARSSON, M. H. M. A. Standardization of echocardiographic parameters of healthy Golden Retriever dogs. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1039-1044, 2007.

PINHEIRO, D.; SINGH, Y.; GRANT, C. R.; APPLETON, R. C.; SACCHINI, F.; WALKER, K. R.; CHADBOURNE, A. H.; PALMER, C. A.; ARMITAGE-CHAN, E.; THOMPSON, I.; WILLIAMSON, L.; CUNNINGHAM, F. GARDEN, O. A. Phenotypic and functional characterization of a CD4(+) CD25(high) FOXP3(high) regulatory T-cell population in the dog. **Immunology**, v. 132, p. 111-122, 2011.

PINTO-MARIZ, F.; CARVALHO, L. R.; MELLO, W.; ARAUJO, A. Q. C.; RIBEIRO, M. G. R.; CUNHA, M. C. S. A. Differential integrin expression by T lymphocytes: Potential role in DMD muscle damage. **Journal of Neuroimmunology**, v. 223, p. 128-130, 2010.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v. 95, n. 1, p. 9-20, 2004.

POLLARD, T. D. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. **Current Opinion Cell Biology**, v. 22, n. 1, p. 50-56, 2010.

PORTER, J. D.; GUO, W.; MERRIAM, A. P.; KHANNA, S.; CHENG, G.; ZHOU, X.; ANDRADE, F. H.; RICHMONDS, C.; KAMINSKI, H. J. Persistent over-expression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in mdx skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 223-235, 2003.

PORTER, J. D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H. J.; RAO, J. S.; MERRIAM, A. P.; RICHMONDS, C. R.; LEAHY, P.; LI, J.; ANDRADE, F. H. Extraocular muscle is defined by a fundamentally distinct gene expression profile. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 12062-1207, 2001.

PREVOSTO, C.; ZANCOLLI, M.; CANEVALI, P.; ZOCCHI, M. R.; POGGI, A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica**, v. 92, p. 881-888, 2007.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2169-2179, 2006.

RASMUSSEN, I.; UHLIN, M.; LE BLANC, K.; LEVITSKY, V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 887-893, 2007.

REIS A. B.; CARNEIRO, C. M.; CARVALHO, M. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 103, n. 3-4, p. 173-185, 2005.

REN, W. L. G.; HUANG, Y.; SU, J.; HAN, Y.; LI, J.; CHEN, X.; CAO, K.; CHEN, Q.; SHOU, P.; ZHANG, L.; YUAN, Z.-R.; ROBERTS, A. L.; SHI, S.; LE, A. D.; SHI, Y. Mesenchymal stem cell: a double-edged sword in regulating immune response. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 9, p. 1505-1513, 2012.

REUTENAUER, J.; DORCHIES, O. M.; PATTHEY-VUADENS, O.; VUAGNIAUX, G.; RUEGG, U. T. Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. **British Journal Pharmacology**, v. 155, n. 4, p. 574-584, 2008.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate-nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide: biology and chemistry**, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

RIGAMONTI, E.; TOUVIER, T.; CLEMENTI, E.; MANFREDI, A. A.; BRUNELLI, S.; ROVERE-QUERINI, P. Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. **Journal Immunology**, v. 190, p. 1767–1777, 2013.

ROMICATELLI, F.; SANTINI, S. A.; CHIERIEI, E.; PITOCCO, D.; TAVAZZI, B.; AMORINI, A. M.; LAZZARINO, G.; DI STASIO, E. Comparison of nitrite-nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal Chromatography B Analytical Technologies Biomedical Life Sciences**, v. 851, p. 257-267, 2007.

ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair: Multiple actions converging on therapeutic efficacy. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 181-185, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.006>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

SAKAGUCHI S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, p. 345–352, 2005.

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; COSTANTINO, C. M.; HAFLER, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 490–500, 2010.

SCHMALBRUCH, H. M. D.; LEWIS, M. B.; CHIR, B. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle and Nerve**, v. 23, n. 4, p. 617–626, 2000.

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

SHIN JH, YUE Y, SRIVASTAVA A, SMITH B, LAI Y, DUAN D. A simplified immune suppression scheme leads to persistent micro-dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy dogs. **Human Gene Therapy**, v. 23, p. 202-209, 2012.

SHIN, J.; TAJRISHI, M. M.; OGURA, Y.; KUMAR, A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 2266–2279, 2013.

SHIN, L.; PETERSON, D. A. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33–42, 2013.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of inflammation. **Annual Review Pathology**, v. 6, p. 457–478, 2011.

SINGH, Y.; GRANT, C. R.; APPLETON, R. C.; SACCHINI, F.; WALKER, K. R. L.; CHADBOURNE, A. H.; PALMER, C. A.; ARMITAGE-CHAN, E.; THOMPSON, I.; WILLIAMSON, L.; CUNNINGHAM, F.; GARDEN, O. Phenotypic and functional characterization of a CD4⁺ CD25^{high} FOXP3^{high} regulatory T-cell population in the dog. **Immunology**, v.132, p. 111–122, 2010.

SOLTER, P. F.; WALTER, E. H.; HUNGERFORD, L. L.; SIEGEL, J. P.; DENIS, S. H.; DORNER, J. L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1738-1742, 1991.

SORICHTER, S.; MAIR, J.; KOLLER, A.; MÜLLER, E.; KREMSER, C.; JUDMAIER, W.; HAID, C.; CALZOLARI, C.; PUSCHENDORF, B. Creatine kinase, myosin heavy chains and magnetic resonance imaging after eccentric exercise. **Journal Sports Science**, v. 9, n. 9, p. 687-91, 2001.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1409-1410, 2006.

SPENCER, M. J.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K.; TIDBALL, J. G. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. **Clinical Immunology**, v. 98, p. 235–243, 2001.

SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? **Neuromuscular Disorders**, v. 1, p. 556–564, 2001.

ST PIERRE, B. A.; TIDBALL, J. G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus reloading after rat hindlimb suspension. **Journal of Applied Physiology**, v.77, p. 290-297, 1994.

SUSSMAN, M. Duchenne muscular dystrophy. **Journal American Orthopaedic Surgeons**, v. 10, p. 138-151, 2002.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nature Immunologic**, v. 9, n. 3, p. 239-44, 2008.

THOR, G.; TERRYBORRY, J. Muscular Dystrophy: recent milestones. **Drug & Market Developmet**, v. 14, n. 4, p. 115-123, 2003.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 17, p. 707-720, 2005.

TIDBALL, J. G. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. **Journal Applied Physiology**, v. 98, n. 5, p.1900-1908, 2005

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparatjve Physiology**, v. 298, p. 1173-1187, 2010.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**: an introduction. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. 147 p.

TRAGGIAI, E.; VOLPI, S.; SCHENA, F.; GATTORNO, M.; FERLITO, F.; MORETTA, L.; MARTINI, A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 562-569, 2008.

TRAKTUEV, D. O.; MERFELD-CLAUSS, S.; LI, J.; KOLONIN, M.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; JOHNSTONE, B. H.; MARCH, K. L. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circulation Research**, v. 102, n. 1, p. 77-85, 2008.

TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 51, p. 443–452, 2007.

TROIDL, C.; MÖLLMANN, H.; NEF, H.; MASSELI, F.; VOSS, S.; SZARDIEN, S.; WILLMER, M.; ROLF, A.; RIXE, J.; TROIDL, K.; KOSTIN, S.; HAMM, C.; ELSÄSSER, A. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. **Journal Cell Molecular Medicine**, v. 13, n. 9, p. 3485–3496, 2009.

UCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 2566–2573, 2006.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C. M.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animals models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, p. 241-248, 2008.

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.; 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, 1990.

VAN LAAR, J. M.; TYNDALL, A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. **Rheumatology**, v. 45, p. 1187–1193, 2006.

VERFAILLIE, C. M.; PERA, M. F.; LANSDORP, P. M. Stem cells: hype and reality. **Hematology American Society Hematology Education Program**, v. 1, p. 369-391, 2002.

VIDAL, B.; SERRANO, A. L.; TJWA, M.; SUELVE, M.; ARDITE, E.; DE MORI, R.; BAEZA-RAJA, B.; MARTINEZ DE LAGRAN, M.; LAFUSTE, P.; RUIZ-BONILLA, V.; JARDI, M.; GHERARDI, R.; CHRISTOV, C.; DIERSEN, M.; CARMELIET, P.; DEGEN, J. L.; DEWERCHIN, M.; MUNOZ- CANOVES, P. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/ alternative macrophage activation pathway. **Genes Development**, v. 22, p. 1747–1752, 2008.

VILLALTA, S. A.; NGUYEN, H. X.; DENG, B.; GOTOH, T.; TIDBALL, J. G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v.18, n. 3, p. 482–496, 2009.

VILLALTA, S. A.; RINALDI, C.; DENG, B.; LIU, G.; FEDOR, B.; TIDBALL, J.G. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 4, p. 790-805, 2011.

WAHL, S. M.; MCCARTNEY-FRANCIS, N.; CHAN, J.; DIONNE, R.; TA, L.; ORENSTEIN, J. M. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? **Cells Tissues Organs**, v. 174, p. 26–33, 2003.

WALLACE, J.L.; VIAPPIANI, S.; BOLLA, M. Cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donors for osteoarthritis. **Trends Pharmacological Science**, v. 30, p. 112–117, 2009.

WANG, Z.; CHAMBERLAIN, J. S.; TAPSCOTT, S. J.; STORB, R. Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. **ILAR News Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 50, n. 2, p. 187-98, 2009.

WANG, H. S.; HUNG, S. C.; PENG, S. T.; HUANG, C. C.; WEI, H. M.; GUO, Y.J.; FU, Y. S.; LAI, M. C.; CHEN, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, p. 1330-1337, 2004.

WAXMAN, F. J.; CLEMMONS, R. M.; HINRICHS, D. J. Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. II. Presence of circulating suppressor cells. **Journal Immunology**, v. 124, p. 1216–1222, 1980.

WEGIENKA, G.; HAVSTAD, S.; ZORATTI, E. M.; WOODCROFT, K. J.; BOBBIT, K. R.; OWNBY, D. R.; JOHNSON, C. C. Regulatory T cells in prenatal blood samples: variability with pet exposure and sensitization. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 81, p. 74-81, 2009.

WEHLING-HENRICKS, M.; LEE, J. J.; TIDBALL, J. G. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 483–490, 2004.

WEHLING-HENRICKS, M.; TIDBALL, J. G. Neuronal nitric oxide synthase-rescue of dystrophin/utrophin double knockout mice does not require nNOS localization to the cell membrane. **PloS One**, v. 6, p. 1-12, 2011.

WEHLING, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **Journal Cell Biology**, v. 155, p. 123–131, 2001.

WRIGHT, G.P.; STAUSS, H.J.; EHRENSTEIN, M.R. Therapeutic potential of Tregs to treat rheumatoid arthritis. **Seminars Immunology**, v. 23, p. 195–201, 2011.

XUAN, W.; WATSON, S. J.; MENG, F. Gene Info Miner - a web server for exploring biomedical literature using batch sequence ID. **Bioinformatics**, v. 21 p. 3452-3453, 2005.

YANG, H. T.; SHIN, J. H.; HAKIM, C. H.; PAN, X.; TERJUNG, R. L.; DUAN, D. Dystrophin deficiency compromises force production of the extensor carpi ulnaris muscle in the canine model of duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.

YOSHIMURA, H.; MUNETA, T.; NIMURA, A.; YOKOYAMA, A.; KOGA, H.; SEKIYA, I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. **Cell Tissue Research**, v. 327, n. 3, p. 449–62, 2007.

ZAPPIA, E.; CASAZZA, S.; PEDEMONTE, E.; BENVENUTO, F.; BONANNI, I.; GERDONI, E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. **Blood**, v.106, p. 1755–1761, 2005.

ZHAO, W.; WANG, Y.; WANG, D.; SUN, B.; WANG, G.; WANG, J.; KONG, Q.; WANG, Q.; PENG, H.; JIN, L.; LI, H. TGF-beta expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. **Cell Immunology**, v. 253, p. 23–30, 2008.

ZHOU, Y.; YAN, W.; HAI-YANG, X.; SHU-SEN Z. Immunossuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Hepatobiliary Pancreat Diseases International**, v. 7, n. 6, p. 608-614, 2008.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-1568, 2008.

ZORDAN, P.; SCIORATI, C.; CAMPANA, L.; COTTONE, L.; CLEMENTI, E. ROVERE QUERINI, P.; BRUNELLI, S. The nitric oxide-donor molsidomine modulates the innate inflammatory response in a mouse model of muscular dystrophy. **European Journal of Pharmacology**, v. 715, p. 296–303, 2013.